

Carolina Bezerra Cavalcanti Nóbrega

DESENVOLVIMENTO DE UM VERNIZ À BASE
DE TETRAFLUORETO DE TITÂNIO E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTICÁRIE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Co-orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Piracicaba

2008

Este exemplar foi devidamente corrigido de acordo com a resolução CCPG 036/83

CPG, 29.10.2008



Assinatura do Orientador

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP N669d
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 77181
PROC 16P-129-08
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 18-06-08
BIB-ID 434535

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Marífene Girello – CRB-8ª / 6159

N669d

Nóbrega, Carolina Bezerra Cavalcanti.

Desenvolvimento de um verniz à base de tetrafluoreto de titânio e avaliação da estabilidade química e atividade anticárie. / Carolina Bezerra Cavalcanti Nóbrega. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores: Pedro Luiz Rosalen, Jaime Aparecido Cury.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Flúor. 2. Titânio. 3. Cárie (dentária) I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Cury, Jaime Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Development of a titanium tetrafluoride varnish and evaluation of its chemical stability and anticaries activity

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Fluorine. 2. Titanium. 3. Dental caries

Área de Concentração: Cariologia

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Pedro Luiz Rosalen, Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Fred Yukio Fujiwara, Raul Cesar Evangelista, Marcelo Gianinni

Data da Defesa: 18-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata CAROLINA BEZERRA CAVALCANTI NÓBREGA aprovada.

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

PROF. DR. FRED YUKIO FUJIWARA

PROF. DR. RAUL CESAR EVANGELISTA

PROF. DR. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOUY

PROF. DR. MARCELO GIANNINI

2008 12037

Ao meu querido avozinho **Francisco Bezerra Cavalcanti** (*in memoriam*) que, apesar de ter ido embora deste mundo tão cedo, deixou um legado tão forte e concreto que nem o tempo será capaz de apagar...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, não só por ter acreditado neste trabalho, mas por ter me dado à chance de executá-lo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury**, por me mostrar que o caminho nem sempre é fácil, mas que nem por isso devemos desistir e, sim, continuar a andar com passos cada vez mais fortes.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. **José Tadeu Jorge**; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, do Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP Prof. Dr. **Mário Alexandre Coelho Sinhoreti** e da Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Profa. Dra. **Cláudia Herrera Tambeli**, pela oportunidade de fazer parte de tão conceituada Universidade, aproveitando todos os momentos de aprendizado durante esses 4 anos.

À Agência de Fomento do Estado de São Paulo: **FAPESP** – Pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa, na concessão da bolsa de doutorado (processo nº 03/09882-4).

A todos os sábios que levam os jovens a enxergarem os singelos momentos, a força que surge nas perdas, a segurança que brota no caos, a grandeza que emana dos pequenos gestos!!!

“As grandes idéias surgem da observação de pequenos detalhes”.

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, senhor maior e todo poderoso, que me deu a vida, e principalmente os obstáculos que a fazem digna de ser vivida a cada segundo.

Aos meus pais **Ari e Nilda**, essências da minha vida, razões do meu viver. Acredito que quando Deus decidiu me dar um presente o fez para que fosse eterno...

Ao meu irmão **Vitor**, meu companheiro de uma infância de liberdade e de uma vida adulta de buscas, incentivo e auxílio mútuo.

Ao meu noivo **Luiz Eduardo**, por simplesmente existir, fazendo da ausência e da distância esperanças e tornando a minha vida cada dia mais especial.

À minha **família**, enorme em número e coração, pessoas maravilhosas que sei que estarão ao meu lado sempre, mesmo que haja distância.

À minha amiga irmã **Sandra**, companheira e confidente, de quem a distância me separou, mas que sei que estará comigo para sempre.

Ao meu amigo **Renzo**, que me ensinou a acreditar em mim, confiar em meus objetivos e transformar o sentimento de ausência em maturidade.

Aos meus amigos **Gláuber, Karlinha, Rodrigo, Cláudia, Anna, Fernando, Thais, Stelinha, Rosana, Renato, Max e Tati**, por tornarem a minha vida em Piracicaba tão especial e por me fazer entender o verdadeiro significado da amizade.

À minha amiga **Luciana**, com quem dividi grandes e importantes momentos da minha vida e de quem vou sentir uma eterna saudade.

Às minhas amigas **Lorena e Luana**, com quem dividi não só o mesmo teto, mas parte da minha vida.

Aos meus amigos de João Pessoa: **Luciana, Anabelle, Ronise e Karina** por me apoiarem e pela amizade apesar da distância.

À **Eliane**, companheira verdadeira, por quem tenho um profundo respeito e admiração.

À **Simone**, amiga de todas as horas, pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

À **Maria Luiza**, por me ensinar o verdadeiro significado da palavra amizade.

À minha querida **Greice**, pela amizade e pela ajuda imprescindível nesse trabalho.

Aos amigos da Farmacologia: **Bruno, Myrella, Michelle, Gilson, Karina, Cristiane, Rogério, Regiane, Ramiro e Fernando** pela amizade e por tantos momentos de alegria.

Aos meus amigos da Pós-Graduação **Adriana, Carol Aires, Alessandra, Bruno Benatti, Emilena, Celso, Giselle, Danna, Alexandre, Marcelo, Liana e Vanessa** por tornarem a minha vida em Piracicaba muito mais agradável.

As Professoras da Cariologia: **Cíntia Tabchoury e Livia Tenuta**, pelo auxílio e pela atenção em todos os momentos desse trabalho.

À Professora **Altair A Del Bel Cury** por ter me dado incentivo e força pra fazer esse doutorado.

Ao Professor **Paulo Dutra (IQ-UFRJ)**, pelo valoroso apoio e pela eterna disponibilidade.

Ao Professor **Raul Cesar Evangelista (UNESP-Araraquara)** pelos ensinamentos tão importantes pra minha vida pessoal e profissional e pela amizade sincera.

Ao Professor **Fred Fujiwara (IQ/UNICAMP)** por acreditar em mim e por me fazer entender que cada novo desafio traz não só a dificuldade, mas também a alegria da vitória.

Ao Professor **Virgílio Nascimento** e ao Aluno de Doutorado **Eduardo Almeida (CENA-USP)** por contribuírem de uma forma tão especial nesse trabalho.

Ao Professor **Jacks Jorge** e ao Aluno de Doutorado **Eduardo Campagnoli** pela preciosa ajuda e pelo convívio tão agradável.

À Professora **Brenda Gomes** pelo auxílio e pela amizade.

À Professora **Ana Maria Valença**, pela amizade sincera e estímulo durante toda minha formação profissional.

Ao Professor **Fábio Sampaio**, pela amizade e apoio durante todas as etapas da minha vida acadêmica.

Ao Pesquisador **Carlos Perez (LNLS – Campinas)**, pelos ensinamentos tão valiosos e pela atenção constante.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

Às secretárias **Elisa, Érica e Raquel** e a estagiária **Tatiane**, pela disponibilidade constante e pelo carinho.

Aos técnicos da Bioquímica: **José Alfredo da Silva, Mariza Soares e Waldomiro Vieira Filho** pela ajuda e pelos inúmeros momentos de aprendizado.

Ao técnico de microscopia **Adriano** pela ajuda em todos os momentos e pela amizade sincera.

Aos técnicos do Biotério: **Wanderley e Fábio**, e ao técnico da Farmacologia **José Carlos** pela ajuda constante.

Aos alunos da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP/Araraquara pela amizade, auxílio constante e pelos momentos de alegria.

À **Marilena, Esther e Raphael Rosalen**, pelo convívio e por me proporcionarem momentos em família, tão valiosos pra quem está longe dos entes queridos.

Ao professor **Chris Sissons**, por acreditar em mim e fazer do meu período de estágio na Universidade de Otago (Wellington – Nova Zelândia) um momento único e inesquecível na minha vida.

Aos amigos da Escola de Medicina de Wellington: **Lisa, Sara, Tesha, Manjula, Linny, Glenn, Zainab e Michael** por fazerem da minha estada na Nova Zelândia uma experiência ímpar e por me mostrarem que quando a experiência e sapiência vêm junto com a humildade e boa vontade tudo que parece impossível se torna simples.

Ao Pesquisador **José Wellington da Silva** (Embrapa) e ao **Prof. Carlos Tadeu Dias** pela valorosa ajuda na área de estatística.

A todos os **funcionários** da FOP pelo auxílio e dedicação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Meu mais sincero: OBRIGADO

Ser um empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos.
É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças.
É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola.
É tomar atitudes que ninguém tomou.
É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória.
É não esperar uma herança, mas construir uma história...

Augusto Cury

RESUMO

O uso de fluoreto tem sido a principal medida para o controle da cárie dentária. Dentre os compostos químicos utilizados, encontra-se o tetrafluoreto de titânio (TiF_4); entretanto, o uso do TiF_4 tem sido limitado devido a sua instabilidade em solução aquosa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um verniz à base de tetrafluoreto de titânio (2,26% de fluoreto), avaliar sua estabilidade química e sua eficácia como agente anticárie. A avaliação da estabilidade química foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear utilizando ^{19}F (RMN – ^{19}F), para identificação e quantificação dos subprodutos à base de titânio encontrados no verniz fresco e após teste de envelhecimento. Adicionalmente, a reatividade do verniz fresco e envelhecido foi determinada pela quantificação de fluoreto fracamente (fluoreto de cálcio) e fortemente (fluorapatita) formados no esmalte dental. O potencial anticárie do verniz foi avaliado utilizando o modelo de cárie animal. Quatro grupos com 12 ratas Wistar SPF cada receberam nos molares aplicação do verniz a base de TiF_4 envelhecido por um ano, verniz Duraphat® (controle positivo – 2,26% de fluoreto), verniz sem princípio ativo (controle negativo), ou não receberam tratamento e foram submetidas a alto desafio cariogênico por 4 semanas. O efeito anticárie foi avaliado por meio de análise da incidência e da severidade de cárie e da composição da microbiota oral. Ao término do experimento, tecidos da cavidade oral das ratas foram removidos para análise do potencial de toxicidade local do verniz. A análise por RMN identificou no verniz desenvolvido seis subprodutos, que se mantiveram estáveis pelo prazo de envelhecimento testado. A capacidade do verniz em formar fluorapatita no esmalte manteve-se estável durante o envelhecimento ($p>0,05$), mas houve redução na formação de fluoreto de cálcio ($p<0,05$). O verniz desenvolvido também se mostrou eficaz na redução da cárie nas ratas em comparação com o controle negativo ($p<0,05$) e foi equivalente ao controle positivo ($p>0,05$). Não

foram identificadas alterações teciduais da cavidade oral na avaliação toxicológica. Os resultados sugerem que o verniz de tetrafluoreto de titânio desenvolvido pode ser considerado uma formulação promissora como agente anticárie.

Palavras-chave: Estabilidade, compostos fluoretados, titânio, agente anticárie.

ABSTRACT

Fluorine has been used as the main alternative to control dental caries. A large number of chemical compounds are available for that purpose as titanium tetrafluoride (TiF_4); however, TiF_4 use has been limited due to its instability in aqueous solutions. In this way, the aim of this study was to develop a titanium tetrafluoride varnish (2.26% fluorine) and evaluate its *in vitro* chemical stability and anti-carries activity in rats. To evaluate the varnish chemical properties ^{19}F nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{19}F -NMR) was used to identify and quantify titanium sub-products in fresh and aged varnishes. Additionally, the reactivity of fresh and aged varnishes was evaluated by quantifying fluoride, loosely (calcium fluoride) and firmly (fluorapatite) formed on dental enamel. To evaluate the anti-carries potential of the titanium tetrafluoride varnish, a caries animal model was used. Wistar SPF rats were randomly assigned to 4 groups (n=12) receiving on molars application of aged TiF_4 varnish, Duraphat[®] varnish (positive control- 2.26% fluorine), non fluoride varnish (negative control) or no treatment and then submitted to a cariogenic challenge for 4 weeks. The varnish anti-carries effect was evaluated by incidence and severity of dental caries and oral biofilm composition. After the experimental period, oral tissues of the rats were removed to analyze the local toxic effect of the varnish. Six titanium sub-products of the varnish were identified through NMR analysis and kept stable over the aging period. Deposition of fluorapatite on enamel was not changed during aging period ($p>0.05$); however, a reduction in calcium fluoride formation was verified ($p<0.05$). TiF_4 varnish also was efficient in reducing caries in rats when compared to negative control ($p<0.05$); showing similar results to the positive control ($p>0.05$). No oral tissue alterations were verified by toxicological analyses. This new TiF_4 formulation might be considered a promising anti-carries agent.

Key-words: Stability, fluoridated compounds, titanium, anti-carries agent.

SUMÁRIO

Introdução	1
Capítulo 1: TiF ₄ Varnish – A ¹⁹ F NMR Stability Study and Enamel Reactivity Evaluation	5
Capítulo 2: Efeito de um verniz à base de tetrafluoreto de titânio na redução de cárie em ratas	9
Considerações Gerais	21
Conclusões	23
Referências	24
Anexos	28

INTRODUÇÃO

Embora tenha havido diminuição considerável da prevalência de cárie nas últimas décadas, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (WHO, 2007), diferenças importantes com relação a essa doença são evidenciadas entre regiões, cidades e até mesmo grupos populacionais (Narvai *et al.*, 2006). Essas diferenças são decorrentes de um fenômeno epidemiológico denominado polarização da doença cárie, o qual cria desequilíbrios no sistema de saúde, gerando a necessidade de busca de medidas alternativas de prevenção e controle da cárie, focadas em grupos específicos (Antunes *et al.*, 2004).

Dentre as medidas alternativas utilizadas para essa finalidade, o amplo uso de fluoretos tem sido priorizado, com destaque para o fluoreto de sódio (NaF). Adicionalmente, diferentes compostos fluoretados têm sido testados no intuito de encontrar alternativas similares ou mesmo com propriedades superiores ao fluoreto de sódio (Shrestha *et al.*, 1972; Wefel & Harless, 1981; Vieira *et al.*, 2005; Hove *et al.*, 2006), entre as quais destaca-se o tetrafluoreto de titânio (TiF₄).

O TiF₄ é um cristal branco extremamente higroscópico (Haendler *et al.*, 1954). Sua solução aquosa é comumente formulada nas concentrações de 1% e 4% (Buyukyilmaz *et al.*, 1997a) e seus constituintes (F e Ti) reagem rapidamente com a água e oxigênio, formando compostos secundários (Skartveit *et al.*, 1991; Kasemi *et al.* 1999), como hexafluoreto de titânio (TiF₆²⁻) e óxido de titânio (TiO₂).

Uma peculiaridade do TiF₄ é ser solúvel em álcool (Budavari, 1996), possibilitando o desenvolvimento de vernizes utilizando uma matriz resinosa, o que não ocorre com o fluoreto de sódio. Adicionalmente, a pequena quantidade de água presente nessas matrizes minimiza os efeitos indesejáveis dos processos de hidrólise do TiF₄.

O mecanismo de ação do TiF₄ na superfície dentária tem sido atribuído ao efeito dos íons fluoreto e titânio com a formação de uma película alcali-ácido resistente composta por dióxido de titânio (Mundorff *et al.*, 1972; Tveit *et al.*, 1985), que permanece na superfície tratada mesmo após desafio ácido (Wei *et al.*, 1976). Essa cobertura é formada por meio da hidrólise do TiF₄, que se deposita nas formas

de dióxido de titânio (TiO_2) e fluoreto de cálcio (CaF_2) nos dentes, aumentando, desta forma, a resistência à dissolução (Mundorff *et al.*, 1972; Shrestha *et al.*, 1972; Wefel & Harless, 1981), e não sendo totalmente removida por lavagem com hidróxido de potássio (KOH) (Wefel & Harless, 1981) ou com ácido clorídrico (HCl) (Kasemi *et al.*, 1999).

O TiF_4 tem sido amplamente pesquisado em Odontologia na diminuição e/ou prevenção da sensibilidade dentinária (Charvat *et al.*, 1995); como selante de fósulas e fissuras (Buyukyilmaz *et al.*, 1997b); em endodontia, para desinfecção dos canais radiculares (Tveit *et al.*, 1985); para prevenir cárie dentária (Shrestha *et al.*, 1972; Wefel, 1982; Derand *et al.*, 1989; Skartveit *et al.*, 1989; 1991; Buyukyilmaz *et al.*, 1997a) e em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos, os quais apresentam maior risco de desenvolvimento de cárie (Buyukyilmaz *et al.*, 1994; Buyukyilmaz *et al.*, 1995). Estudos com TiF_4 apresentam resultados promissores *in vitro* não só na inibição da dissolução do esmalte (Mundorff *et al.*, 1972; Shrestha *et al.*, 1972), mas também na prevenção da erosão dentária (Buyukyilmaz *et al.*, 1997b; van Rijkom *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005; Hove *et al.*, 2006).

O envelhecimento das soluções de Ti está diretamente ligado aos processos de hidrólise do composto em soluções aquosas. A hidrólise do TiF_4 leva à formação de dímeros à base de Ti que se unem, constituindo cadeias do tipo poliméricas com diferentes estruturas. Essas cadeias são ligadas por pontes de Ti com oxigênio estáveis e de caráter irreversível, diminuindo assim a quantidade de íons livres (ativos) presentes na solução e formando precipitados visíveis em curto espaço de tempo (Marion & Thomas, 1946).

Apesar dos resultados favoráveis apresentados para esse composto, não há uma forma farmacêutica que permita a manutenção da integridade do TiF_4 , ou de seus subprodutos, por períodos prolongados (Marion & Thomas, 1946; Laptash *et al.*, 2004). Dessa forma, as soluções aquosas de TiF_4 são consideradas soluções extemporâneas, tendo como dificuldades ou limitações para uso clínico longo tempo necessário para sua preparação, a instabilidade e o curto prazo para utilização.

Diante do exposto, acredita-se que o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica à base de TiF_4 , estável e eficaz, para aplicação em Odontologia seja um objetivo relevante a ser atingido em termos de mais uma alternativa no controle da cárie dentária.

Assim, os objetivos desse estudo foram:

a) desenvolver uma formulação quimicamente estável de um verniz à base de tetrafluoreto de titânio;

b) avaliar a estabilidade química e o potencial anticárie desse verniz.

CAPÍTULOS

Este trabalho de tese foi realizado no formato alternativo, conforme Informação CCPG/002/06, da Comissão Central de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que permite a inclusão de artigos científicos do candidato de forma a atingir o objetivo deste estudo (ANEXO 1).

Assim sendo, esta tese é composta de dois capítulos, contendo artigos que foram aceitos ou estão sendo submetidos para publicação em revistas científicas, conforme descrito abaixo:

✓ Capítulo 1

“TiF₄ Varnish – A ¹⁹F NMR Stability Study and Enamel Reactivity Evaluation.”
Artigo publicado: Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008 Jan; 56(1): 139-41 (ANEXO 3)
(errata ANEXO 8).

✓ Capítulo 2

“Efeito de um verniz à base de tetrafluoreto de titânio na redução de cárie em ratas”

Este artigo será submetido à publicação.

Capítulo 1

TiF₄ Varnish – A ¹⁹F NMR Stability Study and Enamel Reactivity Evaluation

Autores: Carolina Bezerra Cavalcanti NÓBREGA^a, Fred Yukio FUJIWARA^b, Jaime Aparecido CURY^a; Pedro Luiz ROSALEN^{* a}

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 52, Piracicaba, Brasil, CEP: 13414-903; ^b Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6154, CEP: 13084-862.

Chem Pharm Bull (Tokyo). 2008 Jan;56(1):139-41

Errata – Anexo 8

* To whom correspondence should be address, e-mail: rosalen@fop.unicamp.br

TiF₄ Varnish—A ¹⁹F-NMR Stability Study and Enamel Reactivity Evaluation

Carolina Bezerra Cavalcanti NÓBREGA,^a
Fred Yukio FUJIWARA,^b Jaime Aparecido CURY,^a and
Pedro Luiz ROSALEN^{*a}

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; Caixa Postal 52, Piracicaba, CEP 13414-903, Brasil; and
^bInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas; Caixa Postal 6154, CEP 13084-862, Brasil.

Received July 9, 2007; accepted November 7, 2007; published online November 8, 2007

The aim of this study was to develop a titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish and evaluate the stability of the formulation and its reactivity with dental enamel. The varnish was prepared in a resinous matrix using ethanol 96% as solvent. Samples (*n*=45) were aged at 65 °C and 30% of relative humidity (RE n° 01/05—ANVISA) and after 3, 6, 9 and 12 months, nine samples were removed for evaluation and compared with fresh samples. Chemical stability of TiF₄ varnish was determined by ¹⁹F-NMR and the reactivity of the formulation was quantified by formation of fluoride loosely (CaF₂) and firmly bound (fluorapatite; FA) to enamel. For reactivity comparisons, a varnish without TiF₄ was used as control. The loss of soluble fluoride was about 0.9% after one year of storage. The values of the reactivity (mean±S.D.) of fresh, aged at 3, 6, 9 and 12 months and control samples were: CaF₂ (μgF/mm²): 89.3±27.5^a; 84.5±14.3^b; 51.2±29.8^c; 69.3±21.3^d; 48.0±27.4^e; 0.10±0.07^f; FA (μgF/g): 2477.5±1044.0^a; 2484.8±992.0^b; 2580.0±1383.9^c; 2517.2±929.9^d; 2121.0±1059.2^e; 330.0±180.0^f, respectively. Means followed by distinct letters were statistically different (*p*<0.05). After one year of storage, the formulation was chemically stable and the levels of FA were maintained. However there was an initial decrease in the ability to form CaF₂.

Key words titanium tetrafluoride; drug stability; fluoride varnish

Although professionally applied topical fluoride treatment has been used for caries control for many years, there is an interest in finding new compounds for this purpose.^{1,2} TiF₄ (titanium tetrafluoride) is a fluorinated compound which has low values of pH (ca. 1–2)³ in water or alcohol solutions. In addition to the pH values, titanium corrosion resistance and the capacity to form an oxide coating on enamel could be responsible for the results related to caries process.^{1,2,4–7} However, in spite of the promising results, this compound has not yet been used in clinical procedures due to the lack of stability in water solutions.⁸

TiF₄ hydrolysis processes in water have been described, with emphasis on the formation of many fluoride complexes.^{4,6} In addition to the stability and physical chemical properties of fluorinated agents, the efficacy of these products depends on the capacity to react with enamel forming reaction products, which can be loosely (calcium fluoride) or firmly (fluorapatite) bound to enamel and could interfere with the de- and re-mineralizing phases of the caries process.⁷ The aim of this study was to produce a TiF₄ varnish and evaluate the chemical stability and enamel reactivity during one year period.

Experimental

Varnish Preparation and Aging The TiF₄ varnish was prepared by dissolving TiF₄ (ca. 4%) and resin products in ethanol 96%. A homogeneous solution was obtained by slowly adding the solids to ethanol with vigorous stirring. Next, the viscous solution was placed in plastic containers (*n*=45), protected from light exposure and maintained in an aging process at 65 °C and 30% RH (relative humidity).⁹ After 3, 6, 9 and 12 months, nine samples were removed for analyses and compared with fresh samples.

NMR Spectra The fresh and aged TiF₄ varnish formulations were analyzed by ¹⁹F-NMR using a Bruker AC300 (282.4 MHz) and an Advance DFX (235.4 MHz) spectrometer in 5 mm co-axial tubes at –30 °C. CFCl₃ was placed in the center coaxial tube as a chemical shift reference (δ =0 ppm) and as a reference for quantitative analyses.

Reactivity with Enamel The reactivity of the TiF₄ varnish formulation was evaluated using 15 bovine enamel blocks (3×3×2 mm) per group/time. A varnish without TiF₄ was used as a negative control. All the block surfaces were protected with dental wax except for the enamel surface. The treatments were applied to the enamel for 4 min, the excess of varnish on the block was removed with acetone and the enamel surface was washed with distilled water. The blocks were placed in individual tubes containing 0.5 ml 1.0 M KOH to extract the loosely bound fluoride formed on enamel (CaF₂).¹⁰ After 24 h under agitation at room temperature, 0.5 ml of TISAB II, pH 5.0, containing 1.0 M HCl was added to the tubes. The blocks were washed with deionized water and transferred to another tube to extract, by acid etching, the firmly bound fluoride (FA) formed. Then 0.5 ml of 0.5 M HCl was added to the tubes and after 60 s under agitation, the acid was buffered with 0.5 ml of TISAB II (Total Ionic Strength Adjustment Buffer), pH 5.0, added 20 g NaOH/l.

Fluoride as CaF₂ and FA (fluorapatite) were determined with an ion-specific electrode (Orion 96-09) and an ion analyzer (Orion 720 A), which were previously calibrated.

Statistical Analysis The data of fluoride formed were analyzed by ANOVA and Tukey test, and the significance limit was set at 5%.

Results

A typical ¹⁹F-NMR spectrum is shown in Fig. 1 and the complexes identified are shown in Table 1. Low temperatures are used to obtain the spectra because the spectra obtained at ambient temperature presented very broad peaks due to chemical exchange of fluorines between the complexes. Peaks from fluorines in the same complex were identified by their coupling constants or by an F–F COSY experiment and the chemical shifts were calibrated using CFCl₃ as the external standard. The areas under the individual peaks were obtained by a deconvolution procedure where a Lorentzian line-shape is adjusted to each peak. The Bruker Topspin 1.3 software was used to process the spectra. The relative intensities of the fluorines in the Ti complexes determined are shown in Fig. 2. The percentage of fluoride loss after 1 year was approximately 0.9%. It is calculated by comparing the total intensity of the peaks of all complexes with the peak of the CFCl₃ reference in the coaxial tube.

The amount of CaF₂ formed on the enamel initially decreased at the beginning of storage and then remained relatively constant. However, the varnish keeps its capacity to form FA in enamel during all experimental time. These results are presented in Table 2.

Discussion

Toothpastes, varnishes, mouth rinses and gels are popular local delivery systems used in dentistry^{11–13} and there are several commercially available products for professional topical application. Teeth varnish is a delivery system, which is widely used today to minimize the risks of fluoride over-ingestion. The high capacity of the varnish to keep the active

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: rosalen@fop.unicamp.br

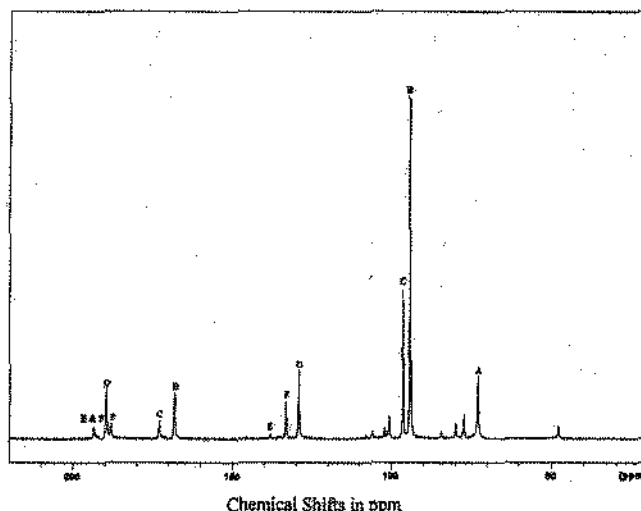


Fig. 1. ^{19}F -NMR Spectra of the Freshly Prepared TiF_4 Varnish at -30°C

Table 1. Chemical Shift Assignments of Ti Complexes in the Varnish^{14,6,19,20}

Peaks identification	TiF_4 complexes	Chemical shifts in ppm (External reference CFCl_3)
A	$[\text{TiF}_6]^{2-}$	73.4 (6F)
B	$[\text{TiF}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}]^-$	168.8 (2F); 94.6 (3F)
C	$[\text{TiF}_5 \cdot \text{EtOH}]^-$	173.5 (2F); 97.0 (3F)
D	$\text{TiF}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	190.1 (2F); 129.9 (2F)
E	$\text{TiF}_4 \cdot 2\text{EtOH}$	194.0 (2F); 138.6 (2F)
F	$\text{TiF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOH}$	194.0 (1F); 188.6 (1F); 133.7 (2F)
—	Not identified	108.5; 106.3; 102.6; 101.4; 84.9; 80.2; 77.8; 48.2

Table 2. Enamel Fluoride Formed (Mean \pm S.D., $n=15$) as CaF_2 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) and FA ($\mu\text{g}/\text{g}$)

Period	CaF_2 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	FA ($\mu\text{g}/\text{g}$)
First day	89 ± 28^a	2500 ± 1000^a
3 months	55 ± 14^b	2500 ± 1000^a
6 months	51 ± 30^b	2600 ± 1400^a
9 months	69 ± 21^c	2500 ± 930^a
12 months	48 ± 27^c	2100 ± 1100^a
Negative control	0.10 ± 0.07^d	330 ± 180^b

Significant differences among periods, for each reaction product, are indicated by different letters ($p < 0.05$). Data analyzed by ANOVA and Tukey test.

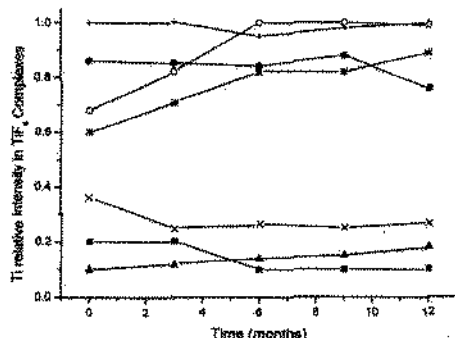


Fig. 2. Variations in the Relative Intensities in the Ti Complexes during the Storage Period

+, $\text{TiF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOH}$; ●, $[\text{TiF}_5 \cdot \text{EtOH}]^-$; ○, $[\text{TiF}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}]^-$; *, $\text{TiF}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ×, $\text{TiF}_4 \cdot 2\text{EtOH}$; ■, total intensity of unidentified peaks; ▲, $[\text{TiF}_6]^{2-}$.

compound in contact with teeth enamel, the secure use of high concentrations of fluoride compounds and the advantage of using ethanol as solvent were the main properties considered to produce this varnish. In relation to stability, the

maximum percentage loss suggests by Brazilian Sanitary Authorities⁵ is 5%. The TiF_4 varnish after aging for one year presented a 0.9% loss of soluble fluorine compounds when compared to a fresh varnish and therefore can be considered as a stable formulation.

Solutions of TiF_4 in ethanol were reported to contain primarily the $\text{TiF}_4 \cdot 2\text{EtOH}$ complex.^{15,16} Species as $[\text{TiF}_5 \cdot \text{EtOH}]^-$, $[\text{TiF}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}]^-$, $\text{TiF}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{TiF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOH}$ seems to be the major products in the reaction and the percentage of fluorine complexes with water ligands has the tendency to increase during time (Fig. 2). The percentage of unknown species were small (Fig. 2) and could be oxides such as $[\text{TiOF}_4]^{2-}$, $[\text{TiOF}]^+$, TiOF_2 and $[\text{TiOF}_3]^-$, that are present in hydroxide fluoride solutions.⁴⁾ Buslaev Y. A., *et al.*⁴⁾ studied the hydrolysis of TiF_4 in ethanol with various amounts of water and observed that several hydrolysis products were formed; most of them are of low concentration and only $[\text{TiF}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}]^-$ and $[\text{TiF}_5 \cdot \text{EtOH}]^-$ were positively identified. In all of the solutions, $\text{TiF}_4 \cdot 2\text{EtOH}$ was found, which is the same observed in this study. Spectra of TiF_4 in absolute ethanol were used to confirm the assignment of the complexes, which do not have water as a ligand. The peaks due to the unidentified compounds were not observed in solutions prepared with absolute ethanol, which indicates that these

compounds are a result of reactions of TIF₂ with water.

In relation to reaction products shown in Table 2, the maintenance of FA levels is important to reduce mineral loss during caries process. However, the decrease in CaF₂ formation could interfere in inhibition of the dynamic of caries process, due to its capacity to act as a pH-controlled reservoir of ions on enamel and dental plaque that can be released during cariogenic challenges.^{17,18)}

Conclusion

In conclusion, the varnish can keep fluoride compounds stable for a year. Furthermore, the varnish was able to maintain the levels of enamel uptake as FA although it was not capable of keeping the levels of calcium fluoride. Further studies are required to explain how this decrease in one of enamel fluoride reservoirs could interfere in factors related to caries process.

Acknowledgments This study was supported by FAPESP scholarship (Process number 03/09882-4).

References and Notes

- Shrestha B. M., Mundorff S. A., Basil G. B., *J. Dent. Res.*, **51**, 1561—1566 (1972).
- Vieira A., Ruben J. R., Hayamans M. C., *Caries Res.*, **39**, 371—379 (2005).
- Laptash N. M., Fedotov M. A., Maslennikova I. G., *J. Struct. Chem.*, **45**, 74—82 (2004).
- Bushaev Y. A., Dyer D. S., Ragsdale R. O., *Inorg. Chem.*, **6**, 2208—2212 (1967).
- Curzon M. B. J., Cutress T. W., "Trace Elements and Dental Disease" ed. by Wright J., PSG Inc., Bristol, 1983.
- Ragsdale R. O., Stewart B. B., *Inorg. Chem.*, **2**, 1002—1004 (1963).
- Wei S. H. Y., Soboroff D. M., Wetzel J. S., *J. Dent. Res.*, **55**, 426—431 (1976).
- Marion S. P., Thomas A. W., *J. Colloid. Sci.*, **1**, 221—234 (1946).
- ANVISA—Resolution RE nº 1, July 29, 2005. Available in: <http://legis.anvisa.gov.br/leisres/public/showAct.php?id=18109&word=>. Access in November, 2005.
- Calavaska V., Moreno E. C., Brydevoild P., *Arch. Oral. Biol.*, **20**, 335—339 (1975).
- Marinho V. C. C., Higgins J. P. T., Logan S., Sheiham A., The Cochrane Library, Issue 4, 2006a. Oxford: Update Software.
- Marinho V. C. C., Higgins J. P. T., Logan S., Sheiham A., The Cochrane Library, Issue 4, 2006b. Oxford: Update Software.
- Marinho V. C. C., Higgins J. P. T., Logan S., Sheiham A., The Cochrane Library, Issue 4, 2006c. Oxford: Update Software.
- Marinho V. C. C., Higgins J. P. T., Logan S., Sheiham A., The Cochrane Library, Issue 4, 2006d. Oxford: Update Software.
- Dyer D. S., Ragsdale R. O., *Inorg. Chem.*, **8**, 1116—1120 (1969).
- Ragsdale R. O., Stewart B. B., *Proc. Chem. Soc.*, **1964**, 194 (1964).
- Ógaard B., *Caries Res.*, **35**, 40—44 (2001).
- White D. J., Nancollas G. H., *J. Dent. Res.*, **69**, 587—594 (1990).
- Dyer D. S., Ragsdale R. O., *Inorg. Chem.*, **6**, 8—11 (1967).
- Serre C., Corbiere T., Lorenz C., Tautelle F., Férey G., *Chem. Mater.*, **14**, 4938—4947 (2002).

Capítulo 2

Efeito de um verniz a base de TiF_4 na redução de cárie em ratas

Autores: Nóbrega CBC; Almeida LSB; Cury JA; Rosalen PL

Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil.

Resumo

O tetrafluoreto de titânio possui vantagens quando comparado a outros sais de fluoreto como a atividade química do titânio e do flúor e alta reatividade com tecidos duros, entretanto o TiF_4 é instável em solução aquosa necessitando assim de uma formulação que não possua água ou que possua uma quantidade mínima de água como solvente. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito anticárie de um novo verniz quimicamente estável à base de TiF_4 . Quatro grupos com 12 ratas Wistar SPF cada foram infectados com *S. sobrinus* 6715 e receberam aplicação tópica nos molares do verniz desenvolvido (2,26 % de fluoreto) e envelhecido por um ano, verniz Duraphat® (controle positivo, 2,26% de fluoreto) ou verniz sem princípio ativo (controle negativo); um grupo adicional não sofreu nenhum tratamento. Após quatro semanas de alto desafio cariogênico por meio de dieta 2000, o efeito dos tratamentos foi avaliado na redução de *S. sobrinus* e de cárie dentária. Também foi avaliada a toxicidade local dos tratamentos em tecidos orais das ratas. Com relação à porcentagem de *S. sobrinus* na cavidade oral, o verniz desenvolvido não diferiu estatisticamente dos controles negativo e positivo ($p>0,05$). Porém, a porcentagem de *S. sobrinus* observada nos grupos tratados com o verniz desenvolvido e o Duraphat® diferiram significativamente do grupo não tratado ($p<0,05$). O verniz desenvolvido foi mais eficaz do que o controle negativo na redução de cárie ($p<0,05$), porém ele não diferiu do controle positivo - Duraphat® ($p>0,05$). A análise do potencial de toxicidade dos tratamentos sobre os tecidos da cavidade oral das ratas não evidenciou nenhuma alteração morfológica. Conclui-se que o verniz desenvolvido possui potencial anticárie mesmo após um ano de envelhecimento, sugerindo ser essa formulação promissora para uso clínico.

Palavras-chave: flúor, titânio, esmalte, atividade anticárie, estudo animal.

Introdução

Embora a prevalência e a severidade da cárie dentária tenham apresentado um decréscimo na maioria dos países industrializados e em desenvolvimento (WHO, 2007), pesquisas buscando alternativas que atuem em grupos populacionais específicos continuam a ser realizadas (Narvai *et al.*, 2006). Fluoretos tópicos têm sido amplamente utilizados para esse propósito e recentes revisões sistemáticas têm mostrado evidências do efeito benéfico da fluoroterapia (Marinho *et al.*, 2007a, b).

O tetrafluoreto de titânio é um composto fluoretado acidulado (pH próximo de 1,0) que tem atraído a atenção dos pesquisadores na área da odontologia nos últimos anos (Rijkom *et al.*, 2003; Hove *et al.*, 2006). O TiF_4 apresenta vantagens quando comparado a outros sais de fluoreto, como a atividade química do titânio em acréscimo ao flúor e a reatividade com tecidos duros (Skartveit *et al.*, 1991). O TiF_4 tem a vantagem adicional de ser solúvel em etanol, viabilizando o desenvolvimento de formulação na forma de verniz sem a instabilidade apresentada pelo composto em solução aquosa.

Apesar de bons resultados não apenas em relação à redução da desmineralização dentária (Exterkate & ten Cate, 2007) como também no efeito protetor contra erosão ácida (Hove *et al.*, 2006) pesquisas sobre o TiF_4 continuam principalmente para solucionar sua falta de estabilidade química em solução aquosa devido aos processos de hidrólise que ocorrem com esse composto em solução (Marion & Thomas, 1946, Laptash *et al.*, 2004).

Assim, um verniz à base de TiF_4 , que manteve a estabilidade química por um ano (Nóbrega *et al.*, 2008), foi avaliado em modelo animal quanto ao seu efeito anticárie.

Material e Métodos

Amostras de verniz a base de TiF_4 (2,26% de fluoreto) formulado em uma matriz resinosa de laca e colofônia foram envelhecidas a 30°C e 65% de umidade relativa (Brasil, 2005), e uma amostra envelhecida por um ano foi escolhida para ser utilizada nesse experimento para que fosse possível avaliar se havia além da estabilidade química, atividade biológica do verniz após esse período.

O experimento de desenvolvimento de cárie animal foi realizado conforme metodologia descrita por Bowen *et al.* (1988) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Protocolo de número 610-1/2003)(ANEXO 4).

Quarenta e oito ratas Wistar de 19 dias de idade, livres de patógenos específicos (specific pathogen free – SPF) e de estreptococos do grupo mutans (Bowen *et al.*, 1988) foram utilizadas. As ratas foram infectadas no 20º, 21º, 22º e 23º dias de idade com culturas de *Streptococcus sobrinus* 6715 em fase logarítmica de crescimento ativo. A confirmação da infecção dos animais foi realizada utilizando “Mitis Salivarius” ágar (Difco® - USA) contendo estreptomomicina (Sigma®- USA). No 25º dia as 48 ratas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (n=12), anestesiadas com hidrato de cloral (440 mg/kg) e submetidas aos seguintes tratamentos: 1) verniz de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) com um ano de envelhecimento; 2) verniz sem o princípio ativo (controle negativo); 3) verniz de fluoreto de sódio Duraphat® (controle positivo, 2,26% de fluoreto); 4) Grupo sem tratamento.

A boca do animal foi mantida aberta com extensor metálico e haste elástica durante todo o procedimento de aplicação dos tratamentos (ver ANEXO 6). Todos os tratamentos foram realizados com mini-pincéis descartáveis (microbrushes®) secos e saturados com o produto, sendo utilizado um para cada hemi-arcada. A aplicação foi feita em todas as superfícies acessíveis dos molares superiores e inferiores, sendo esses dentes previamente secos com gaze estéril. Logo após a aplicação do verniz, os animais foram retirados dos extensores e mantidos em observação e jejum por 2h.

Após o período de 2 horas, os animais foram separados em gaiolas individuais, onde receberam dieta cariogênica 2000 (56% de sacarose) e água destilada deionizada esterilizada *ad libitum* durante todo o experimento. As ratas foram pesadas semanalmente, sendo examinadas diariamente quanto à aparência física. Ao término da quarta semana do período experimental, as ratas foram mortas por asfixia por CO₂. A hemi-mandíbula inferior esquerda de cada animal foi assepticamente dissecada, transferida para um tubo contendo 5 ml de solução de NaCl 0,9% e sonicada (Vibra Cell, Sonics & Material Inc; 6 pulsos de 10s, com intervalos de 5s, a 40 W). As suspensões obtidas foram utilizadas para as análises microbiológicas.

Alíquotas (50 µl) das suspensões, diluídas (1:100) ou não, foram inoculadas em ágar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado) e em "Mitris Salivarius" ágar (Difco®- USA) contendo estreptomicina (Sigma®-USA) com o auxílio do aparelho "Spiral Plater" (Whitley Automatic Spiral Plater, DW Scientific – UK), para determinar o número de microrganismos totais (MT) e de *S. sobrinus* (SS), respectivamente. A partir disso, calculou-se a porcentagem de SS em relação ao número de MT (%SS/TM).

Todas as hemi-arcadas dos animais foram dissecadas, e os dentes foram preparados para determinação dos índices de cárie de acordo com o sistema de Keyes modificado por Larson (Larson, 1981) (ANEXO 7). A determinação dos índices de cárie foi feita de forma cega por um único examinador previamente calibrado.

A avaliação da toxicidade local do verniz foi realizada a partir de observações macroscópicas e microscópicas. A avaliação macroscópica dos tecidos orais foi feita em todos os animais e como nenhuma alteração tecidual foi verificada, somente dois animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para remoção dos tecidos e avaliação microscópica. Amostras foram coletadas da língua, da mucosa jugal, de glândulas salivares e da gengiva (adjacente aos molares), as quais foram cortadas, fixadas, incluídas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas microscopicamente quanto a alterações morfológicas.

Análise Estatística

A igualdade de variâncias e distribuição normal dos erros foi verificada para todas as variáveis testadas (Box *et al.*, 1978). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer HSD. O software SAS foi utilizado para essas análises e os níveis de significância foram ajustados para 5%.

Resultados

As ratas permaneceram saudáveis durante as quatro semanas de experimento e ganharam peso (ganho mínimo: 73 g e máximo: 95 g), não havendo diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$).

O verniz desenvolvido não diferiu dos controles negativo e positivo ($p > 0,05$) no que diz respeito à porcentagem de *S. sobrinus* (Tabela 1), entretanto menor porcentagem de *S. sobrinus* foi observada nos grupos tratados com o verniz desenvolvido e o Duraphat® em comparação com o grupo não tratado ($p < 0,05$).

Com relação à cárie, os animais tratados com o verniz desenvolvido e com o Duraphat® apresentaram os menores valores para lesões em superfície lisa e sulco, quando comparados ao controle negativo e ao grupo não tratado, porém não diferindo estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas entre os vernizes com fluoreto e os grupos sem fluoreto, no que diz respeito aos valores de superfície lisa. O verniz Duraphat® não diferiu estatisticamente do verniz sem fluoreto quando foram comparados os valores relacionados ao total de cáries em sulco ($p > 0,05$).

Os animais tratados com vernizes de TIF₄ e Duraphat® apresentaram valores semelhantes de índice para severidade de cárie (D_s – cárie leve em dentina e D_m – cárie moderada em dentina) (Tabela 1). Nenhuma diferença entre os vernizes fluoretados foi encontrada ($p > 0,05$), apesar de ter sido observada diferença significativa ($p < 0,05$) quando foram comparados com o controle negativo e o grupo não tratado. Não houve cárie de dentina em superfície lisa, em nenhum dos grupos estudados.

Quanto à análise toxicológica da cavidade oral das ratas, nenhuma alteração foi observada, quer seja macroscópica ou microscópica.

Tabela 1. Porcentagem de *S sobrinus* nas hemi-mandíbulas e índices de cárie nos molares das ratas de acordo com os grupos de tratamentos (Média ± dp; n = 12)

Grupos de tratamento	% <i>Streptococcus sobrinus</i> em relação à microbiota total	Total de cárie de superfície lisa (esmalte)	Total de cárie de sulco (esmalte + dentina)	Severidade de cárie de sulco (dentina)	
				Ds	Dm
Não tratado	37,4 ± 22,8 ^a	35,9 ± 10,6 ^a	29,2 ± 6,2 ^a	15,6 ± 5,2 ^a	4,2 ± 3,0 ^a
Verniz sem flúor (Controle negativo)	28,1 ± 14,6 ^{ab}	32,4 ± 9,7 ^a	28,3 ± 5,3 ^{ab}	18,3 ± 7,7 ^a	5,8 ± 5,0 ^a
Duraphat [®] (Controle positivo)	22,9 ± 9,0 ^b	21,0 ± 6,1 ^b	23,8 ± 4,6 ^{bc}	9,0 ± 4,0 ^b	1,3 ± 0,5 ^b
Verniz de TiF ₄	17,9 ± 9,0 ^b	18,2 ± 6,9 ^b	20,0 ± 5,8 ^c	6,4 ± 4,2 ^b	1,3 ± 0,7 ^b

Ds, cárie leve em dentina; Dm, cárie moderada em dentina. Tratamentos cujas médias são seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer HSD ($p < 0,05$).

Discussão

As evidências da eficiência de fluoretos como agente anticárie estão bem documentadas (Marinho *et al.*, 2007a, b) e os compostos fluoretados à base de titânio têm sido pesquisados para a redução da solubilidade ácida desde o início da década de 1970 (Mundorff *et al.*, 1972). Essa redução em amostras tratadas com TiF_4 pode estar associada a propriedades características desse composto como atividade química do flúor e do titânio (Buyukyilmaz *et al.*, 1994, 1995; Chevitarese, *et al.*, 2003; Hove *et al.*, 2006).

No modelo de cárie animal aqui utilizado, pode-se observar que o verniz de TiF_4 envelhecido por um ano apresentou atividade anticárie, com resultados semelhantes aos do grupo tratado com verniz à base de fluoreto de sódio (Duraphat® - Controle positivo). Entretanto, estudo prévio de estabilidade e reatividade no esmalte dental do mesmo verniz (Nóbrega *et al.*, 2008), mostrou que apesar do produto manter estabilidade química dos compostos ativos por um período de envelhecimento de um ano, o mesmo apresentou uma redução na formação de fluoreto de cálcio, um dos produtos de reatividade com o esmalte relacionado com atividade anticárie. Considerando que a diminuição da quantidade de fluoreto de cálcio formado no esmalte foi cerca de 50% (Nóbrega *et al.*, 2008) e que o efeito do flúor não é linear, quando se considera uma correlação dose-efeito de compostos fluoretados (Vieira *et al.*, 2005), pode-se sugerir que essa diminuição não influenciou o efeito biológico do verniz de TiF_4 no esmalte, como visto neste estudo animal. Adicionalmente, pode ter havido efeito coadjuvante dos produtos derivados da hidrólise do TiF_4 , como o óxido de titânio (TiO_2) (Skartveit *et al.*, 1991) ou produtos de Ti ligados ao cálcio (Skartveit *et al.*, 1990) na proteção contra a cárie dental.

Os resultados de cárie (Tabela 1) mostram que o grupo tratado com verniz à base de TiF_4 apresentou uma redução tanto em esmalte (total de cárie em superfície lisa e sulco) quanto em dentina (severidade de sulco), o que sugere que esse composto tem atividade na diminuição da progressão do processo carioso. Esse efeito na redução de desmineralização, principalmente nas áreas de sulco onde o desafio cariogênico promovido pelo modelo animal é mais intenso, pode estar

relacionado à capacidade do titânio em se ligar à superfície e também penetrar no esmalte (Chevitarese *et al.*, 2003).

A análise da porcentagem de *S. sobrinus* na cavidade oral revelou que o grupo tratado com verniz sem flúor (controle negativo) não diferiu do verniz com TiF_4 e também do grupo sem tratamento. Este fato pode sugerir que a matriz resinosa do verniz tenha provocado uma perturbação na colonização deste microrganismo no biofilme dental das ratas (Riethe & Weinnann 1970). Entretanto esta perturbação da colonização microbiana, supostamente causada pela matriz do verniz, não interferiu no desenvolvimento de cárie no grupo controle negativo.

A ação antimicrobiana do flúor sobre microrganismos cariogênicos já foi observada em estudos *in vitro* (Marquis, 1990; Belli *et al.*, 1995). Os resultados de menor infecção microbiana por *S. sobrinus* e redução de cárie verificados nesse estudo para o grupo tratado com verniz TiF_4 também podem estar relacionados à solubilidade do tetrafluoreto de titânio em álcool (Haendler *et al.*, 1954), sua reatividade com o esmalte dental e à capacidade de formar uma camada de TiO_2 que permanece na superfície tratada mesmo após longos períodos de desafio cariogênico (Tveit *et al.*, 1985; Skartveit *et al.*, 1989; Buyukyilmaz *et al.*, 1997a).

É importante ressaltar que a interpretação dos resultados relacionados à formação de biofilme e cárie para todos os grupos, deve ser realizada levando em consideração algumas características do modelo utilizado como similaridade de resposta quando comparado a modelo de cárie em humanos, predominância de *S. sobrinus* no biofilme e desafio cariogênico severo, devido à presença de 56% de sacarose na dieta dos animais.

No estudo foi avaliado, além do potencial de redução de cárie, o provável potencial tóxico causado nos tecidos orais pela aplicação do verniz de TiF_4 . Os resultados da avaliação toxicológica mostraram que não houve alterações morfológicas macro e microscópicas em nível tecidual em nenhum dos grupos experimentais e este estudo não possui similar na literatura. Sen *et al.* (1998) estudando solução aquosa de TiF_4 a 1% verificou que esta formulação apresentou citotoxicidade para cultura de fibroblasto, entretanto este modelo não pode ser comparado com o estudo atual devido a diferenças entre os estudos de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Conclusão

Conclui-se que o verniz desenvolvido possui potencial anticárie mesmo após um ano de envelhecimento, sugerindo ser essa formulação promissora para uso clínico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte científico de R.C. Evangelista no desenvolvimento do verniz e E. Campagnoli na avaliação toxicológica. Este estudo foi patrocinado pela FAPESP (Proc. No. 03/0882-4) na forma de uma bolsa de estudo durante o curso de doutorado em Odontologia, área de concentração Cariologia, FOP-UNICAMP.

Referências

1. Belli WA, Buckley DH, Marquis RE. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can J Microbiol.* 1995; 41: 785-791.
2. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS: *Statistics for Experimenters*. New York, Wiley, 1978.
3. Bowen WH, Madison KM, Pearson SK: Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. *J Dent Res* 1988; 67: 1316-1318.
4. Brasil. Resolução Re nº 01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 29 de julho de 2005, publicada no diário oficial de 01 de agosto de 2005. Acessada em 20 de setembro de 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>
5. Buyukyilmaz T, Tangugsorn V, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G: The effect of titanium tetrafluoride (TiF₄) application around orthodontic brackets. *Am J orthod Dentofacial Orthop* 1994; 105: 293-296.
6. Buyukyilmaz T, Ogaard B, Dahm S: The effect on the tensile bond strength of orthodontic brackets of titanium tetrafluoride (TiF₄) application after acid etching. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1995; 108:256-261.

7. Buyukyilmaz T, Ogaard B, Duschner H, Ruben J, Arends J. The caries – Preventive Effect of Titanium Tetrafluoride on Root Surfaces *in situ* as Evaluated by Microradiography and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Adv Dent Res*, 1997; 11: 448-452.
8. Chevitaese AB, Chevitaese O, Chevitaese MC, Dutra PB: Titanium penetration in human enamel after TiF₄ application: *J Clin Pediatr Dent*, 2003;28:253-256.
9. Exterkate RAM, Ten Cate JM. Effects of a new titanium derivate o enamel de- and remineralization: *Eur J Oral Sci*. 2007; 115: 143-147.
10. Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB: The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid *in vitro* measured by white light interferometry: *Caries Res* 2006; 40: 440-443.
11. Laptash NM, Fedotov MA, Maslennikova IG. Hydrolysis of volatile ammonium oxofluorotitanate according to F-19, O-17, and Ti-49 NMR data *J. Struct. Chem*. 2004, 45, 74-82
12. Larson RM: Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes' method. In: *Animal Models in Cariology*. IRL Press, Washington DC, pp. 195-203. 1981.
13. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007a. Oxford: Update Software.
14. Marinho VCC, Higgins JPT, Sheiham A, Logan S. One topical fluoride (toothpastes, or mouthrinses, or gels, or varnishes) versus another for preventing dental caries in children and adolescents (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2007b. Oxford: Update Software.
15. Marion SP, Thomas AW: Effect of Diverse anions on the pH of maximum precipitation of aluminum hydroxide. *J Colloid Sci*. 1946; 1: 221-234.
16. Marquis RE. Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *J Dent Res* 1990; 69:682-683.
17. Mundorff SA, Little MF, Bibby BG: Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. *J Dent Res* 1972; 51: 1567-1571.

18. Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica*. 2006; 19: 385-93.
19. Nóbrega CBC, Fujiwara FY, Cury JA, Rosalen PL: TiF₄ varnish-A ¹⁹F -RMN stability study and enamel reactivity evaluation. *Chem Pharm Bull* 2008; 56: 139-141.
20. Riethe P, Weinnann K: Caries Inhibition with fluoride gel and fluoride varnish in rats: *Caries Res* 1970; 4: 63-68.
21. Sen BH, Kasemi RB, Spangberg LSW: Morphologic effects on L929 fibroblasts of titanium tetrafluoride application. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86: 341-346.
22. Skartveit L, Tveit AB, Klinge B, Totdal B, Selvig KA: *In vivo* uptake and retention of fluoride after a brief application of TiF₄ to dentin: *Acta Odontol Scand* 1989;47: 65-68.
23. Skartveit L, Selvig KA, Myklebust S, Tveit AB: Effect of TiF₄ solutions on bacterial-growth in vitro and on tooth surfaces *Acta Odontol Scand* 1990;48:169-174.
24. Skartveit L, Gjerdet NR, Selvig KA: Release of fluoride and metal ions from root surfaces after topical application of TiF₄, SnF₂, and NaF *in vitro*: *Acta Odontol Scand* 1991; 49; 127-131.
25. Tveit AB, Totdal B, Klinge B, Nilvéus R, Selvig KA: Fluoride Uptake by dentin surfaces following topical application of TiF₄, NaF and Fluoride Varnishes *in vivo*: *Caries Res* 1985; 19: 240-247.
26. van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin G-J, Mulder J: Erosion-inhibition effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment *in vitro*: *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 253-257.
27. Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RB. Fluoride dose-response in pH-cycling models using bovine enamel: *Caries Res* 2005; 39: 514-520.
28. WHO - World Health Organization. online <http://www.whocollab.od.mah.se>, 2007

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O efeito do tetrafluoreto de titânio inibindo a desmineralização do esmalte dental já é bem descrito na literatura (Mundorff *et al.*, 1972; Buyukyilmaz *et al.*, 1994, 1995; Kasemi *et al.*, 1999; Hove *et al.*, 2006; Exterkate & ten Cate, 2007). Entretanto, como não há uma formulação estável que permita a utilização do composto por períodos prolongados de tempo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um verniz a base de tetrafluoreto de titânio, mantendo a sua estabilidade química e verificando se nessa forma farmacêutica quimicamente estável o composto apresentaria seu efeito na desmineralização do esmalte dental.

A formulação farmacêutica escolhida para essa finalidade foi o verniz odontológico, principalmente por ser a única formulação utilizada na odontologia que não é dependente de água como solvente, mas álcool, no qual o TiF_4 também é solúvel (Budavari, 1996) podendo assim ser desenvolvido numa matriz resinosa compatível.

Vários estudos pilotos foram realizados até a formulação final ser definida como um verniz de tetrafluoreto de titânio (2,26% de fluoreto) em uma matriz resinosa composta por laca e colofônia. Após formulado, o verniz foi submetido a teste de envelhecimento de longa duração (Brasil, 2005), no intuito de avaliar a estabilidade química do composto ou de seus sub-produtos (Capítulo 1). Esse teste simula uma condição de estocagem por período prolongado, o que significa que o envelhecimento do produto por um ano equivale a manutenção do produto em estoque por 2 anos (Brasil, 2005).

Apesar da estabilidade química do composto ter sido verificada (Capítulo 1), ainda foi necessária a avaliação da atividade contra desmineralização dental, a qual já é conhecida na literatura para soluções aquosas à base de TiF_4 (Skartveit *et al.*, 1991; Buyukyilmaz *et al.*, 1997a; Exterkate & ten Cate, 2007). Sendo assim, foram realizados testes de reatividade com o esmalte e avaliação anticárie (Capítulos 1 e 2).

Nos testes de reatividade do verniz de TiF_4 com o esmalte (Capítulo 1) observou-se que o flúor ligado à apatita (fluorapatita) teve seus níveis mantidos durante todo o período experimental, o que não ocorreu com o fluoreto de cálcio. Entretanto, a diminuição nos níveis de fluoreto de cálcio formado no

esmalte (cerca de 50% após 1 ano) não foi relevante biologicamente, pois não interferiu na ação anticárie do verniz de TiF_4 conforme verificado no estudo de modelo animal submetido a um grande desafio cariogênico (Capítulo 2).

Não foram encontradas alterações nos níveis de fluoreto de cálcio formados na superfície do esmalte em amostras tratadas com solução aquosa recém-preparada de tetrafluoreto de titânio (ANEXO 5). Desta forma, as alterações nos níveis de fluoreto de cálcio causadas com o verniz envelhecido de TiF_4 , embora sem consequência sobre o efeito anticárie, são resultantes do processo de envelhecimento do produto formulado.

No estudo *in vivo* (Capítulo 2) verificou-se a atividade anticárie do verniz TiF_4 sendo que seus resultados foram comparáveis aos do verniz de fluoreto de sódio (Duraphat[®], controle positivo, ou padrão ouro), não sendo superior a este controle. Além disso, numa análise inicial para verificação do potencial de toxicidade sobre os tecidos orais adjacentes as áreas tratadas com o produto formulado não evidenciou, em nível morfológico, alteração tecidual, demonstrando uma possível compatibilidade biológica.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- 1- Foi possível desenvolver uma formulação quimicamente estável de um verniz a base de TiF_4 ;
- 2- A atividade anticárie da formulação foi equivalente a do controle positivo;
- 3- Os resultados de redução de cárie em ratos sugerem que o verniz desenvolvido apresenta estabilidade para uso clínico.

REFERÊNCIAS*

Antunes JFL, Narvai PC, Nugent ZJ. Measuring inequalities in the distribution of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32: 41-48.

Brasil. Resolução Re nº 01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 29 de julho de 2005, publicada no diário oficial de 01 de agosto de 2005. Acessada em 20 de setembro de 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>

Budavari S, editor. *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biological.* 20th. New Jersey: Merck & CO., Inc; 1996. P.9616-9617

Buyukyilmaz T, Tangugsorn V, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rolla G. The effect of titanium tetrafluoride (TiF₄) application around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994; 105: 293-296.

Buyukyilmaz T, Ogaard B, Dahm S. The effect on the tensile bond strength of orthodontic brackets of titanium tetrafluoride (TiF₄) application after acid etching. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995; 108: 256-261.

Buyukyilmaz T, Ogaard B, Duschner H, Ruben J, Arends J. The caries – preventive effect of titanium tetrafluoride on root surfaces *in situ* as evaluated by microradiography and confocal laser scanning microscopy. *Adv Dent Res.* 1997a; 11: 448-452.

Buyukyilmaz T, Sen BH, Ogaard B. Retention of titanium tetrafluoride (TiF₄), used as fissure sealant on human deciduous molars. *Acta Odontol Scand.* 1997b; 55: 73-78.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos estão em conformidade com o Medline.

Charvat J, Soremark R, Li J, Vacek J. Titaniumtetrafluoride for treatment of hypersensitive dentine. *Swed Dent J.* 1995; 19: 41-46.

Derand T, Lodding A, Petersson LG. Effect of topical F⁻ solutions on caries-like lesions in root surfaces. *Caries Res.* 1989; 23: 135-140.

Exterkate RAM, Ten Cate JM. Effects of a new titanium derivate o enamel de- and remineralization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 143-147.

Haendler M, Bartram SF, Becker RS, Bernard WJ, Bukata SW. The reaction of fluorine with titanium, zirconium and the oxides of titanium(IV), zirconium(IV) and vanadium(IV). *J Chem Soc.* 1954; 76: 2177.

Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TIF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid *in vitro* measured by white light interferometry. *Caries Res.* 2006; 40: 440-443.

Kasemi RB, Sen BH, Spangberg LS. Permeability changes of dentine treated with titanium tetrafluoride. *J Dent.* 1999; 27: 531-538.

Laptash NM, Fedotov MA, Maslennikova IG. Hydrolysis of volatile ammonium oxofluorotitanate according to F-19, O-17, and Ti-49 NMR data. *J Struct Chem.* 2004; 45: 74-82.

Marion SP, Thomas AW. Effect of diverse anions on the pH of maximum precipitation of aluminum hydroxide. *J Colloid Sci.* 1946; 1: 221-234.

Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. *J Dent Res.* 1972; 51: 1567-1571.

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

Nóbrega CBC, Fujiwara FY, Cury JA, Rosalen PL: TiF₄ varnish-A ¹⁹F -RMN stability study and enamel reactivity evaluation. Chem Pharm Bull 2008; 56: 139-141.

Shrestha BM, Mundorff SA, Bibby BG. Enamel dissolution. I. Effect of various agents and titanium tetrafluoride. J Dent Res. 1972; 51: 1561-1566.

Skartveit L, Tveit AB, Klinge B, Totdal B, Selvig KA. *In vivo* uptake and retention of fluoride after a brief application of TiF₄ to dentin. Acta Odontol Scand. 1989; 47: 65-68.

Skartveit L, Spak C, Tveit AB, Selvig KA. Caries-inhibitory effect of titanium tetrafluoride in rats. Acta Odontol Scand. 1991; 49: 85-88.

Tveit AB, Totdal B, Klinge B, Nilvéus R, Selvig KA. Fluoride Uptake by dentin surfaces following topical application of TiF₄, NaF and Fluoride Varnishes *in vivo*. Caries Res. 1985; 19: 240-247.

van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin G, Mulder J. Erosion-inhibition effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment *in vitro*. Eur J Oral Sci. 2003; 111: 253-257.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2005; 39: 371-379.

Wefel JS, Harless JD. The effect of topical fluoride agents on fluoride uptake and surface morphology. J Dent Res. 1981; 60: 1842-1848.

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

Wei SHY, Soboroff DM, Wefel JS. Effects of titanium tetrafluoride on human enamel. J Dent Res. 1976; 55: 426-431.

World Health Organization. Who. [acesso 2007 20 de julho]. Disponível em: <http://www.whocollab.od.mah.se>.

ANEXO 1

Deliberação CCPG para Defesa de Tese em Formato Alternativo

INFORMAÇÃO CCPG/002/06

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/06, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, à Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), à área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.
- VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.
- VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.
- VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.
- IX. Todas as páginas com numeração "ímpar" serão impressas como "frente" e todas as páginas com numeração "par" serão impressas como "verso".

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º - A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

ANEXO 1

Deliberação CCPG para Defesa de Tese em Formato Alternativo

§ único - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

Artigo 3º - Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ser apresentada em formato alternativo, desde que observados os incisos I, II, III, IV, V e VII do artigo 1º.

Artigo 4º - Para impressão, na gráfica da Unicamp, dos exemplares definitivos de dissertações e teses defendidas, deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

§ 1º - A solicitação para impressão dos exemplares de dissertações e teses poderá ser encaminhada à gráfica da Unicamp pelas Unidades, que se responsabilizarão pelo pagamento correspondente.

§ 2º - Um original da dissertação ou tese, em versão definitiva, impresso em folha tamanho carta, em uma só face, deve ser encaminhado à gráfica da Unicamp acompanhado do formulário "Requisição de Serviços Gráficos", onde conste o número de exemplares solicitados.

§ 3º - A gráfica da Unicamp imprimirá os exemplares solicitados com capa padrão. Os exemplares solicitados serão encaminhados à Unidade em, no máximo, cinco dias úteis.

§ 4º - No formulário "Requisição de Serviços Gráficos" deverão estar indicadas as páginas cuja reprodução deva ser feita no padrão "cores" ou "foto", ficando entendido que as demais páginas devam ser reproduzidas no padrão preto/branco comum.

§ 5º - As dissertações e teses serão reproduzidas no padrão frente e verso, exceção feita às páginas iniciais e divisões de capítulos; dissertações e teses com até 100 páginas serão reproduzidas no padrão apenas frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica.

§ 6º - As páginas fornecidas para inserção deverão ser impressas em sua forma definitiva, ou seja, apenas frente ou frente/verso.

§ 7º - O custo, em reais, de cada exemplar produzido pela gráfica será definido pela Administração Superior da Universidade.

Artigo 5º - É obrigatória a entrega de dois exemplares para homologação.

Artigo 6º - Esta Informação entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário, principalmente as Informações CCPG 001 e 002/98 e CCPG/001/00.

Campinas, 13 de setembro de 2008

Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvare
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação

ANEXO 2

Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "Desenvolvimento de um verniz à base de tetrafluoreto de titânio e avaliação da estabilidade química e atividade anticárie", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 29/02/2008


Autor: Carolina Bezerra Cavalcanti Nobrega

RG n.º 2170517


Orientador: Pedro Luiz Rosalen

RG n.º 11185975

ANEXO 3

Permissão para utilização de artigo como parte da tese

THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN
2-12-15, Sidosaya, Shibuya-ku, Tokyo 150-0522, Japan
TEL: +81-3-3408-3321 FAX: +81-3-3408-1825 http://www.pharm.or.jp

PERMISSION REQUEST FORM

Date: 21/01/2008
To: Editorial Office
The Pharmaceutical Society of Japan
2-12-15, Sidosaya, Shibuya-ku, Tokyo
150-0522, Japan

From: CAROLINA A. C. VIEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
CAMPUS APODIACA
Phone: 55 51 3611 5300
Fax: _____
E-mail: CCVIEIRA@UNERJ.BR

I am preparing a paper entitled: DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW ORAL ANTIBIOTICS
to appear in a book, magazine, journal, or other SCIENTIFIC PUBLICATION
entitled: DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW ORAL ANTIBIOTICS
to be published by: WILEY-INTERSCIENCE, JOHN WILEY & SONS, INC.

I would appreciate your permission to use the following PSJ material in print and other formats with the understanding that the required PSJ copyright credit line will appear with each item and that this permission is for only the requested work listed above:

From Chemical & Pharmaceutical Bulletin:

Title of Publication: THE DESIGN OF A NEW ORAL ANTIBIOTIC
ACTIVITY OF CURCUMIN
Author(s): Y. EBIZUKA, M. YAMAZAKI, S. YAMAZAKI, M. YAMAZAKI, S. YAMAZAKI, S. YAMAZAKI
Chemical & Pharmaceutical Bulletin Year: 2007 Vol. 55 No. 1 Page(s): 189-191
Figure(s)/Table(s): 4

.....[Office Only].....

We hereby grant permission for the use of the material requested above provided that the copyright credit line is printed at the end of the citation:

Reproduced (or "Reproduced in part") with permission from
Chemical & Pharmaceutical Bulletin Vol. No.
Copyright [Year] Pharmaceutical Society of Japan

Yutaka Ebizuka
Prof. Yutaka Ebizuka
Chemical & Pharmaceutical Bulletin
Editor in Chief
The Pharmaceutical Society of Japan

Date: 21 January, 2008

ANEXO 4

Certificado CEEA para estudo animal



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 610-1, sobre "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE TETRAFLUORETO DE TITÂNIO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen/Carolina Bessaera Cavalcanti Nobrega está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de Outubro de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 610-1, entitled "DEVELOPMENT AND EVALUATION OF BIOLOGICAL AND CHEMISTRY PROPERTIES OF A TITANIUM TETRAFLUORIDE RELEASE SYSTEM", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 3, 2003.

Campinas, 03 de Outubro de 2003.

Prof. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Estima Alencar
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLÓGICA
RUA JOSE ROCHA PENTEADO, 308
13081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE: 51 3789-6753
FAX: 51 37 309334

ANEXO 5

Quantificação de produtos de reatividade formados no esmalte dental

Tabela 1 – Quantificação de Fluoreto de cálcio ($\mu\text{g F/cm}^2$) na Estrutura Dentária (Média \pm dp; n = 15)

Tempo (meses)	Verniz TiF_4	Solução TiF_4	Verniz Blanck
0	89,3 \pm 27,5 ^a	16,8 \pm 6,0 ^a	0,1 \pm 0,1 ^a
3	54,5 \pm 14,3 ^b	23,5 \pm 12,7 ^a	0,1 \pm 0,1 ^a
6	51,2 \pm 29,8 ^b	21,1 \pm 9,2 ^a	0,1 \pm 0,2 ^a
9	69,3 \pm 21,3 ^{ab}	23,7 \pm 9,7 ^a	0,3 \pm 0,2 ^a
12	48,0 \pm 27,4 ^b	20,0 \pm 13,0 ^a	0,6 \pm 0,2 ^a

Tabela 2 – Quantificação de Fluorapatita ($\mu\text{g F/g}$) na Estrutura Dentária (Média \pm dp; n = 15)

Tempo (meses)	Verniz TiF_4	Solução TiF_4	Verniz Blanck
0	2477,5 \pm 1044,0 ^a	1145,2 \pm 312,0 ^a	330,3 \pm 177,5 ^a
3	2484,8 \pm 992,0 ^a	1486,0 \pm 1046,9 ^a	409,2 \pm 297,3 ^a
6	2580,0 \pm 1383,9 ^a	1502,3 \pm 511,5 ^a	382,9 \pm 215,6 ^a
9	2517,2 \pm 929,9 ^a	1459,4 \pm 524,3 ^a	473,8 \pm 378,4 ^a
12	2121,0 \pm 1059,2 ^a	1169,4 \pm 598,4 ^a	343,3 \pm 237,2 ^a

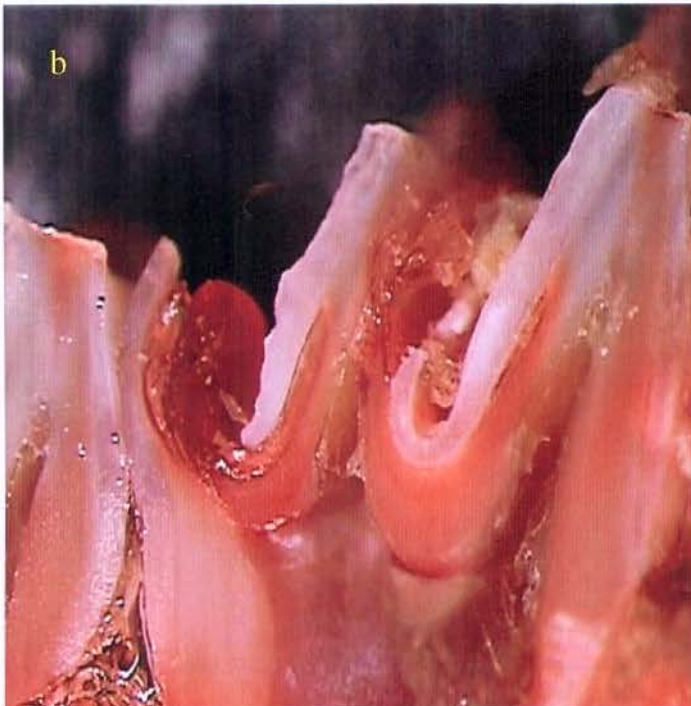
ANEXO 6

Imobilização e tratamento dos animais para estudo animal



ANEXO 7

Dentes Preparados Para Mensuração de Índice de Cárie: a – superfície lisa, b- sulco



ANEXO 8

Errata enviada à Revista Chemical and Pharmaceutical Bulletin

Erratum

Carolina Bezerra Cavalcanti NÓBREGA, Fred Yukio FUJIWARA; Jaime Aparecido CURY; Pedro Luiz ROSALEN: TiF₄ Varnish – A ¹⁹F NMR Stability Study and Enamel Reactivity Evaluation. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2008 Jan; 56(1):139-41

In the abstract, 15th line, and results, table 2, line 1, instead of $\mu\text{g F/mm}^2$ it should be read $\mu\text{g F/cm}^2$. In the abstract 16th line, and results, table 2, column 2, please change 69 ± 21^a to 69 ± 21^{ab} . Also in the abstract line 6 and Experimental: Varnish preparation and aging, could modify 65 °C and 30% RH by 30 °C and 65% RH.

Corresponding author:

Dr. Pedro Luiz Rosalen

Departamento de Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 52

13414-903 - Piracicaba, SP, Brasil.

e-mail: rosalen@fop.unicamp.br