

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO IN VITRO DE VERNIZES FLUORETADOS  
CONTENDO NAF E TIF<sub>4</sub> NAS PROPRIEDADES  
NANOMECÂNICAS E DE SUPERFÍCIE DO  
ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO À EROSÃO**

**Maria Isabel Dantas de Medeiros**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**2014**

**MARIA ISABEL DANTAS DE MEDEIROS**

**EFEITO IN VITRO DE VERNIZES FLUORETADOS CONTENDO  
NAF E TIF<sub>4</sub> NAS PROPRIEDADES NANOMECÂNICAS E DE  
SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO À EROSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Odontologia Preventiva e Infantil.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo

João Pessoa

2014

M488e Medeiros, Maria Isabel Dantas de.  
Efeito in vitro de vernizes fluoretados contendo NaF e  $TiF_4$   
nas propriedades nanomecânicas e de superfície do esmalte  
dentário submetido à erosão / Maria Isabel Dantas de  
Medeiros.-- João Pessoa, 2014.  
44f. : il.  
Orientadora: Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo  
Coorientador: Hugo Lemes Carlo  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS  
1. Odontologia. 2. Odontologia preventiva e infantil.  
3. Erosão dentária. 4. Módulo de elasticidade. 5. Fluoretos.  
6. Microscopia de força atômica.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

**MARIA ISABEL DANTAS DE MEDEIROS**

**EFEITO IN VITRO DE VERNIZES FLUORETADOS CONTENDO  
NAF E TIF<sub>4</sub> NAS PROPRIEDADES NANOMECÂNICAS E DE  
SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO À EROSÃO**

Banca Examinadora

---

Prof. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo  
Orientadora - UFPB

---

Prof. Dr. Hugo Lemes Carvalho Carlo  
Co-orientador - UFPB

---

Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos  
Examinador - UFPB

---

Prof. Dra. Regina Maria Puppim Rontani  
Examinadora - UNICAMP

## DEDICATÓRIA

Dedico essa minha dissertação de mestrado, bem como todos os meus esforços para ser uma boa profissional, a minha irmã Maria Hortência Dantas de Medeiros, que está viva em meu coração, e aos muitos pacientes que assim como ela tanto necessitaram e necessitam dos cuidados odontológicos.

As pessoas por muitas vezes precisam de um exemplo de vida para se espelhar e vencer as adversidades da vida, e Hortência é esse exemplo para mim, por ter sido uma pessoa feliz e alegre mesmo nos momentos mais difíceis, quando as limitações e a dor se faziam presentes.

Acredito que Deus envia cada um de nós nesse mundo com uma missão a ser cumprida, e apesar da breve passagem de Hortência por esta vida ela conseguiu cumprir a missão de transmitir mesmo que inconscientemente bons ensinamentos a minha família e as pessoas que tiveram a oportunidade de conviver com ela, ajudando, dessa forma, a construir a minha história.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me reservado esta oportunidade de aumentar meus conhecimentos, e colocar as pessoas certas no meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais, Maria do Céu e Ademar Sales, pelo incentivo e apoio durante a realização deste mestrado, assim como pelo cuidado e dedicação a mim dispensados, por toda minha vida, para construção da minha carreira profissional. “Mainha” obrigada por está ao meu lado, sempre.

Ao meu esposo Paulo André pelo incentivo e compreensão nesta etapa de minha vida. Obrigada pela cumplicidade e apoio que tem me dado independente das minhas escolhas. A sua atenção e carinho foram fundamentais neste processo.

A minhas irmãs, Luiza e Cecília, pelo apoio e atenção durante este mestrado.

Ao meu tio Antônio Ivo pela atenção e colaboração com meus estudos, e pelo exemplo que você deixou como profissional da saúde.

À Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho pela excelente orientação, pelos ensinamentos, dedicação e por acreditar no meu trabalho. Minha profunda admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo, Coordenador do Mestrado Acadêmico em Odontologia da UFPB, pelo apoio e colaboração com o presente estudo.

Aos Profs. Wilton Padilha e Ana Maria Valença, que me ensinaram a gostar de pesquisa e me despertaram o interesse pela vida acadêmica.

Aos Profs. Frederico e Severino Jackson pela atenção e disponibilização dos laboratórios onde foi realizado o nosso trabalho.

A todos os Professores do Curso de Mestrado em Odontologia da UFPB pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal da Paraíba-UFPB, instituição onde tive a oportunidade de dar um importante passo rumo ao crescimento científico e profissional.

A todos os funcionários desta instituição que contribuíram para a realização do meu trabalho durante este período.

Aos colegas do curso de mestrado por compartilhar comigo as dificuldades e conquistas neste curso de mestrado.

Ao doutorando Bruno, pela colaboração com o nosso estudo, sempre disponível e atencioso aos nossos questionamentos.

Aos alunos que fazem parte do LAMIB, em especial Kássia, Patrícia, Camila, Fernanda, Emanuele e Danilo, pela ajuda durante o período em que passei estudando neste laboratório.

## EPÍGRAFE

“Quem espera que a vida seja feita de ilusão  
Pode até ficar maluco ou morrer na solidão  
É preciso ter cuidado pra mais tarde não sofrer  
É preciso saber viver...”

Toda pedra do caminho você deve retirar  
Numa flor que tem espinhos você pode se arranhar  
Se o bem e o mal existem você pode escolher  
É preciso saber viver...”

Roberto Carlos e Erasmo Carlos

## RESUMO

**Objetivos:** Analisar o efeito dos vernizes de NaF e TiF<sub>4</sub> na nanodureza (N) e módulo de elasticidade (E) da superfície do esmalte após um curto tempo de exposição a bebida a base de cola, simulando a ingestão de uma lata de refrigerante, e também avaliar a espessura e topografia da camada protetora formada, por meio de microscópio de força atômica (AFM).

**Métodos:** Trinta blocos de esmalte humano (4x4 mm) foram divididos em 3 grupos (n = 10): controle (sem verniz), verniz de NaF e verniz de TiF<sub>4</sub>. As amostras permaneceram em saliva artificial durante 24 horas, e os vernizes foram aplicados apenas uma vez. Após 6h os espécimes foram submetidos a desafio erosivo (10 ciclos: 5s em bebida a base de cola/5s em saliva artificial). A espessura da camada protetora formada e a topografia da superfície foram avaliadas por microscopia óptica e AFM. Os dados foram submetidos à ANOVA Two-Way, Tukey e T- Student ( $\alpha = 0,05$ ).

**Resultados:** Houve diferença estatística dos valores de N e E (GPa), antes e após o desafio erosivo, apenas para os grupos controle e TiF<sub>4</sub>. Após o desafio erosivo o grupo NaF mostrou estatisticamente maiores valores de N e E que os grupos controle e TiF<sub>4</sub>. No entanto, os valores da espessura e profundidade da indentação mostraram que os valores encontrados de N e E para o grupo TiF<sub>4</sub> estavam relacionados com a camada protetora formada e não com o esmalte erodido. Ambos os vernizes mostraram, por meio de AFM, a formação de uma camada protetora globular, e a espessura da camada formada foi significativamente maior para o grupo TiF<sub>4</sub> que NaF.

O verniz de NaF foi capaz de proteger as propriedades nanomecânicas de esmalte após curto desafio erosivo e o verniz de TiF<sub>4</sub> apresentou formação de camada protetora espessa e homogênea com propriedades nanomecânicas .

**Conclusões:** O verniz de NaF foi capaz de proteger as propriedades nanomecânicas de esmalte após curto desafio erosivo e o verniz de TiF<sub>4</sub> apresentou formação de camada protetora espessa e homogênea com propriedades nanomecânicas.

**Palavras-chave:** Erosão dentária; módulo de elasticidade; fluoretos; microscopia de força atômica.

## ABSTRACT

**Objectives:** To analyze the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on nanohardness (N) and elastic modulus (E) of enamel surface after very short exposure time to simulation of drinking a can of soft drink; and evaluate the thickness and topography of protective layer formed, by atomic force microscopy (AFM).

**Methods:** Thirty blocks of human enamel (4x4 mm) were divided into 3 groups (n=10): control, NaF varnish and TiF<sub>4</sub> varnish. The specimens remained in artificial saliva for 24h, and the varnishes were applied only once. After 6h, specimens were submitted to erosive challenge (10 cycles: 5s in cola drink/5s in artificial saliva). The thickness of protective layer formed and the surface topography were evaluated by optical microscope and AFM. The data were subjected to Two-Way ANOVA, Tukey and Student's-*t* ( $\alpha=0.05$ ).

**Results:** The values shown for N and E (GPa) before and after erosive challenge differed statistically, only for control and TiF<sub>4</sub> groups. After the erosive challenge, NaF group showed statistically higher values for N and E than those found for control and TiF<sub>4</sub> groups. However, the thickness and depth of indentation values showed that N and E values found for TiF<sub>4</sub> group were related to the protective layer formed. By AFM, both varnishes showed globular protective layer formation, and the thickness of layer was significantly higher for TiF<sub>4</sub> than NaF group.

**Conclusions:** NaF varnish was able to protect the nanomechanical properties of enamel after short erosive challenge, and TiF<sub>4</sub> varnish showed a thick and homogeneous protective layer formation with nanomechanical properties.

**Keywords:** tooth erosion; elastic modulus; fluorides; microscopy, atomic force

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NaF – Fluoreto de Sódio

TiF<sub>4</sub> – Tetrafluoreto de Titânio

AFM – Microscópio de força atômica

N – Nanodureza

E – Módulo de elasticidade

CaF<sub>2</sub> – Fluoreto de cálcio

H – dureza

P<sub>max</sub> - Pico de carga

A<sub>c</sub> - Área de contato

V - coeficiente de Poisson

E<sub>i</sub> – Módulo de elasticidade/parâmetro do indentador

V<sub>i</sub> – coeficiente de Poisson/parâmetro do indentador

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. CAPÍTULO 1</b>	<b>05</b>
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>23</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>34</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um declínio na prevalência de cárie dentária em países industrializados ou em desenvolvimento tem sido observado nas últimas décadas<sup>9, 39, 54</sup>, e paralelamente a esta redução, outra lesão causada pela desmineralização da estrutura dentária tem recebido destaque: a erosão dentária<sup>20</sup>.

Estudos recentes demonstram uma alta prevalência de erosão dentária<sup>7, 21, 38, 44</sup>. Bartlett et al.<sup>7</sup> estudaram a prevalência de erosão dentária em uma amostra de jovens adultos europeus com idades entre 18-35 anos e relataram que 57,1% se enquadravam nos escores de 1 a 3 de BEWE (Basic Erosive Wear Examination) que vai desde perda inicial da superfície até perda de superfície maior que 50%. Murakami et al.<sup>38</sup> avaliaram a prevalência de desgaste dentário erosivo em 967 pré-escolares brasileiros, e constataram que estava presente em 51,6% das crianças. Na Noruega Søvik et al.<sup>44</sup> relataram a uma prevalência de erosão dentária de 59%. Isaksson<sup>21</sup> observou a prevalência de erosão dentária, constatando que 75% dos indivíduos estudados em uma coorte de 494 suecos de 20 anos de idade apresentavam erosão dentária, sendo também encontrada uma relação entre erosão dentária e estilo de vida e sobrepeso/obesidade.

A erosão dentária é definida como a perda de estrutura dentária devido a processos químicos, decorrentes de exposição ácida, sem o envolvimento bacteriano<sup>1, 49</sup>. Os fatores etiológicos podem ser intrínsecos relacionados ao ácido gástrico em indivíduos que são acometidos por doença gástrico esofágica, doenças metabólicas e psicossomáticas<sup>11, 28</sup>, e fatores extrínsecos advindos de ácidos provenientes da dieta e medicamentos, bem como ácidos de origem ambiental/ocupacional no qual o indivíduo pode absorver substâncias (líquidos ou vapores ácidos) como trabalhadores em indústrias de produção de baterias e fertilizantes e atletas nadadores<sup>28, 53, 55</sup>.

Atualmente, o fator extrínseco está ganhando importância devido ao aumento do consumo de bebidas ácidas<sup>29</sup> e a prevenção desta doença depende, principalmente, da restrição do contato com alimentos ou bebidas que causam erosão, juntamente com aplicação tópica de flúor<sup>45</sup>. Há, no entanto, algumas dificuldades relacionadas ao contato com ingestão de alimentos ou bebidas ácidas devido à necessidade de colaboração do paciente. Além disso, em casos de erosão devido a fatores intrínsecos existe a dificuldade de controle das

doenças gástrico esofágicas <sup>45</sup>. Assim, a aplicação tópica de flúor é uma maneira simples e acessível para proteger o esmalte frente à desmineralização por ácidos <sup>12</sup>.

A ação de fluoretos é principalmente atribuída a precipitação de glóbulos de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) na superfície do esmalte dentário, o qual atua como uma barreira física que dificulta o contato dos ácidos com o esmalte subjacente. Esta precipitação de  $\text{CaF}_2$  forma um reservatório mineral, o qual é “atacado” pelo desafio erosivo, liberando íons que auxiliam no tamponamento dos ácidos e na remineralização <sup>35, 41</sup>. A formação da camada de  $\text{CaF}_2$  e seu efeito protetor contra a desmineralização dependem do pH, concentração de íons fluoreto, tipo de sal do fluoreto e veículo <sup>35</sup>. As preparações de fluoretos mais ácidas, assim como as mais concentradas podem formar camadas mais espessas de  $\text{CaF}_2$ , podendo portanto, oferecer uma maior proteção contra a erosão dentária <sup>37</sup>.

Pesquisas mostram que compostos a base de fluoreto de sódio, o qual é comumente utilizado, previnem significativamente a progressão da erosão dentária <sup>12, 22, 23</sup>. Entretanto, existem estudos que demonstram que outros compostos fluoretados, como o tetrafluoreto de titânio ( $\text{TiF}_4$ ), podem apresentar efeito protetor significativamente maior contra a erosão dentária que o fluoreto de sódio <sup>17, 18, 30, 50, 51</sup>.

O  $\text{TiF}_4$  é um composto fluoretado que contém o íon metálico polivalente titânio em sua constituição <sup>31, 33, 34</sup>. Este fluoreto pode ser mais eficaz na prevenção da erosão dentária, devido à formação de uma cobertura ácido-resistente, na superfície de esmalte, rica em titânio, bem como devido ao aumento de incorporação de fluoreto e a incorporação de titânio na hidroxiapatita <sup>52</sup>. Este composto tem sido amplamente pesquisado, visto que suas formulações, seja na forma de solução ou de verniz, têm mostrado efeitos promissores na prevenção da erosão dentária <sup>16-19, 30, 50, 51</sup>. Porém, ainda há controvérsia quanto à utilização do  $\text{TiF}_4$ , já que em alguns estudos esse fluoreto não se mostrou efetivo contra a erosão <sup>32, 46, 47</sup>, provavelmente devido a diferenças metodológicas entre eles. No estudo de Magalhães et al. <sup>32</sup>, por exemplo, o teste utilizado foi o de microdureza diferentemente daqueles que apresentaram resultados promissores para o  $\text{TiF}_4$ , em que fizeram testes de perfilometria <sup>16, 30, 50</sup>, interferometria <sup>17, 18</sup>, espectroscopia de absorção atômica <sup>19, 50</sup> e análise colorimétrica de liberação de cálcio <sup>51</sup>.

Wiegand et al.<sup>51</sup> observaram em seu estudo que a solução de TiF<sub>4</sub> pode diminuir a perda de cálcio no esmalte e na dentina durante a erosão, sendo que o seu efeito a longo prazo é limitado e restrito a dentina. Dessa forma estes autores sugeriram a realização de novas investigações em que o veículo fluoretado tenha melhor capacidade de aderência a superfícies dentais, tais como géis ou vernizes, o que poderia aumentar seu efeito protetor.

Magalhães et al.<sup>30</sup>, compararam *in vitro* o efeito do verniz experimental de TiF<sub>4</sub> a vernizes utilizados comercialmente a base de fluoreto de sódio, e a solução de TiF<sub>4</sub>, sobre a erosão em esmalte de dente bovino, e concluíram que, nas condições do estudo, o verniz de TiF<sub>4</sub> reduziu a erosão em esmalte bovino, mostrando melhores resultados em relação aos dois vernizes de fluoreto de sódio.

Levy et al.<sup>24</sup> analisaram *in vitro* o efeito dos vernizes e soluções de TiF<sub>4</sub> e NaF na proteção contra a erosão do esmalte dentário com e sem abrasão. Estes autores observaram que todos os vernizes fluoretados foram capazes de reduzir significativamente a perda de esmalte, de modo que o verniz de TiF<sub>4</sub> apresentou os menores valores de perda mineral. Foi concluído que o verniz de TiF<sub>4</sub> pode ter um efeito promissor na redução da perda de esmalte sob condições erosivas e abrasivas *in vitro*.

Uma das formas de avaliação *in vitro* utilizada em estudos relacionados às alterações sobre as propriedades mecânicas das estruturas dentárias é a técnica de nanoindentação<sup>3, 6, 8, 10</sup>. Nos estágios iniciais da erosão, o teste de nanoindentação é capaz de medir pequenas alterações de estrutura fornecendo a nanodureza e o módulo de elasticidade<sup>3, 4, 8, 10, 14, 26, 43</sup>. Esta técnica permite a aplicação de pequenas forças resultando em deformações na estrutura em escala nanométrica. Além disso, muitos estudos associam o teste de nanoindentação juntamente com a análise em microscopia de força atômica, o que possibilita correlacionar as alterações mecânicas de ultraestrutura com a topografia de superfície<sup>4, 10, 14, 26, 27, 43</sup>.

Segundo Anusavice<sup>2</sup> a dureza de um material ou estrutura fornece a resistência dos mesmos à deformação plástica durante um ensaio de penetração, que pode ser definido pela razão entre a carga máxima de penetração e área da impressão do indentador. Enquanto que o módulo de elasticidade corresponde à razão entre a tensão e a deformação elástica da estrutura quando uma carga é aplicada<sup>2</sup>, de modo a fornecer a propriedade de rigidez do mesmo.

O módulo de elasticidade do esmalte dentário submetido à erosão foi investigado por Barbour et al. <sup>5</sup>, Barbour et al. <sup>6</sup>, Beyer et al. <sup>8</sup> e Lippert, Parker e Jandt <sup>26</sup>. Beyer et al. <sup>8</sup> observaram redução dos valores de nanodureza e módulo de elasticidade em esmalte dentário humano submetido a diferentes soluções ácidas (ácido tartárico, maleico, láctico, ascórbico, fosfórico e cítrico), bem como Barbour et al. <sup>5</sup>, que utilizaram soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH pra produzir erosão. Lippert, Parker e Jandt <sup>26</sup> investigaram um possível reendurecimento da superfície amolecida de esmalte por meio de solução remineralizante com propriedades químicas semelhantes as da saliva humana, porém não foi observado aumento da nanodureza do esmalte após a remineralização. Porém, ainda não foi investigado o efeito da aplicação de agentes fluoretados no módulo de elasticidade e nanodureza do esmalte dentário durante o desenvolvimento inicial da erosão.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de vernizes fluoretados contendo NaF e TiF<sub>4</sub> nas propriedades nanomecânicas e de superfície do esmalte dentário submetido à erosão.

## 2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Journal of Dentistry” e encontra-se em análise.

### **Effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on nanomechanical properties of enamel surface and protective layer after a short erosive challenge**

Maria Isabel Dantas Medeiros<sup>a</sup>, Bruno Alessandro Silva Guedes Lima<sup>b</sup>, Hugo Lemes Carlo<sup>c</sup>, Rogério Lacerda dos Santos<sup>d</sup>, Fabíola Galbiatti de Carvalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Social Dentistry, Health Science Center, UFPB – Federal University of Paraíba, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Mechanical Technology, Technological Center, UFPB - Federal University of Paraíba, Brazil;

<sup>c</sup> Department of Operative Dentistry, Health Science Center, UFPB - Federal University of Paraíba, Brazil;

<sup>d</sup> Department of Biological Science, Division of Dentistry, UFCG - Federal University of Campina Grande, Brazil

**Key Words:** tooth erosion; elastic modulus; fluorides; microscopy, atomic force

**Corresponding Author:** Prof. Fabíola Galbiatti de Carvalho - Department of Clinical and Social Dentistry - Federal University of Paraíba - Health Science Center – Campus I - João Pessoa, Paraíba, Brazil  
Zip-Code 58051-900 - Phone: +(55)-83-32167251 FAX:+(55)-83-3216-7797  
e-mail: [fabigalbi@yahoo.com.br](mailto:fabigalbi@yahoo.com.br)

## **Effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on nanomechanical properties of enamel surface and protective layer after a short erosive challenge**

### **Abstract**

**Objectives:** To analyze the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on nanohardness (N) and elastic modulus (E) of enamel surface after very short exposure time to simulation of drinking a can of soft drink; and evaluate the thickness and topography of protective layer formed, by atomic force microscopy (AFM).

**Methods:** Thirty blocks of human enamel (4x4 mm) were divided into 3 groups (n=10): control, NaF varnish and TiF<sub>4</sub> varnish. The specimens remained in artificial saliva for 24h, and the varnishes were applied only once. After 6h, specimens were submitted to erosive challenge (10 cycles: 5s in cola drink/5s in artificial saliva). The thickness of protective layer formed and the surface topography were evaluated by optical microscope and AFM. The data were subjected to Two-Way ANOVA, Tukey and Student's-*t* ( $\alpha=0.05$ ).

**Results:** The values shown for N and E (GPa) before and after erosive challenge differed statistically, only for control and TiF<sub>4</sub> groups. After the erosive challenge, NaF group showed statistically higher values for N and E than those found for control and TiF<sub>4</sub> groups. However, the thickness and depth of indentation values showed that N and E values found for TiF<sub>4</sub> group were related to the protective layer formed. By AFM, both varnishes showed globular protective layer formation, and the thickness of layer was significantly higher for TiF<sub>4</sub> than NaF group.

**Conclusions:** NaF varnish was able to protect the nanomechanical properties of enamel after short erosive challenge, and TiF<sub>4</sub> varnish showed a thick and homogeneous protective layer formation with nanomechanical properties.

**Clinical Significance:** After very short erosive challenge the enamel surface exhibited reduction in nanomechanical properties, and TiF<sub>4</sub> varnish showed formation of a thick protective layer with mechanical resistance, which would be able to protect it against erosion.

## Introduction

The strategy to control or to prevent erosive demineralization of teeth involves the topical application of conventional fluoride, such as sodium fluoride (NaF).<sup>1-3</sup> The action of NaF fluoride is mainly attributed to precipitation of CaF<sub>2</sub>-like material on the eroded dental surface forming a protective layer.<sup>1,4</sup> The topical application of highly concentrated NaF varnishes is often recommended to prevent erosion<sup>5</sup> and these have demonstrated effective protection against dental erosion due to their higher fluoride concentration and capacity to adhere to enamel.<sup>6-8</sup>

As the anti-erosive effect of conventional fluorides requires a very intensive fluoridation regime,<sup>9</sup> current studies have focused on fluoride compounds that might have higher level of efficacy, for example, compounds containing polyvalent metal ions such as titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>). The protective capacity of TiF<sub>4</sub> is related to increased uptake of fluoride by acidic pH and the formation of a glaze-like surface layer that might primarily act as an acid-resistant diffusion barrier.<sup>10, 11</sup> Although some studies have shown that TiF<sub>4</sub> varnishes had an inhibitory effect on dental erosion,<sup>3, 7, 12, 13</sup> the results about its effect are still contradictory.<sup>14, 15</sup>

Several studies have investigated the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on enamel erosion by experimental models of erosive challenge with a variety of daily cycles performed in a period from 5 to 7 days<sup>3, 7, 12, 13</sup> to simulate patients with dental erosion. However, little attention has been given to the initial alterations in the enamel structure caused by occasional soft drink consumption, such as drinking a can of soft drink or a single intake of soft drink during a meal, which is a very common habit in the world population. This fact is relevant because a very short time of exposure to an acidic beverage may lead to the early stages of dental erosion, which are characterized by softening of the enamel surface.<sup>16</sup>

The initial changes in enamel caused by acidic beverages have been measured by the nanoindentation test.<sup>16- 20</sup> However, the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on the nanomechanical properties of enamel after initial erosion and the thickness and topography of the protective layer formed by both varnishes have not been reported before. Therefore, the hypotheses tested were: 1) There was difference between the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnish application on the nanohardness and elastic modulus of the enamel surface after a very short time of exposure to cola beverage, by the nanoindentation test; 2) There was difference

between the thickness and topography of the protective layer formed by the two varnishes on eroded enamel, when analyzed by atomic force microscopy (AFM).

## **Material and method**

### **Specimen Preparation**

After obtaining approval from the Research Ethics Committee, twenty-five sound human third molars were selected for this study. Teeth were stored in 0.1% thymol at 4°C and used within 1 month after extraction. From each tooth, two enamel specimens (4 x 4 x 3 mm) were cut with a flexible diamond disc (7016, KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) at low speed under water cooling, and fifty specimens were obtained. They were embedded in acrylic resin (Vipi Flash – Pirassununga, SP, Brazil) and the enamel surfaces were ground flat with SiC paper discs (400, 600 and 1200 grit) and polished with 1µm alumina suspension (Erios Corp., São Paulo, SP, Brazil). Afterwards, the specimens were cleaned in an ultrasonic device (UltrasonicCleaner, model USC1400, Unique Ind. Com. Ltda, São Paulo, SP, Brazil) for 2 min and checked for the presence of cracks and fractures using a microscope (Nikon 88286, Tokyo, Japan) at 40x magnification. The baseline nanohardness of the enamel surface was determined and specimens with  $4.85 \text{ GPa} \pm 20\%$  of this value were selected<sup>21</sup> to standardize the initial hardness. Specimens without the pre-determined values were discarded. Thirty specimens were selected and allocated to three groups (n=10), according to fluoride varnish application: 1. Control group – without agent application; 2. NaF group – NaF varnish application (Duraphat, Colgate-Palmolive Ind. Com. Ltda, São Bernardo, SP, Brazil) and 3. TiF<sub>4</sub> group – experimental TiF<sub>4</sub> varnish application (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brazil) (Table1). Ten specimens were selected for evaluation of thickness of the protective layer formed by varnish application.

### **Fluoride varnish application**

The specimens were immersed in artificial saliva for 24 h to simulate acquired enamel pellicle formation.<sup>22</sup> After this, the varnish was applied to each sample, according to each group. Each fluoride agent was individually inserted into a 0.3 mL insulin syringe (BD Ultra-fine, Franklin Lakes, NJ, USA) to standardize the amount of agent applied on the enamel surface.

For the NaF and TiF<sub>4</sub> groups, 20 µL of each fluoride varnish was applied on the specimen surface and spread with microbrush. After this, the specimens were immersed in artificial saliva for 6 h, for clinical simulation of the contact time of the varnish with the tooth surface.<sup>12, 14, 15</sup> After this period, the varnishes were carefully removed from the surface using acetone and a scalpel blade, taking care to avoid touching the enamel surface.<sup>14, 15</sup> In the control group no product was applied and specimens were immersed in artificial saliva for 6 h. The method of producing artificial saliva used was similar to that of McKnight-Hanes and Whitford,<sup>23</sup> but without sorbitol (in g:L). The varnishes were applied only once before the erosive challenge.<sup>6, 15</sup>

To evaluate the thickness of the protective layer formed by TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes, five specimens were prepared for each varnish group. The enamel surface was divided into two equal parts: one half of the surface was covered with 2 layers of acid-resistance nail varnish (control surface - without varnish application) and on the other half, fluoride varnish was applied according to each group. After fluoride application, the nail varnish was removed with a scalpel blade and the entire surface of the specimen was submitted to the erosive challenge.

#### Erosive challenge

The erosive challenge was based on simulating a short time of exposure to a cola beverage (pH 2.6; coke, Porto Real, RJ, Brazil) according to Wongkhantee et al.<sup>24</sup>: the specimens were immersed in 32.5 mL of cola drink for 5 s at room temperature, rinsed in deionized water and then immersed in 32.5 mL of artificial saliva at room temperature for 5 s. This cycle was repeated 10 times. After this, the specimens were stored in 100% humidity until the nanoindentation test was performed.

#### Nanoindentation test

The nanohardness and the elastic modulus were evaluated by ultramicrohardness testing (DUH-211S, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a Berkovich diamond indenter. A peak load of 5000 µN was used, with loading and unloading rates of 311.3 µN/s and a holding segment of 10 s.<sup>16</sup> In each readout, 5 indentations were made in the center of the enamel surface of each specimen, at least 50 µm apart, and their mean value was taken to represent the specimen

nanohardness and elastic modulus. Measurements were taken at baseline and after erosive challenge. All readouts were performed by the same examiner.

The method described by Oliver and Pharr<sup>25</sup> was used to calculate the hardness ( $H$ ) and elastic modulus of enamel ( $E$ ), using the formulas:

$$H = P_{max} / A_c$$

$$1/E_r = (1 - \nu^2)/E + (1 - \nu_i^2)/E_i$$

where  $P_{max}$  is peak load and  $A_c$  is the contact area, and  $E$  and  $\nu$  are Young's modulus and Poisson's ratio for the specimen and  $E_i$  and  $\nu_i$  are the same parameters for the indenter, respectively. Poisson's ratio for enamel was assumed to be 0.4.<sup>26</sup>

The depth of indentation for each specimen after varnish application and erosive challenge was given by ultramicrohardness software and it was determined as Maximum Height (nm). The depth of indentation values were compared with the thickness values of the protective layer formed by varnish application to investigate whether the indentation was made in the enamel surface or in the protective layer.

### Optical Microscopy

Five specimens from each group were randomly selected for analysis of the enamel surface after varnish application and erosive challenge, by Optical Microscope (Axiotech), at 100x magnification.

### Atomic Force Microscopy

Five randomized specimens of each group were analyzed using atomic force microscopy (AFM; SPM-9600, Shimadzu, Kyoto, Japan). Each specimen was fixed to the microscope holder on a stub (2 x 3 mm). The block surface morphology was probed in "contact mode". Imaging was performed with standard geometry silicon nitride Micro-Cantilever (OMCL-TR, Olympus, Tokyo, Japan) and probed with 0.15 N/m constant elastic and 24 KHz resonant frequency. Images 30  $\mu$ m x 30  $\mu$ m with a resolution of 256 X 256 pixels and operating point of 1.5 V were collected at a very low scan rate to obtain details of the enamel structure and to avoid damaging the tip.

The specimens that were prepared to measure the thickness of the protective layer formed by the two varnishes were analyzed using the same

parameters as described above. After image capture, the *Height Trace* tool was used. Four parallel lines were made on each specimen. Each outline started on the control half (without fluoride application) and finished on the half to which the fluoride varnish was applied. The difference in height of each line was recorded by the *Height Trace* tool and the thickness of the protective layer was measured. The mean thickness (nm) of the protective layer was obtained for each group.

### Statistical analysis

Data analysis was performed with the GraphPad InStat version 2.0 (GraphPad software, La Jolla, USA) at a level of significance of  $\alpha = 0.05$ . Since all the variables tested satisfied the assumptions of equality and normal distribution (Bartlett and Kolmogorov–Smirnov tests, respectively), Two-Way ANOVA and Tukey tests were carried out for statistical comparisons of enamel nanohardness and elastic modulus among the groups. To compare the baseline and after erosive challenge nanohardness and elastic modulus values in the same group the paired-T test was used.

### Results

Mean values ( $\pm$  sd) of enamel nanohardness, elastic modulus for each group are reported in Table 2. There were no statistically significant differences among groups for baseline values of nanohardness and elastic modulus ( $p=0.73$  and  $p=0.81$ , respectively). After erosive challenge, there were significant differences of nanohardness and elastic modulus values among groups ( $p=0.001$ ). The Control Group had intermediate values of nanohardness ( $3.4 \pm 0.4$  GPa) and elastic modulus ( $104.0 \pm 8.5$  GPa) and the  $\text{TiF}_4$  varnish group statistically showed the lowest nanohardness ( $2.4 \pm 0.8$  GPa) and elastic modulus ( $82.2 \pm 14.3$  GPa) values ( $p=0.001$ ). The NaF varnish group showed the highest nanohardness ( $4.4 \pm 0.5$  GPa) and elastic modulus ( $121.7 \pm 15.3$  GPa) values. The statistical comparison before (baseline) and after erosion for each group showed that only the Control and  $\text{TiF}_4$  varnish groups showed significant differences for nanohardness ( $p=0.001$  and  $p=0.002$ , respectively) and elastic modulus values ( $p=0.008$  and  $p=0.001$ , respectively).

Figures 1, 2, and 3 show the AFM images after fluoride varnish application and erosive challenge. Figure 1 showed areas of eroded enamel without a

protective layer (Figs. 1A and 1B). The varnishes showed different surface topographies. The NaF varnish group showed a surface interspersed with globular deposits forming a non-homogeneous globular layer (Figs. 2A and 2B). The TiF<sub>4</sub> varnish group showed homogeneous globular deposition forming a protective layer that completely hid the enamel surface (Figs. 3A and 3B).

Figure 4 shows the optical microscopy images after fluoride varnish application and erosive challenge. Both varnishes formed protective layer on the enamel surface (Fig 4B and 4C), however, the TiF<sub>4</sub> varnish showed a more homogeneous layer formation, completely covering the enamel surface (Fig. 4C). The NaF varnish showed the formation of an interspersed protective layer on enamel (Fig. 4B). The Control group showed no protective layer formation (Fig. 4A).

Mean thickness values ( $\pm$  sd) of the layer formed by the TiF<sub>4</sub> varnish and NaF varnish groups, and mean values ( $\pm$  sd) of maximum indentation height for each group are reported in Table 3. The depth of indentation post-erosion was significantly higher for the TiF<sub>4</sub> varnish group ( $296.9 \pm 49.2$  nm), followed by Control ( $237.5 \pm 19.7$  nm) and NaF varnish groups ( $213.7 \pm 17.1$ ). The protective layer thickness of the TiF<sub>4</sub> varnish group also was significantly higher ( $953 \pm 55.7$  nm) than that of the NaF varnish group ( $53.1 \pm 3.7$  nm). Thus, the thickness of the protective layer formed was higher than the indentation depth for the TiF<sub>4</sub> varnish group. Figure 5 illustrates the measurement of thickness of the protective layer formed by TiF<sub>4</sub> varnish application after the erosive challenge, analyzed by AFM.

## Discussion

The nanomechanical properties of enamel surfaces subjected to initial erosion after the application of remineralizing agents have not been extensively investigated and only solutions with or without the addition of fluoride have been tested.<sup>17, 27</sup> As fluoride varnish is recommended to prevent erosion,<sup>5</sup> the innovative approach of the present study was related to the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on the nanomechanical properties of enamel surfaces after a short time of exposure to a cola beverage.

The initial step in erosive dissolution, usually referred to as softening, is diffusion of acid into the hard tissue, leading to loss of calcium and phosphate from the outer few micrometers, and hence to a partly demineralized, weakened

structure overlying sound tissue.<sup>16</sup> If the exposure to acid is prolonged or repeated at short intervals, the mineral loss continues and the outermost layer of softened tissue is completely dissolved and irreversibly lost.<sup>16</sup> The majority of studies have investigated the effect of NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes on enamel erosion caused by acidic beverages for a prolonged period of time.<sup>7, 13, 14, 22</sup> However, it was demonstrated by nanoindentation test that there was significant enamel softening after 30 s exposure to soft drink,<sup>28</sup> thus making it clinically relevant to investigate the effect of short times of exposure to acidic beverages on enamel surfaces.

The experimental model of erosive challenge used in the present study was designed to simulate an individual drinking a can of soft drink (325 mL) with the washing effect of saliva, by cyclic specimen immersion and time comparable with that taken for the intake of a single drink, as was used by Wongkhantee et al.<sup>24</sup> and Panich and Poolthong<sup>29</sup>. Furthermore, the nanoindentation test has a limited use for longer exposure times than the one evaluated in the present study.<sup>28, 19</sup>

The standardization of baseline nanohardness values (Table 2) made it possible to establish nanomechanical comparisons among the groups after treatment. The NaF varnish group was the only that showed no statistically significant difference before and after erosive challenge (Table 2), demonstrating that this varnish was effective in preventing the initial demineralization or softening of enamel caused by a very short time of exposure to cola beverage. This protective effect of NaF varnish has also been observed in previous studies,<sup>6, 14, 30</sup> and results from the formation of a CaF<sub>2</sub> layer that acts as a mineral reservoir. It also behaves as a physical barrier that prevents the acid from coming into contact with the underlying enamel, leading to decreased susceptibility to further enamel dissolution.<sup>4, 13</sup> AFM images (Fig. 2) showed globular deposits on the surface, indicating formation of the CaF<sub>2</sub> layer, with a thickness of 53.1 ± 3.7 nm even after the erosive challenge (Table 3).

A significant decrease in nanohardness and elastic modulus values was found for the Control and TiF<sub>4</sub> varnish groups after erosive challenge. As no fluoride agent was used in the control group, no protective layer was formed (Figs.1 and 4A) and there was a decrease in the nanomechanical properties of enamel. This information is clinically relevant, because the erosive challenge used simulated the intake of a can of soft drink (325 mL) and demonstrated that a very short time of exposure to cola beverage was enough to cause alterations in the

nanohardness and elastic modulus of enamel. This result emphasizes the importance of prevention of dental erosion even in patients who have not yet developed the disease, but are considered a risk group, such as those who habitually consume soft drinks. Wongkhantee et al.<sup>24</sup> and Panich and Poolthong<sup>29</sup> also related the reduction in enamel microhardness values after using the same erosive challenge.

Some factors have been shown to influence the efficacy of fluoride agents against demineralization, mainly the composition of fluoride salt, fluoride concentration and pH.<sup>4</sup> In the present study, TiF<sub>4</sub> showed higher concentration of fluoride (2.45%) and lower pH (3.4) in comparison with NaF (2.26% and 4.5, respectively). From this aspect, one would expect a better effect of TiF<sub>4</sub> when compared with NaF, not only because of the titanium, but also due to the high concentration and low pH, which could increase the enamel fluoride uptake. Although this study found lower nanohardness and elastic modulus values for the TiF<sub>4</sub> group, these results were not consistent with the optical and AFM images (Figs. 3 and 4). AFM and optical images (Figs.3 and 4C) showed a homogeneous globular deposition completely hiding the enamel surface, showing the protective layer formed by TiF<sub>4</sub> varnish application. This layer probably is the glaze-like surface layer cited by others authors.<sup>10, 11</sup> The glaze-like layer is assumed to be formed from a new compound (hydrated hydrogen titanium phosphate) or organometallic complexes by substitution of calcium by titanium ions in the apatite lattice.<sup>10, 11</sup> Magalhães et al.<sup>7</sup> investigated the surface layer coating by TiF<sub>4</sub> varnish, using scanning electron microscopy and confirmed the titanium deposits with concentrations of  $3.5 \pm 1.0\%$  Ti and  $2.0 \pm 0.8\%$  of fluoride. This layer can be characterized as barrier acid-resistance diffusion,<sup>7, 10, 11</sup> which might have prevented the reduction in nanomechanical properties of enamel.

Based on the contradictory results found between the nanomechanical test and microscopic images, the authors investigated whether the indentation could perhaps have been performed in the layer formed by TiF<sub>4</sub> varnish applied in this group, and not in the eroded enamel surface. This premise was confirmed when the average depth of indentation post-erosion (maximum height – Table 3) of TiF<sub>4</sub> group was  $296.9 \pm 49.2$  nm and the thickness of the protective layer, by AFM analysis (Fig 5), was  $953 \pm 55.7$  nm. Thus, the nanohardness and elastic modulus values found post-erosion were those of the layer formed by TiF<sub>4</sub> varnish, and not

related to the enamel surface treated. To author's knowledge, this is thought to be the first demonstration that the precipitates formed after the application of  $\text{TiF}_4$  produced a metal-rich layer that has a significantly higher level of nanomechanical properties and thickness than the layer formed by NaF varnish (Table 3). The nanohardness and elastic modulus values of the  $\text{TiF}_4$  layer formed ( $2.4 \pm 0.8$  and  $82.2 \pm 14.3$  GPa, respectively) were significantly lower than eroded enamel values ( $3.4 \pm 0.4$  and  $104.0 \pm 8.5$  GPa, respectively) (Table 2). However, these values may be considered high, since the numerical difference between them was 1 GPa for nanohardness and 21.8 GPa for elastic modulus. Based on this fact, it can be suggested that in addition to the metal-rich layer perhaps being able to act as barrier acid-resistance diffusion, it might also be able to support mechanical forces and protect the enamel surface against erosion and abrasion.

Although the nanomechanical properties of enamel after  $\text{TiF}_4$  varnish application could not be measured, AFM images (Figs. 3 and 5) showed the formation of a homogeneous, thick and mechanically resistant layer on the surface, indicating the protective effect of this varnish. The hypotheses tested in this study were accepted and the potential of  $\text{TiF}_4$  varnish for use as a remineralizing agent is of special interest. However, maintenance of the mechanical properties of the  $\text{TiF}_4$  layer formed need to be investigated after aggressive erosive challenge, and clinical studies are still necessary to evaluate its protective effect against erosion.

## **Conclusion**

The NaF varnish was able to protect the nanomechanical properties of enamel surface and to create a protective layer after a very short time of exposure to cola beverage. For  $\text{TiF}_4$  varnish, the nanohardness and elastic modulus values post-erosion were related to the homogeneous, thick, mechanically resistant layer formed on surface, which demonstrated the protective effect of this varnish.

## **Acknowledgment**

The authors are grateful to FGM for manipulating the experimental varnish and to Prof. Severino J. Guedes de Lima of LSR/UFPB laboratory for AFM use.

## References

1. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *Journal of Applied Oral Science* 2009; **17**:75-86.
2. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Research* 2008;**42**:2-7.
3. Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Efficacy of TiF<sub>4</sub> and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive–abrasive wear. *Clinical Oral Investigations* 2013; DOI 10.1007/s00784-013-1096-y.
4. Saxegaard E, Rølla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1988;**96**:523-35.
5. Mohammed A, Dusara K. What is the role of topical fluoride application in preventing dental erosion? *Evidence-Based Dentistry* 2013;**14**:59-62.
6. Murakami C, Bönecker M, Corrêa MSNP, Mendes FM, Rodrigues CRMD. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Archives of Oral Biology* 2009;**54**:997- 1001.
7. Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR. The effect of an experimental 4% TiF<sub>4</sub> varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF<sub>4</sub> solution on dental erosion in vitro. *Caries Research* 2008;**42**:269–74.
8. Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MC. Inhibition of Erosive Wear by Fluoride Varnish. *Caries Research* 2007;**41**:61-7.
9. Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Research* 2004;**38**:561–6.
10. Büyükyılmaz T, Øgaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetra fluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *European Journal of Oral Sciences* 1997;**105**:473–7.
11. Ribeiro CC, Gibson I, Barbosa MA. The uptake of titanium ions by hydroxiapatite particles - structural changes and possible mechanisms. *Biomaterials* 2006;**27**:1749-61.

12. Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT et al. Effect of a single application of TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* 2011;**29**:537- 44.
13. Levy FM, Magalhães AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, Buzalaf MAR. The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes and solutions on enamel in vitro. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2012;**22**:11- 6.
14. Magalhães AC, Stancari FH, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. *Journal of Dentistry* 2007;**35**:858-61.
15. Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *Journal of Dentistry* 2010;**38**:153- 7.
16. Barbour ME, Shellis RP. An investigation using atomic force microscopy nanoindentation of dental enamel demineralization as a function of undissociated acid concentration and differential buffer capacity. *Physics in Medicine and Biology* 2007;**52**:899-910.
17. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004;**280**:442- 8.
18. Cheng Z, Wang X, Cui F, Ge J, Yan J. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomedical Materials* 2009;**4**:1-7.
19. White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *European Journal of Oral Sciences* 2010;**118**:604-9.
20. Beyer M, Reichert J, Bossert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Acids with an equivalent taste lead to different erosion of human dental enamel. *Dental Materials* 2011;**27**:1017-23.
21. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Susceptibility of deciduous and permanent enamel to dietary acid-induced erosion studied with atomic force microscopy nanoindentation. *European Journal of Oral Sciences* 2004;**112**:61-6.

22. Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Jorge AMJ, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: an in situ/ex vivo study. *Archives of Oral Biology* 2008;**53**:399 - 404.
23. Mcknight-hanes C, Whitford GM. Fluoride release from three glass ionomer materials and the effects of varnishing with or without finishing. *Caries Research* 1992;**26**:345-50.
24. Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and toothcoloured filling materials. *Journal of Dentistry* 2006;**34**:214-20.
25. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research* 1992;**7**:1564- 83.
26. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Archives of Oral Biology* 2001;**46**:173 - 83.
27. Abdullah AZ, Ireland AJ, Sandy JR, Barbour ME. A nanomechanical investigation of three putative anti-erosion agents: remineralisation and protection against demineralisation. *International Journal of Dentistry* DOI 10.1155/2012/768126.
28. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Journal of Oral Rehabilitation* 2005;**32**:16- 21.
29. Panich M, Poolthong S. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on in vitro enamel hardness. *Journal of the American Dental Association* 2009;**140**:455-60.
30. Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Research* 1994;**28**:227-32.

## Figure legends

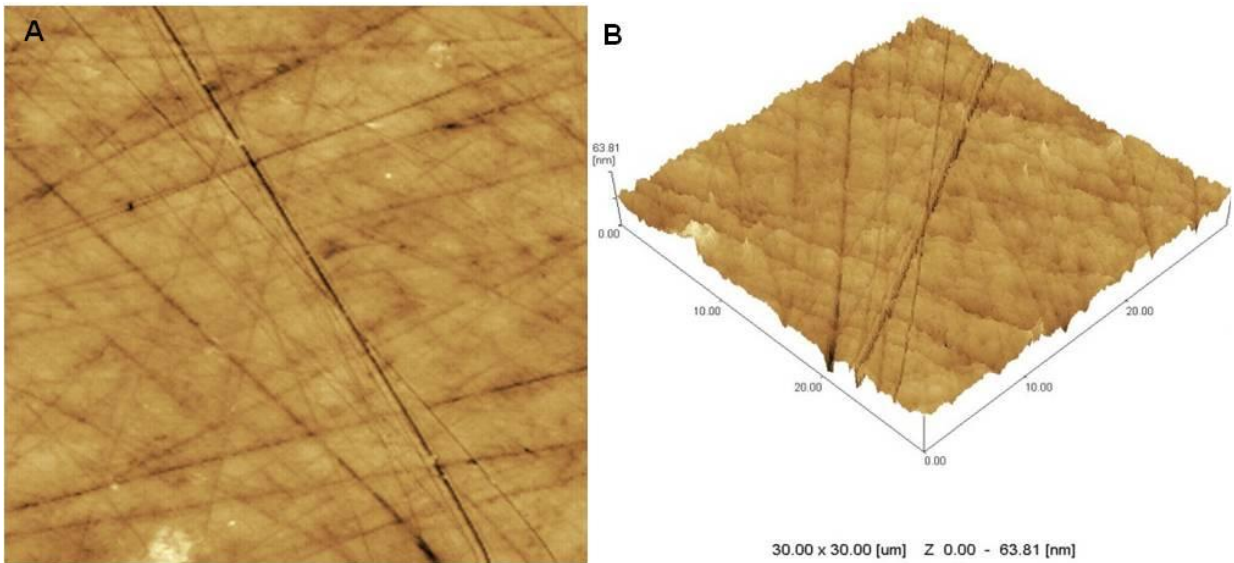


Figure 1 - AFM image of enamel surface after erosive challenge and no-varnish application. (A) “Straches” lines caused by polish procedure. (B) Rough surface without protection layer.

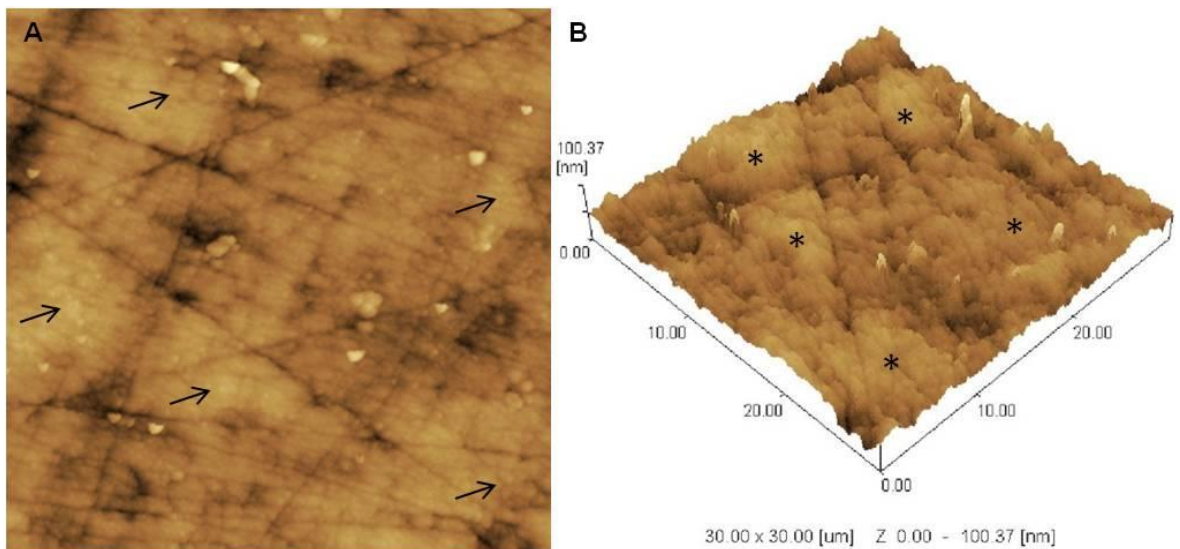


Figure 2 - AFM image of enamel surface after NaF varnish application and erosive challenge. (A) (→) Non-homogeneous globular deposits on surface. (B) Enamel surface partially hidden by a layer of globular deposits (\*).

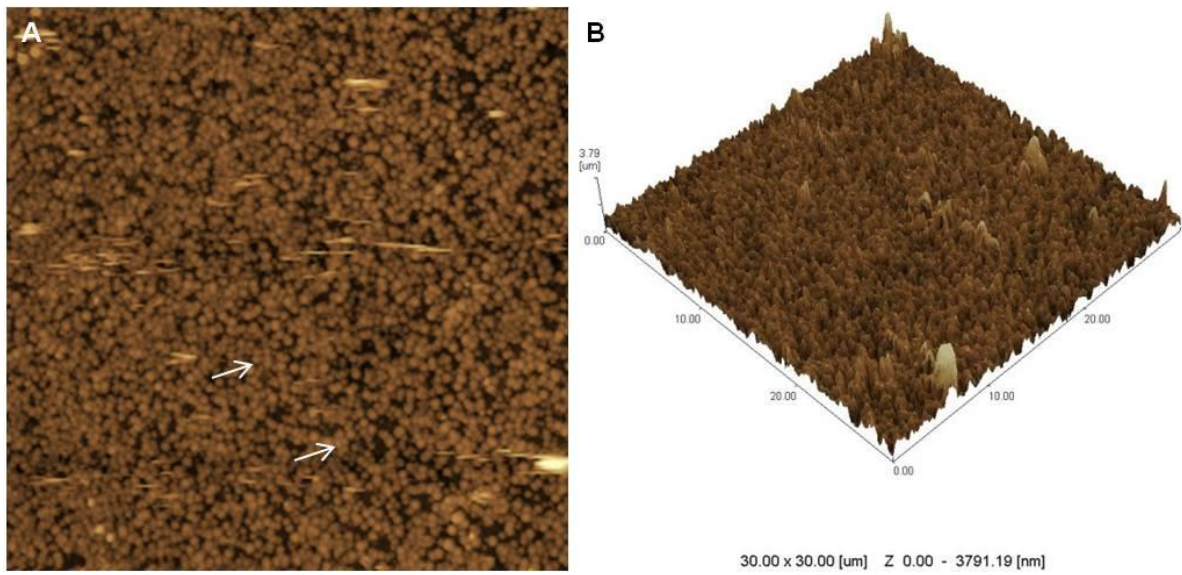


Figure 3 - AFM image of enamel surface after  $\text{TiF}_4$  varnish application and erosive challenge. (A) ( $\rightarrow$ ) Homogeneous globular deposits on surface. (B) Enamel surface completely hidden by a layer of globular deposits.

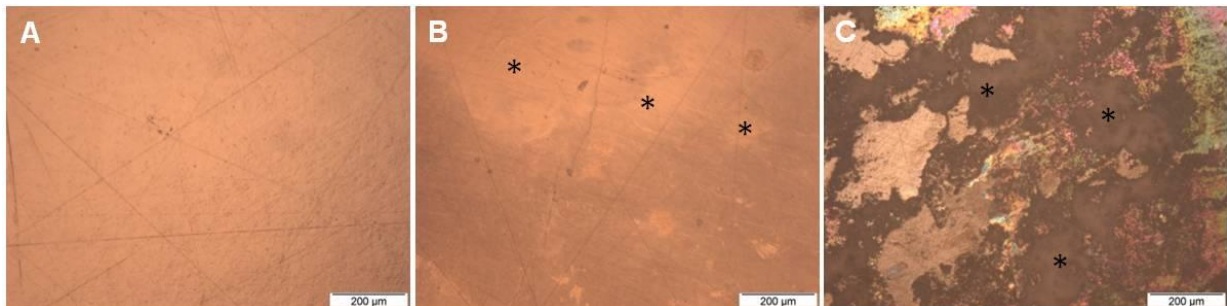


Figure 4 – Optical microscopy image (100x) of enamel surface after fluoride varnishes application and erosive challenge. (A) control – no-varnish application. (B) NaF varnish - surface with interspersed layer formation (\*). (C)  $\text{TiF}_4$  varnish – homogeneous layer formation on surface (\*).

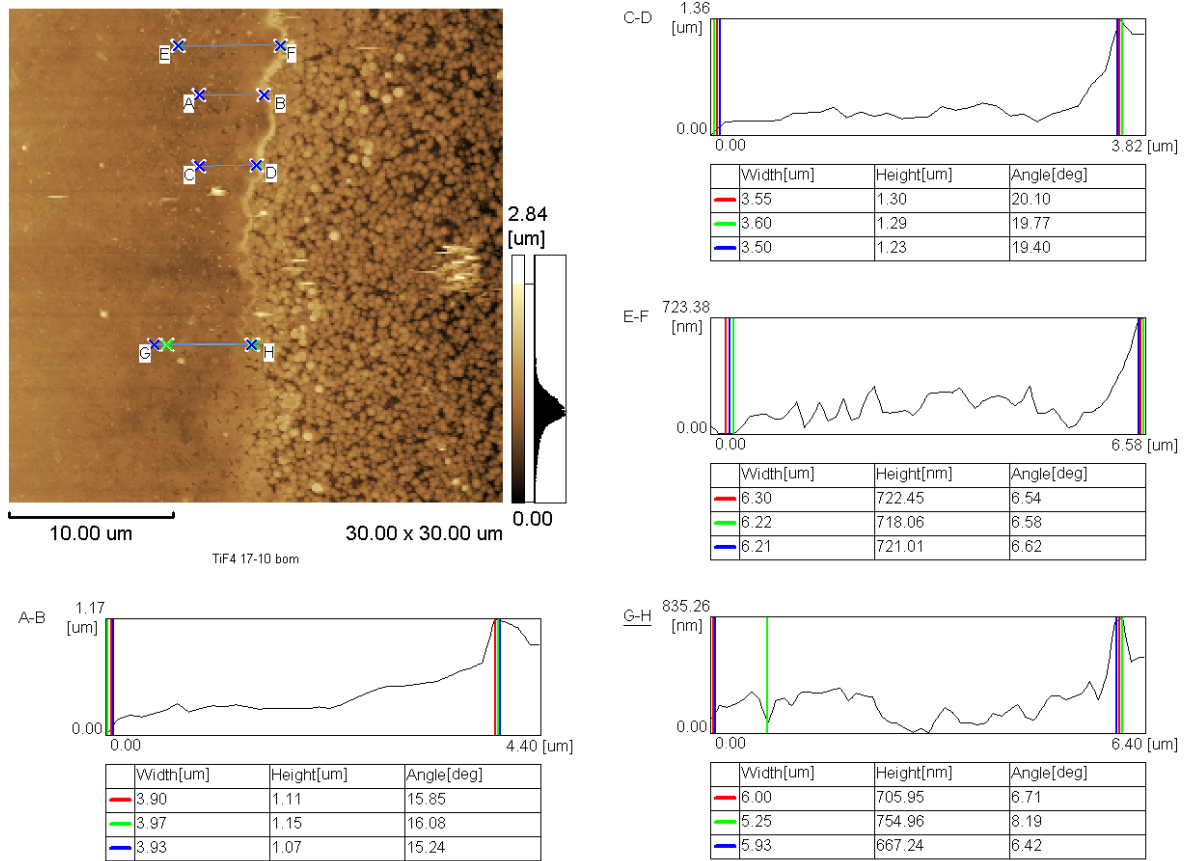


Figure 5 - AFM image of TiF<sub>4</sub> varnish group specimen with surface divided on side with varnish application + erosive challenge and side without varnish application + erosive challenge. The image shows the *Height Trace* tool used to obtain the values of thickness of layer formed.

Table 1. Composition of fluoride varnishes tested in the study.

Material	Composition (batch number)
<i>Duraphat</i> (Colgate-Palmolive, Ind. Com. Ltda, São Bernardo, SP, Brazil)	2.26% sodium fluoride, alcohol, natural resins, wax, saccharine, flavor - pH 4.5 (051001)
Experimental TiF <sub>4</sub> varnish (FGM, Joinville, SC, Brazil)	2.45% titanium tetrafluoride, ethanol, synthetic resin and natural resin – pH 3.4 (200313)

Table 2. Mean values ± standard deviation (GPa) of nanohardness and elastic modulus before and after NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes application and erosive challenge.

Groups (n=10)	Nanohardness		Elastic modulus	
	Baseline	Post-erosion	Baseline	Post-erosion
Control	4.9 ± 0.3 <sup>a*, A**</sup>	3.4 ± 0.4 <sup>b, B</sup>	124.2 ± 15.5 <sup>a, A</sup>	104.0 ± 8.5 <sup>b, B</sup>
NaF	4.8 ± 0.5 <sup>a, A</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>a, A</sup>	127.4 ± 10.3 <sup>a, A</sup>	121.7 ± 15.3 <sup>a, A</sup>
TiF <sub>4</sub>	5.0 ± 0.3 <sup>a, A</sup>	2.4 ± 0.8 <sup>b, C</sup>	128.5 ± 13.3 <sup>a, A</sup>	82.2 ± 14.3 <sup>b, C</sup>

\* Same lowercase letters indicate that there was no significant difference between baseline and post-erosive challenge values of each agent (paired-t- test, p>0.05).

\*\* Same uppercase letters indicate that there was no significant difference among groups in each experimental period (baseline and post-challenge) (Two-way ANOVA and Tukey test, p>0.05).

Table 3. Mean values ± standard deviation (nm) of depth of indentation (maximum height) and thickness of protective layer formed by NaF and TiF<sub>4</sub> varnishes application after erosive challenge.

Groups (n=5)	Depth Indentation (Maximum Height - nm)	Thickness of protective layer (nm)
Control	237.5 ± 19.7 <sup>*B</sup>	—
NaF	213.7 ± 17.1 <sup>C</sup>	53.1 ± 3.7 <sup>B</sup>
TiF <sub>4</sub>	296.9 ± 49.2 <sup>A</sup>	953 ± 255.7 <sup>A</sup>

\* Same uppercase letters indicate that there was no significant difference among groups (Two-way ANOVA and Tukey test, p>0.05).

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos no Capítulo 1 foi constatado que o consumo eventual de bebida a base de cola é capaz de promover o desenvolvimento inicial de erosão do esmalte dentário, ressaltando dessa forma, a importância da prevenção da erosão dentária mesmo em pacientes que ainda não tenham desenvolvido a doença, mas que se apresentem em um grupo de risco, como aqueles que costumam consumir refrigerantes.

Para isso o presente estudo mostrou o efeito do verniz de NaF e do verniz experimental de  $TiF_4$ . O verniz de NaF foi capaz de preservar as propriedades nanomecânicas do esmalte dentário quando da curta exposição a bebida a base de cola, com a formação e preservação da camada de  $CaF_2$ . Isso demonstra que este verniz foi eficaz na prevenção da desmineralização inicial ou amolecimento do esmalte causado por um eventual consumo de bebida ácida.

Quanto ao efeito do verniz experimental de  $TiF_4$ , este mostrou a formação de uma camada protetora mais espessa e homogênea comparada a do verniz de NaF, a tal ponto da análise de propriedades nanomecânicas terem sido feitas nesta camada e não no esmalte dentário.

Diante do exposto no presente estudo e em outras pesquisas <sup>24, 25, 30, 33</sup>, em relação aos efeitos promissores do verniz experimental de  $TiF_4$ , é de grande relevância clínica, para o tratamento da erosão dentária, que este verniz seja incorporado no mercado, pois existem relatos demonstrando que a eficácia dos vernizes fluoretados usados convencionalmente no tratamento da erosão dentária apresentam eficácia limitada, devido a possível dissolução da camada de  $CaF_2$  formada por estes compostos em ambiente ácido <sup>13, 48</sup>. Entretanto para isso se faz necessário a realização de mais pesquisas que procurem investigar as propriedades do verniz de  $TiF_4$  quando armazenado por longos períodos de tempo.

Outra questão a ser investigada seria a citotoxicidade deste composto, sabendo-se que essa citotoxicidade foi avaliada apenas para a solução de  $TiF_4$  em um único estudo *in vitro* <sup>42</sup>, no qual foi relatado um potencial citotóxico em fibroblastos desse composto devido a dissolução do  $TiF_4$  na água resultar em solução altamente ácida. Porém, foi sugerido que outras pesquisas fossem desenvolvidas para tal comprovação.

Dessa forma o presente estudo sugere a aplicação profissional do verniz a base de NaF para a prevenção da erosão dentária causada por eventuais consumos de bebidas ácidas, visto que entendemos que entre um eventual consumo de bebida ácida e outro, pode ocorrer desmineralização, caso a saliva e o flúor presente no ambiente bucal não consigam restabelecer o pH favorável para remineralização. O verniz de  $TiF_4$  possui potencial para ser utilizado clinicamente na prevenção e tratamento da erosão dentária <sup>24, 25, 30, 33</sup>, porém novas pesquisas devem ser conduzidas, principalmente *in situ* e *in vivo*, com este verniz para que o mesmo possa ser largamente utilizado clinicamente, como o verniz de NaF.

#### **4. CONCLUSÃO**

O verniz de NaF foi capaz de proteger as propriedades nanomecânicas de superfície do esmalte e criar uma camada protetora, após um curto tempo de exposição a bebida a base de cola. Para o verniz de  $\text{TiF}_4$ , os valores de nanodureza e módulo de elasticidade pós-erosão foram relacionados com a camada formada na superfície.

## REFERÊNCIAS\*

1 Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent.* 2005; 33: 243-252.

2 Anusavice K J. *Phillips Materiais Dentários.* São Paulo: Elsevier; 2005.

3 Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *J Oral Rehabil.* 2005; 32: 16–21.

4 Barbour ME, Shellis RP. An investigation using atomic force microscopy nanoindentation of dental enamel demineralization as a function of undissociated acid concentration and differential buffer capacity. *Phys Med Biol.* 2007; 52: 899-910.

5 Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range  $2.30 \leq \text{pH} \leq 6.30$  – a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 258-262.

6 Barbour ME, Finke M, Parker DM, Hughes JA, Allen GC, Addy M. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. *J Dent.* 2006; 34: 207-213.

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

---

\* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8 Beyer M, Reichert J, Bossert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Acids with an equivalent taste lead to different erosion of human dental enamel. *Dent Mater.* 2011; 27: 1017-1023.

9 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. 2012, 116 p.

10 Cheng Z, Wang X, Cui F, Ge J, Yan J. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomed.Mater.* 2009; 4: 1-7.

11 Chuajedong P, Kedjarune-Leggat U, Kertpon V, Chongsuvivatwong V, Benjakul P. Associated factors of tooth wear in southern Thailand. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 997-1002.

12 De Carvalho Filho ACB, Sanches RP, Martin AA, Do Espírito Santo AM, Soares LES. Energy Dispersive X-Ray Spectrometry Study of the Protective Effects of Fluoride Varnish and Gel on Enamel Erosion. *Microsc Res Tech.* 2011; 74: 839–844.

13 Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J: Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions: A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 9-14.

14 Ge J, Cui FZ, Wang XM, Feng HL. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials.* 2005; 26: 3333-3339.

15 Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 173 - 183.

- 16 Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions—A comparison of calcium and profilometric analyses. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 229-234.
- 17 Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The Protective Effect of TiF<sub>4</sub>, SnF<sub>2</sub> and NaF against Erosion-Like Lesions in situ. *Caries Res.* 2008; 42: 68–72.
- 18 Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The erosion-inhibiting effect of TiF<sub>4</sub>, SnF<sub>2</sub>, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65: 259-264.
- 19 Hove LH, Young A, Tveit AB. An in vitro Study on the Effect of TiF<sub>4</sub> Treatment against Erosion by Hydrochloric Acid on Pellicle-Covered Enamel. *Caries Res.* 2007; 41: 80–84.
- 20 Imfeld, T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 215–220.
- 21 Isaksson H. On dental caries and dental erosion in Swedish young adults. *Swed Dent J Suppl.* 2013; 232:1-60.
- 22 Jones L, Lekkas D, Hunt D, McIntyre J, Rafir W. Studies on dental erosion: An in vivo-in vitro model of endogenous dental erosion – its application to testing protection by fluoride gel application. *Aust Dent J.* 2002; 47: 304-308.
- 23 Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *J Dent.* 2009; 37: 233–236.
- 24 Levy FM, Magalhães AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, Buzalaf MAR: The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes and solutions on enamel in vitro. *Int J Paediatr Dent.* 2012; 22: 11-16.

- 25 Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC: Efficacy of TiF<sub>4</sub> and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive–abrasive wear. *Clin Oral Investig* 2013; DOI 10.1007/s00784-013-1096-y.
- 26 Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 280: 442-448.
- 27 Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Susceptibility of deciduous and permanent enamel to dietary acid-induced erosion studied with atomic force microscopy nanoindentation. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 61-66.
- 28 Lussi A, Jaeggi T. Erosion-Diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig* 2008; 12: 5-13.
- 29 Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B. Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. *Caries Res.* 2004; 38: 567-71.
- 30 Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR. The Effect of an Experimental 4% TiF<sub>4</sub> Varnish Compared to NaF Varnishes and 4% TiF<sub>4</sub> Solution on Dental Erosion in vitro. *Caries Res.* 2008; 42: 269–274.
- 31 Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF<sub>4</sub> and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent.* 2010; 38: 153-157.
- 32 Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Jorge Jr. AM, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: An in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol.* 2008; 53: 399-404.
- 33 Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha ACC, Buzalaf MAR. Effect of a Single Application of TiF<sub>4</sub> and NaF Varnishes and Solutions Combined with Nd:YAG Laser Irradiation on Enamel Erosion in Vitro. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 537-544.

- 34 Magalhães AC, Stancari FH, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. *J Dent.* 2007; 35: 858-861.
- 35 Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 75-86.
- 36 Mcknight-hanes C, Whitford GM. Fluoride release from three glass ionomer materials and the effects of varnishing with or without finishing. *Caries Res* 1992; 26: 345 - 350.
- 37 Murakami C, Bönecker M, Corrêa MSNP, Mendes FM, Rodrigues CRMD. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 997-1001.
- 38 Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Corrêa MSNP, Haddad AE, Bönecker M. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. *Caries Res.* 2011; 45:121-9.
- 39 Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JL. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica.* 2006; 19: 385-393.
- 40 Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res* 1992; 7: 1564 - 1583.
- 41 Saxegaard E, Rølla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96: 523-535.
- 42 Sen BH, Kazemi RB, Spangberg LS: Morphologic effects on L929 fibroblasts of titanium tetrafluoride application. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86: 341-346.

43 Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and Models in Erosion Research: Discussion and Conclusions. *Caries Res.* 2011; 45: 69-77.

44 Søvik JB, Tveit AB, Storesund T, Mulic A. Dental erosion: a widespread condition nowadays? A cross-sectional study among a group of adolescents in Norway. *Acta Odontol Scand.* 2014; Doi:10.3109/00016357.2013.875588.

45 Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MC. Inhibition of Erosive Wear by Fluoride Varnish. *Caries Res.* 2007; 41: 61-67.

46 Vieira A, Lugtenborg M, Ruben JL, Huysmans MC. Brushing abrasion of eroded bovine enamel pretreated with topical fluorides. *Caries Res.* 2006; 40: 224-230.

47 Vieira A, Ruben, JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2005; 25: 371-379.

48 Wiegand A, Attin T: Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 245-253.

49 Wiegand A, Köwing L, Attin T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 1043-1047.

50 Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhães AC, Attin T. Comparison of the Effects of TiF<sub>4</sub> and NaF Solutions at pH 1.2 and 3.5 on Enamel Erosion in vitro. *Caries Res.* 2009; 43: 269–277.

51 Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, Attin T. Protective Effect of Different Tetrafluorides on Erosion of Pellicle-Free and Pellicle-Covered Enamel and Dentine. *Caries Res.* 2008; 42: 247–254.

52 Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent.* 2010; 8: 159-64.

53 Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and toothcoloured filling materials. *J Dent.* 2006; 34: 214-220.

54 World Health Organization. The world oral health report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21<sup>st</sup> century – the approach of the WHO global oral health programme. Geneva: WHO; 2003.

55 Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 162-177.

## ANEXO 1

### Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 4ª Reunião realizada no dia 23/04/2013, o projeto de pesquisa intitulado: “EFEITOS IN VITRO DE AGENTES REMINERALIZANTES NAS PROPRIEDADES NANOMECÂNICAS E DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO À EROÇÃO” da Pesquisadora Maria Isabel Dantas de Medeiros. Prot. nº 0056/13. CAAE: 08660713.5.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.

  
Dr<sup>a</sup> Eliane Marques D. Sousa  
Coordenadora CEP/CCS/UFPB  
Mat. SIAPE: 0332618

## ANEXO 2

### Comprovação de Submissão do artigo

<https://br-mg6.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=2t88dtot7emht#mail>

---

<b>Assunto:</b>	Submission Confirmation for Journal of Dentistry
<b>De:</b>	Journal of Dentistry (JoD@elsevier.com)
<b>Para:</b>	fabigalbi@yahoo.com.br;
<b>Data:</b>	Segunda-feira, 27 de Janeiro de 2014 18:57

---

Dear Prof. Carvalho,

Your submission entitled "Effect of NaF and TiF4 varnishes on nanomechanical properties of enamel surface and protective layer after a short erosive challenge" has been received by the Journal of Dentistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jjod/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Matt Walmsley  
Journal Manager  
Journal of Dentistry

## **APÊNDICE**

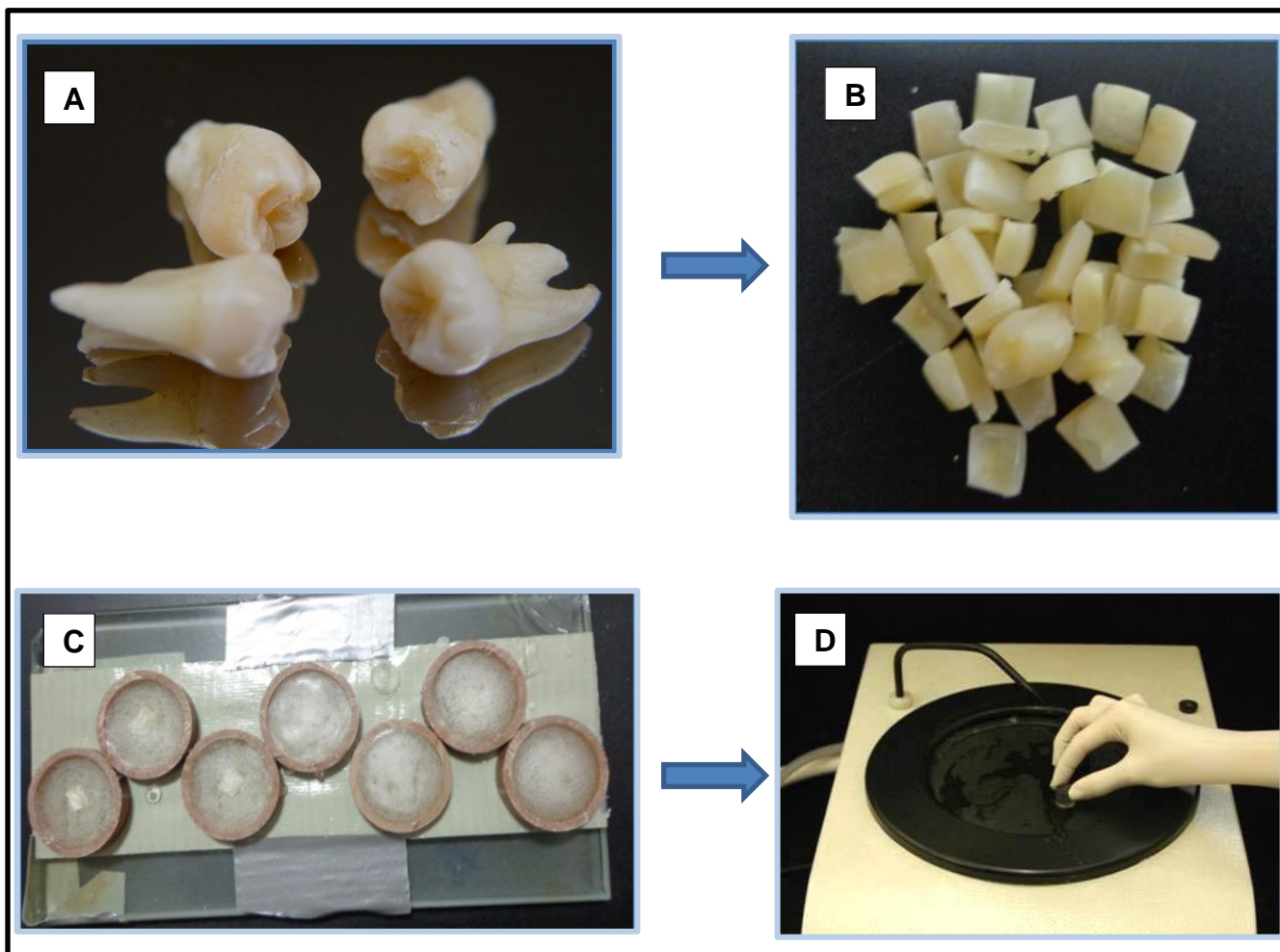
### **METODOLOGIA**

#### **Preparo das amostras**

Após obtenção da aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Anexo 1), 25 terceiros molares hígidos foram selecionados para este estudo (Figura 1A). Os dentes coletados foram armazenados em solução de timol a 0,1% por um período máximo de 1 mês, e congelados a 4°C até o momento de sua utilização.

Dois blocos de esmalte (4 x 4 x 3 mm) com área de 16 mm<sup>2</sup> foram obtidos da superfície mais plana de cada dente utilizando disco diamantado dupla face (7016, KG Sorensen –Barueri, SP, Brasil) em peça de mão do micromotor, sob refrigeração (Figura 1B). Cinquenta corpos de prova foram confeccionados por meio do embutimento de cada bloco de esmalte em resina acrílica autopolimerizável (Vipi Flash – Pirassununga, SP, Brasil). Para este fim, a superfície externa do esmalte de cada bloco foi fixada em fita adesiva, aderida a uma placa de vidro. Em seguida, cada bloco de esmalte foi envolto por um tubo de PVC e a resina acrílica foi inserida no interior do mesmo (Figura 1C).

Os corpos de prova foram polidos serialmente em politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil) com discos de lixa de carbetto de silício de granulação 400, 600 e 1200 e suspensão de alumina de 1µm (Erios - Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda, SP, Brasil), sob irrigação constante (Figura 1D). Em seguida, os corpos de prova foram inseridos em ultrassom (Ultrassom Cleaner, modelo USC1400, Unique Ind. e Com. Ltda, São Paulo) com água destilada por 2 minutos para remoção de impurezas, e foram inspecionadas em microscópio óptico (Nikon 88286, Tokyo, Japan) com aumento de 40x para avaliação de trincas e fraturas.



**Figura 1** – Imagem do preparo das amostras. (A) Terceiros molares hígidos. (B) Blocos de esmalte 4 x 4 x 3 mm. (C) Embutimento dos blocos de esmalte. (D) Polimento em politriz.

### **Nanoindentação inicial**

Na superfície de esmalte de cada corpo de prova (Figura 2A) foi realizada a análise de nanodureza e módulo de elasticidade inicial. Cinco nanoindentações no centro da superfície do esmalte de cada corpo de prova foi feito utilizando o Ultramicrodurômetro (Shimadzu – DUH-211S, Kyoto, Japão), do laboratório de Laboratório de Solidificação Rápida – Centro de tecnologia (CT)/UFPB (Figura 2B), com a ponta de diamante Berkovich, a qual possui uma geometria piramidal de três lados, com cada lado formando um ângulo de  $65,3^\circ$  com um plano normal à base da pirâmide. A carga de  $5000 \mu\text{N}$  (5mN) e velocidade de carregamento de

311,3μN/s foram utilizadas <sup>4</sup>. A média dos valores das cinco indentações foi obtida e considerada como medida inicial.

O método descrito por Oliver e Pharr <sup>37</sup> foi utilizado para o cálculo da nanodureza (H) e do módulo de elasticidade do esmalte (E) por meio das fórmulas:

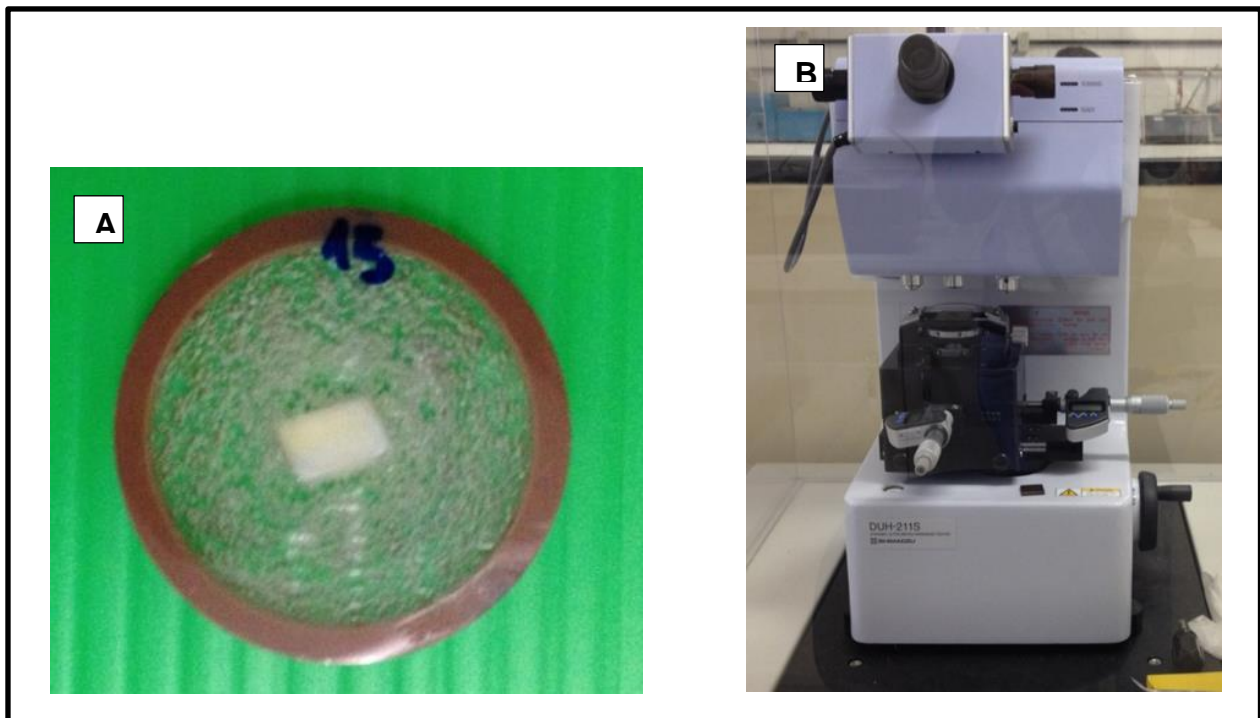
$$H = P_{\max} / A_c$$

Onde  $P_{\max}$  é o pico da carga e  $A_c$  é a área de contato.

$$1/E_r = (1 - \nu^2) / E + (1 - \nu_i^2) / E_i$$

Onde E e  $\nu$  são o módulo de elasticidade e coeficiente de Poisson da amostra, e  $E_i$  e  $\nu_i$  são os parâmetros do indentador, respectivamente. Coeficiente de Poisson do esmalte foi de 0.4 <sup>14</sup>.

Baseado no estudo de Lippert, Parker e Jandt <sup>25</sup>, onde o valor médio de nanodureza, para superfície de esmalte de dente permanente humano, encontrado foi de 4,85 GPa, foram selecionadas apenas as amostras com valores de nanodureza até 20% acima ou 20% abaixo desse valor.



**Figura 2** – Teste de nanoindentação. (A) corpo de prova. (B) Ultramicrodurômetro (Shimadzu – DUH-211S, Kyoto, Japão).

## Tratamento com vernizes fluoretados

Foram selecionados 30 corpos de prova, e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=10), de acordo com a aplicação dos vernizes fluoretados (Tabela 1)

- Grupo 1: controle – sem aplicação de agente fluoretado.
- Grupo 2: Verniz Duraphat® (NaF, 2,26% F, pH 4,5, Colgate, São Bernardo, SP, Brasil) (Figura 3A);
- Grupo 3: Verniz experimental de TiF<sub>4</sub> (2,45%F, pH 3,4, FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) (Figura 3B);

**Tabela 1** - Composição dos vernizes fluoretados testados neste estudo.

Material	Composição (número do lote)
Duraphat(Colgate-Palmolive, Ind. Com. Ltda, São Paulo, Brasil)	Fluoreto de Sódio a 2,26%, álcool, resinas naturais, cera, sacarina, sabor - pH 4,5 (05 10 01)
Verniz experimental de TiF <sub>4</sub> (FGM, Joinville, SC, Brasil)	Tetrafluoreto de titânio a 2,45%, etanol, resina sintética e resina natural – pH 3,4 (200313)

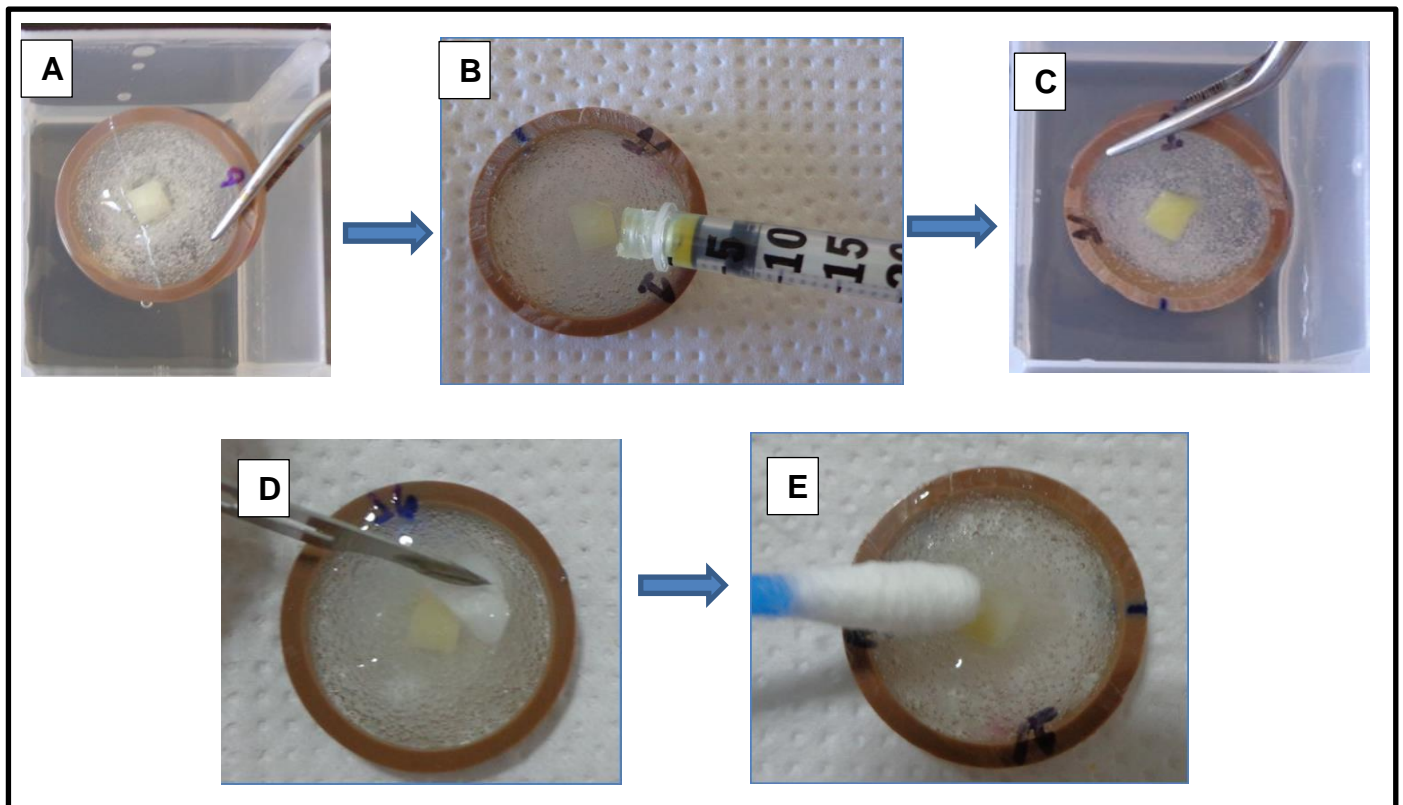


**Figura 3** – Vernizes fluoretados. (A) Verniz Duraphat®.  
(B) Verniz experimental de TiF<sub>4</sub>.

Além das amostras distribuídas nos grupos, mais dez amostras foram selecionadas para avaliação da espessura da camada protetora formada pela aplicação dos vernizes.

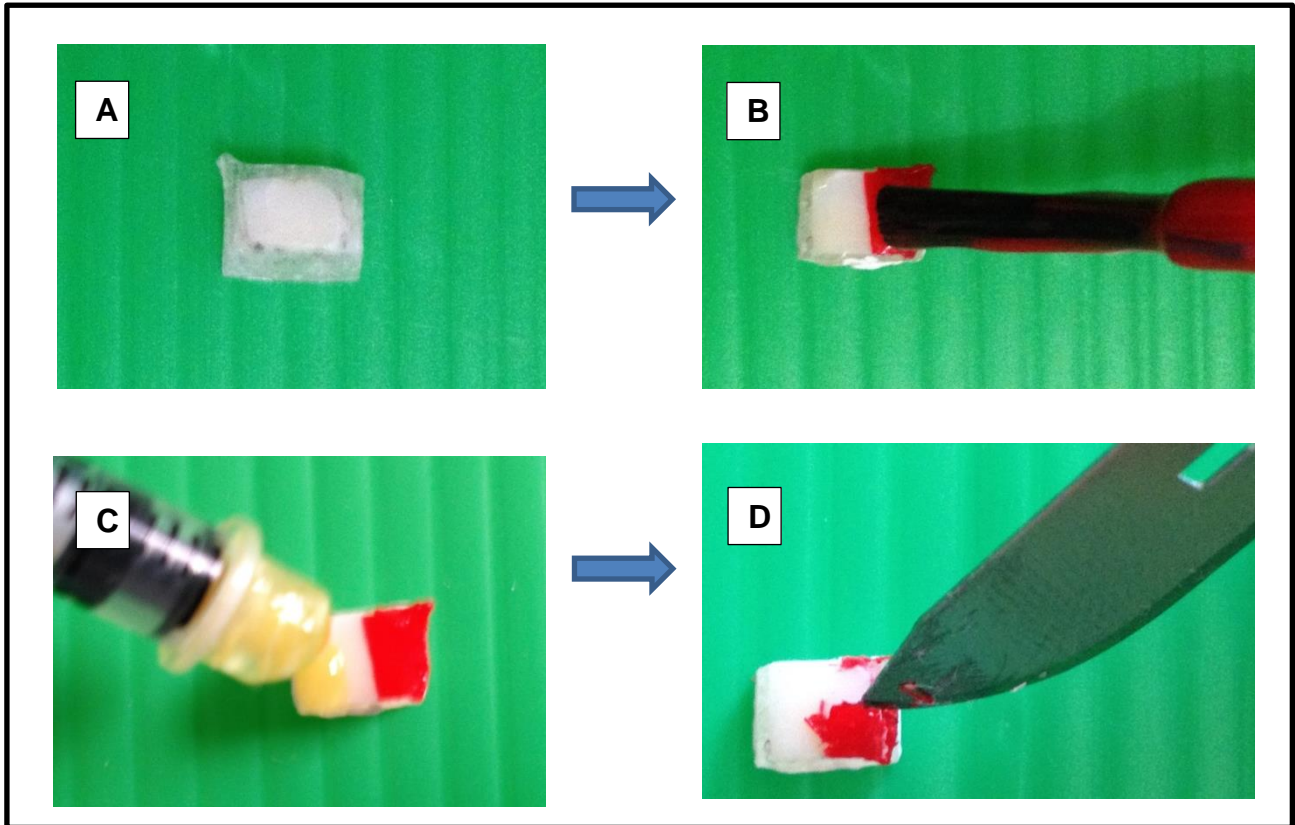
Os corpos de prova foram imersos em saliva artificial durante 24 horas (Figura 4A) para simular a formação da película adquirida do esmalte<sup>30</sup>. Após, em cada amostra foi aplicado o verniz de acordo com cada grupo e seguindo as recomendações dos fabricantes. Cada produto foi inserido individualmente em seringa de insulina de 0,3 mL (BD Ultra-fine, Franklin Lakes, NJ, USA) para padronizar a quantidade do agente aplicado na superfície de esmalte.

Nos grupos 2 e 3, 20µL dos vernizes fluoretados foram aplicados na superfície da amostra e espalhados com microbrush (Figura 4B). Depois, foram imersos em saliva artificial por 6 horas (Figura 4C), com o objetivo de simular clinicamente o tempo de contato do verniz com a superfície dentária<sup>29, 31, 32</sup>. Após este período, os vernizes foram removidos cuidadosamente, com o auxílio de lâmina de bisturi (Figura 4D) e pelota de algodão embebida em acetona (Figura 4E), evitando tocar na superfície de esmalte<sup>29, 32</sup>. No grupo 1 (controle) nenhum produto foi aplicado e as amostras foram imersas em saliva artificial até o período de 6h. O método de produção da saliva artificial utilizado foi similar ao de McKnight-Hanes e Whitford<sup>34</sup>, porém excluindo o sorbitol (em g:L): 2 g de Metil-p-hidroxibenzoato; 0,625 g de carboximetilcelulose de sódio; 0,059 g de MgCl<sub>2</sub> - 6H<sub>2</sub>O; 0,166 g de CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O; 0,804 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,326 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ajustando o pH para 6,75 com KOH. Os vernizes foram aplicados uma única vez antes do desafio erosivo<sup>29, 35</sup>.



**Figura 4** – Tratamento com vernizes fluoretados. (A) Saliva artificial por 24 horas. (B) Aplicação do verniz. (C) Saliva artificial por 6 horas. (D) e (E) Remoção do verniz.

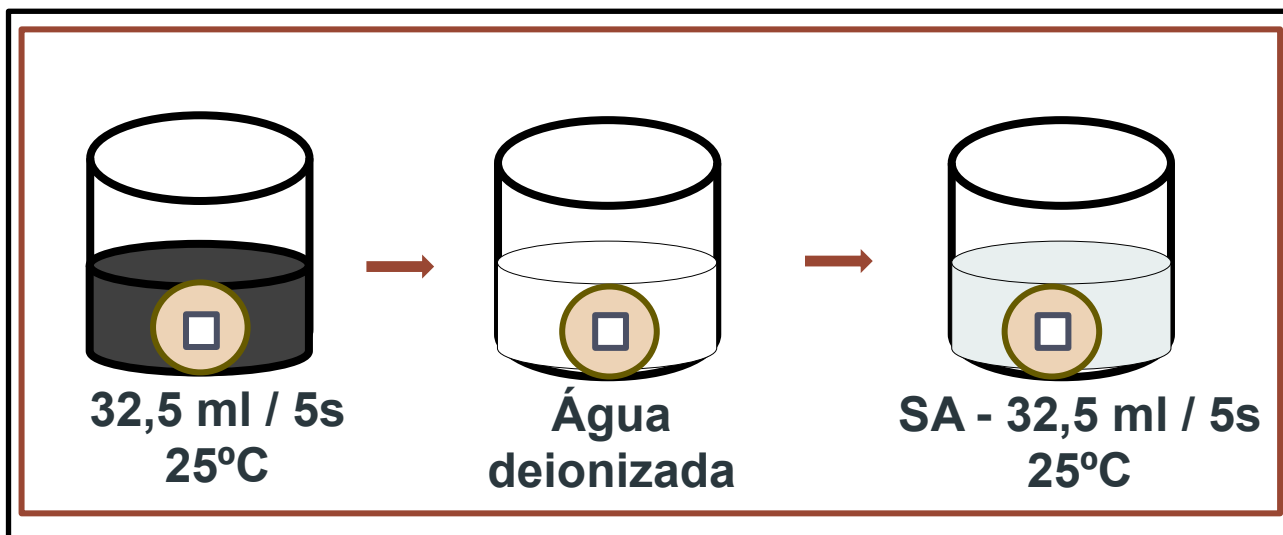
Para avaliação da espessura da camada protetora formada pelos vernizes de  $\text{TiF}_4$  e  $\text{NaF}$ , cinco amostras foram preparadas para cada grupo do verniz (Figura 5A). A superfície do esmalte foi dividida em duas partes iguais: uma metade da superfície foi coberta com duas camadas, ácido-resistente, de esmalte de unhas (superfície controle - sem aplicação de verniz) (Figura 5B) e na outra metade foi aplicado o verniz fluoretado, tal como descrito, de acordo com cada grupo (Figura 5C). Após a aplicação de flúor, o esmalte foi removido com uma lâmina de bisturi (Figura 5D), e toda a superfície do espécime foi submetida ao desafio erosivo.



**Figura 5** – Preparo de amostras para avaliação da espessura da camada protetora. (A) Amostra. (B) Cobertura com esmalte de unha. (C) Aplicação do verniz fluoretado. (D) Remoção da camada de esmalte de unha.

### **Desafio erosivo**

O desafio erosivo foi realizado para simular um curto tempo de exposição a refrigerante a base de cola (Coca cola<sup>®</sup>, pH 2,6, Coca-Cola Company, Porto Real, RJ, Brasil) de acordo com Wongkhantee et al.<sup>49</sup>: as amostras foram imersas em 32,5 mL de coca cola por 5 s em temperatura ambiente (25°C), lavadas em água deionizada e, em seguida, imersas em 32,5 mL de saliva artificial em temperatura ambiente (25°C) por 5 s (Figura 6). Este ciclo foi repetido 10 vezes. As amostras foram mantidas em 100% de umidade.



**Figura 6** – Esquema do desafio erosivo utilizado

### **Nanoindentação final**

Na área de superfície foram realizadas as medidas de nanodureza e módulo de elasticidade final (após desafio erosivo) como descrito no item de “Nanoindentação inicial”.

A profundidade da indentação para cada amostra após aplicação do verniz e desafio erosivo foi dada pelo software do ultramicrodurômetro e determinada como altura máxima (nm). Os valores de profundidade da indentação foram comparados com os valores de espessura da camada protetora formada pela aplicação dos vernizes, para investigar se a indentação foi realizada sobre a superfície de esmalte ou na camada protetora.

### **Microscopia Óptica**

Cinco espécimes de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para avaliar o aspecto da camada formada após a aplicação do verniz e desafio erosivo por meio de Microscópio Óptico (Axiotech) (Figura 7), com um aumento de 100x.



**Figura 7** – Microscópio Óptico (Axiotech).

### **Microscopia de força atômica**

A superfície de esmalte dos mesmos corpos de prova selecionados para análise em microscopia óptica foi analisada em Microscópio de Força Atômica (Shimadzu – SPM-9600, Kyoto, Japão) (Figura 8), do Laboratório de Solidificação Rápida – CT/UFPB. Cada espécime foi fixado ao suporte do microscópio sobre um “stub” (2 x 3 mm). A morfologia da superfície foi analisada no “modo de contato”. As imagens foram obtidas com a ponta de geometria padrão de Microcantilever com composição de nitreto de silício (OMCL -TR , Olympus, Tóquio, Japão) e utilizada com constante elástica de 0,15 N/m e 24 KHz de frequência. Foram coletadas imagens de 30 $\mu$ m x 30 $\mu$ m com resolução de 256 X 256 pixels e ponto de operação de 1,5 V, em uma taxa de varredura muito baixa para obter detalhes da estrutura do esmalte e para evitar que a ponta fosse danificada.

As amostras preparadas para medir a espessura da camada protetora formada por ambos os vernizes foram analisadas utilizando os mesmos parâmetros descritos. Após a captura de imagem, foi utilizada a ferramenta “Height Trace”. Quatro linhas paralelas foram feitas em cada espécime. Cada esboço começou na metade controle (sem aplicação de flúor) e terminou na metade que foi aplicado o verniz fluoretado. A diferença de altura de cada linha foi registrada pela ferramenta “Height Trace” para obtenção da espessura da camada de proteção. Foi feita uma média da espessura (nm) para cada grupo.



**Figura 8** - Microscópio de Força Atômica (Shimadzu).

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados com o GraphPad InStat versão 2.0 (software GraphPad, La Jolla, USA) com nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Todas as variáveis testadas assumiram igualdade de variância e distribuição normal (teste Bartlett e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente), os testes de Two-Way ANOVA e Tukey foram realizados para comparação estatística de nanodureza e módulo de elasticidade do esmalte entre os grupos. O teste T pareado foi usado para comparar os valores de nanodureza e módulo de elasticidade, iniciais (sem aplicação dos vernizes e erosão) e finais (depois do desafio erosivo), dentro de cada grupo.