



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



ENIR RABELO DA SILVA

Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo *in vitro*.

Ribeirão Preto

2021

ENIR RABELO DA SILVA

Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo *in vitro*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa Dra Regina Guenka Palma Dibb.

Versão Corrigida da dissertação

Ribeirão Preto

2021

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Enir Rabelo

Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2021.

51p. :il. ; 30cm

“A versão corrigida se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa Dra Regina Guenka Palma Dibb.

1. Desmineralização 2. Esmalte decíduos. 3. Própolis 4. Quitosana. 5. Verniz dentário.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva ER. **Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo *in vitro*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria
Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa Dra Regina Guenka Palma Dibb.

Data da defesa : __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

ENIR RABELO DA SILVA

Nascimento: 9 de julho 1971 - Cascalho Rico - MG

Filiação: Agnaldo Mendes Rabelo
Fátima da Silva Rabelo

1993-1998 Curso de Graduação
Universidade de Uberaba - UNIUBE

2007-2008 Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral
Escola de Aperfeiçoamento Profissional - EAP/ABO

2017-2018 Especialização em Gestão de Redes de Atenção à Saúde
Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP/FIOCRUZ

2017-2019 Especialização em Odontopediatria
Universidade de Uberaba-UNIUBE

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo fim”*

Chico Xavier

Dedico este trabalho...

*A **Deus**, pela dádiva da vida, pela família que me deu de presente, por cada pessoa que colocou em meu caminho e por cada desafio que me foi apresentado, me proporcionando oportunidades de crescimento moral e intelectual!*

*Aos meus pais, **Agnaldo Mendes Rabelo e Fátima da Silva Rabelo**, por todo amor, carinho, dedicação, proteção... Obrigada por cada ensinamento, ditado na maioria das vezes não por palavras, mas por exemplos. Exemplos de fé, humildade, caridade, honestidade, respeito, caráter, empatia... Não tenho palavras para agradecer o que sempre fizeram e fazem por mim!*

*Às minhas irmãs, **Edlamar e Elisama** por todo carinho, amizade, e apoio às minhas decisões. Obrigada sempre!*

*Aos meus sobrinhos queridos, **Karen e Henrique**. Vocês são presentes de Deus na minha vida!*

*Ao meu companheiro **Adeilson** por todo incentivo, paciência, cuidado... Obrigada por me motivar e compartilhar comigo essa jornada de experiência e aprendizado!*

Agradecimento especial

*À minha orientadora querida, **Profa Dra Regina Guenka Palma Dibb**, a quem aprendi a chamar carinhosamente e respeitosamente – **Re!** pela confiança, paciência, palavras de otimismo, conselhos, ensinamentos... por cada conhecimento compartilhado. Sua sabedoria aliada ao seu jeito simples de ser cativa as pessoas. Seu comprometimento e dedicação com a pesquisa são exemplos a serem seguidos. Determinada, dedicada à família e ao trabalho... Obrigada por tudo **Re!** Serei eternamente grata por me acolher e me permitir fazer parte deste grupo de pesquisa, do qual muito me orgulho!*

Agradecimentos

Profa Dra Maria Angelica Hueb Menezes de Oliveira, por ter me apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e me incentivado a cursar o Mestrado nesta brilhante instituição.

À Profa Dra Carolina Paes Torres Mantovani, pelas inúmeras vezes que me recebeu em sua sala e me permitiu acompanhá-la em seus atendimentos junto aos pacientes especiais. Incrível quanto carinho e dedicação envolvidos!

Você me inspira a lutar cada vez mais por uma odontologia humanizada.

*À querida amiga, Juliana Jendiroba Faraoni, por todo auxílio e companheirismo no desenvolvimento desta pesquisa, amiga de todas as horas, que não mede esforços para ajudar as pessoas, sempre disposta, com um sorriso no rosto... humilde, educada... Sem palavras para descrever tantas virtudes e para agradecer! Como dizia sua amiga Isaura “Como é bom, no trem da vida, ter alguém no vagão da frente...” E assim segue a **Ju**, conduzindo o vagão da ciência com sabedoria, competência, paciência...*

Servindo a todos que buscam por sua ajuda!

Gratidão amiga!

*Aos meus **amigos de mestrado**, em especial à **Marília Goulardins Gomes**, por todo conhecimento e experiência compartilhados... foi muito bom estar com vocês ao longo desses 24 meses. Vocês são muito especiais!*

Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar! Sucesso a todos!

*Às minhas **amigas do grupo de pesquisa**, em especial à **Isabela Barbosa Quero**, pela amizade e convivência sempre agradável, quer seja no dia a dia do laboratório, quer seja na salinha apertada da Ju onde nos descontraímos, estudamos, trocamos experiências, esclarecemos dúvidas... levarei comigo eternas e boas recordações, além de muito aprendizado. Gratidão a todas!*

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan** e do Vice-Reitor, **Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da Vice-Coordenadora, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, pela condução dos trabalhos junto esta Coordenação sempre zelando pela qualidade dos trabalhos realizados, prova disto é a nota 6 que o Programa possui junto à Capes, um programa com reconhecimento de excelência internacional.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Adelvina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Kranya Victória Diaz Serrano**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula**, pelos conhecimentos compartilhados.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Mary Possani Carmessano** pela acolhida, por todo carinho, atenção... e disponibilidade em ajudar!

Sempre com um sorriso no rosto! Muito obrigada por tudo!

Gratidão amiga!

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo... em especial à **Patricia Marchi** e ao **Carlos Feitosa dos Santos** pela amizade e colaboração para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

RESUMO

Silva ER. Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo *in vitro*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2021.

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia de um verniz experimental de própolis/quitosana para prevenção da progressão das lesões desmineralizadas em esmalte de dentes decíduos. Dentes decíduos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=13): Ausência de Tratamento - Controle (C), Verniz Duraphat (VD) e Verniz Experimental (VE). Os espécimes foram submetidos a um desafio desmineralizante (pH=5/39h), e então submetidos aos tratamentos e retornados à saliva. Após 24h, os espécimes foram submetidos a 7 ciclos de Des/Re (8h, pH=5/16h, pH=7). Foram avaliadas a rugosidade superficial - Sa (baseline, pós-desmineralização e pós-tratamento), o perfil de desgaste, a topografia e a microdureza. Os dados foram submetidos a ANOVA 2 critérios de medidas repetidas, ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). Pode-se observar no desgaste que todos os grupos foram similares entre si tanto na pós-desmineralização ($p = 0,64$), quanto no pós-tratamento ($p = 0,29$). Em relação à rugosidade pós-tratamento, houve diferença entre os grupos ($p < 0,05$), sendo que VD apresentou a superfície mais rugosa ($3,00 \pm 1,51 \mu\text{m}$); C ($1,60 \pm 0,88 \mu\text{m}$) e VE ($1,43 \pm 0,66 \mu\text{m}$) foram estatisticamente semelhantes entre si. Para a variação da dureza, VD ($129,76\% \pm 41,23\%$) apresentou maior valor e superior a área desmineralizada e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) ao C ($83,69\% \pm 17,84\%$) e VE ($98,88\% \pm 35,23\%$), mas nenhum tratamento foi capaz de restabelecer a dureza inicial. Na morfologia pode-se observar uma topografia irregular dos espécimes que se intensificou após o processo de desmineralização, sendo que apenas o controle apresentou microcavidades.

Conclui-se que o verniz experimental não foi capaz de remineralizar o esmalte previamente desmineralizado, porém foi capaz de impedir a continuidade do processo de desmineralização e o verniz fluoretado remineralizou parcialmente o substrato.

Palavras-chave: Desmineralização. Esmalte decíduo. Própolis. Quitosana. Verniz dentário.

ABSTRACT

Silva ER. Efficacy of a propolis/ chitosan varnish in preventing demineralization of primary tooth enamel. an in vitro study. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2021.

The present study evaluated the in vitro efficacy of an experimental propolis/chitosan varnish in preventing enamel demineralization. The primary teeth were divided into 3 groups (n=13). No treatment - Control (C), Duraphat Varnish (VD) and Experimental Varnish (VE). The specimens were submitted to the demineralizing challenge (pH=5.32), and in the sequence submitted to treatments/saliva. After 24h, the specimens were submitted to 7 cycles of Des/Re (8h, pH=5/16h, pH=7). Surface roughness – Sa (baseline, post-desmineralization and post-treatment), wear profile and microhardness. Data were submitted to two-way ANOVA with repeated measures, one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p<0.05$). For the wear profile, the condition post-demineralization ($p=0.64$) was similar to the post-treatment ($p=0.29$) for all groups. Regarding post-treatment roughness, there was a difference among the groups ($p<0.05$); VD presented the roughest surface ($3.00\pm 1.51\mu\text{m}$), and C ($1.60\pm 0.88\mu\text{m}$) and VE ($1.43\pm 0.66\mu\text{m}$) were statistically similar to each other. For the variation of microhardness, VD ($129.76\%\pm 41.23\%$) presented the highest value and was superior to the demineralized area and statistically different ($p<0.05$) from C ($83.69\%\pm 17.84\%$) and VE ($98.88\%\pm 35.23\%$), but the treatment was not able to restore the initial microhardness. In the morphology, an irregular topography of the specimens was observed, which was intensified by the demineralization process, and only the control showed microcavities. It is concluded that the experimental varnish was not able to remineralize the previously demineralized enamel, but it was able to prevent the continuity of the demineralization process and the fluoride varnish partially remineralized the substrate.

Keywords: Demineralization. Deciduous enamel. Propolis. Chitosan. Dental varnish.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	PROPOSIÇÃO	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO A.	46

1. INTRODUÇÃO

A doença cárie apresenta alta prevalência mundial podendo ser considerada um persistente problema de saúde pública (1,2). A doença consiste em uma ação metabólica das bactérias presentes na cavidade bucal, em um ciclo constante de desmineralização e remineralização (Des/Re) determinado por múltiplos fatores, dentre eles o acúmulo de biofilme, que associados podem provocar um desequilíbrio levando à formação da lesão cariosa (3). A cárie dentária é considerada uma disbiose, ou seja, uma doença causada pelo desequilíbrio microbiológico com aumento na proporção de microrganismos altamente cariogênicos, dentre eles os *Streptococcus mutans*, que são os principais associados às lesões de cárie (4). São acidogênicos e acidúricos, ou seja, capazes de produzir ácido e de sobreviver em meio ácido, respectivamente, favorecendo a perda de estrutura dental mineralizada (5), sendo que inicialmente as lesões se manifestam como manchas brancas no esmalte que se não forem tratadas evoluem para a formação de cavidades (6).

Orientações de dieta e de higiene bucal, além do uso de fluoretos, são ações adotadas com o objetivo de deter os agentes multifatoriais causadores da doença (7). Entretanto, apesar de todos os esforços, estes ainda não têm sido suficientes para conter os índices crescentes da doença, permanecendo esta como um importante problema de saúde pública (8), principalmente em pacientes jovens (9). Em certas condições, dada a dificuldade de colaboração de alguns pacientes infantis no consultório odontológico, a aplicação de verniz contendo fluoretos pode ser uma alternativa viável devido a facilidade de aplicação e liberação lenta e gradual na cavidade bucal, estendendo sua ação preventiva por um período mais prolongado sobre a superfície dental (10). O esmalte dentário é um tecido composto por minerais, dentre eles a hidroxiapatita (11). O mecanismo de ação dos fluoretos inclui sua participação nos processos Des/Re (12). As bactérias presentes na cavidade bucal produzem ácidos, a partir da metabolização dos açúcares, que diminuem o pH da saliva. Em um pH inferior ao nível crítico da hidroxiapatita 5,5 ocorre a dissolução de seus cristais com conseqüente desmineralização do esmalte dentário e formação da lesão cariosa. A presença de íons flúor na saliva reduz a dissolução da hidroxiapatita, inibindo o processo. Em um pH acima de 5,5 os íons fluoreto são absorvidos no esmalte, formando a fluorhidroxiapatita favorecendo a remineralização (12).

Contudo, a exposição frequente e em concentrações elevadas de fluoretos pode causar efeitos deletérios aos tecidos mineralizados (13,14) como fluorose dentária (14) e esquelética, dentre outras complicações (15,16) assim, a utilização de produtos com alta concentração de

flúor têm sido objeto de preocupação por se tratar de um elemento neurotóxico químico (17). A fluorose dentária é um defeito de desenvolvimento do esmalte que ocorre durante a amelogênese e sua etiologia está relacionada a fatores sistêmicos, ingestão excessiva de flúor durante a fase de formação da coroa dos dentes permanentes (14). Fluoretos adicionados à água potável e a produtos de higiene bucal são as principais formas de ingestão (14), sobretudo quando utilizado topicamente de forma incorreta e/ou indiscriminada, porém as crianças na atualidade também estão expostas a várias outras fontes, como alimentos e bebidas ultraprocessados que contém flúor em sua composição (18). Ademais, o íon fluoreto liberado durante processos vulcânicos, degradação de minerais, produção de fertilizantes, fungicidas e outros, polui o meio ambiente e pode causar efeitos prejudiciais à saúde humana, sobretudo pela ingestão de águas subterrâneas contaminadas (19).

Buscando a conservação e revitalização dos recursos naturais disponíveis, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque no campo científico, em avanços tecnológicos e atividades econômicas (20). Essa iniciativa está cada vez mais crescente, uma vez que a produção de xenobióticos gera contaminação química do meio ambiente, pela dispersão de agentes tóxicos, que esgotam e contaminam os recursos naturais disponíveis (20). Com isso, a busca pela produção e extração consciente dos produtos brutos, protegendo e preservando os recursos naturais tem despertado interesse da comunidade científica (20).

Desta forma, visando obter produtos com propriedades anti cariogênicas e redução de efeitos adversos para serem utilizados na prática odontológica e prevenção da cárie dentária, novas abordagens têm sido propostas. A inclusão de extratos naturais em produtos de higiene bucal para prevenção da doença cárie vem sendo amplamente estudada por serem ecologicamente sustentáveis, apresentarem segurança, biodisponibilidade e custo relativamente baixo (20,21). A relação entre extratos naturais e a patogênese da cárie, demonstrou estar na redução e adesão de microrganismos sobre a superfície dentária, impedindo a formação do biofilme e conseqüentemente o desenvolvimento de lesões cariosas (22). O emprego de extratos naturais vem sendo extensivamente utilizado para esses fins (23) como o extrato de chá verde e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), que apresentam atividade contra biofilmes cariogênicos (24,25), a folha de oliveira (*Olea europaea*) que inibe a produção de ácido e adesão de microrganismos (26), o própolis que apresenta efetividade na prevenção da cárie dentária (27–29), dentre outros (21,22).

O própolis é um produto natural resinoso produzido pelas abelhas a partir de exsudatos extraídos das plantas (30) sendo utilizado como um agente protetor formando uma camada seladora contra a água e agressões externas e conservando o meio interno livre de agentes

patogênicos e em temperatura ideal (30). A composição química do própolis é bastante complexa incluindo 50 a 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias de acordo com a biodiversidade da vegetação, a espécie de abelha e a estação do ano em que o própolis é coletado (31). Flavonóides, fenólicos e aromáticos são componentes ativos do própolis sendo responsáveis por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anestésicas e citotóxicas (32).

A ação antimicrobiana do própolis sobre os *Streptococcus mutans* foi demonstrada tanto em crianças de baixo risco à cárie quanto naquelas de alto risco, evitando o surgimento de novas lesões em superfícies lisas (33). Enxaguatórios bucais contendo própolis demonstraram efetividade sobre diferentes microrganismos presentes na cavidade bucal (34).

Recentemente, foi demonstrado o potencial de um verniz contendo própolis, miswak e quitosana na prevenção da cárie dentária retardando a desmineralização do esmalte dental (35) e a atividade contra bactérias cariogênicas, adesão à superfície dentária e liberação sustentada, de um verniz formulado a partir de diferentes concentrações de própolis adicionado à quitosana (36).

A quitosana é um biopolímero produzido por meio da quitina, um polissacarídeo natural encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos, através de um processo de alcalinização que possui propriedades como biocompatibilidade inata, biodegradabilidade e ausência de toxicidade (37). Apresenta ainda atividades mucoadesivas e antimicrobianas (38,39) dentre outras, sendo utilizada sozinha ou misturada a outros polímeros naturais (35,36). Estudos relataram o efeito da quitosana contra a adesão inicial de *Streptococcus mutans* e a formação primária de biofilme, além da interrupção significativa de biofilme maduro (40,41).

As nanopartículas (NPs) em Odontologia, que são partículas de 1 a 100 nm, têm sido utilizadas em terapias antibacterianas e possuem propriedades especiais derivadas de sua elevada proporção entre área superficial e volume (42,43). Dois métodos são usados em relação à cárie dentária, um deles a partir da incorporação de NPs inorgânicas em materiais dentários visando reduzir o biofilme de microrganismos com contato direto (44,45) e o outro envolve o uso de NPs orgânicas atuando sobre o processo de desmineralização, dentre elas a quitosana (36).

Considerando que a literatura já demonstrou os benefícios antimicrobianos de um verniz dentário, potencializado pelo sinergismo entre o própolis e a quitosana (36,46) e que o desempenho anticariogênico de um material depende tanto da inibição do crescimento bacteriano quanto da inibição do processo de desmineralização (47), se faz necessário verificar se verniz experimental a base de própolis/quitosana possui efeito nas estruturas mineralizadas

durante a simulação de um processo de cárie.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um verniz de própolis/quitosana experimental para prevenção da progressão das lesões desmineralizadas em esmalte de dentes decíduos na simulação do processo de cárie.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a eficácia de um verniz experimental à base de própolis/quitosana para prevenir a progressão de lesões desmineralizadas em esmalte de dentes decíduos após simulação do processo carioso, por meio da análise da microdureza, rugosidade superficial, perfil de desgaste e análise morfológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos

O presente estudo foi inicialmente submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, processo nº4.253.830, recebendo parecer favorável (Anexo A).

Delineamento Experimental

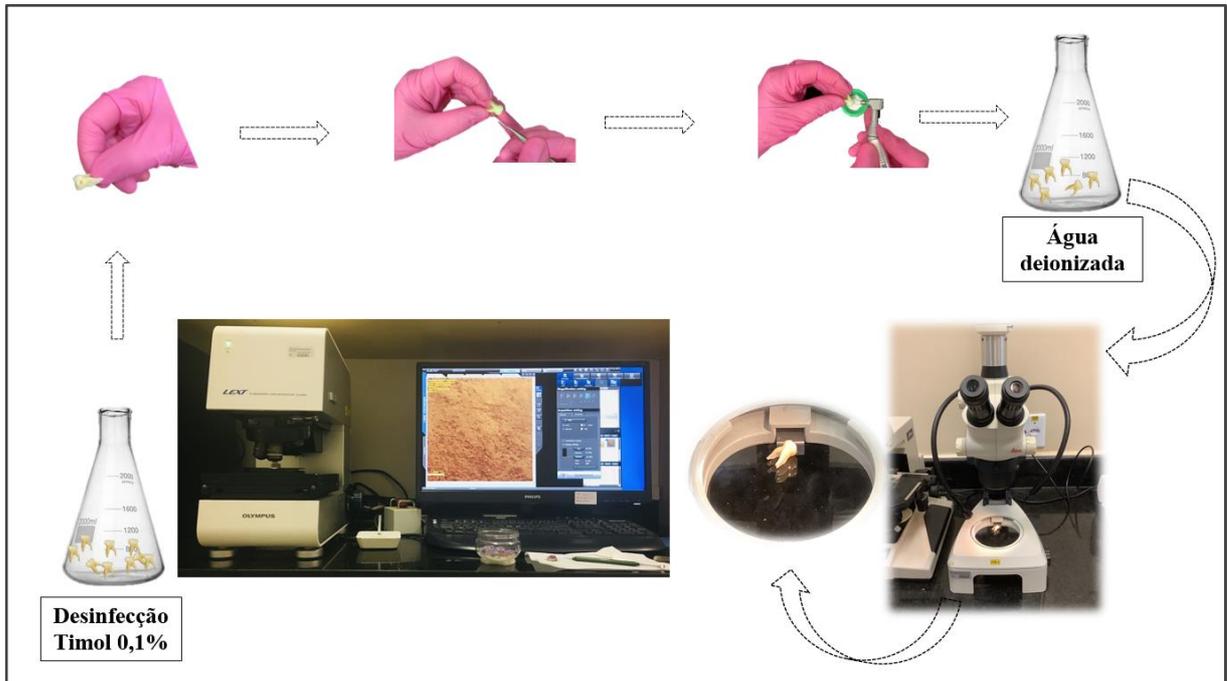
O experimento consistiu em um estudo *in vitro*, fatorial, cujo fator de estudo foi o tratamento em 3 níveis: ausência de tratamento – Controle (C), Verniz Experimental (VE) e Verniz Duraphat (VD). As unidades experimentais foram 39 fragmentos de esmalte de molares decíduos humanos, divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=13).

O estudo foi realizado de acordo com um delineamento em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram a rugosidade superficial (baseline, pós-desmineralização e pós-tratamento) e o perfil de desgaste em microscopia confocal de escaneamento a laser – MCEL (Olympus LEXT OLS4100®) e a microdureza knoop do esmalte. Qualitativamente, foram realizadas análises morfológicas da superfície em MCEL.

Seleção das Amostras

Foram selecionados molares decíduos humanos, extraídos por razões não relacionadas a esta pesquisa ou esfoliados, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP). A desinfecção foi realizada com solução de timol a 0,1%, na qual ficaram imersos durante uma semana. Então, os dentes foram limpos com curetas periodontais e pedra-pomes e água com o auxílio de escova Robinson, montada em um contra-ângulo, em baixa rotação, lavados e mantidos em água deionizada durante todo o período de preparação dos espécimes, sendo a mesma trocada diariamente. Em seguida, foram examinados em lupa estereomicroscópio (Leica S6 D) e MCEL com o intuito de detectar alterações estruturais que pudessem comprometer os resultados do estudo. Dentes com presença de trincas, extensas rachaduras, lesões de cárie ou manchas brancas foram descartados. A representação esquemática da metodologia utilizada na seleção dos espécimes está exemplificada na figura 1.

Figura 1. Fluxograma da metodologia para seleção dos espécimes.



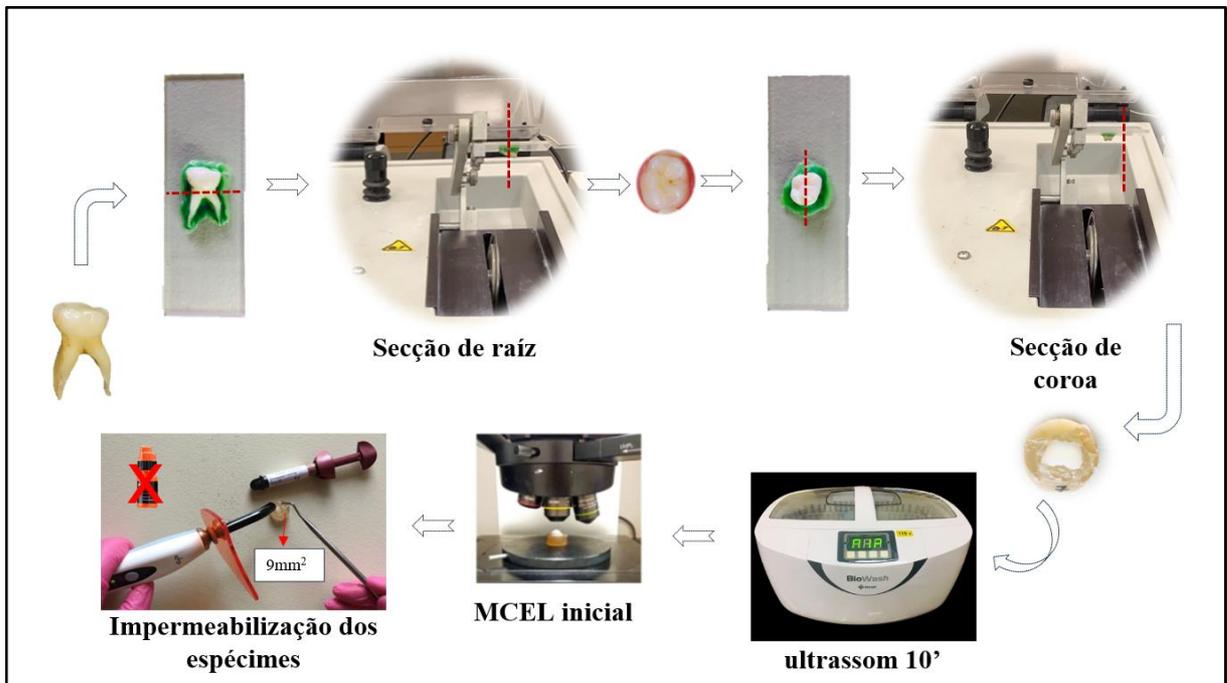
Fonte: da Silva, E.R. 2021

Preparo dos Espécimes

Os espécimes foram fixados com cera em placas de acrílico e as raízes dentais, quando presentes, foram seccionadas com disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brasil) sob refrigeração à água, acoplado em uma máquina de corte (IsoMet 1000, Precision saw, Buehler) 1 mm abaixo da junção amelo-cementária. Em seguida, as coroas foram fixadas com cera em suportes de acrílico e divididas em 2 partes no sentido méso-distal. Os espécimes foram imersos em água deionizada sob ação do ultrassom ((BioWash, Bio-art) por 10 minutos para lavagem e remoção de resíduos, fixados em blocos de resina acrílica e realizadas imagens iniciais em MCEL.

Para a simulação da cárie, os espécimes foram impermeabilizados com resina composta, sem aplicação do sistema adesivo, com exceção de uma área na superfície mais plana do esmalte, selecionada com auxílio de um paralelômetro, de 3x3 mm (9 mm²) a qual ficou exposta à desmineralização inicial. A impermeabilização foi efetuada com o intuito de proteger, durante o processo inicial e a ciclagem de pH, as áreas que posteriormente foram utilizadas como referência de esmalte hígido, área controle. A representação esquemática da metodologia utilizada no preparo dos espécimes está exemplificada na figura 2.

Figura 2. Fluxograma da metodologia para preparo dos espécimes.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Desmineralização Inicial/Formação da Lesão

Inicialmente, cada espécime foi exposto a uma solução desmineralizante [pH 5,0 – contendo 1,28 mM cálcio, 0,74 mM fosfato, 0,03 µg flúor/mL] por 39 horas (2ml/mm²), modificado de Queiroz *et al*, 2008 (48). Após este período, os espécimes foram lavados em água deionizada e foram realizadas imagens da área desmineralizada em MCEL. A representação esquemática da metodologia utilizada para a desmineralização inicial está exemplificada na figura 3.

Figura 3. Fluxograma da metodologia para desmineralização inicial dos espécimes.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Tratamento dos Espécimes

Metade da área exposta à desmineralização foi impermeabilizada com resina composta sem aplicação do sistema adesivo, 1,5 x 3 mm (4,5 mm²), que posteriormente foi utilizada como referência da área desmineralizada. A outra metade do espécime recebeu a aplicação do tratamento.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=13), de acordo com os tratamentos descritos na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais quanto aos tratamentos empregados.

Grupo	Tratamento	Composição
C	Controle/ nenhum tratamento	-----
VD	Verniz de fluoreto de sódio a 5% (Duraphat [®] - Colgate)	22.600ppm (NaF 5%) -1mL/50mg NaF, Colofônia, álcool etílico, goma-laca, mástica, sacarina, aroma, cera branca de abelha.
VE	Verniz Experimental (Própolis/ Quitosana)	Quitosana (Sigma-Aldrich) Extrato de Própolis Verde (Apis Flora) Outros ingredientes

A aplicação dos tratamentos foi realizada conforme o protocolo:

C - Controle/ sem tratamento – Não foi aplicado nenhum tratamento (armazenamento em saliva artificial);

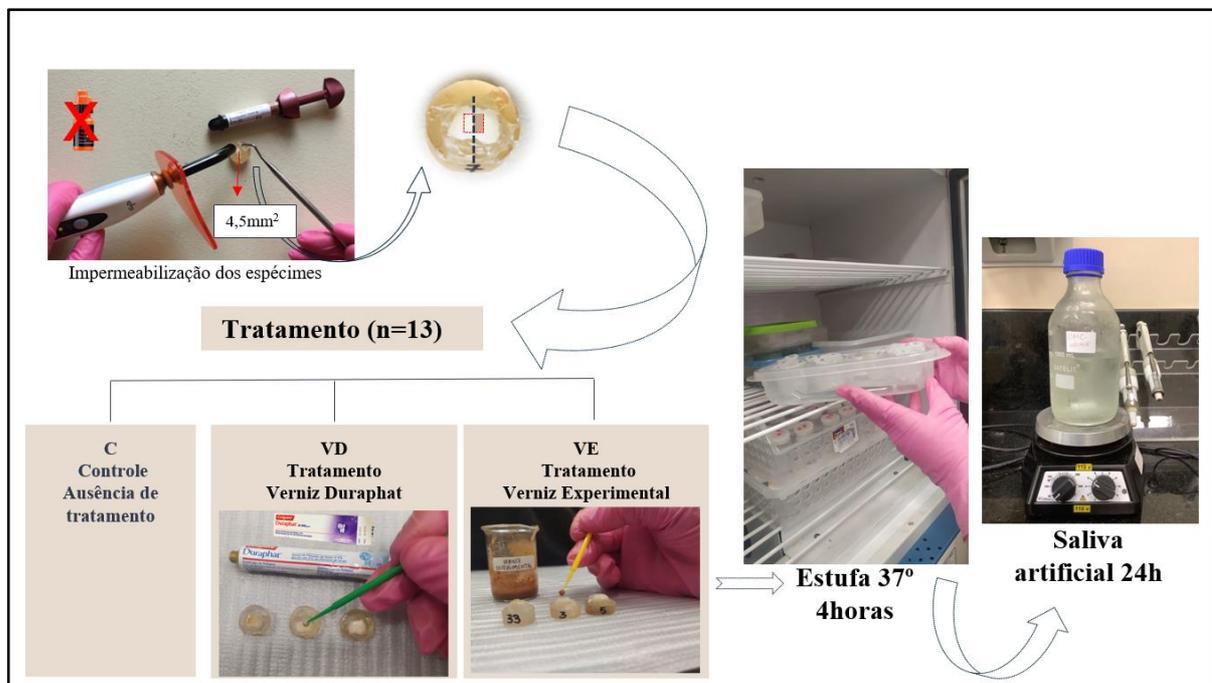
VD - Verniz Duraphat[®] – O espécime foi seco e então o verniz foi aplicado com microbrush ativamente por 10s, permanecendo sobre a superfície do espécime por 4 hs. Após esse período, o verniz foi cuidadosamente removido com gaze umedecida em água deionizada;

VE - Verniz Experimental – O espécime foi seco e então o verniz foi aplicado com microbrush ativamente por 10 s, permanecendo sobre a superfície do espécime por 4 horas. Após esse período, o verniz foi cuidadosamente removido com gaze umedecida em água deionizada.

Durante as 4 horas de tratamento, tempo padronizado a partir de experimentos anteriores, os espécimes foram mantidos em umidade relativa de 100% em estufa a 37° C.

Ao final do tratamento, os espécimes foram acondicionados em saliva artificial em estufa a 37° C por 24 horas. A representação esquemática da metodologia utilizada na aplicação dos tratamentos está exemplificada na figura 4.

Figura 4. Fluxograma da metodologia dos tratamentos aplicados.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Ciclagem de pH

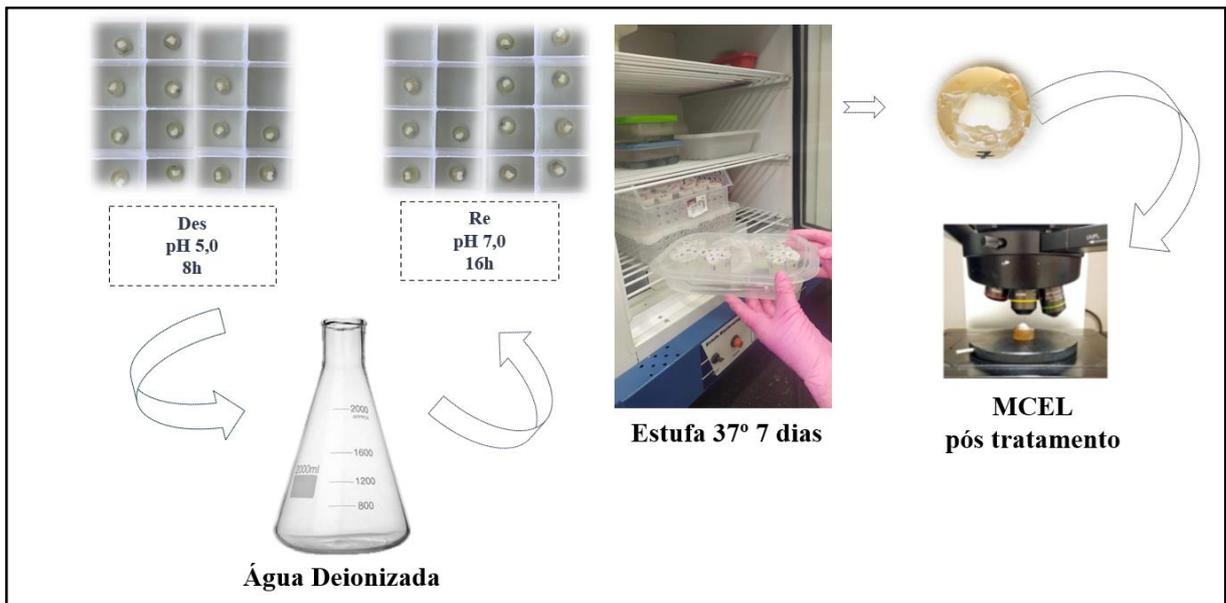
Para a ciclagem de pH, foi utilizada uma solução desmineralizante (Des) de mesma composição da solução inicial de 39 horas e solução remineralizante (Re) (pH 7,0 constituída de 1,5 mM cálcio, 0,9 mM fósforo, 150 mM cloreto de potássio, 0,05 µg Flúor/mL, 0.1 M Tris buffer), modificado de Queiroz *et al*, 2008 (48).

As amostras foram submetidas à ciclagem de pH durante 7 dias. Os espécimes foram mantidos por 8 horas em solução Des e 16 horas em solução Re. Entre as mudanças dos espécimes de uma solução para a outra, os mesmos foram lavados com água deionizada e secos com papel absorvente. A proporção do volume das soluções por área de blocos foi de 6,25 mL/mm² (28,13 mL) para Des e 3,12 mL/mm² (14 mL) para Re. Após 4 dias do início da ciclagem a solução foi substituída por outra de igual composição,

se mantendo nesta até o final da ciclagem.

Durante todo o experimento, os espécimes foram mantidos em estufa, a uma temperatura constante de 37° C. Ao final da ciclagem a resina composta foi removida expondo todas as áreas e os espécimes foram lavadas com água deionizada, secos com papel absorvente e armazenados em saliva artificial. Foram realizadas capturas das imagens pós-tratamentos de todas as áreas experimentais e também das interfaces em MCEL. A representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH está exemplificada na figura 5.

Figura 5. Fluxograma da metodologia utilizada na ciclagem de pH.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Análise Superficial

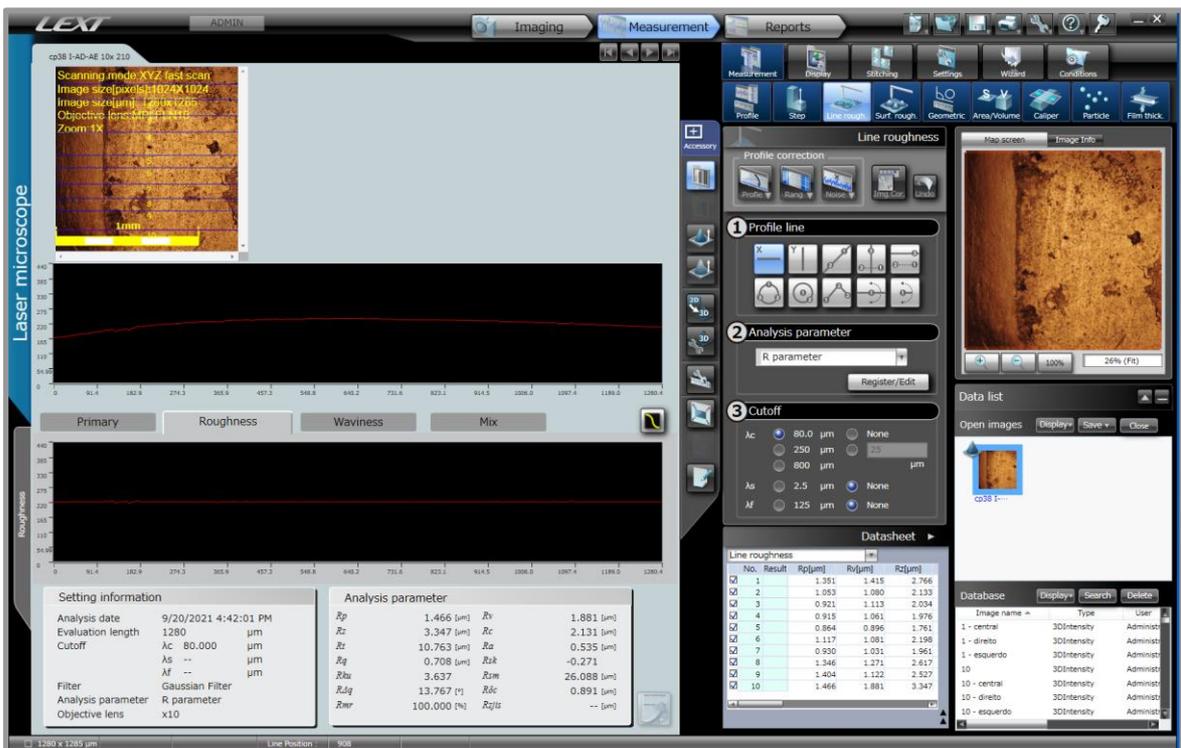
As análises da superfície das amostras foram realizadas por meio de MCEL através de imagens das áreas mais representativas de cada corpo de prova nos diferentes tempos do experimento. Para análise de cada amostra, os blocos de acrílico contendo os espécimes foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio e realizadas capturas das imagens em aumento de 216x e 2160x (objetiva de 10x e 100x, respectivamente).

Para análise da morfologia superficial foram utilizadas as imagens em aumento de 2160x, explorando as áreas controle, desmineralizada e experimental-tratada do mesmo corpo de prova. A avaliação das imagens obtidas permite a observação da presença e exposição dos prismas de esmalte, bem como de regiões inter prismáticas.

A rugosidade superficial dos espécimes foi realizada nas imagens em aumento de 216x, realizando as leituras nas áreas controle, desmineralizada e experimental-tratada, comparando os valores de cada tempo do experimento, inicial, lesão de mancha branca e pós tratamento.

Quanto à análise do perfil de desgaste, a captação das imagens foi realizada após a remoção de toda a resina na superfície do esmalte, com exposição de todas as áreas. As imagens foram adquiridas em aumento de 216x (objetiva de 10x) analisando as interfaces área controle (AC)/área desmineralizada (AD) e área controle (AC)/área experimental (AE) dos 3 grupos de tratamento (C, VD e VE). Após selecionar a área mais representativa do espécime, foi realizada a aquisição da imagem, com atenção para que a parte correspondente à área desmineralizada fosse sempre selecionada a fim de que a mesma pudesse ser referência na realização do perfil. Foram realizadas 10 leituras/imagem (por meio de um software específico (Olympus LEXT OLS4100[®]) englobando tanto AC/AD como AC/AE, os dados foram obtidos em micrômetros (figura 6). Para análise dos dados foi utilizada a média das dez leituras.

Figura 6. Imagem obtida do software LEXT OLS4100[®] demonstrando as 10 mensurações do perfil de desgaste.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Microdureza Longitudinal

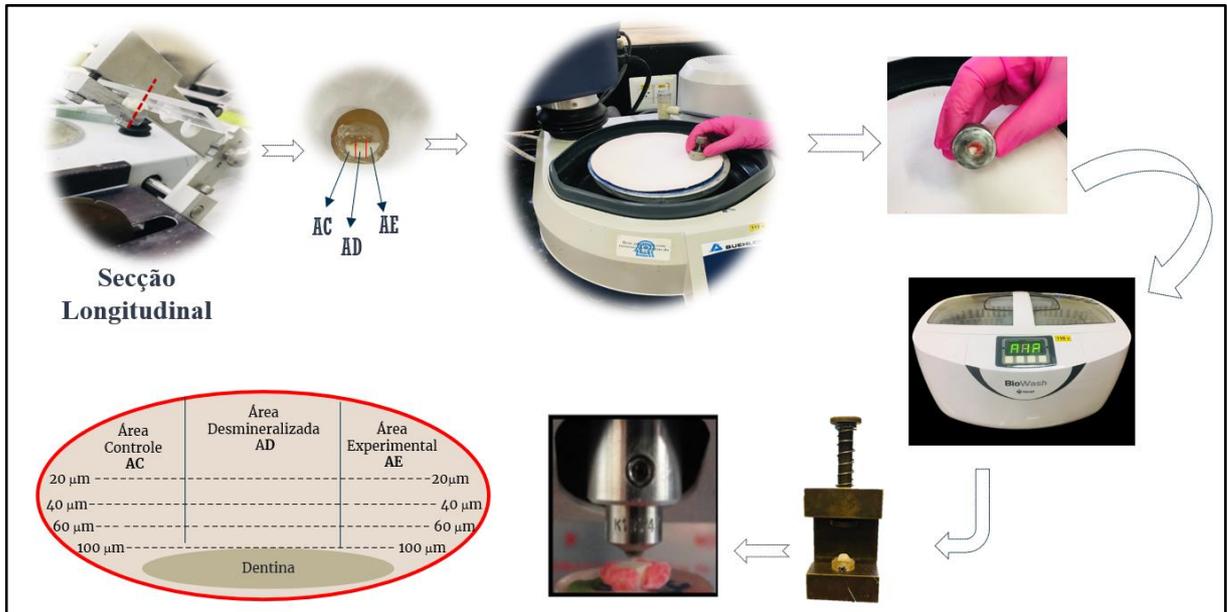
Após a realização dos tratamentos/ciclagem e análise em MCEL, os espécimes foram incluídos em resina de poliéster e seccionados ao meio longitudinalmente, com disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brasil) sob refrigeração à água, acoplado em uma máquina de corte (IsoMet 1000, Precision saw, Buehler) para análise da microdureza longitudinal. O corte foi realizado de modo que em cada secção houvesse as áreas AC, AD e AE.

As secções foram preparadas através de procedimentos de planificação e polimento com lixa d'água de granulação #600 e #1200 e disco de feltro (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) com suspensão de alumina 0,3 e 0,05 µm (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Todo o processo de planificação e polimento foi realizado em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil), sendo em seguida limpos em ultrassom (BioWash, Bio-art) e água deionizada por 10 minutos.

Os espécimes foram fixados com cera pegajosa (Cera Rosa 7, Polidental Indústria e Comércio Ltda., São Paulo – SP, Brasil) a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos-SP, Brasil), deixando a superfície a ser analisada paralela à placa. Para analisar a microdureza dos espécimes foi utilizado o Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2.000 (Shimadzu Corporation – Kyoto-Japan) com penetrador diamantado tipo Knoop, com carga estática de 25 gramas força de peso por 10 segundos, de maneira que a ponta do indentador se mantivesse perpendicular à superfície do espécime. As áreas analisadas foram AC, AD e AE.

As penetrações foram realizadas em cada área na região de subsuperfície da lesão formada. A primeira marcação foi localizada a 20 µm abaixo da superfície e as marcações seguintes a 40, 60 e 100 µm, fazendo-se uma varredura em cada área, sendo realizadas 12 medidas por área, totalizando 36 indentações em cada espécime. As medidas foram feitas em todas as áreas para avaliar a variação da dureza de cada espécime. Foi realizada a média de cada área e então realizou-se o cálculo da variação da dureza em percentual ($VD(\%) = (AE * 100) / AD$ ou AC). A representação esquemática da metodologia utilizada na análise da microdureza longitudinal está exemplificada na figura 7.

Figura 7. Fluxograma da metodologia utilizada na análise da microdureza longitudinal.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Análise dos dados

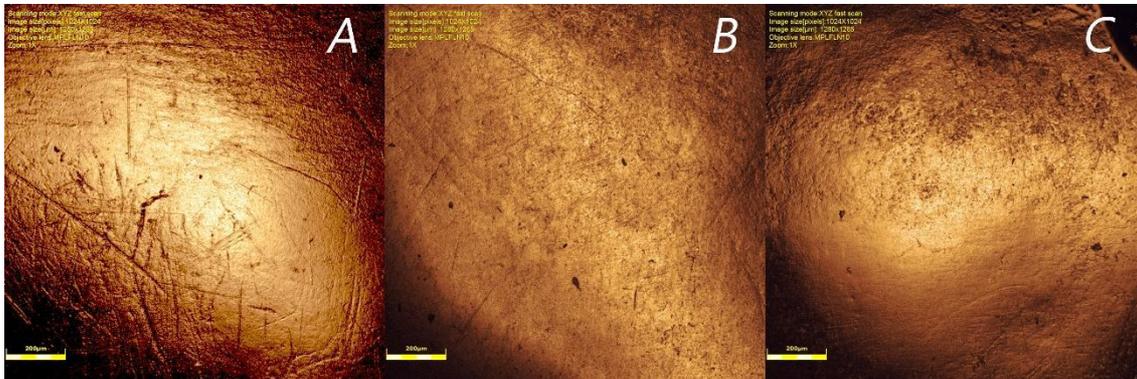
Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados por meio do teste ANOVA 2 critérios de medidas repetidas para avaliação da rugosidade superficial (baseline, pós-desmineralização e pós-tratamento) e pelo teste ANOVA para as análises de microdureza e perfil de desgaste, seguidos do teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). A análise morfológica foi realizada qualitativamente por meio de imagens obtidas no MCEL.

4. RESULTADOS

Análise Morfológica

Após a análise bi e tridimensional da superfície do esmalte de todos os espécimes, no decorrer do estudo, foi possível observar que nas imagens realizadas inicialmente, antes de qualquer intervenção, na quase totalidade dos espécimes observou-se uma superfície amorfa, aprismática com presença de pequenas irregularidades, haja visto as superfícies não terem sido polidas (figura 8).

Figura 8. Imagem da superfície de esmalte inicialmente, antes da formação da lesão de mancha branca e ciclagem de pH.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

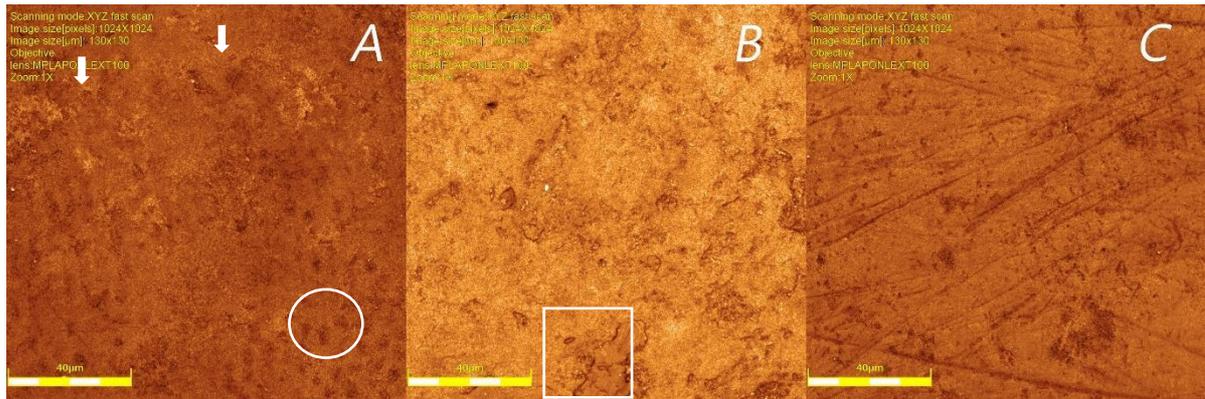
Após o processo de desmineralização por 39 horas foi possível observar que houve exposição parcial dos prismas de esmalte, com formação de pequenas cavidades, e visualmente observou-se discreta lesão de mancha branca, sendo mais evidente à secagem. Apesar da padronização dos espécimes observou-se que em alguns o processo de desmineralização foi um pouco mais intenso, apresentando áreas de maior extensão de exposição dos prismas e com formação de cavidades mais volumosas.

Ao final do tratamento/ciclagem dos espécimes, pode-se observar que o Grupo C (controle) apresentou prismas de esmalte expostos, irregularidades mais evidentes, e áreas amorfas, haja visto a ausência de tratamento neste grupo e conseqüentemente continuação do processo de desmineralização (figura 9A).

No grupo VD (verniz duraphat), observou-se uma superfície amorfa com presença de irregularidades e pequenas áreas de material depositado, sugestivas de retenção do material, entre áreas homogêneas (figura 9B).

Para o grupo de VE (verniz experimental) observou-se presença de áreas homogêneas, sem grandes irregularidades, apenas pequenos riscos superficiais provavelmente devido ao movimento de aplicação do microbrush na superfície. (figura 9C).

Figura 9. Superfície do esmalte ao final da ciclagem de pH (2160 x). A: Grupo C – observa-se os prismas expostos (círculo), irregularidade superficial e pequenas cavidades (seta); B: Grupo VD – observa-se superfície amorfa, irregular com áreas de deposição de material (quadrado); C. Grupo VE – observa-se superfície amorfa sem grandes irregularidades.



Fonte: da Silva, E.R. 2021

Rugosidade superficial

Na análise dos dados observou-se que em 2 momentos, rugosidade inicial e pós-desmineralização, os 3 grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes entre si. Com relação à rugosidade pós-tratamento, houve diferença entre os grupos ($p < 0,05$), sendo que VD apresentou a superfície mais rugosa ($3,00 \pm 1,51 \mu\text{m}$) e significativa em relação aos demais grupos e ambos, C ($1,60 \pm 0,88 \mu\text{m}$) e VE ($1,43 \pm 0,66 \mu\text{m}$), foram estatisticamente semelhantes entre si, conforme demonstrado na tabela 2. Na comparação dos tempos dentro do grupo, observou que os grupos C e VE apresentaram uma diminuição da rugosidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao final da ciclagem de pH, e diferentemente o VD apresentou semelhança na rugosidade inicial e final ($p > 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos grupos nos diferentes tempos do experimento para rugosidade (μm).

	C	VD	VE
Sa Inicial	3,04 \pm 0,76 Aa	3,28 \pm 0,67 Aa	3,17 \pm 0,82 Aa
Sa pós DES	1,07 \pm 0,33 Ba	1,52 \pm 0,74 Ba	1,22 \pm 0,40 Ba
Sa final	1,60 \pm 0,88 Bb	3,00 \pm 1,51 Aa	1,43 \pm 0,66 Bb

*Mesma letra similaridade estatística - Letras maiúsculas – comparação na coluna. Letras minúsculas – comparação na linha.

Perfil de desgaste

Na análise dos dados, observou-se que em relação ao desgaste não houve diferença significativa entre os 3 grupos de tratamento pós-desmineralização ($p=0,63582$) demonstrando que todos os grupos iniciaram com o mesmo padrão. O mesmo comportamento foi observado após o pós-tratamento onde não se observou diferença estatística ($p=0,28518$) entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão do perfil de desgaste dos grupos nas diferentes regiões analisadas (μm).

Grupo	Região	
	AC/AD	AC/AE
C- Controle	3,96 \pm 1,23a	7,24 \pm 1,98A
VD -Duraphat	3,93 \pm 1,27a	8,36 \pm 1,87A
VE- Experimental	4,35 \pm 1,27a	7,47 \pm 1,76A

*Comparação na coluna – mesma letra similaridade estatística

Microdureza Longitudinal

Na análise dos dados observou-se que o verniz Duraphat-VD (129,76% \pm 41,23%) apresentou a maior porcentagem de variação de dureza da área tratada em relação à área desmineralizada, sendo estatisticamente diferente ($p<0,05$) do controle-C (83,69% \pm 17,84%) e do verniz experimental-VE (98,88% \pm 35,23%). Sendo que o C, no qual não se realizou nenhum tratamento, foi o que apresentou uma menor variação de

dureza. Em relação à área tratada e a área controle, VD também mostrou a maior porcentagem de variação de dureza ($63,67\% \pm 10,41\%$), sendo também estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do C ($51,03\% \pm 16,10\%$) e VE ($51,40\% \pm 16,10\%$). Os dados mostram que nenhum dos tratamentos realizados foram capazes de restabelecer a dureza inicial apresentada pelo esmalte hígido (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual (%) de variação da dureza para os diferentes grupos estudados e nas áreas analisadas.

Grupo	% variação da dureza	
	AD/AE	AC/AE
C - Controle	83,69±17,84 B	51,03±16,10 B
VD- Duraphat	129,76±41,23 A	63,67±10,41 A
VE - Experimental	98,88±35,23 B	51,40±16,10 B

* Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa nas colunas ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A prevenção da doença cárie tem como primeira linha de defesa a instauração de hábitos de higiene bucal frequentes, associados ao uso de fluoretos. O flúor é um elemento amplamente utilizado e importante para a saúde humana e animal, uma vez que auxilia no correto funcionamento estrutural e fisiológico de ossos e dentes (49). Esse composto é muito empregado para controle da doença cárie, uma vez que sua ação é tanto sistêmica, através da ingestão e absorção pelos cristais de apatita do dente em formação, quanto local, ao estarem presentes nos fluidos bucais que circundam os dentes reduzindo a solubilidade dos tecidos dentais (50). Apesar do importante papel desempenhado pelo flúor, deve-se ter precaução quanto à alta ingestão e aplicação desse composto, o qual pode levar a diversas complicações à saúde e ao meio ambiente (19). A suplementação excessiva e frequente por fluoretos pode ser tóxica ao organismo humano, acarretando problemas ósseos, neurais, cardíacos, renais, hepáticos, pulmonares e até imunológicos (13). Para a cavidade bucal, essa sobredosagem está diretamente associada à fluorose dental (13,14). Ademais, o excesso de fluoretos no meio ambiente também leva à uma toxicidade da fauna e flora, sendo um possível contaminante do solo, ar e água (13,19). Assim, produtos de origem natural que não lesem o ecossistema estão sendo pesquisados a fim de gerar novas alternativas de tratamentos.

Os produtos naturais têm sido alvo de pesquisas em diferentes áreas, sobretudo naquelas relacionadas à saúde como medicina, farmácia e odontologia. Na área odontológica, em pesquisas de prevenção à cárie dentária, o própolis tem se destacado por apresentar resultado efetivo quanto à sua propriedade antimicrobiana (27, 33, 34, 36). O própolis é um produto natural resinoso de composição química bastante complexa (51), sendo um composto não-tóxico com ação antiinflamatória, antitumoral, citotóxica, hepatoprotetora, antioxidante, imunomodulatória e hemato estimulativa, além de apresentar uma alta atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias, vírus e parasitas (53). Sua ação antibacteriana se dá em função do própolis ser rico em polifenol (28), um composto capaz de inibir as enzimas glicosiltransferase responsáveis pela aderência do *S. mutans* na formação do biofilme, além de modificar a película adquirida prevenindo a colonização de bactérias cariogênicas (53-55). Sua composição química varia de acordo com a biodiversidade da vegetação da região em que as abelhas se encontram, o que interfere diretamente na intensidade ou presença de algumas atividades biológicas (31). No Brasil, já foram classificados 13 tipos diferentes de própolis (56) com propriedades

distintas, sendo que sua ação está intimamente relacionada com as plantas que originaram a resina e os bálsamos (57). Contudo, apesar da dificuldade de padronização da sua composição, a sua atividade antimicrobiana é efetivamente comprovada, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, bem como, bactérias aeróbias e anaeróbias (57).

Estudos avaliando os efeitos do própolis nas propriedades bioquímicas do esmalte dental são escassos, mas já foi observado que o uso de uma solução alcoólica de própolis não promoveu atividade na inibição do processo de desmineralização da cárie dentária (53). Além da forma solução alcoólica, estudos já avaliaram o extrato de própolis incorporado em dentifrícios, enxaguatórios e na forma de verniz (29, 32, 57). Acredita-se que a formulação do tipo verniz pode ser capaz de promover um efeito anticárie mais eficaz por apresentar a capacidade de formar um filme na superfície dos tecidos dentais, propiciando uma ação mais prolongada nesta superfície. Mas, para isso, é necessário a utilização de um polímero na sua formulação. Desta forma, o presente estudo, utilizou a quitosana como polímero e base para desenvolver um verniz de própolis, na tentativa de prevenir a progressão das lesões desmineralizadas.

A quitosana, componente base do verniz experimental utilizado no presente estudo, é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina, a qual é obtida essencialmente do exoesqueleto de artrópodes (37). É uma macromolécula atóxica e que apresenta estruturalmente a forma de um polímero linear com grupos reativos e inúmeras ligações de hidrogênio o que lhe confere excelente propriedade de biocompatibilidade e permite à quitosana ser carregada positivamente mesmo em baixo pH, além de facilitar sua adesão à estrutura dentária agindo como uma barreira protetora contra o ataque ácido. Devido a essas características, a quitosana têm sido adicionada a vários agentes anticariogênicos com a finalidade de paralisar e/ou remineralizar lesões de cárie (58). Estudos demonstraram alta evidência da quitosana no controle do biofilme (59) e sua influência no processo de desmineralização, evitando a perda de minerais (60). Frente às potenciais características do própolis e da quitosana, acredita-se que uma associação entre eles possa potencializar sua ação antibacteriana, como observada em alguns estudos (36, 46) e apresentar capacidade mineralizante.

Para avaliar o efeito remineralizante no esmalte dental, os espécimes foram submetidos a ciclagem de pH *in vitro* por ser este um método que permite simular o

processo Des/Re e analisar a perda e ganho de minerais, semelhante ao que ocorre na cavidade bucal (61,62). Lesões iniciais de mancha branca foram formadas na superfície do esmalte dental, através da imersão dos espécimes em solução desmineralizante com pH 5,0, para simular os episódios de queda de pH (63). A formação das lesões foi confirmada através da análise em microscopia confocal de escaneamento a laser. A fase de remineralização ocorreu com a imersão dos espécimes em solução composta por cálcio e fosfato em pH 7,0. Todo o preparo do espécime previamente a aplicação do tratamento se fez para simular uma situação clínica de um paciente de alto risco a cárie, mas ainda com possibilidade de realizar procedimentos não invasivos.

Para analisar o desempenho do verniz experimental na prevenção da progressão das lesões de cárie em esmalte, empregou-se a microscopia confocal de escaneamento a laser para análise da topografia da superfície, bem como dos parâmetros de rugosidade superficial e perfil de desgaste. Neste método as imagens são obtidas por diferentes planos focais e reconstruídas tridimensionalmente. Uma luz laser monocromática é empregada para realizar o escaneamento e é utilizado um software específico que fornece informações qualitativas e quantitativas. Este é um método também utilizado na realização de análises quantitativas de perda de tecido e profundidade nos casos de erosão e outras lesões dentárias (64). Esta metodologia permite a realização de imagens 3D por meio de um sistema óptico avançado, sem a necessidade de preparo e/ou destruição prévia das amostras (65).

Para a análise de rugosidade superficial, o verniz experimental e o grupo controle apresentaram comportamento semelhante, e menos rugosos que o verniz Duraphat® (VD) utilizado como padrão-ouro para avaliar o comportamento do verniz experimental (VE). Pode-se observar que os 3 grupos iniciaram com rugosidade similar e também após a formação da lesão, demonstrando que a padronização dos espécimes foi adequada, permitindo a comparação dos grupos. Também foi observado um aumento da rugosidade superficial no pós-tratamento com o VD. No entanto, analisando morfológicamente a superfície do esmalte tratado com VD, áreas irregulares foram observadas na superfície do esmalte, que são sugestivas de deposição do verniz que não foi efetivamente removido pela técnica adotada para a remoção dos tratamentos dos grupos. Dessa forma, o acúmulo do VD em determinadas áreas contribuiu para tornar a superfície mais irregular e conseqüentemente apresentar maior valor de rugosidade que os demais grupos.

Apesar de demonstrar áreas menos rugosas para o C e VE, ao analisar o perfil de

desgaste observou-se comportamento similar para os três grupos, tanto após desmineralização como após a finalização da ciclagem de pH. Em relação ao desgaste da lesão de mancha branca inicial, a similaridade nos resultados demonstra que todos os grupos iniciaram de forma semelhante e padronizada, contudo, nenhum dos tratamentos foi capaz de conter a perda estrutural ocorrida na superfície após o tratamento/ciclagem e sendo portanto comparável ao controle.

Todavia, na análise da microdureza subsuperficial observou-se que o VD proporcionou maiores valores de dureza que os outros grupos. Como a dureza e a resistência do substrato dental são determinadas pelo equilíbrio entre os processos Des/Re (66), a microdureza do esmalte dental submetido ao tratamento com o verniz experimental de própolis/quitosana não foi capaz de segurar esse processo e apresentou valores próximos do controle. Neste método os dados são obtidos pela relação entre força aplicada e área deformada. É um método relativamente rápido, de fácil execução e não demanda extensa área para análise. A microdureza Knoop, aplicada nesse estudo, tem sido o método mais utilizado nas pesquisas de substratos dentais, uma vez que o recuo Knoop é mais longo e raso que o Vickers o que possibilita a aplicação de cargas com menor risco de fraturas, sendo portanto amplamente utilizado em estruturas frágeis (67) como a superfície do esmalte dos dentes decíduos (68).

A microdureza é uma variável importante para determinar o grau de mineralização de um tecido mineralizado (69) e pode-se observar que todos os grupos apresentaram dureza inferior ao tecido hígido, ou seja, nenhum tratamento foi capaz de restabelecer a dureza inicial, sendo que apenas o VD demonstrou capacidade de remineralizar parcialmente o substrato. É importante salientar que esse resultado foi referente a uma única sessão de tratamento. Diferente do estudo de Godoi et al., 2019, no qual o tratamento com verniz Duraphat foi realizado previamente a cada ciclo de Des/Re, totalizando 6 aplicações (70), mas também demonstrou que o verniz Duraphat não foi capaz de remineralizar a lesão subsuperficialmente, semelhante a lesão analisada no presente estudo. Em um estudo *in situ* também observou-se que ele foi incapaz de prevenir a desmineralização após a ciclagem de pH (71). Apesar do comportamento do VD ter sido interessante na análise de microdureza, ele apresenta uma alta concentração de flúor em sua composição (22.600ppm - NaF 5%), o qual, quando utilizado de forma indiscriminada, pode acarretar diversos danos ao organismo, principalmente em crianças abaixo de 4 anos. Portanto, indica-se a avaliar a necessidade da aplicação desse produto em crianças de menores faixas etárias (0-4 anos) e avaliar os riscos e benefícios, uma vez

que a calcificação e maturação do esmalte dentário ocorre durante esse período (72), aumentando os riscos de fluorose e toxicidade, uma vez que crianças retêm alta proporção dos fluoretos ingeridos (80-90%) (73).

No Grupo Controle, que não recebeu tratamento, foi possível observar que a desmineralização continuou ocorrendo durante o processo de ciclagem de pH, apresentando morfológicamente início de formação de pequenas cavidades, indicativo de que o efeito da solução remineralizante não foi suficiente para interromper o desafio cariogênico e proporcionar a remineralização da estrutura de esmalte. O grupo do Verniz Experimental de própolis/quitosana não retornou aos valores iniciais de dureza, ou seja, não houve uma remineralização do esmalte previamente desmineralizado, porém foi capaz de impedir a continuidade do processo de desmineralização (efeito preventivo), achados consistentes com o estudo de Wassel e Khattab que avaliaram a microdureza superficial de um verniz contendo nanopartículas de própolis/ quitosana e miswak e demonstraram seu potencial em retardar a desmineralização do esmalte dental (35). Em contradição, Ali *et al.* (57) encontraram aumento da microdureza superficial, com potencial de remineralização satisfatório após desmineralização artificial do esmalte, em produtos contendo própolis comparado ao controle. Essa divergência de resultados se deve provavelmente às particularidades de cada estudo, do tipo e origem de própolis empregado e da forma adicionada aos produtos bucais (31), além do substrato e tipo de dente testado (74) (permanente/decíduo). É importante ressaltar que no presente estudo foram utilizados dentes decíduos, que estruturalmente apresentam prismas de esmalte menores e mais permeáveis (75) e uma composição química com maior quantidade de carbonato, apresentando maior solubilidade que os dentes permanentes (74) e conseqüentemente podendo influenciar nos valores de dureza.

Apesar dos resultados do presente trabalho não demonstrarem que o verniz experimental foi superior ao verniz fluoretado, deve-se enfatizar que o própolis possui outras ações sobre os microrganismos na cavidade bucal devido a sua composição. Os principais compostos químicos encontrados no própolis, à exceção da cera, são os polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides) e terpenoides que são os mais ativos. Além disso, pode possuir ainda micro e macroelementos (Mn, Fe, Si, Mg, Zn, Se, Ca, K, Na, Cu) e vitaminas (B1, B2, B6, C e E). Essa diversidade na composição química dá ao própolis uma vantagem de evitar a ocorrência de resistência microbiana ao produto e assim ser um excelente agente antimicrobiano (57). Somado a isso, é um produto natural biodegradável e com mínimos efeitos colaterais, destacando-se nestes quesitos em relação

ao flúor. Assim, talvez seja uma alternativa viável a ser empregada em pacientes muito jovens e/ou naqueles que apresentem restrições ao uso de flúor.

Uma especulação importante quanto aos resultados do verniz experimental, é que eles podem ser ainda mais promissores em estudos *in situ/in vivo* do que foi simulado no presente estudo, no qual desenvolveu-se a desmineralização *in vitro* por ciclagem. Essa observação deve-se ao fato da literatura ter demonstrado que o própolis interfere positivamente não só na redução do crescimento do *Streptococcus mutans*, como também na aderência bacteriana e atividade da glicosiltransferase, propriedades importantes no estabelecimento do processo cariogênico (31).

6. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada, com os resultados obtidos e considerando as limitações de um estudo *in vitro*, foi possível concluir que o verniz experimental testado não foi capaz de remineralizar o esmalte previamente desmineralizado, porém apesar da perda estrutural, conseguiu impedir a continuidade do processo de desmineralização sem promover aumento da rugosidade superficial e alterações morfológicas significativas. O verniz Duraphat foi capaz de remineralizar parcialmente o substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, Murray CJL, Marcenes W; GBD 2015 Oral Health Collaborators. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017 Apr;96(4):380-387.
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005 Sep;83(9):661-9.
3. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.
4. Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis.* 2019 May;25(4):982-995.
5. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Apr;33(4):499-515.
6. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008 Sep;53(3):286-91. .
7. Sajjan PG, Nagesh L, Sajjanar M, Reddy SK, Venkatesh UG. Comparative evaluation of chlorhexidine varnish and fluoride varnish on plaque *Streptococcus mutans* count--an in vivo study. *Int J Dent Hyg.* 2013 Aug;11(3):191-7.
8. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, Listl S, Celeste RK, Guarnizo-Herreño CC, Kearns C, Benzian H, Allison P, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet.* 2019 Jul 20;394(10194):249-260.
9. Kazeminia M, Abdi A, Shohaimi S, Jalali R, Vaisi-Raygani A, Salari N, Mohammadi M. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med.* 2020 Oct 6;16(1):22.
10. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jul 11;(7):CD002279.
11. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999 Jun 30;126(3):270-99.

12. Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:23-30.
13. Zuo H, Chen L, Kong M, Qiu L, Lü P, Wu P, Yang Y, Chen K. Toxic effects of fluoride on organisms. *Life Sci.* 2018 Apr 1;198:18-24.
14. Abanto Alvarez J, Rezende KM, Marocho SM, Alves FB, Celiberti P, Ciamponi AL. Dental fluorosis: exposure, prevention and management. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Feb 1;14(2):E103-7.
15. Kebede A, Retta N, Abuye C, Whiting SJ, Kassaw M, Zeru T, Tessema M, Kjellevoid M. Dietary Fluoride Intake and Associated Skeletal and Dental Fluorosis in School Age Children in Rural Ethiopian Rift Valley. *Int J Environ Res Public Health.* 2016 Jul 26;13(8):756.
16. Srivastava S, Flora SJS. Fluoride in Drinking Water and Skeletal Fluorosis: a Review of the Global Impact. *Curr Environ Health Rep.* 2020 Jun;7(2):140-146.
17. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 2014 Mar;13(3):330-8.
18. Nagata ME, Delbem AC, Kondo KY, de Castro LP, Hall KB, Percinoto C, Aguiar SM, Pessan JP. Fluoride concentrations of milk, infant formulae, and soy-based products commercially available in Brazil. *J Public Health Dent.* 2016 Mar;76(2):129-35.
19. Maheshwari N, Qasim N, Anjum R, Mahmood R. Fluoride enhances generation of reactive oxygen and nitrogen species, oxidizes hemoglobin, lowers antioxidant power and inhibits transmembrane electron transport in isolated human red blood cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Jan 15;208:111611.
20. Khan RA. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharm J.* 2018 Jul;26(5):739-753.
21. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011;45(3):243-63.
22. Palombo EA. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:680354.
23. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules.* 2015 Apr 22;20(4):7329-58.
24. Zayed SM, Aboulwafa MM, Hashem AM, Saleh SE. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. *AMB Express.* 2021 May 25;11(1):73.
25. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MG, Silva ML, Filho AA, Martins

- CH, Crotti AE, Pauletti PM, Groppo M, Cunha WR. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chem Biodivers*. 2010 Jul;7(7):1835-40.
26. Golestannejad Z, Khozeimeh F, Abtahi R, Zarei Z, Sadeghalbanaei L, Sadeghian R. Inhibitory effects of ethanolic, methanolic, and hydroalcoholic extracts of olive (*Olea europaea*) leaf on growth, acid production, and adhesion of *Streptococcus mutans*. *Dent Res J (Isfahan)*. 2020 May 23;17(3):179-185.
 27. Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimoga MH, Rosalen PL. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*. 2013 May 15;61(19):4546-50.
 28. Martins ML, Leite KLF, Pacheco-Filho EF, Pereira AFM, Romanos MTV, Maia LC, Fonseca-Gonçalves A, Padilha WWN, Cavalcanti YW. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Arch Oral Biol*. 2018 Sep;93:56-65.
 29. DE Luca MP, Freires IA, Gala-García A, Santos VR, Vale MP, Alencar SM, Rosalen PL. The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. *Braz Oral Res*. 2017 Jun 5;31:e45.
 30. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26(2):83–99.
 31. Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, Ribeiro MN, Gonçalves AG, Guerra RN. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol*. 2009 Aug 17;125(1):1-9.
 32. Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GM, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res*. 2002 Nov-Dec;36(6):445-8.
 33. Neto EMR, Valadas LAR, Lobo PLD, Fernandes AMB, da Cruz Fonseca SG, Fechine FV, Júnior FJG, Bandeira MAM, de França Fonteles MM. Dose-response Evaluation of Propolis Dental Varnish in Children: A Randomized Control Study. *Recent Pat Biotechnol*. 2020;14(1):41-48.
 34. Martins ML, Monteiro ASN, Guimarães JEC, Guimarães MBCT, da Silva RF, Cabral LM, Farah A, dePaula J, Romanos MTV, Maia LC, Cavalcanti YW, Fonseca-Gonçalves A. Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash, with or without fluoride, on the growth of a cariogenic biofilm. *Arch Oral Biol*. 2019 Nov;107:104512.
 35. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res*. 2017 Jul;8(4):387-392.
 36. Franca JR, De Luca MP, Ribeiro TG, Castilho RO, Moreira AN, Santos VR,

- Faraco AA. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Dec 12;14:478.
37. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015 Mar 2;13(3):1133-74.
 38. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010 Nov 15;144(1):51-63.
 39. Aliasghari A, Rabbani Khorasgani M, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: an in vitro study. *Iran J Microbiol*. 2016 Apr;8(2):93-100.
 40. Costa EM, Silva S, Tavarria FK, Pintado MM. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*. 2013 Apr;20:27-31.
 41. Kawakita ERH, Ré ACS, Peixoto MPG, Ferreira MP, Ricomini-Filho AP, Freitas O, Aires CP. Effect of Chitosan Dispersion and Microparticles on Older *Streptococcus mutans* Biofilms. *Molecules*. 2019 May 10;24(9):1808.
 42. Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, Mosallam O, El Danaf HA. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018 Jul 12;6(7):1289-1295.
 43. Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*. 2009 Oct;4(10):634-41.
 44. Pérez-Díaz MA, Boegli L, James G, Velasquillo C, Sánchez-Sánchez R, Martínez-Martínez RE, Martínez-Castañón GA, Martínez-Gutierrez F. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Oct;55:360-6.
 45. Covarrubias C, Trepiana D, Corral C. Synthesis of hybrid copper-chitosan nanoparticles with antibacterial activity against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Dent Mater J*. 2018 Jun 8;37(3):379-384.
 46. De Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int*. 2014;2014:348647.
 47. Antonio AG, Iorio NL, Pierro VS, Candraeva MS, Farah A, dos Santos KR, Maia LC. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2011 Jun;56(6):556-64.
 48. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate

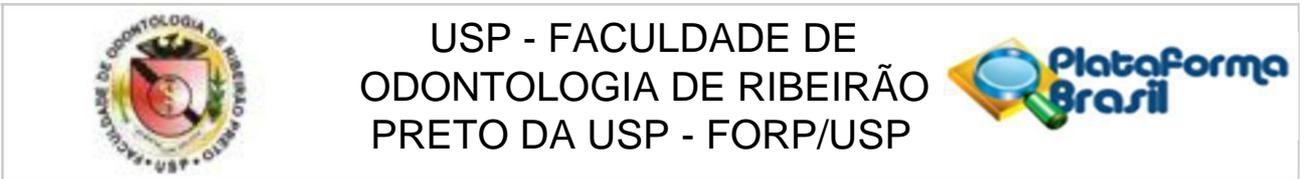
- the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008;19(1):21-7.
49. Zhang S, Jiang C, Liu H, Guan Z, Zeng Q, Zhang C, Lei R, Xia T, Gao H, Yang L, Chen Y, Wu X, Zhang X, Cui Y, Yu L, Wang Z, Wang A. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Sep 1;271(2):206-15.
 50. Buzalaf MAR. Review of Fluoride Intake and Appropriateness of Current Guidelines. *Adv Dent Res.* 2018 Mar;29(2):157-166.
 51. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Sep;5(3):313-6.
 52. De Vecchi E, Drago L. Attività antimicrobica della propoli: cosa c'è di nuovo? [Propolis' antimicrobial activity: what's new?]. *Infez Med.* 2007 Mar;15(1):7-15. Italian.
 53. Cardoso JG, Iorio NL, Rodrigues LF, Couri ML, Farah A, Maia LC, Antonio AG. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol.* 2016 May;65:77-81.
 54. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull.* 2003 Apr;26(4):527-31.
 55. Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One.* 2012;7(8):e42204.
 56. Machado CS, Mokochinski JB, de Lira TO, de Oliveira Fde C, Cardoso MV, Ferreira RG, Sawaya AC, Ferreira AG, Pessoa C, Cuesta-Rubio O, Monteiro MC, de Campos MS, Torres YR. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:6057650..
 57. Ali S, Farooq I, Bugshan A, Siddiqui IA, Al-Khalifa KS, Al-Hariri M. Efficacy of propolis in remineralising artificially induced demineralisation of human enamel - An in-vitro study. *J Taibah Univ Med Sci.* 2020 Dec 14;16(2):283-287.
 58. Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, Yousefi M, Tanomand A, Yousefi B, Mahmoudi S, Kafil HS. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol.* 2020 Nov 1;162:956-974.
 59. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020 Jan 1;185:110627.
 60. Arnaud TM, de Barros Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-

- remineralization: an in vitro evaluation. *J Dent.* 2010 Nov;38(11):848-52.
61. Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:108-24.
 62. Stookey GK, Featherstone JD, Rapozo-Hilo M, Schemehorn BR, Williams RA, Baker RA, Barker ML, Kaminski MA, McQueen CM, Amburgey JS, Casey K, Faller RV. The Featherstone laboratory pH cycling model: a prospective, multi-site validation exercise. *Am J Dent.* 2011 Oct;24(5):322-8.
 63. Paula AB, Fernandes AR, Coelho AS, Marto CM, Ferreira MM, Caramelo F, do Vale F, Carrilho E. Therapies for White Spot Lesions-A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract.* 2017 Mar;17(1):23-38.
 64. Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion--a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater.* 2010 Apr;26(4):326-36.
 65. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:13-23.
 66. Amaechi BT, Mathews SM, Mensinkai PK. Effect of theobromine-containing toothpaste on dentin tubule occlusion in situ. *Clin Oral Investig.* 2015 Jan;19(1):109-16.
 67. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):13-29.
 68. Jain A, Suprabha BS, Shenoy R, Natarajan S, Rao A. Remineralising Effectiveness of Two Fluoride Varnishes Containing Additives: An In Vitro Study. *Oral Health Prev Dent.* 2019;17(4):385-393.
 69. Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol.* 1996 Jun;41(6):539-45.
 70. Godoi FA, Carlos NR, Bridi EC, Amaral FLBD, França FMG, Turssi CP, Kantovitz KR, Basting RT. Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions. *Braz Oral Res.* 2019 May 27;33:e044..
 71. Comar LP, Souza BM, Martins J, Santos MG, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Response of carious enamel to TiF₄ varnish treatment under diverse cariogenic activities in situ. *J Dent.* 2017 Aug;63:81-84.
 72. Toumba KJ, Twetman S, Splieth C, Parnell C, van Loveren C, Lygidakis NA. Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019 Dec;20(6):507-516.
 73. Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review. *Environ*

Health. 2019 Dec 19;18(1):110.

74. Sønju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res.* 1997 Nov;11(4):523-7.
75. Lindén LA, Björkman S, Hattab F. The diffusion in vitro of fluoride and chlorhexidine in the enamel of human deciduous and permanent teeth. *Arch Oral Biol.* 1986;31(1):33-7.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa:Emprego de Verniz de Própolis na Prevenção da Cárie Dentária

Pesquisador: ENIR RABELO DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36797420.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.253.830

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores apresentam seu projeto de pesquisa destacando, inicialmente, a alta prevalência da doença cárie, em termos globais. Em seguida, ao discorrer sobre a sua fisiopatologia, eles reforçam a importância de métodos preventivos, dentre os quais destacaram orientações de dieta e de higiene bucal e o uso de fluoretos. Porém, os autores do projeto apontam as dificuldades inerentes a estes métodos mencionados, tendo em vista sua dependência da cooperação do paciente – no caso do primeiro, ou a potencial causa de fluorose dentária – para o segundo método citado.

Em seguida, os autores apresentam como alternativa neste contexto os extratos naturais, particularmente o própolis, para a inclusão em produtos de higiene bucal. O própolis é considerado seguro, disponível e de custo relativamente baixo, assim declaram os autores. Além disso, sua já comprovada eficácia se dá, conforme relato sustentado pelos pesquisadores, pelas suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anestésicas e citotóxicas. Como uma de suas variações, o própolis associado à quitosana, apresentou, em estudo prévios, bons resultados em decorrência da sua ação contra bactérias cariogênicas, muito embora dados referentes à sua ação no processo de remineralização ainda não estejam definidos. Baseando-se nesta lacuna científica é que os pesquisadores justificam assim o seu projeto.

Endereço: Avenida do Café
s/nº

Bairro: Monte Alegre

UF: SP

**Telefon
e:**

(16)3315-
0493

Município: RIBEIRAO PRETO

Fax: (16)3315-4102

**CE
P:** 14.040-
904

E-mail: cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 4.253.830

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, através de um estudo in vitro, a eficácia de um verniz de própolis/quitosana experimental para prevenir a desmineralização na simulação do processo de cárie em esmalte de dentes decíduos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de um estudo in vitro, utilizando dentes humanos, sendo esta a razão exclusiva para que este projeto tenha sido submetido a este Comitê. Segundo a avaliação deste relator, não há quaisquer riscos envolvidos.

Além disso, o presente Projeto de Pesquisa é cientificamente relevante e traz em si potenciais efeitos benéficos. Isto porque se trata de um estudo que verificará a eficácia de um composto natural. Assim, a análise experimental prevista no Projeto, possibilitaria a obtenção de dados inéditos no que se refere ao mecanismo de ação da substância testada sobre o processo de remineralização.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram fornecidos dados suficientemente claros para que os aspectos éticos e documentais da pesquisa fossem apreciados por este relator.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O relator considera que o projeto de pesquisa encontra-se suficientemente claro, condizente com os preceitos que regem a condução ética de pesquisas em seres humanos. Os pesquisadores reuniram documentos suficientemente comprobatórios, incluindo autorização do Biobanco de Dentes Humanos desta escola, dando conta de adequadas condições estruturais para que o projeto possa ser plenamente executado dentro dos limites do cronograma apresentado.

Recomendações:

Este relator recomenda ao CEP responsável a aprovação deste Projeto de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 239ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 31/08/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida do Café
s/nº

Bairro: Monte Alegre

UF: SP

Telefone: (16)3315-
0493

Município: RIBEIRAO PRETO

Fax: (16)3315-4102

CEP: 14.040-
904

E-mail: cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 4.253.830

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_D O_P ROJETO_1603062.pdf	17/08/2020 15:38:38		Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	17/08/2020 15:36:23	ENIR RABELO DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	11/08/2020 07:05:45	ENIR RABELO DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Decl_Biobanco.pdf	11/08/2020 06:58:40	ENIR RABELO DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decl_Infraestrutura.pdf	11/08/2020 06:58:27	ENIR RABELO DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 02 de Setembro de 2020

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café
s/nº

Bairro: Monte Alegre

UF: SP

Telefone:

(16)3315-
0493

Município: RIBEIRAO PRETO

Fax: (16)3315-4102

CEP: 14.040-
904

E-mail: cep@forp.usp.br

