



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

DIEGO FELIPE MARDEGAN GONÇALVES

**EFEITO DE DENTIFRÍCIO COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE
FLÚOR NA REMINERALIZAÇÃO E RESISTÊNCIA DE UNIÃO
DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO EM SUBSTRATOS
DENTÁRIOS COM CÁRIE ARTIFICIAL**

Araçatuba - SP
2021

DIEGO FELIPE MARDEGAN GONÇALVES

**EFEITO DE DENTIFRÍCIO COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE
FLÚOR NA REMINERALIZAÇÃO E RESISTÊNCIA DE UNIÃO
DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO EM SUBSTRATOS
DENTÁRIOS COM CÁRIE ARTIFICIAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi

Araçatuba - SP
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G635e	Gonçalves, Diego Felipe Mardegan Efeito de dentifrício com alta concentração de flúor na remineralização e resistência de união de cimento de ionômero de vidro em substratos dentários com cárie artificial / Diego Felipe Mardegan Gonçalves. - Araçatuba, 2021 55 f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes
Tozzi	1. Esmalte dentário 2. Dentina 3. Cimentos de ionômero de vidro 4. Dentifrícios I. T. Black D2 CDD 617.6

Dedicatória

Dedico este trabalho à Denize Mardegan, minha mãe, João Victor Mardegan Gonçalves, meu irmão, e aos meus avós: Jesus Gonçalves, Helena Gonçalves, Oscar Mardegan (*in memoriam*) e Irene Mardegan. Ter concluído essa etapa só foi possível pelo apoio e pelas orações de vocês!

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, pelo dom da vida, equilíbrio mental e espiritual diante das dificuldades e por conceder a mim tantas oportunidades e conquistas.

Aos meus pais e irmão, **Denize Mardegan e José Gonçalves, e João Victor**, pelo amor e dedicação dispensados ao longo da minha vida, por acreditar em meus sonhos, por me ensinar a buscar a excelência e por compreender que toda a ausência física em momentos em família tem sido para criar oportunidades de um futuro melhor para nós!

Aos meus avós, **Helena e Jesus Gonçalves, e Irene Mardegan**, por serem pessoas incríveis e apostarem todas as fichas em mim. Pelas orações, pelo colo, apoio emocional, pelos conselhos e por ensinarem a encarar todas as experiências com otimismo. Ter chegado até aqui foi um mérito nosso!

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional em todos os momentos,

A minha orientadora, **Profa. Ticiane Fagundes**, pelas oportunidades que me proporcionou desde a iniciação científica, por ser tão humana e compreensível diante das minhas limitações. MUITÍSSIMO obrigado pela confiança depositada em mim e pela paciência ao longo de todo esse tempo. Aprendi muito com a senhora sobre buscar respostas, estabelecer um foco na vida e ter determinação para concluir cada etapa independente das dificuldades, pois os resultados surgirão como frutos de muita dedicação.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Bruna de Oliveira Reis, e Profa. Denise Pedrini Ostini**, por aceitarem prontamente o convite para participar desse momento tão importante, por serem seres humanos cheios de luz e transmitirem tanta empatia em uma simples conversa.

Ao nosso grupo de pesquisa, representado pela **Érika Omoto, Fernanda Ramos, Laryssa Castro e Taísa Zago**. Não há palavras no mundo que possam traduzir a minha eterna gratidão pelo apoio de vocês! Saibam que foram fundamentais para que eu conseguisse concluir esta etapa e que

independentemente de onde estiver estarei torcendo por cada conquista e sucesso na vida pessoal e na carreira de vocês!

Aos amigos **Gabriel Nunes e Leonardo Moraes**, por serem companheiros de apartamento e compartilharem tantos momentos ao longo desse tempo em que moramos juntos. Cada um com suas características, estiveram sempre prontos a me ajudar, seja em dúvidas científicas ou até mesmo em planejar viagens. Tenho a certeza de que o futuro de vocês será brilhante, pois são pessoas esforçadas e trabalham arduamente para alcançarem seus objetivos! Contem comigo sempre!

Aos meus amigos de Mirandópolis, **Camila Batista, Franci Helen, Gabriel Brufatto, Paulo Anhani** por estarem sempre presentes, seja nos fins de semana ou por vídeo-chamadas. Só quem precisa se ausentar por determinado tempo pode reconhecer a importância de ter bons amigos!

Aos irmãos que Araçatuba me deu, **Renan Fernandes e Luciene Castro**, pela convivência nos últimos anos, por compartilharem grandes momentos da vida de vocês comigo e por todas as boas lembranças que certamente levarei por onde for. MUITÍSSIMO obrigado pela amizade e por tornarem a caminhada leve!

Aos meus amigos **Fernanda Furuse, Júlio Martinez, Pedro Petrilli, Sthaelle Albuquerque**, pelas caminhadas, momentos de descontração, viagens, e pelos fins de semana em Araçatuba. Estendo o agradecimento a toda família Furuse pelo acolhimento e bons momentos durante este período.

Ao meu grupo de amigos da Turma XV, **Cíntia Martinez, Gleice Ramirez, Lia Kobayashi, Jaqueline Hassumi e Roberta Kanda**, obrigado por manterem viva a amizade que criamos durante a graduação e estarem sempre disponíveis para aconselhar, apoiar e até mesmo planejar a vida profissional.

Aos amigos **Caio Pavani, Isis Hoshino, Lara Esteves e Laura Vieira**, por serem tão parceiros em momentos críticos e de alegria também. Fico muito feliz por ter a oportunidade de acompanhar o crescimento profissional de vocês e torço muito pelo sucesso de cada um!

Aos colegas do **Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora**, pela receptividade, amizade, “coffee time” e ajuda em toda a caminhada. Se não fosse o bom convívio proporcionado ao longo desses anos certamente a caminhada não teria sido tão agradável!

“Que a vida retribua a cada um por todo o bem semeado na minha vida e na vida de todos aqueles que ainda virão!”

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Professor Dr. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Professor Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, por ser a instituição que viabilizou o sonho de me tornar Cirurgião-dentista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, representado pelo coordenador **Professor Dr. André Luiz Fraga Briso**, por estimular desde a aula inaugural a manter a excelência e qualidade dos artigos oriundos das pesquisas desenvolvidas em nosso programa.

Aos professores da Pós-Graduação, **André Luiz Fraga Briso, Paulo Henrique dos Santos, Renato Herman Sundfeld, Rodolfo Bruniera Anchieta e Ticiane Cestari Fagundes Tozzi**, pelas considerações e sugestões durante os seminários e discussão dos projetos; certamente esses detalhes fizeram diferença durante minha passagem pelo mestrado.

Às colaboradoras da secretaria de Pós-Graduação, **Cristiane Lui, Lilian Mada e Valéria Zagatto**, por se manterem firmes e conduzirem com maestria as questões burocráticas dos Programas de Pós-Graduação.

Aos colaboradores **Carlos Suetake e Jorge Trevelim**, pelo suporte oferecido na manutenção do laboratório, fundamentais para execução de todas as atividades.

Aos colaboradores da biblioteca, **Ana Cláudia e Cláudio Matsumoto**, que em muito auxiliam na busca de artigos ou dúvidas referentes à elaboração da dissertação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil – Código de Financiamento 001**, e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2019/13326-8**.

Επίγραφε

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

Resumo

GONÇALVES, D. F. M. **Efeito de dentifrício com alta concentração de flúor na remineralização e resistência de união de cimento de ionômero de vidro em substratos dentários com cárie artificial.** 2021. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes dentifrícios na dureza de superfície, em secção transversal e perfil de desgaste do esmalte, assim como na resistência de união de cimentos de ionômero de vidro de alta viscosidade (CIV-AV) à dentina, após indução de cárie artificial, ciclagem de pH e escovação. Foram utilizados 80 dentes bovinos, divididos em blocos de esmalte e dentina. Os espécimes de esmalte foram polidos e selecionados de acordo com a microdureza. Em seguida, metade de cada bloco de esmalte foi protegida com verniz ácido resistente. Os espécimes de dentina foram incluídos em resina acrílica e planificados. O protocolo de cárie artificial foi feito através de ciclos de desmineralização em esmalte (n=20) e pela imersão da dentina (n=40) em solução desmineralizadora. Vinte amostras de dentina não foram submetidas à cárie, sendo o grupo controle. Todas as amostras foram submetidas à ciclagem de pH e escovação durante 7 dias de acordo com cada dentifrício: Colgate Total 12 1450 ppm F (CT) e Clinpro 5000 ppm F + TCP (CL). Em seguida, os blocos de esmalte foram submetidos às análises de dureza de superfície, em secção transversal e perfilometria. Microscopia eletrônica de varredura foi realizada em três blocos representativos de cada grupo. Os espécimes de dentina foram subdivididos de acordo com material restaurador: CIV-AV Ketac Molar (KM) e cimento ionomérico híbrido Equia Forte (EF). Em seguida, as amostras foram armazenadas sob umidade relativa durante 24 horas e preparados para o teste de microcissalhamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA) 1 critério para avaliar a recuperação mineral e perfil de desgaste, ANOVA 2 critérios com medidas repetidas para avaliar a dureza de superfície e em secção transversal, ANOVA 3 critérios para avaliar o microcissalhamento e pós teste de Tukey para comparações múltiplas, com significância de 5%. Observou-se recuperação parcial da dureza de superfície, independente do dentifrício. Os dados da dureza em secção

transversal evidenciaram que CL obteve valores inferiores a CT até 90 micrômetros (μm) no lado teste. O dentifrício CT apresentou maior desgaste quando comparado à CL. Em dentina, ao comparar os dentifrícios dentro de cada CIV, CT apresentou maior resistência adesiva para ambos os materiais. A comparação entre CIVs dentro do mesmo dentifrício evidenciou resistência adesiva superior para KM quando comparado à EF na dentina tratada com CL. Conclui-se que o dentifrício com maior concentração de flúor promoveu menor dureza em secção transversal no esmalte e o dentifrício convencional resultou em maior desgaste superficial. Na superfície dentinária, o dentifrício com maior concentração de flúor diminuiu a resistência adesiva de cimentos de ionômero de vidro.

Palavras-chave: Esmalte dentário. Dentina. Cimentos de ionômeros de vidro. Dentifrícios.

Abstract

GONÇALVES, D. F. M. **Effect of dentifrice with high concentration of fluoride under remineralization and bond strength of glass ionomer cement on dental substrates with artificial caries.** 2021. 55 f. Dissertation (Master degree) – Araçatuba School of Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of different dentifrices on surface hardness and cross-sectional hardness, wear profile on enamel, as well as on the bond strength of high viscosity glass ionomer cements (HV-GIC) to dentin, after to produce artificial caries, pH cycling and brushing. Eighty bovine teeth were used, divided into enamel and dentin blocks. The enamel specimens were polished and selected according to microhardness. Then, half of each enamel block was covered with resistant acid varnish. Dentin specimens were embedded in acrylic resin and flattened. The artificial caries protocol was carried out through enamel demineralization cycles (n= 20), and the dentin (n= 40) was immersed in demineralizing solution. Twenty dentin specimens were not subjected to artificial caries, being the control group. All blocks were subjected to pH cycling and brushing for 7 days according to each dentifrice: Colgate Total 12 1450 ppm F (CT) and Clinpro 5000 ppm F + TCP (CL). Then, the protected enamel surfaces were exposed for the analysis of surface hardness, cross sectional hardness and profilometry. Scanning electron microscopy was performed in three representative blocks of each group. The dentin specimens were subdivided according to restorative material: HV-GIC Ketac Molar (KM), and hybrid GIC Equia Forte (EF). Then, the specimens were stored under relative humidity for 24 hours and prepared for the micro-shear test. The data were submitted to normality test, one-way analysis of variance (ANOVA) to assess mineral recovery and wear, two-way repeated measures ANOVA to assess surface and cross-sectional hardness, and three-way ANOVA to analyze the bond strength. Tukey post-test was used for multiple comparisons, with a significance level of 5%. It was observed a partial recovery of superficial microhardness, regardless of the dentifrice. Cross sectional hardness data showed that CL obtained values below CT up to 90 micrometers (μm) on the test side. CT dentifrice presented greater wear when compared to CL. In dentin, when the dentifrices were compared within each GIC, CT showed greater adhesive resistance for both materials. A comparison

between GICs within the same dentifrice showed superior adhesive resistance for KM when compared to EF in dentin treated with CL. It was concluded that the dentifrice with the highest fluoride concentration promoted less cross-sectional hardness in the enamel and the conventional dentifrice resulted in greater surface wear. On the dentin, the dentifrice with the highest fluoride concentration decreased the adhesive strength of glass ionomer cements.

Keywords: Tooth enamel. Dentin. Glass ionomer cement. Toothpaste.

Listas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fluxograma do desenho experimental.	29
FIGURA 2 -	Processo detalhado da obtenção, inclusão e seleção dos espécimes. A) Dente bovino colado em placa de acrílico B) Cortes longitudinais em cortadeira de precisão C) Obtenção dos blocos D) Politriz metalográfica E) Bloco colado para polimento F) Aspecto final do bloco G) Microdurômetro H) Análise da dureza inicial.	31
FIGURA 3 -	Etapa de indução da cárie artificial. A) Bloco de esmalte com hemiface protegida para indução do desafio de cárie. B) Modelo aplicado para induzir cárie artificial.	32
FIGURA 4 -	Etapa de inclusão e escovação realizados em dentina. A) Processo de inclusão dos espécimes de dentina em resina acrílica B) Aspecto final após inclusão C) Pipetagem do dentifrício sobre os espécimes D) Escovação com escova elétrica.	33
FIGURA 5 -	Procedimento restaurador em dentina. A) Adaptação da matriz de silicone sobre os espécimes B) Pesagem do CIV KM C) Inserção de CIV KM com seringa Centrix D) Inserção de CIV EQ em dispositivo próprio E) Lâmina de vidro sobre os espécimes para extravasar excessos.	35
FIGURA 6 -	Micrografia da superfície do esmalte dentário no lado controle (A), tratado com o dentifrício CT (B) e CL (C). A Figura D evidencia a formação de cárie subsuperficial em esmalte através de um modelo de pH dinâmico (desmineralização e remineralização). A marcação mostra a lesão de subsuperfície formada. As Figuras A-C foram feitas em aumento de 3000x, enquanto a Figura D em 1000x.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Nome comercial, composição e fabricante dos materiais utilizados	30
TABELA 2 -	Média e desvio padrão da dureza de superfície (KHN) e recuperação mineral (%) do esmalte	39
TABELA 3 -	Média e desvio padrão da dureza em secção transversal (KHN) do esmalte	40
TABELA 4 -	Média e desvio padrão da análise de microcisalhamento (MPa) da dentina hígida e submetida à cárie	41

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição do padrão de fratura (%) entre os grupos 42
experimentais

LISTAS DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%SHR	Percentual de recuperação mineral
$\sqrt{\text{KHN}}$	Raiz quadrada da dureza Knoop
A	Área da interface de união
ANOVA	Análise de variância
Ca	Cálcio
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Nitrato de cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIV	Cimento de ionômero de vidro
CIV-AV	Cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade
CL	Clinpro
CT	Colgate Total 12
EF	Equia Forte
F	Fluoreto
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Gramas
H_2O	Água
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
KHN	<i>Knoop Hardness Number</i>
KM	Ketac Molar
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Mili molar
mm^2	Milímetros quadrados
mmol/L	Milimol/Litro
MPa	Megapascal
N	Newton

n	Tamanho amostral
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaF	Fluoreto de sódio
NaN ₃	Azida sódica
NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Graus Celsius
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
Ra	Rugosidade média
RDA	<i>Relative Dentin Abrasivity</i>
REA	<i>Relative Enamel Abrasivity</i>
Ru	Resistência de união
SH	<i>Surface Hardness</i>
TCP	Tricálcio fosfato
TRA	Tratamento restaurador atraumático
UNESP	Universidade Estadual Paulista
vol% min	Percentual de volume mineral
β-TCP	Beta-Tricálcio-Fosfato
μg	Microgramas
μm	Micrômetro

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Delineamento experimental	29
3.2 Preparo e seleção dos espécimes	30
3.3 Indução da lesão de cárie	31
3.4 Ciclagem de pH e escovação	32
3.5 Procedimento restaurador em dentina	33
3.6 Análises	35
3.6.1 Dureza de superfície e em secção transversal	35
3.6.2 Perfilometria	36
3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
3.6.4 Resistência de união - Microcissalhamento	36
3.6.5 Padrão de fratura	37
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

A ausência de cuidados com a higiene oral pode piorar o quadro clínico de pacientes hospitalizados, visto que longos períodos de internação podem permitir a evolução de infecções pré-existentes e aumentar o risco de desenvolvimento de infecções oportunistas.¹ Em condições saudáveis, a relação entre os microrganismos da cavidade bucal é de simbiose, na qual espécies diferentes interagem de forma benéfica entre si, sem prejuízo para o meio bucal.² No entanto, quando há alterações sistêmicas, no padrão de higiene bucal ou com o uso de antimicrobianos, o equilíbrio entre as espécies é rompido e o ambiente torna-se propício para a expressão de microrganismos patógenos. Nesse sentido, a inclusão do cirurgião-dentista na equipe hospitalar contribui para reduzir o risco de cárie dentária, doença periodontal e impedir que a cavidade oral seja foco de infecção e disseminação de microrganismos para a circulação sistêmica.

Os dentifrícios fluoretados com 1450 ppm de flúor são amplamente utilizados pela população e há alguns anos foram desenvolvidos dentifrícios com alta concentração de fluoreto de sódio (5000 ppm);³ estes são disponibilizados apenas sob prescrição profissional para casos específicos, tais como em pacientes acamados com risco elevado de desenvolvimento de lesões de cárie. Dentro deste contexto, devido à capacidade dos fosfatos em estimular o processo de equilíbrio mineral e remineralização em profundidade de lesões de cárie, o tricálciofosfato (TCP)^{3,4} foi adicionado em determinados dentifrícios para fornecer proteção adicional a pacientes vulneráveis ao desenvolvimento da cárie. Desse modo, o uso de dentifrícios de alta concentração de flúor contendo TCP pode ser uma medida preventiva e eficaz para aumentar a disponibilidade dos íons cálcio e fosfato na cavidade bucal.⁵

Após o desenvolvimento da doença cárie, é necessário realizar procedimentos restauradores com materiais resinosos ou ionoméricos para limitar o dano e impedir a progressão da mesma. Nesse sentido, o tratamento restaurador atraumático (TRA) é uma abordagem eficiente para o atendimento em ambientes hospitalares por ser minimamente invasivo, gerar menos estresse ao paciente e ser de rápida execução.^{6,7} Em relação aos resultados obtidos por esta técnica, uma

revisão sistemática apresentou taxas de sobrevida cumulativa para restaurações de TRA de uma face (em dentes permanentes) de 85 e 80%, após três e cinco anos, respectivamente. Em restaurações envolvendo mais de uma face, a taxa de sobrevida foi de 86% em 1 ano.⁶ Ainda, um estudo clínico comparando a sobrevida de restaurações com resina composta e abordagem TRA (em dentes decíduos e permanentes) concluiu que, após acompanhamento de 3 anos, as restaurações com cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (CIV-AV) apresentaram melhor desempenho.⁸

O CIV-AV é frequentemente utilizado na técnica TRA, pois apresenta módulo de elasticidade semelhante ao da dentina e maior resistência flexural quando comparado aos demais materiais, indicando-o para restaurações posteriores extensas.^{9,10} Além disso, a capacidade de liberação de flúor para o meio bucal nos períodos iniciais é desejável na condição de vulnerabilidade em que o paciente acamado se encontra, pois fornece proteção adicional e previne contra o surgimento de novas lesões cariosas.^{9,10} Este material adere-se quimicamente à estrutura dental por meio de uma reação ácido-base entre fluoraminosilicato de vidro e poliácidos, formando ligações cruzadas entre ânions carboxilato liberados pelo material e íons cálcio presentes na estrutura dentária.⁹ Dentre os CIV-AV, foi lançado recentemente no mercado odontológico um cimento ionomérico híbrido, caracterizado pela introdução de partículas de vidro ultrafinas e altamente reativas, com a adição de um ácido poliacrílico de maior peso molecular.¹⁰ Aliado a isso, o fabricante menciona tolerância à umidade e oferece uma resina fluida nanoparticulada denominada cobertura de proteção (coat), que pode ser aplicada sobre a restauração com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e aumentar a resistência ao desgaste.¹⁰

Correlacionando uma população hospitalizada que necessita de tratamentos especiais e a inserção de novos dentifrícios e um material restaurador híbrido no mercado odontológico, justifica-se a realização de um estudo que avalie a capacidade de um dentifrício com alta concentração de flúor em remineralizar lesões de cárie, bem como a efetividade de adesão de CIVs após ciclagem de pH e escovação.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a influência de diferentes dentifrícios na dureza de superfície, em secção transversal e perfil de desgaste do esmalte, assim como na resistência de união de CIVs à dentina, após indução de cárie artificial, ciclagem de pH e escovação. As hipóteses nulas deste estudo foram:

- I. Não haveria diferença entre os dentifrícios na dureza de superfície, em secção transversal e perfil de desgaste do esmalte dentário.
- II. Não haveria diferença entre os dentifrícios na resistência de união quando o mesmo CIV fosse utilizado em dentina hígida e afetada por cárie.
- III. Não haveria diferença entre os diferentes CIVs na resistência de união à dentina hígida e afetada por cárie quando um mesmo dentifrício fosse utilizado.
- IV. Não haveria diferença entre os substratos hígidos e afetados por cárie na dureza de superfície e em secção transversal do esmalte, assim como na resistência de união à dentina quando um mesmo dentifrício e CIV fossem utilizados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Processo 00513-2019). Foram utilizadas 10 amostras para cada grupo de dentifrício no esmalte dentário e 10 para cada grupo e subgrupo de dentina. Um fator experimental (dentifrício) foi investigado para ambos os substratos dentários: Colgate Total 12 1450 ppm F (CT) e Clinpro 5000 ppm F + TCP (CL); somente para a dentina dois fatores experimentais (dentifrício e CIV-AV) foram avaliados: CIV-AV Ketac Molar (KM) e CIV híbrido Equia Forte (EF).

As variáveis de resposta foram: dureza de superfície e em secção transversal do esmalte hígido e com lesão de cárie artificial através de dureza Knoop, perfilometria para avaliação do perfil de desgaste entre esmalte hígido e afetado por cárie, e resistência de união dos CIVs à dentina hígida e afetada por cárie através do teste de microcisalhamento. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em três espécimes representativos de cada grupo para avaliar as diferenças entre o esmalte hígido e afetado por cárie. O fluxograma do estudo está representado na Figura 1 e os materiais utilizados, na Tabela 1.

FIGURA 1 - Fluxograma do desenho experimental

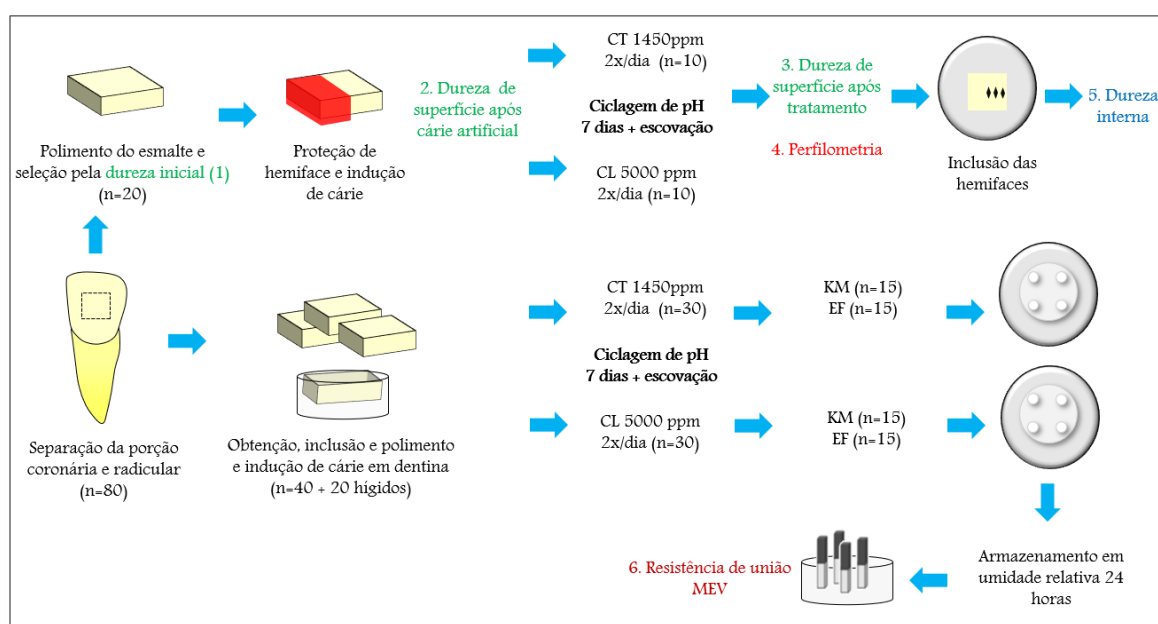


TABELA 1 - Nome comercial, composição e fabricante dos materiais utilizados

NOME COMERCIAL	COMPOSIÇÃO	FABRICANTE
COLGATE TOTAL 12 (CT)	Glicerina, água, sílica hidratada, laurilsulfato de sódio, arginina, óxido de zinco, goma de celulose, poloxâmero 407, pirofosfato tetrasódio, citrato de zinco, álcool benzílico, cocamidopropil betaína, fluoreto de sódio, sacarina sódica, goma xantana, ácido fosfórico, sucralose, eugenol.	Colgate-Palmolive (São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) (Lote 9080BR122D)
CLINPRO 5000 (C)	Fluoreto de sódio, água, sorbitol, sílica hidratada, glicerina, sílica amorfa, glicol de polipropileno-polietileno, aroma, polietilenoglicol, laurilsulfato de sódio, dióxido de titânio, carboximetilcelulose, sacarina sódica e tricálcio fosfato.	3M ESPE (St Paul, Estados Unidos da América) (Lote 11038)
KETAC MOLAR EASY MIX (KM)	Pó: Vidro de fluoralumínio silicato, estrôncio e lantânio. Líquido: Ácido poliacarbônico, ácido tartárico e água.	3M ESPE (Seefeld, Alemanha) (Lote: 7400462)
EQUIA FORTE (EF)	Líquido: ácido carboxílico polibásico. Pó: óxido de ferro III, fluoroalumino silicato de vidro	GC America (Alsip, Estados Unidos da América) (Lote: 1911061)

Fonte: Autor, 2021

3.2 Preparo e seleção dos espécimes

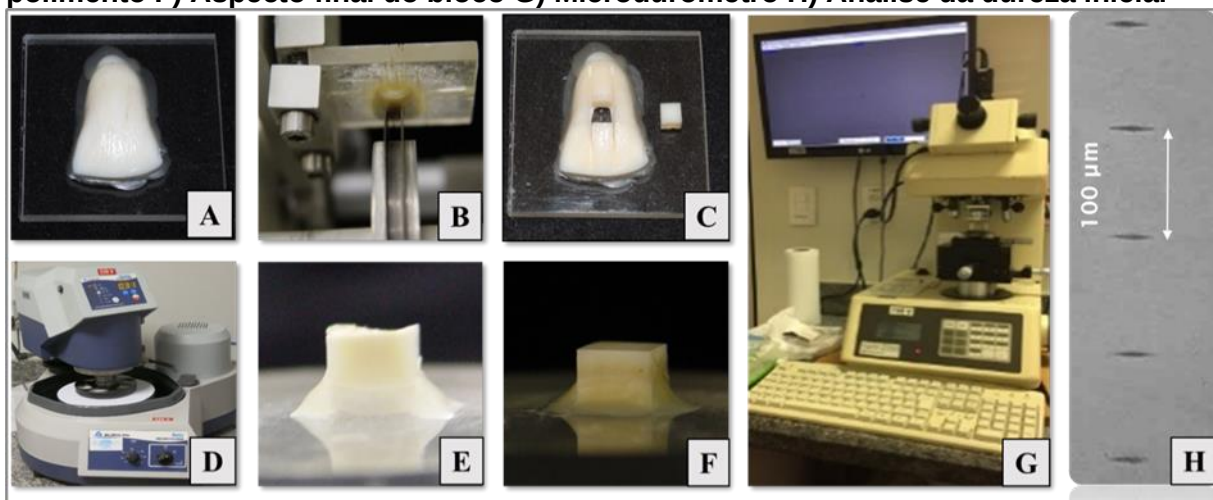
As amostras foram obtidas a partir de dentes bovinos (n=80) e armazenadas em solução aquosa de timol a 0,1% durante 30 dias. Os debris orgânicos da superfície coronária e radicular foram removidos com cureta periodontal e a coroa foi separada da raiz utilizando um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) acoplado em micromotor de baixa rotação (Kavo Keer, Joinville, Santa Catarina, Brasil) sob irrigação constante. A partir da porção coronária foram obtidos os espécimes de esmalte e dentina (Figura 2A).

Os blocos de esmalte (n=20, 4x4mm²) e dentina (n=60, 6x6 mm²) foram obtidos através de cortes nos sentidos méso-distal e incisivo-cervical na região central da coroa com um disco diamantado (Buehler, Illinois, Estados Unidos da

América) montado em cortadeira metalográfica (Isomet 1000, Buehler, Illinois, Estados Unidos da América). Para isso, a coroa foi fixada em uma base de acrílico com cera pegajosa (Kota, Cotia, São Paulo, Brasil) e submetida aos cortes e (Figura 2B, 2C). O polimento realizado com lixa de carbeto de silício de granulometria #600 para exposição e planificação da superfície¹¹ (Figura 2D, 2E, 2F).

Os blocos de esmalte foram padronizados de acordo com a dureza de superfície, sendo excluídos os espécimes com valores 10% abaixo e acima da média.¹² A dureza inicial foi analisada no centro dos espécimes em um microdurômetro (Micromet 5114 e OmniMet Software – Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos da América), realizando 5 indentações com uma ponta piramidal tipo Knoop com 100 μm de distância entre elas, sob carga estática de 25 g por 10 segundos¹² (Figura 2G, 2H). A randomização estratificada foi realizada para distribuir as amostras com valores semelhantes de dureza entre os grupos, garantindo que os valores fossem estatisticamente semelhantes após o desafio de cárie.

FIGURA 2 - Processo detalhado da obtenção, inclusão e seleção dos espécimes. A) Dente bovino colado em placa de acrílico B) Cortes longitudinais em cortadeira de precisão C) Obtenção dos blocos D) Politriz metalográfica E) Bloco colado para polimento F) Aspecto final do bloco G) Microdurômetro H) Análise da dureza inicial



Fonte: Autor e Gabriel Nunes, 2021

3.3 Indução de lesão de cárie

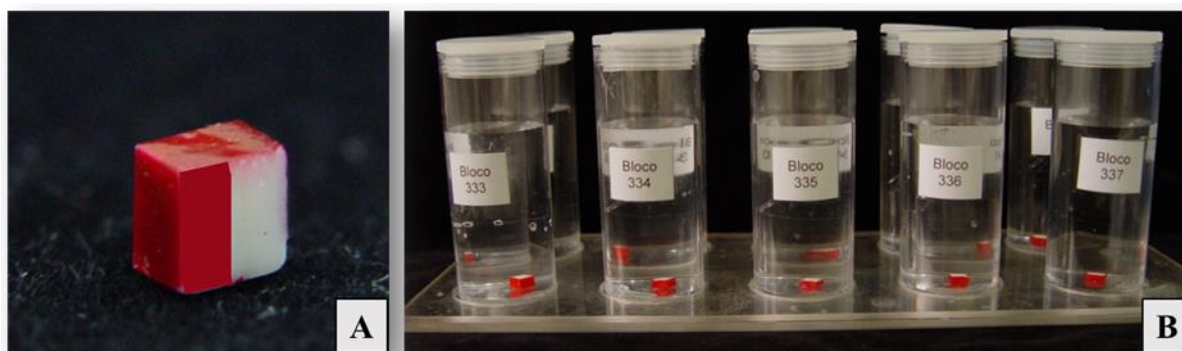
Para o esmalte, a hemiface de cada amostra foi protegida com verniz ácido resistente (Colorama, São Paulo, São Paulo, Brasil), no intuito de criar uma área de

referência (controle) e outra de exposição à cárie artificial e consequentes tratamentos. (Figura 3A). Cada bloco de esmalte foi imerso em 30 ml de solução desmineralizadora (2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,075 M tampão acetato e 0,04 ppm F, pH 4,7, 6 horas/dia), e 30 ml de solução remineralizadora (1,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,50 mM KCl, 0,2 M Tris e 0,05 ppm NaF, pH 7,0, 18 horas/dia) renovados diariamente durante 7 dias, para formar uma lesão subsuperficial de cárie (Figura 3B).¹³

Em dentina, o protocolo de desmineralização foi feito pela imersão de cada amostra em 30 ml de solução desmineralizadora (1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM KH_2PO_4 , 50 mM ácido acético, 0,02% NaN_3 em pH 4,5 ajustado com NaOH) a 37 °C por 60 horas.¹¹ Após remoção da solução desmineralizadora, as amostras foram lavadas abundantemente com água deionizada.

Após a indução de cárie, as amostras de esmalte foram submetidas à análise de dureza de superfície para verificar a redução dos valores de dureza (SH_1).

FIGURA 3 – Etapa de indução da cárie artificial. A) Bloco de esmalte com hemiface protegida para indução do desafio de cárie. B) Modelo aplicado para induzir cárie artificial



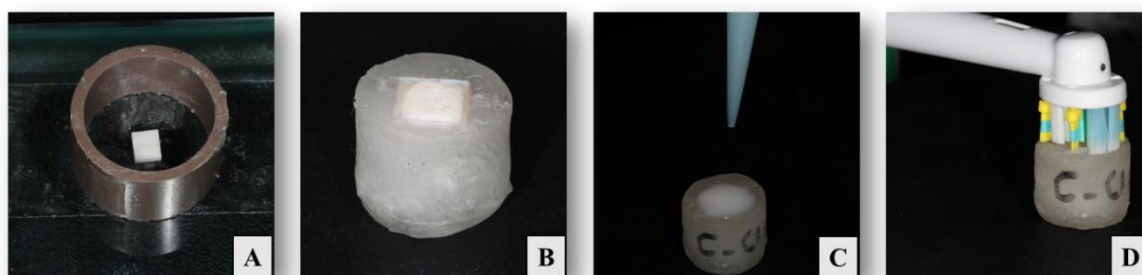
Fonte: Gabriel Nunes, 2021

3.4 Ciclagem de pH e escovação

Em seguida, foi realizada a ciclagem de pH através de ciclos de desmineralização e remineralização. Em esmalte, os espécimes foram imersos em 35 ml de solução desmineralizadora (2,0 mmol/L⁻¹ Ca, 2,0 mmol/L⁻¹ P, 0,075 mol/L⁻¹ de tampão acetato, 0,04 µg F/mL, com pH 4,7) por 6 horas, e em solução remineralizadora (1,5 mmol/L Ca, 0,9 mmol/L P, 0,15 mmol/L KCl, 0,02 mmol/L

tampão cacodilato de sódio, 0,05 μg de F/mL, com pH 7,0) por 18 horas durante 7 dias.¹⁴ Para dentina, os espécimes foram imersos em 30 ml da solução desmineralizadora (1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM KH_2PO_4 , 50 mM tampão láctico, pH 5,0, 8 h) e 30 ml da solução remineralizadora (5 mM CaCl_2 , 0,9 mM KH_2PO_4 , 130 mM KCl, 20 mM tampão HEPES e 5 mM NaN_3 , pH 7,0, 16 horas) por 7 dias.¹⁵ Concomitantemente às ciclagens de pH, foi realizada a escovação com os dentifrícios citados no item 3.1. Para a escovação, os dentifrícios foram pesados e diluídos diariamente em água destilada (proporção 1:3) sobre um agitador magnético para homogeneização. Em seguida, 2 ml de dentifrício foi pipetado sobre os espécimes de cada grupo e os mesmos escovados manualmente com escova elétrica (Oral B Professional Care 5000 Oral B, Schwalbacham Taunus, Hesse, Alemanha) equipada com um sensor de pressão cuja luz vermelha acenderia quando a pressão exercida alcançasse o valor de 2N (Figura 4C, 4D).¹⁶ A escovação foi realizada duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, sendo 15 segundos de escovação simulada e imersão no slurry dos dentifrícios até completar 2 minutos.¹⁷ O objetivo de associar a ciclagem de pH e escovação é simular uma condição em que o paciente acamado com alto risco de desenvolvimento de cárie recebe escovação supervisionada por uma pessoa instruída durante o período de vulnerabilidade. Ao final do período experimental, as amostras foram lavadas e secas com guardanapos de papel e armazenadas em umidade relativa a 37 °C.

FIGURA 4 - Etapa de inclusão e escovação realizados em dentina. A) Processo de inclusão dos espécimes de dentina em resina acrílica B) Aspecto final após inclusão C) Pipetagem do dentifrício sobre os espécimes D) Escovação com escova elétrica



Fonte: Autor, 2021

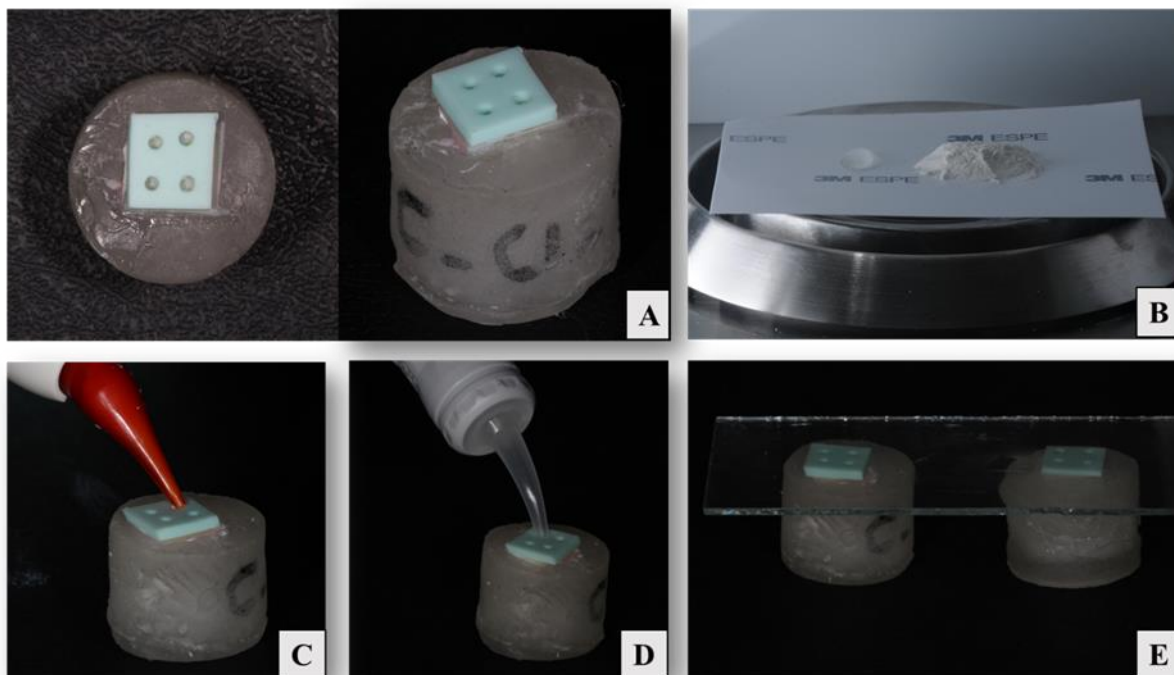
3.5 Procedimento restaurador em dentina

Após as ciclagens de pH e escovação, os espécimes de dentina foram restaurados com o respectivo material restaurador, de acordo com as instruções do fabricante. Os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica (Cristófoli, Campo Mourão, Paraná, Brasil) durante 8 minutos em água destilada. Em seguida, o ácido poliacrílico 20% (Cavity Conditioner 20%, GC Corporation, Tokio, Japão) foi aplicado nos espécimes a serem restaurados com EF, e o líquido que acompanha o KM foi aplicado como condicionante (3M ESPE, Seefeld, Alemanha) nos espécimes a serem restaurados com KM, tal como recomenda o fabricante. Para inserção dos materiais, uma matriz de silicone de condensação (Perfil Putty #1801430, Coltene, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foi confeccionado com dimensões 6x6x1mm, a fim de se obter 4 cilindros por espécime para o ensaio mecânico de microcisalhamento. (Figura 5A)

O KM foi pesado em balança de precisão digital previamente à sua manipulação (Figura 5B). Em seguida, o material foi aglutinado em um bloco para espatulação e com uma seringa (Centrix, DFL, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foi inserido no interior da matriz posicionada sobre a dentina. (Figura 5C)

Para o EF, a cápsula que contém o material foi acoplada em um amalgamador (Astromix, Dabi Atlante, São Paulo, São Paulo, Brasil) para auto mistura durante 10 segundos; em seguida, o material foi dispensado sobre a dentina com auxílio de um dispositivo fornecido pelo fabricante (Figura 5D). Uma lâmina de vidro foi posicionada sobre os espécimes juntamente com um peso para extravasar os excessos (Figura 5E); após o tempo de presa do material, os espécimes foram vaselinados e armazenados em umidade relativa a 37 °C por 24 horas.

FIGURA 5 - Procedimento restaurador em dentina. A) Adaptação da matriz de silicone sobre os espécimes B) Pesagem do CIV KM C) Inserção de CIV KM com seringa Centrix D) Inserção de CIV EQ em dispositivo próprio E) Lâmina de vidro sobre os espécimes para extravasar excessos



Fonte: Autor, 2021

3.6 Análises

3.6.1 Dureza de superfície e em secção transversal (SH)

As 20 amostras de esmalte foram submetidas à avaliação de dureza de superfície por três vezes: inicialmente, após indução de cárie e após as escovações. Para isso, 5 indentações com 100 μm de distância umas das outras foram realizadas tanto no lado controle quanto no lado teste, para avaliar se os dentifrícios promoveram aumento na dureza de superfície final (SH₂).¹⁸ O percentual de recuperação da dureza de superfície (%SHR) foi calculado pela fórmula $[\%SHR = 100(SH_2 - SH_1)/SH_1]$.¹⁸

Para a análise de dureza em secção transversal, 20 amostras foram seccionadas longitudinalmente na região central após as escovações, incluídas em

resina acrílica e polidas sequencialmente com lixa de carbeto de silício (#600, #800 e #1200) até expor toda a superfície do esmalte. Foram realizadas 7 indentações com as distâncias de profundidade de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 µm, tanto no lado controle quanto no lado teste, com um penetrador tipo Knoop sob carga de 5g por 10 segundos.¹⁹ As médias foram calculadas para cada distância e os valores convertidos em conteúdo mineral ($\text{vol\% min} = 3,66 * (\sqrt{\text{KHN}}) + 21,19$).¹⁹

3.6.2 Perfilometria

O desgaste foi determinado por meio de um perfilômetro óptico (Surftest SJ 401, Mitutoyo American Corporation, Illinois, Chicago, Estados Unidos da América).¹⁷ Após o período experimental, o desgaste do esmalte da área teste foi determinado em relação à respectiva área de referência (lado controle). No centro das amostras de esmalte foram realizadas 3 varreduras (comprimento de 2 mm) com intervalo de 0,5 mm entre si. As varreduras foram interpretadas com um software específico acoplado ao perfilômetro a partir da construção de linhas de regressão entre as áreas de referência e experimental. A perda de tecido quantificada em micrômetros foi definida a partir da distância vertical entre as linhas de regressão da área de referência (previamente protegida pelo verniz), e da área submetida às ciclagens de pH e escovação. A média entre as três varreduras foi calculada.¹⁷

3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Três espécimes representativos de cada grupo (controle e teste) foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (EVO LS-15, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 3000x, para observar as diferenças estruturais no esmalte hígido e afetado por cárie após ciclagem de pH e escovação. Para tanto, as amostras foram desidratadas em estufa a 37 °C, fixadas em stubs metálicos, metalizadas com ouro (Balzers SCD-050 sputter coater, OC Oerlikon Corporation AG, Pfäffikon, Zurique, Suíça) e levadas ao microscópio eletrônico.

3.6.4 Resistência de união – Microcissalhamento

Após as 24 horas da confecção dos cilindros de material restaurador (descrito na seção 3.5), foi realizado o teste de microcissalhamento. Cada espécime apresentava em sua superfície 4 cilindros de material restaurador com a distância de 1 mm entre si, diâmetro interno de aproximadamente 1,3 mm e altura de 1 mm. Para remoção da matriz de silicone, uma lâmina de bisturi foi empregada cuidadosamente até a completa exposição dos cilindros.²⁰

Em seguida, as amostras foram fixadas em um dispositivo metálico do equipamento de ensaio mecânico utilizado (OM100, Odeme Dental Research, Luzerna, Santa Catarina, Brasil). Para execução fidedigna, as amostras foram posicionadas de modo que os cilindros permanecessem alinhados à direção da aplicação da força. Um fio ortodôntico de 0,2 mm de diâmetro (NiCr, Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil) foi utilizado para aplicar a força nos cilindros. O equipamento foi ajustado à velocidade de 0,7 mm/min para avaliação da resistência de união. Os valores de resistência de união foram obtidos em MPa por meio da fórmula: $R_u = (F/A)$, em que R_u = resistência de união, F = carga necessária para fraturar o espécime expressa em Newtons (N), e A = área da interface de união em mm^2 .

3.6.5 Padrão de fratura

Os padrões de fratura foram observados em estereomicroscópio (Leica MZ6). Para tanto, os espécimes foram fixados em uma base de cera rosa nº 7, de modo que a interface fraturada permanecesse em foco no estereomicroscópio. As fraturas foram classificadas em adesiva, quando a fratura ocorresse na interface adesiva; coesiva em dentina quando a fratura ocorresse na dentina; coesiva em material restaurador quando a fratura ocorresse no material restaurador; e mista, quando da ocorrência de fraturas adesiva e coesiva.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no presente estudo foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA) 1 critério para avaliar a recuperação mineral e perfil de desgaste, ANOVA 2 critérios com medidas repetidas para avaliar a dureza de superfície e em secção transversal, ANOVA 3 critérios para avaliar a resistência de união através do microcisalhamento, e pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%, utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, Califórnia, Estados Unidos da América).

5 RESULTADOS

Os resultados referentes às análises do esmalte estão apresentados a seguir. De acordo com os dados obtidos na análise de dureza de superfície (Tabela 2), ao comparar os dentifrícios não houve diferença estatística significativa em nenhuma condição experimental. Na comparação entre as superfícies, houve diferença estatística entre o esmalte hígido, cariado e após o tratamento com os respectivos dentifrícios, com menores valores para o esmalte submetido à cárie. Através do cálculo da recuperação mineral, foi observado que ambos os dentifrícios também foram estatisticamente semelhantes após os tratamentos.

TABELA 2 – Média e desvio padrão da dureza de superfície (KHN) e recuperação mineral (%) do esmalte

	CT	CL
HÍGIDO (INICIAL)	345,04 ± 7,23 Aa	340,94 ± 7,63 Aa
CÁRIE ARTIFICIAL	57,86 ± 21,17 Ac	54,34 ± 23,00 Ac
TRATAMENTO (ESCOVAÇÃO)	148,18 ± 25,16 Ab	144,36 ± 21,10 Ab
RECUPERAÇÃO MINERAL	31,05 ± 9,60 A	30,8 ± 10,05 A

Letras maiúsculas comparam os dentifrícios. Letras minúsculas comparam as superfícies.

Fonte: Autor, 2021

Os resultados da dureza em secção transversal (Tabela 3) evidenciam que o dentifrício CL obteve valores inferiores comparando-se ao CT no lado controle, e até 90µm no lado teste. Ao avaliar as diferentes profundidades para cada dentifrício no lado controle, o grupo CT apresentou menor dureza para a distância de 10µm e 30µm, com diferença estatística para às demais mensurações, estabilizando a partir de 50µm. De forma semelhante, o grupo CL teve a menor dureza observada para a distância de 10µm e aumento gradativo até 220µm. Ao analisar o lado submetido aos desafios, houve diferenças estatísticas até 50µm para o grupo CT e até 70µm para o grupo CL. A partir de 70 a 90µm, o grupo CT assemelhou-se às distâncias

mais profundas e ao atingir 110 μ m alcançou estabilidade de dureza, enquanto o grupo CL deixou de apresentar diferenças estatísticas em 110 μ m. Por fim, houve diferença entre o lado controle e teste dentro da mesma profundidade e dentifrício somente até 50 μ m para ambos os dentifrícios. Quanto ao perfil de desgaste, o dentifrício CT apresentou maior perfil de desgaste (-47,9 $\pm$ 4,9) quando comparado ao CL (-17,5 $\pm$ 2,2), com valores expressos em Ra.

TABELA 3 – Média e desvio padrão da dureza em secção transversal do esmalte

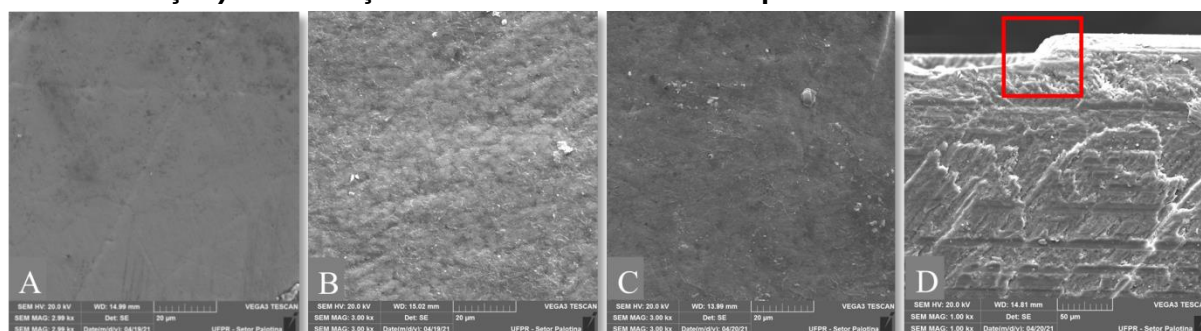
PROFUNDIDADE	CONTROLE		TESTE	
	CT	CL	CT	CL
10	206,23 $\pm$ 11,49 Ab	183,49 $\pm$ 15,51 Bc	104,35 $\pm$ 4,23 Ae*	68,13 $\pm$ 6,15 Bf*
30	220,61 $\pm$ 16,17 Aab	195,29 $\pm$ 18,49 Bbc	163,01 $\pm$ 26,61 Ad*	129,24 $\pm$ 28,48 Be*
50	227,16 $\pm$ 12,75 Aa	200,25 $\pm$ 19,66 Bbc	200,91 $\pm$ 22,08 Ac*	161,25 $\pm$ 23,62 Bd*
70	229,9 $\pm$ 16,11 Aa	201,4 $\pm$ 14,95 Bbc	212,37 $\pm$ 14,15 Abc	192,83 $\pm$ 11,77 Bc
90	235,84 $\pm$ 12,47 Aa	209,26 $\pm$ 13,70 Bab	229,10 $\pm$ 10,75 Aab	209,01 $\pm$ 18,44 Bbc
110	236,64 $\pm$ 14,27 Aa	213,30 $\pm$ 16,90 Bab	232,47 $\pm$ 9,8 Aa	216,4 $\pm$ 16,08 Aab
220	244,56 $\pm$ 7,72 Aa	224,09 $\pm$ 11,74 Ba	236,03 $\pm$ 9,0 Aa	229,08 $\pm$ 20,6 Aa

Letras maiúsculas comparam os dentifrícios. Letras minúsculas comparam as profundidades. Asteriscos indicam diferenças estatísticas dentro do mesmo dentifrício e profundidade após os desafios.

Fonte: Autor, 2021

A Figura 6 representa micrografias obtidas através da MEV com aumento de 3000x e ilustra o aspecto da superfície das amostras no lado controle (A), tratado com CT (B) e tratado com CL (C). Na Figura 6B é possível observar maior desorganização superficial comparada às Figuras 6A e 6C, enquanto a Figura 6C caracteriza-se por maior homogeneidade da superfície após o tratamento.

FIGURA 6 - Micrografia da superfície do esmalte dentário no lado controle (A), tratado com o dentifrício CT (B) e CL (C). A Figura D evidencia a formação de cárie subsuperficial em esmalte através de um modelo de pH dinâmico (desmineralização e remineralização). A marcação mostra a lesão de subsuperfície formada.



Fonte: Autor, 2021

De acordo com os dados obtidos na análise de microcissalhamento (Tabela 4), ao comparar os dentifrícios dentro de cada material restaurador observou-se que CT apresentou maior resistência adesiva para ambos os materiais. A comparação entre materiais restauradores dentro do mesmo dentifrício evidenciou resistência adesiva superior para KM se comparado ao EF somente para o dentifrício CL, independente da condição da dentina.

TABELA 4 – Média e desvio padrão da análise de microcissalhamento (MPa) da dentina hígida e submetida à cárie

CIV	Dentifrício	Resistência de união (MPa)	
		Hígida	Cariada
KM	CT	4,14 ± 2,64 Aa	5,06 ± 2,86 Aa
EF		5,45 ± 2,90 Aa	4,83 ± 2,42 Aa
KM	CL	2,42 ± 0,98 Ab*	3,77 ± 2,45 Ab*
EF		1,24 ± 0,79 Ab	1,54 ± 1,16 Ab

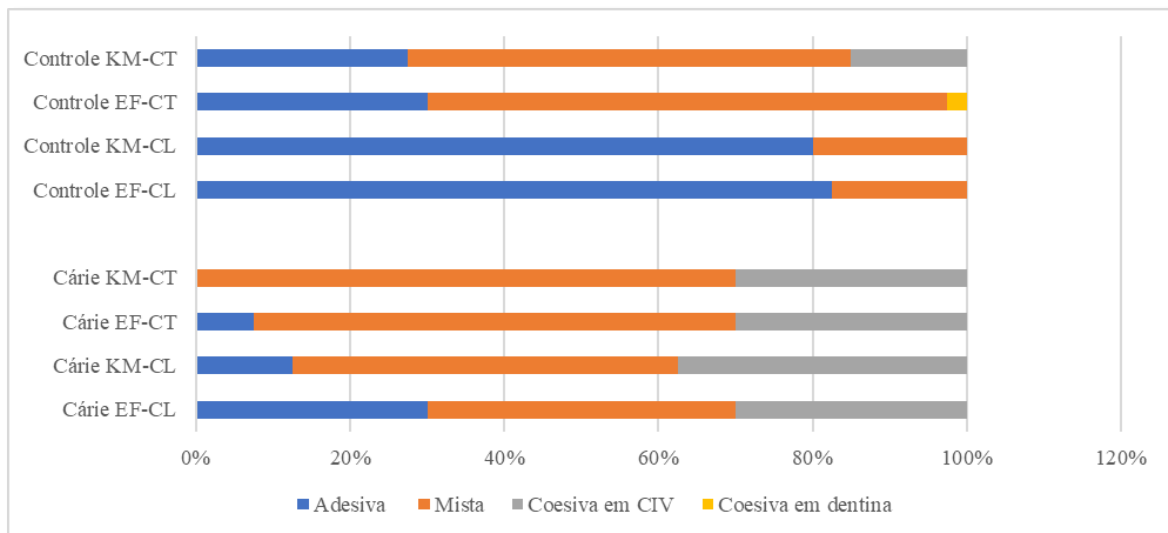
Letras maiúsculas comparam superfícies. Letras minúsculas comparam dentifrícios dentro do mesmo material restaurador. Asteriscos comparam materiais restauradores dentro do mesmo dentifrício

Fonte: Autor, 2021

O padrão de fratura está representado no Gráfico 1. No grupo controle tratado com CT, o padrão de fratura mais frequente foi de falha mista (KM: 57,5% / EF: 67,5%), seguido por falha adesiva (KM: 27,5% / EF: 30%), falha coesiva em CIV somente para KM (15%) e falha coesiva em dentina para EF (2,5%). No grupo tratado com CL, houve predominância de falhas adesivas (KM: 80% / EF: 82,5%) e mistas (KM: 20% / EF: 17,5%). Para os espécimes submetidos à cárie artificial, o grupo tratado com CT apresentou falhas mistas (KM: 70% / EF: 62,5%), coesivas em CIV (KM e EF: 30%, respectivamente) e somente em EF obteve falha adesiva (7,5%). Por fim, o grupo tratado com CL apresentou predominantemente falha mista

(KM: 50% / EF: 40%), coesiva em CIV (KM: 37,5% / EF: 30%) e adesiva (KM: 12,5% / EF: 30%).

GRÁFICO 1 - Distribuição do padrão de fratura (%) entre os grupos experimentais



Fonte: Autor, 2021

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, o teste de dureza de superfície no esmalte foi empregado em três períodos distintos (inicial, após a indução de cárie artificial e após escovação), a fim de identificar a redução mineral alcançada. Apesar de possuir 96% de carga inorgânica, o equilíbrio mineral do esmalte é comprometido frente a exposição constante a ácidos, que promovem a dissolução dos íons e criam espaços interprismáticos subsuperficiais.²¹ Por meio da ação salivar e terapias remineralizadoras coadjuvantes, há uma tendência de recuperação dos íons perdidos; no entanto, a recuperação pode não ocorrer em sua totalidade e deixar desníveis na estrutura dentária. Por esta razão, a perfilometria foi empregada a fim de identificar o desgaste entre lado hígido e submetido à cárie artificial após escovação com os dentifrícios analisados. O microcissalhamento foi avaliado na dentina com e sem cárie artificial e restaurada com materiais ionoméricos, a fim de observar as características referentes aos dentifrícios e materiais restauradores que porventura influenciariam na resistência de união ao substrato.^{11,13}

A primeira hipótese do presente estudo foi negada, visto que os dentifrícios apresentaram diferenças na dureza em secção transversal e no perfil de desgaste. Após induzir a formação de cárie artificial, o esmalte teve a dureza reduzida significativamente comparada com a leitura inicial, comprovando a metodologia utilizada para indução da cárie artificial, assim como demonstrado na Figura 6D.¹³ Em geral, o mecanismo de ação dos dentifrícios se dá pela inibição do processo de desmineralização e aumento da remineralização, promovendo ação preventiva em substratos hígidos e terapêutica frente à cárie.²² Ainda, os dentifrícios com fluoreto de sódio agem por meio da formação de fluorapatita, que é a união do flúor aos cristais de hidroxiapatita presentes no esmalte dentário.²³ Corroborando com os resultados do presente estudo, CL e outro dentifrício também com 1450 ppm, além de arginina (Colgate Sensitive Pro-Relief), promoveram valores de dureza de superfície estatisticamente semelhantes em esmalte desmineralizado com lesão de mancha branca. De acordo com o fabricante, durante o processo de remineralização, o dentifrício CL promove um pH neutro ou levemente alcalino.²⁴ O fabricante ainda menciona que, com a adição do TCP, é esperado que a ação em áreas subsuperficiais seja mais efetiva que dentifrícios apenas com fluoreto de sódio. No processo de produção do dentifrício, os íons são protegidos por um ácido

carboxílico (ácido fumárico) modificado que produz o β -TCP.^{25,26} Quando em contato com o meio aquoso, a interface entre o ácido que protege os íons é rompida, liberando cálcio e fosfato para o meio. No entanto, observou-se no presente estudo valores superiores de dureza em secção transversal para o dentifrício convencional se comparado ao CL, havendo dificuldade de comparações com a literatura devido à carência de estudos que avaliam o mesmo parâmetro em esmalte desmineralizado e escovado com dentifrício com alto conteúdo de flúor. Contrastando com o presente estudo, existem algumas evidências *in vitro* e *in situ* sobre os efeitos do β -TCP presente em soluções, enxaguatórios bucais, dentifrícios e vernizes, mostrando que a associação com o fluoreto melhora a dureza do esmalte, absorção de flúor, remineralização das lesões de manchas brancas e liberação de cálcio na saliva.^{24,27-}

³² Alguns fatores podem explicar a diferença entre os resultados do presente estudo comparado a literatura, tais como: presença de biofilme, tempo de escovação e tipo de armazenamento. No presente estudo, um processo químico foi utilizado para induzir a cárie artificial, diferente de modelos com biofilme onde o dentifrício pode se ligar a película adquirida, atuando como um reservatório adicional para potencializar a ação do dentifrício.³³ Além disso, o tempo total de contato das amostras com o dentifrício foi de 2 minutos, com base no tempo que um indivíduo leva para escovar os dentes e em acordo com o estudo de Pini et al.¹⁷ e Featherstone *et al.*³⁴ indicam como apropriado o contato de 5 minutos do dentifrício com a superfície a fim de promover maior retenção do flúor.^{3,34} Sabe-se também que o armazenamento em saliva artificial apresenta um papel fundamental no processo de remineralização, podendo influenciar nos resultados de estudos *in vitro* que avaliam dentifrícios.³⁵

As vantagens da presença da alta concentração de flúor e TCP no dentifrício CL, puderam ser evidenciadas nos resultados de perfilometria, visto que o mesmo apresentou melhor resistência ao desgaste comparado ao CT. A concentração mais alta de flúor também aumentou a proteção contra o efeito deletério de dentifrícios altamente abrasiva.³⁵ Sabe-se que além das características de composição, a abrasividade pode afetar a ação dos dentifrícios no desgaste do esmalte visto que lesões formadas *in vitro* podem ser desgastadas por escovação mais facilmente do que o esmalte hígido.³⁶ Além de conter ingredientes ativos, os dentifrícios possuem características referentes à abrasividade. Neste contexto, medidas como RDA (relative dentine abrasion) e o REA (relative enamel abrasion) estão presentes em estudos que investigam o efeito da abrasividade de dentifrícios, mostrando que a

dentina é mais susceptível à abrasão que o esmalte. No entanto, nem todas as empresas fornecem os valores de RDA e REA, assim como, a relação entre RDA e REA não é necessariamente direta, uma vez que um dentifrício que apresenta um valor alto de RDA pode ter um valor baixo de REA e vice-versa.³⁷ O dentifrício CL utilizado no presente estudo apresenta RDA 62,15 e REA 3,49, enquanto o dentifrício CT apresenta o valor de RDA entre 70 e 78 e valor de REA não especificado.³⁸ Vale ressaltar que as imagens representativas em MEV demonstram a rugosidade superior promovida pelo dentifrício CT comparado ao CL (Figura 6B).

Correlacionando os resultados de dureza em secção transversal e do perfil de desgaste, especula-se que a superioridade dos resultados de CT comparando-se a CL seja devido a remoção do esmalte superficial fragilizado pelo processo de cárie artificial. O efeito da cárie artificial associado aos tratamentos promoveu uma superfície porosa, especialmente no grupo CT. Existe uma condição denominada laminação, onde o ácido se difunde pelas porosidades sem que haja o tamponamento do mesmo, resultando em desmineralização da área previamente tratada.³⁹ Vale ressaltar que essa condição varia conforme o modelo de ciclagem de pH e a concentração de flúor no dentifrício. Apesar da superfície ter sido mais rugosa no dentifrício CT, como observado na Figura 6B, a interação entre fluoreto de sódio com os minerais disponíveis foi capaz de neutralizar os ácidos e criar uma barreira eficaz contra a desmineralização. As distâncias iniciais são fundamentais para detectar as diferenças encontradas nos valores de dureza, e neste estudo ficou evidente que o dentifrício CL levou uma distância maior para alcançar estabilidade na dureza em secção transversal. Outros fatores relatados também contribuem com o aspecto superficial, tais como a presença de sílica abrasiva, incorporada para aumentar o potencial de limpeza, o tempo diário de contato com ácidos, força e abrasividade promovidos pela escovação e abrasividade relativa do dentifrício. Por se tratar de um estudo *in vitro* onde determinadas variáveis são passíveis de controle, o tempo total de contato com ácido foi seguido de acordo com o protocolo, a força e abrasividade durante a escovação também foram consideradas adequadas, visto que a escova elétrica utilizada conta com um sensor de pressão que é acionado frente à força excessiva.¹⁷ Por outro lado, não foi o objetivo do estudo quantificar os abrasivos e demais componentes sobre os substratos.

A segunda hipótese foi negada, pois houve diferença entre os dentifrícios na resistência de união quando o mesmo material foi avaliado entre as superfícies

hígida e afetada por cárie. No dentifrício CL, ambos os materiais tiveram a resistência de união inferior comparando-se à dentina escovada com CT. Vale ressaltar também que o β -TCP presente no dentifrício CL leva a formação de complexos de fosfato de cálcio ou a formação de CaF_2 quando associado ao fluoreto, diminuindo a biodisponibilidade de cálcio, podendo afetar a adesão química dos CIVs.^{27,28,40}

A terceira hipótese nula foi negada, visto que para ambas as superfícies escovadas com CL, o CIV KM apresentou resultados de resistência adesiva superiores ao EF. O EF apresenta-se como um material vantajoso quando da utilização da cobertura resinosa nanoparticulada (coat),⁴¹ no entanto, no presente estudo não foi possível a utilização da cobertura, pois toda a superfície da restauração estava envolta pela matriz de silicone até o momento do teste de microcisolamento.

Em relação ao padrão de fratura, a baixa resistência da superfície escovada com CL esteve associada ao maior número de falhas adesivas em dentina hígida, sendo 80% no grupo restaurado com KM e 82,5% em EF. No entanto, nota-se que para o CIV EF, no grupo controle, houve algumas falhas do tipo coesiva em dentina, demonstrando que a resistência da interface adesiva foi superior a resistência interna da dentina. Semelhante ao nosso resultado, um estudo que avaliou a resistência de união pela microtração encontrou que o padrão de fratura mista foi mais frequente no grupo afetado por cárie.⁴²

Comparando as superfícies hígida e com cárie artificial, o protocolo de cárie artificial foi efetivo, visto que a superfície cariada apresentou menores valores de dureza de superfície, assim como até 50 micrômetros para a dureza em secção transversal. No entanto, não houve diferença na resistência adesiva entre as superfícies híginas e cariadas, tal como observado em outro estudo.⁴³

Como limitações do presente estudo, o modelo de cárie artificial, tempo de escovação e tipo de armazenamento podem ter possibilitado encontrar resultados diferente daqueles encontrados na literatura e que utilizam protocolos com biofilme ou tempo superior de escovação. Para a dentina, remover os excessos de material restaurador nos períodos iniciais à confecção da restauração pode ser mais vantajoso, uma vez que o material ainda não atingiu todas as ligações químicas e estão mais sensíveis a manipulação.⁴³

Estudos futuros que combinem o β -TCP com dióxido de titânio ou outros óxidos de metal podem torná-lo mais estável.^{27,28,40} Uma alternativa é funcionalizá-lo com moléculas orgânicas e/ou inorgânicas, permitindo a criação de barreiras que evitam interações prematuras de fluoreto-cálcio, e facilitando a disponibilidade dos íons quando aplicado aos dentes por meio de dentifrícios, vernizes e outros meios.

7 CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, conclui-se que na superfície do esmalte, o dentifrício com maior concentração de flúor promoveu menor dureza em secção transversal, no entanto, o dentifrício convencional resultou em maior desgaste superficial. Na superfície dentinária, o dentifrício com maior concentração de flúor diminuiu a adesão, sendo que o cimento ionomérico de alta viscosidade obteve maior resistência de união quando a dentina foi escovada com dentifrício convencional.

REFERÊNCIAS

1. LAURENCE, B. *et al.* Hospital admissions for pneumonia more likely with concomitant dental infections. **Clin. Oral Invest.**, v. 19, n. 6, p. 1261–1268, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1342-y>.
2. SANZ, M. *et al.* Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 44, n. 18, p. 5-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>.
3. VELO, M. M. A. C. *et al.* Profile of high-fluoride toothpastes combined or not with functionalized tri-calcium phosphate on root dentin caries control: an in vitro study. **Am. J. Dent.**, v. 31, n. 6, p. 290-296, 2018.
4. COCHRANE, N. J. *et al.* New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 11, p. 1187-1197, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034510376046>.
5. GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; FERNÁNDEZ, C. E. Recent advances in remineralization therapies for caries lesions. **Adv. Dent. Res.**, v. 29, n. 1, p. 55-59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034517740124>.
6. FRENCKEN, J. E.; LEAL, S. C.; NAVARRO, M. F. Twenty-five-year atraumatic restorative treatment (ART) approach: a comprehensive overview. **Clin. Oral Invest.**, v. 16, n. 5, p1337–1346, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0783-4>.
7. MOLINA, G. F.; FAULKS, D.; FRENCKEN, J. Acceptability, feasibility and perceived satisfaction of the use of the Atraumatic Restorative Treatment approach for people with disability. **Braz. Oral Res.**, v. 29, n. 1, p. S1806-83242015000100292, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0097>.

8. MOLINA, G. F. *et al.* Three-year survival of ART high-viscosity glass-ionomer and resin composite restorations in people with disability. **Clin. Oral Investig.**, v. 22, n. 1, p. 461-467, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2134-y>.
9. SIDHU, S. K.; NICHOLSON, J. W. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. **J. Funct. Biomater.**, v. 7, n. 3, p. 16, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/jfb7030016>.
10. GROSSI, J. A. *et al.* Glass hybrid restorations as an alternative for restoring hypomineralized molars in the ART model. **BMC Oral Health**, v. 18, n. 65, p. 65, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0528-0>.
11. SAAD, A. *et al.* Microtensile bond strength of resin-modified glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected root dentin with different conditioning. **Oper. Dent.**, v. 42, n. 6, p. 626-635, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2341/16-375-L>.
12. SOUZA, B. M. *et al.* Effect of an experimental paste with hydroxyapatite nanoparticles and fluoride on dental demineralisation and remineralisation in situ. **Caries Res.**, v. 49, n. 5, p. 499-507, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1159/000438466>.
13. FREITAS, M. C. C. A. *et al.* In vitro effect of a resin infiltrant on different artificial caries-like enamel lesions. **Arch. Oral Biol.**, v. 95, p. 118-124, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.011>.
14. VIEIRA, A. E. M. *et al.* Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, v. 39, n. 6, p. 514-520, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1159/000088189>.
15. GONÇALVES, R. S. *et al.* Sodium trimetaphosphate as a novel strategy for matrix metalloproteinase inhibition and dentin remineralization. **Caries Res.**, v. 52, n. 3, p. 189-198, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1159/000484486>.
16. LOPES, R. M. *et al.* Enamel surface loss after erosive and abrasive cycling with different periods of immersion in human saliva. **Arch. Oral Biol.**, v. 109, p. 104549, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104549>.

17. PINI, N. I. P. *et al.* In vitro efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel. **Caries Res.**, v. 50, n. 3, p. 337-345, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000445758>.
18. DELBEM, A. C. *et al.* Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: an in situ study. **Arch. Oral Biol.**, v. 55, n. 11, p. 913-918, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.07.020>.
19. DANELON, M. *et al.* Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: in situ study. **J. Dent.**, v. 43, n. 7 p. 806-813, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.010>.
20. BRISO, A. L. *et al.* Evaluating the bonding of two adhesive systems to enamel submitted to whitening dentifrices. **Acta Odontol. Latinoam.**, v. 23, n. 2, p. 111-116, 2010.
21. FEAGIN, F.; KOULOURIDES, T.; PIGMAN, W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. **Arch. Oral Biol.**, v. 14, n. 12, p. 1407-1417, 1969. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(69\)90258-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(69)90258-1).
22. FERNÁNDEZ, C. E. *et al.* Effect of 5,000 ppm fluoride dentifrice or 1,100 ppm fluoride dentifrice combined with acidulated phosphate fluoride on caries lesion inhibition and repair. **Caries Res.**, v. 51, n. 3, p. 179-187, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1159/000453624>.
23. BUZALAF, M. A. R. *et al.* Mechanisms of action of fluoride for caries control. In: BUZALAF, M. A. R. (Ed.). **Fluoride and the oral environment**. Basel: Karger, 2011. p. 97–114. DOI: <https://doi.org/10.1159/000325151>.
24. WALSH, L. J. Contemporary technologies for remineralisation therapies: a review. **Int. Dent.**, v. 11, n. 6, p. 6–16, 2009. Disponível em: http://moderndentistrymedia.com/nov_dec2009/walsh.pdf. Acesso em: 21 maio 2021.

25. KARLINSEY, R. L. *et al.* In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: a pilot study. **J. Dent. Oral Hyg.**, v. 3, n. 2, p. 22–29, 2011.
26. KARLINSEY, R. L. *et al.* Preparation, characterization and in vitro efficacy of an acid modified beta-TCP material for dental hard-tissue remineralization. **Acta Biomater.**, v. 6, n. 3, p. 969–978, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.034>.
27. KARLINSEY, R. L. *et al.* Surfactant-modified beta-TCP: structure, properties, and in vitro remineralization of subsurface enamel lesions. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 21, n. 7, p. 2009–2020, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4064-y>.
28. KARLINSEY, R. L.; PFARRER, A. M. Fluoride plus functionalized β -TCP: a promising combination for robust remineralization. **Adv. Dent. Res.**, v. 24, n. 2, p. 48–52, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034512449463>.
29. MENSINKAI, P. K. *et al.* In situ remineralization of white-spot enamel lesions by 500 and 1,100 ppm F dentifrices. **Clin. Oral Investig.**, v. 16, n. 4, p. 1007–1014, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0591-2>.
30. DUNCAN, J. *et al.* The role of the chemical composition of monetite on the synthesis and properties of α -tricalcium phosphate. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 34, p. 123–129, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.038>.
31. COCHRANE, N. J. *et al.* Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. **Aust. Dent. J.**, v. 59, n. 1, p. 100–105, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/adj.12144>.
32. BUCKSHEY, S. *et al.* Remineralizing potential of Clinpro® and Tooth Mousse Plus® on artificial carious lesions. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 43, n. 2, p. 103–108, 2019. DOI: <https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.2.6>.

33. KRÄMER, N. *et al.* Glass ionomer cement inhibits secondary caries in an in vitro biofilm model. **Clin. Oral Investig.**, v. 22, n. 2, p. 1019-1031, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2184-1>.
34. FEATHERSTONE, J. D. B. *et al.* Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. *In*: LEACH, S. A. **Factors affecting de- and remineralization of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 23-34.
35. NASSAR, H. M. *et al.* Impact of toothbrushing frequency and toothpaste fluoride/abrasivity levels on incipient artificial caries lesion abrasion. **J. Dent.**, v. 76, p. 89-92, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.06.018>.
36. KIELBASSA, A. M. *et al.* Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. **Caries Res.**, v. 39, n. 5, p. 380-386, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1159/000086844>.
37. GANSS, C. *et al.* Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. **Caries Res.**, v. 45, n. 6, p. 581-589, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1159/000334318>.
38. 3M CENTER. **Clinpro™ 5000**: 1.1% sodium fluoride anti-cavity toothpaste. 2008. Disponível em: <https://multimedia.3m.com/mws/media/544542O/3m-clinpro-5000-1-1-anti-cavity-toothpaste-technical-product-profile.pdf>. Acesso em: 21 maio 2021.
39. BROWN, W. E.; GREGORY, T. M.; CHOW, L. C. Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. **Caries Res.**, v. 11, suppl. 1, p. 118–141, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1159/000260298>.
40. KARLINSEY, R. L.; MACKEY, A. C. Solid-state preparation and dental application of an organically modified calcium phosphate. **J. Mater. Sci.**, v. 44, n. 1, p. 346–349, 2009.

41. GURGAN, S. *et al.* A randomized controlled 10 years follow up of a glass ionomer restorative material in class I and class II cavities. **J. Dent.**, v. 94, p. 103175, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.07.013>.

42. CHOI, K. *et al.* Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. **Oper. Dent.**, v. 31, n. 5, p. 590-597, 2006. DOI: <https://doi.org/10.2341/05-108>.

43. ALVES, F. B. *et al.* The bonding of glass ionomer cements to caries-affected primary tooth dentin. **Pediatr. Dent.**, v. 35, n. 4, p. 320-324, 2013.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito de dentifrício com alta concentração de flúor na remineralização e resistência de união de cimento de ionômero de vidro em substratos dentários com cárie artificial"**, Processo FOA nº 00513-2019, sob responsabilidade de Ticiane Cestari Fagundes Tozzi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Março de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Abril de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of dentifrice with high concentration of fluoride on remineralization and bond strength of glass ionomer cement on dental substrates with artificial caries"**, Protocol FOA nº 00513-2019, under the supervision of Ticiane Cestari Fagundes Tozzi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 07, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 07, 2021.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP