CAMILA VIEIRA DA SILVA

**Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl_2 no
seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental
humano**

São Paulo
2015

CAMILA VIEIRA DA SILVA

**Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl_2 no
seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental
humano**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para
obter o título de Mestre em Ciências,
pelo Programa de Pós-Graduação
em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Patricia
Moreira de Freitas

São Paulo

2015

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Camila Vieira da.

Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl_2 no seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano / Camila Vieira da Silva ; orientador Patricia Moreira de Freitas. -- São Paulo, 2015.

88p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Erosão de dente. 2. Estanho. 3. Fluoreto. 4. Esmalte dentário. I. Freitas, Patricia Moreira de. II. Título.

Silva CV. Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl_2 no seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). _____

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). _____

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). _____

Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À Deus que está sempre iluminando o meu caminho, me mantendo no caminho certo.

À minha família, ao meu pai Antônio, obrigada pelo apoio, por estar sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos, por me ensinar que o trabalho enobrece e dá mais sentido às conquistas e por sempre demonstrar o orgulho pelas minhas conquistas. À Minha mãe Clélia, que não mede esforços para cuidar de mim, obrigada pelo amor, pela educação e por toda dedicação desde que nasci. Ao meu irmão, Bruno, por cuidar de mim, por sempre demonstrar seu carinho, pela conexão que temos desde pequenos e pelas risadas compartilhadas. Eles são as bases que eu levarei para o resto da minha vida!

Orgulho imenso de pertencer a esta família.

Obrigada por tudo! Amo vocês!

À minha orientadora, professora Dra. Patricia Moreira de Freitas. Meu exemplo não só profissional, mas também pessoal. Obrigada, não só pela orientação desse trabalho, mas também por sempre acreditar no meu potencial, pelo seu incentivo em buscar novos conhecimentos e principalmente por me ensinar que não devemos encarar os contratempos como problemas e sim como desafios!

Agradeço pela confiança e carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Reitor, Prof. Dr. Marco Antônio Zago. O ambiente deste campus me proporciona hospitalidade e tranquilidade desde que ingressei em 2009, como aluna de graduação.

À Faculdade de Odontologia de São Paulo –FOUSP- representado por seu Diretor, Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge. Esta tem sido minha segunda casa desde a graduação, agradeço não só pela minha formação como dentista, profissão com a qual tenho grande dedicação e amor, mas também por todas as oportunidades que esta casa me proporcionou. Tenho o maior orgulho de ser filha da FOUSP.

Ao Prof. Dr. Giulio Gavini, chefe do departamento de Dentística. Agradeço pela infraestrutura que é disponibilizada aos alunos deste departamento.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística, que sempre foi uma inspiração de como docente e pesquisadora.

À todos os professores do Departamento de Dentística por todos os ensinamentos transmitidos a mim. Em especial à Profa. Dra. Adriana Bona Matos, pelo carinho que teve por mim em todos os momentos da pós-graduação.

À Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, meus sinceros agradecimentos, por toda a ajuda e disponibilidade, por abrir as portas do seu laboratório, e por ter me sugerido modificações que me permitiram seguir em frente neste trabalho.

À Profa. Dra. Tais Scaramucci, pela disponibilidade e sugestões para este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da FOU SP, pela disponibilidade e pelo profissionalismo.

A todos os colegas de Pós-graduação pelas experiências compartilhadas e por tornar os dias no laboratório mais agradáveis. Em especial à Anely, pelos momentos que você ouviu meus desabafos, você me ajudou a não desistir.

À minha querida amiga Beatriz Togoro, tenho muito a agradecer pelo seu incentivo, companheirismo, por nunca permitir que eu me abatesse. Sua parceria me ajudou diariamente durante este mestrado e fora dele. Sem as nossas risadas e gordices, não teria conseguido.

Às minhas queridas amigas de pós-graduação, Thayanne, Tais, Maria Cecília e Renata. Agradeço o apoio, o suporte que vocês me deram durante o mestrado. À Renata pelo seu companheirismo e solidariedade que você teve comigo durante os períodos mais difíceis. À Tais pela parceria incrível que pudemos formar, sei que com você eu posso contar. À MaCeci por toda a ajuda que você me deu, principalmente nos momentos mais difíceis da fase experimental, sem você não teria conseguido terminar à tempo. À Thayanne pela dedicação incansável que você teve a mim, desde a iniciação científica, você me incentivou e me incentiva, não só na pesquisa, quanto na vida pessoal. Sem o conselho de vocês, tudo teria sido mais difícil.

À, Giovana, a amiga que a pós-graduação me deu. Ter uma pessoa tão competente e dedicada como você ao meu lado, me dá forças para buscar sempre mais. Você é uma inspiração!

À minha querida amiga, Mariana, que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por sempre me fazer companhia. Obrigada por esses dezesseis anos de companheirismo e carinho.

À minha querida amiga Beatriz Jesus, por nossa sintonia e transmissão de pensamentos, porque não precisamos nem nos falar para saber o que a outra está pensando. Você é uma pessoa muito especial, e tenho muita sorte por nossos caminhos terem se cruzado, pois não existe pessoa neste mundo com quem eu me identifique tanto. Obrigada por estar sempre presente.

Às minhas amigas de graduação e de sempre, Camilla e Layane. À Camilla por, além de ser minha xará de nome, sobrenome e até de nome de irmão, ser uma pessoa tão presente na minha vida. Tantas coincidências só serviram pra nos aproximar e por isso sou muito grata. À Layane, por ser uma pessoa tão especial, carinhosa e amiga. Seus abraços sempre me confortaram. Obrigada por sempre me ouvirem e por sempre acreditarem em mim, quero levar a amizade de vocês pra toda a vida.

Aos meus amigos de graduação, Mario e Mortal, pelas risadas proporcionadas e por me aguentarem todos os dias.

Aos meus queridos voluntários. Obrigada por terem aceitado participar desta pesquisa e pela paciência que tiveram. Sem vocês, nada teria sido possível.

À toda minha família por estarem sempre torcendo por mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Amostra de esmalte humano com área delimitada.....	44
Figura 4.2 – Amostra fixada no <i>eppendorf</i> para formação da lesão de erosão incipiente.....	44
Figura 4.3 – Dispositivo intra-oral unilateral.....	47
Figura 4.4 – Amostras posicionadas no dispositivo intra-oral.....	47
Figura 4.5 – Amostra posicionada recuada em relação ao limite do nicho.....	47
Figura 4.6 – Amostra com lesão formada <i>in situ</i> , após a remoção das fitas de UPVC.....	50
Figura 5.1 – Imagens obtidas na perfilometria das amostras antes e após erosão <i>in vitro</i>	53
Figura 5.2 – Imagens obtidas na perfilometria das amostras antes e após erosão <i>in situ</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Caracterização dos tratamentos.....	36
Tabela 4.2 - Descrição das soluções de ciclagem.....	39
Tabela 4.3 - Delineamento experimental <i>in situ</i> – Modelo <i>crossover</i>	42
Tabela 5.2 – Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato da análise perfilométrica <i>in vitro</i> (µm).....	51
Tabela 5.2 – Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato da análise perfilométrica <i>in situ</i> (µm).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	micrômetro
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanometro
M	molar
N	newton
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
ppm	partes por milhão
s	segundo(s)
h	hora(s)
F ⁻	fluoreto
AmF	fluoreto de amina
NaF	fluoreto de sódio
SnCl ₂	cloreto de estanho
Sn	estanho
SnF ₂	fluoreto de estanho
P	fósforo
CaF ₂	fluoreto de cálcio
TiF ₄	tetrafluoreto de titânio
t	tempo experimental
kg/mm ²	quilograma por milímetro quadrado
x	vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	grau(s) celsius
n	número de espécimes
>	maior
<	menor
®	marca registrada
α	alfa
β	beta

RESUMO

Silva CV. Influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ no seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Apesar de diversos estudos demonstrarem resultados promissores da utilização da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na inibição da progressão da lesão de erosão dental, medidas que visam melhorar ainda mais sua eficácia são fundamentais. Sendo assim, este estudo *in vitro* e *in situ* se propôs a avaliar se o efeito protetor dessa solução pode ser potencializado pelo aumento da frequência de uso. Para tanto, foram obtidas, a partir de terceiros molares humanos hígidos, sessenta amostras de esmalte dental humano para o estudo *in vitro* (4 X 4 X 1 mm), e noventa e seis para o *in situ* (3 X 3 X 1 mm). Após a formação de lesão erosiva incipiente nas amostras *in vitro*, (ácido cítrico a 1%, pH 4,0, durante 3 minutos), estas foram divididas nos 5 grupos de tratamentos (n=12): G1 – água destilada (controle negativo); G2 – solução de NaF (controle positivo) 1x/dia; G3 - solução de NaF (controle positivo) 2x/dia; G4 – solução de AmF/NaF/SnCl₂ 1x/dia; G5 – solução de AmF/NaF/SnCl₂ 2x/dia. As amostras foram então submetidas a 5 dias de ciclagem erosiva através de 6 imersões diárias de 2 minutos em solução de ácido cítrico (0,05M, pH 2.6). Ao final da ciclagem erosiva, foi realizada a determinação do desgaste de superfície por meio de Perfilometria óptica. Para realização do desafio erosivo *in situ*, as amostras também foram submetidas à formação da lesão incipiente, com a mesma metodologia do *in vitro*. Doze voluntários participaram do estudo *in situ* e cruzado, dividido em quatro fases de 5 dias cada, os quais utilizaram um dispositivo removível inferior unilateral contendo 2 amostras de esmalte dental humano erodido, que foram trocadas a cada fase. As amostras foram divididas em 4 grupos de tratamentos (n=12), os mesmos utilizados na etapa *in vitro*, com exceção do grupo da solução de NaF 2x/dia. Durante a fase experimental *in situ* o dispositivo contendo as amostras foi submetido à ciclagem erosiva (ex

vivo) semelhante à etapa *in vitro*. Ao final de cada fase experimental *in situ*, as amostras foram removidas do dispositivo e analisadas através de perfilometria, e foram consideradas as médias das amostras em duplicata para a análise estatística. A ANOVA mostrou que o desgaste superficial foi afetado pelos tratamentos avaliados tanto *in vitro* quanto *in situ* ($p < 0,001$), com nível de significância de 5%. No estudo *in vitro*, o teste de Tukey demonstrou que não houve diferença entre os grupos de aplicação do NaF 1 ($16,21 \pm 1,56$) ou 2 vezes ($15,39 \pm 1,01$), que apresentaram redução limitada no desgaste quando comparado ao grupo da água destilada ($20,36 \pm 1,56$); já entre os grupos da solução AmF/NaF/SnCl₂ houve diferença entre aplicação 1 ($10,40 \pm 2,36$) e 2 vezes ($7,27 \pm 3,29$), e que apesar de ambos demonstrarem redução significativa da perda de substrato, o aumento da frequência aumentou este potencial anti-erosivo. Na parte *in situ*, a solução de NaF não demonstrou capacidade de reduzir o desgaste, e apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos AmF/NaF/SnCl₂ 1 ($2,64 \pm 1,55$) e 2 vezes ($1,34 \pm 1,16$), esta solução foi eficaz na redução do desgaste erosivo em comparação aos grupos NaF ($4,59 \pm 2,13$) e água destilada ($4,55 \pm 2,75$). A solução de AmF/NaF/SnCl₂ demonstrou se eficaz em proteger o esmalte da progressão da erosão dental, e o aumento da frequência potencializou seu efeito anti-erosivo tanto *in vitro*, quanto *in situ*.

Palavras-chave: Erosão dental. AmF/NaF/SnCl₂. Estanho. Fluoretos. Esmalte.

ABSTRACT

Silva CV. Influence of application frequency of AmF/NaF/SnCl₂ solution in its potential in inhibiting the progression of erosion in human dental enamel. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Although several studies have shown promising results using the AmF/NaF/SnCl₂ solution in inhibiting the progression of dental erosion, measures to further improve its effectiveness are fundamental. Thus, this *in vitro* and *in situ* study aimed to evaluate if the protective effect of this solution can be enhanced by increasing the frequency of use. Human enamel samples were obtained from sound human third molars; sixty for the *in vitro* study (4 x 4 x 1 mm), and ninety-six for the *in situ* (3 X 3 X 1 mm) study. After the formation of incipient erosive lesions, the *in vitro* samples (1% citric acid, pH 4.0, for 3 minutes), were divided into 5 treatment groups (n = 12): G1 - distilled water (negative control); G2 - NaF solution (positive control) 1x/day; G3 - NaF solution (positive control) 2x/day; G4 - AmF/NaF/SnCl₂ solution 1x/day; G5 - AmF/NaF/SnCl₂ solution 2x/day. The samples were then subjected to 5 days of erosive cycling through 6 daily immersions (2 minutes each) in citric acid solution (0.05 M, pH 2.6). At the end of erosive cycling, surface wear was determined by means of optical profilometry. To perform the *in situ* erosive challenge, the samples were also subjected to the formation of incipient lesion with the same methodology of the *in vitro* study. Twelve volunteers participated in the *crossover in situ* study - divided into four phases of 5 days each - and used a unilateral lower removable device containing 2 samples of eroded human enamel, which were changed at each phase. The samples were divided into 4 treatment groups (n = 12), the same considered for the *in vitro* phase, with the exception of the group of NaF solution 2x/day. During the *in situ* experimental phase, the device containing the sample was subjected to the erosive cycling (*ex vivo*), similar to the *in vitro* phase. At the end of each *in situ* experimental phase, the samples were

removed from the device and analyzed by profilometry, and the average of duplicate samples were considered for statistical analysis. The ANOVA showed that the surface wear was affected by treatments evaluated in both *in vitro* and *in situ* ($p < 0,001$) studies. In the *in vitro* study, the Tukey test showed no difference between the application of groups of NaF 1 (16.21 ± 1.47) or 2 times (15.39 ± 1.01), which showed limited reduction in wear compared to the distilled water group (20.36 ± 1.56). Among the groups of AmF/NaF/SnCl₂ solution, there was no difference between 1 (10.40 ± 2.36) and 2 application times (7.27 ± 3.29), and, although both demonstrated significantly reduced tissue loss, increasing the frequency has increased its anti-erosive potential. In the *in situ* phase, the NaF solution did not reveal the ability to reduce surface wear, and although there was no significant difference between the AmF/NaF/SnCl₂ 1 (2.64 ± 1.55) and 2 times groups (1.34 ± 1.16), this solution was effective in reducing the erosive wear compared to groups NaF (4.59 ± 2.75) and distilled water (4.55 ± 2.75). The AmF/NaF/SnCl₂ solution shown to be effective in protecting the enamel progression of dental erosion, and increasing the frequency potentiate its anti-erosive effect both *in vitro* and *in situ*.

Keywords: Dental erosion. AmF/NaF/SnCl₂ rinse. Tin. Fluorides. Enamel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Aspectos éticos	35
4.2 Estudo <i>in vitro</i>	35
4.2.1 Delineamento experimental <i>in vitro</i>	35
4.2.2 Obtenção dos dentes e preparo das amostras.....	36
4.2.3 Seleção das amostras de esmalte	37
4.2.4 Delimitação da área de estudo	38
4.2.5 Formação da lesão de erosão incipiente.....	38
4.2.6 Ciclagem erosiva	39
4.2.7 Tratamentos de superfície	39
4.2.7.1 <i>Controle negativo – Água destilada</i>	39
4.2.7.2 <i>Solução de fluoreto de sódio</i>	40
4.2.7.3 <i>Solução de AmF/NaF/SnCl₂</i>	40
4.2.8 Análise perfilométrica	40
4.3 Estudo <i>in situ</i>.....	41
4.3.1 Delineamento experimental <i>in situ</i>	41
4.3.2 Cálculo amostral.....	42
4.3.3 Obtenção dos dentes e preparo das amostras.....	42
4.3.4 Seleção das amostras de esmalte	43
4.3.5 Delimitação da área de estudo	43
4.3.6 Formação da lesão de erosão incipiente.....	44
4.3.7 Esterilização das amostras.....	45
4.3.8 Seleção dos voluntários	45

4.3.8.1 Critérios de inclusão.....	45
4.3.8.2 Critérios de exclusão.....	45
4.3.9 Preparo dos dispositivos intra-oriais	46
4.3.10 Desafio erosivo <i>in situ</i>	47
4.3.11 Tratamento com as soluções experimentais	48
4.3.12 Análise perfilométrica	49
4.4 Análise estatística	49
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Resultados <i>in vitro</i>	51
5.1 Resultados <i>in situ</i>	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do estudo <i>in vitro</i>	75
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do estudo <i>in situ</i>	78
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	81
APÊNDICE B – Instruções aos voluntários	85

1 INTRODUÇÃO

A erosão dental é um processo químico, caracterizado pela dissolução patológica e crônica dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a ácidos de origem não-bacteriana (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011). É uma patologia comumente associada a fatores intrínsecos, como vômitos ou regurgitações decorrentes de distúrbios alimentares (anorexia e/ou bulimia) ou de refluxos gastroesofágicos. Também pode estar associada a fatores extrínsecos, os quais estão diretamente relacionados a uma dieta ácida ou a condições inerentes à profissão (Zero, 1996; Lussi; Jaeggi 2008; Ganss et al., 2012).

O desgaste erosivo tem origem multifatorial e seu desenvolvimento está diretamente associado à interação de fatores químicos, biológicos e comportamentais (Zero, 1996; Moss, 1998; Lussi et al., 2011). Fatores químicos, como tipo e quantidade de ácido, seu pH, capacidade tampão, conteúdo mineral (fosfato, cálcio e flúor) e presença de agentes quelantes, podem determinar o potencial erosivo de bebidas e alimentos ácidos. Dentre os fatores biológicos tem-se a saliva, película adquirida, estrutura dental e seu posicionamento em relação aos tecidos moles e língua. Por último, fatores comportamentais, como hábitos dietéticos, alcoolismo crônico e distúrbios alimentares, podem contribuir para o desenvolvimento dessas lesões (Zero, 1996; Lussi et al., 2011).

Em função da mudança dos hábitos dietéticos da população, que tem consumido com maior frequência bebidas esportivas, refrigerantes, sucos industrializados e frutas cítricas, têm sido considerados os principais fatores causadores da erosão dentária (Scheutzel, 1996; Zero, 1996; Magalhães et al., 2009; Lussi et al., 2011). No esmalte dental, o processo de erosão se inicia com a desmineralização parcial da superfície resultando na diminuição de sua dureza (amolecimento superficial) e no aumento da rugosidade superficial, aumentando conseqüentemente a susceptibilidade às forças mecânicas, como abrasão por escovação (Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Rios et al., 2006; Magalhães et al., 2007). Desafios erosivos prolongados podem levar à perda irreversível de tecido duro dental e resultar em problemas estéticos

e/ou funcionais (Lussi et al., 20011; Schlueter et al., 2011a). Medidas preventivas ou de controle da lesão de erosão em esmalte consistem, portanto, em modificar a superfície desse substrato, aumentando sua resistência ácida.

Como a erosão acontece frequentemente no meio bucal, estudos têm sido realizados para investigar como estas lesões podem ser prevenidas ou controladas. Estudos *in vitro* (Sorvari et al., 1994; Büyükyilmaz et al, 1997; Ganss et al., 2001; vanRijkom et al., 2003; Vieira et al., 2005; Hove et al., 2006; Lagerweij et al., 2006; Schlueter et al., 2007; Ganss et al., 2008; Wiegand et al., 2009; Yu et al., 2010a,b) e *in situ* (Ganss et al., 2004; Hove et al., 2008; Schlueter et al., 2009a, 2011a; Wiegand et al., 2010a; Mathews et al., 2012) mostraram a eficácia de diferentes produtos fluoretados na proteção e remineralização de lesões de erosão em esmalte dental. A maioria destes estudos avaliou compostos fluoretados utilizados que apresentam eficácia comprovada na prevenção e controle da cárie dental, como fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF), fluoreto de estanho (SnF₂) e tetrafluoreto de titânio (TiF₄), os quais apresentam diferentes interações com o tecido mineralizado dental.

Dentre eles, o estanho associado a fluoretos tem se destacado, demonstrando notável eficácia na inibição do processo de desmineralização (Ganss et al., 2004, 2010a; Schlueter et al., 2011b, 2014; Hove et al., 2008), agindo provavelmente pela precipitação de uma camada amorfa relativamente ácido-resistente (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2009b) composta por sais de Sn/F/P ou Ca/P, dependendo da composição da fórmula aplicada (Krutchkoff et al., 1972; Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2012). No esmalte, sob desafios erosivos, há a incorporação de íons de estanho, e possivelmente de fluoreto, à superfície por um processo de desmineralização-remineralização (Schlueter 2009b; Ganss et al., 2010b).

O aumento da prevalência de lesões de erosão (Jaeggi; Lussi, 2006, 2014; Kreulen et al., 2010; Bartlett et al., 2013; Salas et al., 2015) reforça a necessidade da otimização dos métodos preventivos já existentes e do desenvolvimento de terapias realmente eficazes em inibir a perda de mineral frente a um desafio erosivo, antes que a perda irreversível da estrutura dental possa ocorrer. Diversos estudos *in vitro* e *in situ* (Ganss et al., 2008, 2010b; Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e, 2010, 2011b; Gracia et al., 2010; Yu et al.,

2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014). demonstraram resultados promissores utilizando da solução comercial do composto de AmF/NaF/SnCl₂ na proteção do substrato dental do processo erosivo. Considerando que um regime de fluoretação intensivo pode melhorar a proteção oferecida pelos produtos fluoretados (Ganss et al., 2004), o aumento da frequência de uso pode potencializar a eficácia desta solução. Para a obtenção de resultados confiáveis referentes à frequência para prevenção da progressão das lesões de erosão, há a necessidade de simulação das condições biológicas presentes na boca, já que as técnicas disponíveis para avaliação da progressão das lesões de erosão ainda não permitem estudos *in vivo*. Desta forma, este estudo *in situ* foi delineado para avaliar a influência da frequência de uso da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na proteção do esmalte dental humano em desafios erosivos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erosão dental

Erosão dental é caracterizada pela perda progressiva, patológica, crônica e multifatorial dos tecidos duros dentais, causada pela ação de ácidos de origem não-bacteriana (ten Cate; Imfeld, 1996; Imfeld, 1996; Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008). Estes ácidos podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Os ácidos de origem intrínseca (ácido clorídrico presente no suco gástrico) entram em contato com os dentes por meio da doença do refluxo gastresofágico ou por vômitos crônicos causados por transtornos alimentares. Já aqueles de origem extrínseca chegam à cavidade bucal, na maioria das vezes, por meio da ingestão de alimentos e bebidas ácidas (Zero, 1996; Lussi; Jaeggi, 2008; Ganss et al., 2012) ou devido a condições inerentes à profissão (Wiegand; Attin, 2007).

Quando esmalte e dentina são expostos a soluções ácidas, o pH diminui e a dissolução mineral se inicia assim que um pH crítico para os tecidos duros dentais é atingido, o que depende do grau de saturação do meio em relação ao mineral dos dentes. Se o pH do fluido que circunda a superfície dental é menor que o pH crítico, este está subsaturado em relação ao mineral dos dentes, e haverá a desmineralização (Larsen, 1990; Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012). Diferentemente do que ocorre nas lesões cariosas, o pH crítico para formação das lesões erosivas não é definido (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012), porém sabe-se que a dissolução aumenta exponencialmente em valores de pH abaixo de 3,5 (West et al., 2001; Ganss et al., 2012). Determinar quais características dos ácidos é mais importante na progressão da dissolução mineral ainda consiste em um desafio, visto que o potencial erosivo destes ácidos não pode ser determinado apenas pelo seu pH, mas também pela titulação, pKa, capacidade tampão, temperatura, potencial quelante de cálcio, todos fatores dependentes entre si (West et al., 2001; Wang; Lussi, 2012).

O processo de erosão é caracterizado pela desmineralização inicial do esmalte pela ação direta dos ácidos na superfície dental, que leva a um

amolecimento superficial (Lussi et al., 2004; Schlueter et al., 2012). Essa camada amolecida pode ter uma espessura entre 0,2 e 3,0 μm (Amaechi; Higham, 2001; Eisenburger et al., 2001; Wiegand; Attin, 2007; Cheng et al., 2009; Voronets; Lussi, 2010) e resulta no aumento da rugosidade superficial (Nekrashevych; Stösser, 2003) e diminuição da dureza do substrato dental (Lussi et al., 1993), tornando a superfície mais suscetível à ação de forças mecânicas (Attin et al., 1997; Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Voronets et al., 2008; Wiegand et al., 2008b). Esse processo é seguido pela dissolução camada-a-camada dos cristais de esmalte, que ocorre de maneira centrípeta (Lussi et al., 2011), inicialmente pela bainha prismática, seguida pelo núcleo do prisma, posteriormente o ácido não ionizado difunde-se pela região interprismática e dissolve a região sob a superfície, deixando uma camada superficial amolecida parcialmente desmineralizada (Lussi; Jaeggi, 2008; Eisenburger et al., 2001; Lussi et al., 2011; Buzalaf et al. 2012). Se o desafio erosivo persistir, a dissolução mineral progride, podendo levar até à exposição da camada de dentina (Schlueter et al., 2012).

Clinicamente, as lesões de erosão em esmalte são caracterizadas pela perda de brilho, de contorno e da morfologia da superfície natural (Carvalho et al., 2015). Nas superfícies oclusais, há arredondamento das cúspides, achatamento das estruturas oclusais e as restaurações tornam-se proeminentes, projetando-se acima da superfície (Levitch et al., 1994; Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008). Em estágios avançados, a morfologia oclusal pode desaparecer e superfícies escavadas podem se desenvolver (Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008; Carvalho et al., 2015). Os sinais típicos de erosão sobre superfícies lisas são o achatamento da superfície e, normalmente, há uma banda de esmalte intacto ao longo da margem gengival (Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008), que pode ser devido a um efeito neutralizante do fluido sucular (Lussi et al., 2004), que tem um pH entre 7,5 e 8,0 (Stephen et al., 1980). Outra hipótese para formação dessa banda, é que algum remanescente de placa bacteriana poderia agir como uma barreira de difusão para os ácidos (Schweizer-Hirt et al., 1978; Lussi et al., 2004). A progressão da lesão leva ao desenvolvimento de concavidades, cuja largura excede claramente a sua profundidade. (Lussi; Jaeggi, 2008). Em todos os

casos, essas lesões ocorrem em dentes permanentes e decíduos, podendo ser localizadas, generalizadas ou assimétricas, dependendo da etiologia (Carvalho et al., 2015).

2.2 Importância da saliva na erosão

A erosão dental é uma condição multifatorial e tem uma etiologia complexa. Cada fator (químicos, biológicos e comportamentais) desempenha um papel na progressão ou prevenção da erosão. Ao longo do tempo, a interação de todos estes fatores pode levar a uma progressão ou mesmo proteção da superfície (Lussi et al., 2011).

Dentre os fatores biológicos capazes de alterar o processo de erosão estão a composição e anatomia dentais, oclusão, relação entre dentes e tecidos moles e principalmente, a saliva (Zero, 1996; Moss, 1998; Lussi e Jaeggi, 2008; Lussi et al., 2011). Vários mecanismos de defesa salivares influenciam durante um desafio erosivo, tais como a formação da película adquirida, ação diluente sobre os ácidos, depuração salivar que gradualmente elimina o agente erosivo da boca através de deglutição, capacidade tampão, favorece remineralização por ser supersaturada em relação ao conteúdo mineral dos dentes, e algumas proteínas presentes na saliva e película adquirida desempenham um papel importante na erosão dental (Eisenburguer et al., 2001; Lussi et al., 2004; Van Nieuw Amerongen et al., 2004; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012).

A saliva é constituída por componentes inorgânicos e orgânicos. Entre os componentes inorgânicos, o bicarbonato é relacionado com a capacidade tampão da saliva, enquanto o cálcio e fosfato determinam o grau de saturação (Buzalaf et al., 2012). Quando em níveis adequados, a presença destes compostos inorgânicos na saliva pode promover a sua redeposição sobre o tecido dental e remineralização do tecido desmineralizado (Rios et al., 2006).

O nível de bicarbonato na saliva está positivamente relacionado com a taxa de fluxo salivar; portanto, saliva produzida em um baixo fluxo salivar possui um pH mais baixo, uma capacidade tampão reduzida e menor conteúdo mineral salivar (Zero, 1996; Moss, 1998). Além do nível de bicarbonato, o aumento do fluxo salivar promove maior oferta de cálcio e fosfato (Dawes, 1969), que atuam como íons comuns para os minerais no esmalte e dentina, facilitando a deposição mineral e resultando em uma taxa de dissolução mais lenta do mineral (Meurman; ten Cate, 1996; Buzalaf et al., 2012). O fluxo salivar age também como fator protetor do tecido dental devido à diluição dos agentes erosivos e, juntamente com a deglutição, à depuração salivar (Lussi et al., 2004; Buzalaf et al., 2012).

A porção orgânica da saliva é basicamente constituída por proteínas e glicoproteínas. Dentre elas, destacam-se as proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterinas, histatinas, mucinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Dodds, et al., 2005; Buzalaf et al., 2012). Elas apresentam um papel importante na formação da película adquirida.

A película adquirida pode ser definida como uma fina camada acelular, homogênea e livre de bactérias que se forma sobre tecidos duros e moles após exposição aos fluidos presentes na cavidade bucal (Armstrong, 1968; Buzalaf et al., 2012; Siqueira et al., 2012). As estaterinas, histatinas e PRPs também são conhecidas como “proteínas precursoras de película”, pois possuem elevada afinidade para a hidroxiapatita e adsorvem a superfície dental rapidamente através de interações eletrostáticas, iniciando o processo de formação da película adquirida (Hay, 1973; Jensen et al., 1992; Lendenmann et al., 2000; Siqueira et al., 2012). Durante o processo de maturação, outras proteínas interagem com as precursoras e as mucinas auxiliam nessa agregação, até que um equilíbrio entre adsorção e de-sorção de proteínas se estabeleça e resulte em uma película madura e livre de placa, o que ocorre em até 2 horas (Lendenmann et al., 2000).

A presença desta camada, que é relativamente resistente à exposição aos ácidos (Hannig; Balz, 1999), pode auxiliar na proteção das superfícies dentais contra a dissolução ácida devido a sua capacidade de agir como uma

barreira de difusão ou uma membrana de permeabilidade seletiva, prevenindo o contato direto do ácido com a superfície dental, reduzindo assim a desmineralização (Hannig; Balz, 1999; Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012; Ganss et al., 2012). Além disso, tem a capacidade de regular a precipitação de minerais sobre a superfície dental (Zahradnik, 1979; Siqueira et al., 2012), o que inibe a precipitação espontânea de fosfato de cálcio e possibilita que a saliva mantenha-se supersaturada em relação ao mineral dental (Gron; Hay, 1976; Buzalaf et al., 2012; Vukosavljevic et al., 2014). Além disso, é capaz de promover lubrificação, o que diminui o atrito entre os dentes e a mucosa e, conseqüentemente, minimiza a abrasão durante a mastigação (Lendenmann et al., 2000; Siqueira et al., 2012).

Diferenças na composição e espessura da película adquirida podem proporcionar diferentes graus de proteção contra a desmineralização do esmalte dental (Hara et al., 2006; Moazzez et al., 2014; Vukosavljevic *et al.*, 2014). Mais de 100 proteínas de diferentes graus de funcionalidade foram identificadas em películas de esmalte (Siqueira et al., 2007), e a variação na presença ou na quantidade dessas proteínas pode alterar a capacidade da película de atuar como fator protetor na erosão dental (Hannig; Balz, 1999). Estudos sugerem que as superfícies dos dentes com películas mais finas têm uma resistência menor à dissolução mineral em comparação com as superfícies dos dentes com películas mais espessas (Amaechi et al., 1999; Hannig e Balz, 1999; Young; Khan, 2002). Em indivíduos susceptíveis à erosão dental a película adquirida alterada pode ser um potencial fator de risco que contribui para o desenvolvimento de lesões erosivas (Carpenter et al., 2014; Moazzez et al., 2014).

Considerando a importância da função protetora da saliva aos tecidos dentais frente a desafios erosivos (Buzalaf et al., 2012), estudos que reproduzam as condições que ocorrem na cavidade oral mostram-se mais verossímeis para a avaliação de fatores que possam interferir na progressão das lesões erosivas (Hove et al., 2008; Wiegand e Attin, 2011). Neste sentido, trabalhos *in situ* têm sido realizados (Ganss et al., 2004, 2010b; Hove et al., 2008; Schlueter et al., 2009a, 2011b, 2014; Mathews et al., 2012), visto que, além de permitirem o contato das amostras com o ambiente bucal, possibilitam

condições experimentais padronizadas (Wiegand; Attin, 2011) e métodos precisos de análises do substrato dental (Hove et al., 2008; Shellis et al., 2011).

2.3 Prevenção e controle da erosão dental

Com o aumento da prevalência de erosão dental (Jaeggi; Lussi, 2006, 2014; Kreulen et al., 2010; Bartlett et al. 2013; Salas et al., 2015), o desenvolvimento de métodos de prevenção e tratamento das lesões erosivas é imprescindível. Para um tratamento adequado de pacientes com erosão dental é fundamental um diagnóstico adequado, avaliação e identificação da origem dos ácidos e implementação de estratégias para reduzir o impacto dos ácidos (Ganss et al., 2012; Carvalho et al., 2015). Adicionalmente ao controle dos fatores etiológicos, diversas estratégias complementares para proteger as superfícies dos dentes, reduzindo a progressão da desmineralização por erosão, têm sido estudadas (Ganss et al., 2012). Dentre elas, podem ser citados os fluoretos (Attin et al., 1999; Ganss et al., 2001, 2004, 2008, 2010b, 2012; Hove et al., 2006, 2008; Schlueter et al., 2007, 2009a, c, d, e, 2010, 2011b; Wiegand et al., 2010a; Yu et al., 2010a, b; Magalhães et al., 2011; Mathews et al., 2012), soluções antiácidas (Turssi et al., 2012), lasers de alta potência (Wiegand et al., 2010b; Magalhães et al., 2011a; Lepri et al., 2014; Ramos-Oliveira et al., 2014; Scatolin et al., 2015), adesivos (Azzopardi et al., 2004; Sundaram et al., 2007) e selantes (Bartlett et al., 2011). Em casos com grande perda tecidual, restaurações adesivas se fazem necessárias (Schlueter et al., 2012), porém devem ser associadas com métodos preventivos (Carvalho et al., 2015).

2.3.1 Fluoretos

Estratégias eficazes de prevenção são essenciais em estágios iniciais de erosão, e, dentro desse contexto, o uso de fluoretos tem o papel principal de

minimizar a perda mineral do tecido dental, e não a remineralização da camada de esmalte amolecido (Magalhães et al., 2011b). Isso porque, apesar do amolecimento do esmalte ser um processo reversível, podendo ser potencialmente remineralizado, esta camada desmineralizada de esmalte erodido é consideravelmente pequena em comparação com a perda de esmalte, que é irreversível (Rakhmatullina et al., 2013). Sendo assim, produtos fluoretados que contenham outros componentes que interferem neste processo de desmineralização do esmalte tornam-se interessantes para serem estudados.

2.3.1.1 Mecanismo de ação dos fluoretos

Após a aplicação de flúor tópico sobre a superfície dental, há deposição de material semelhante a fluoreto de cálcio (CaF_2) (Wiegand et al., 2010c; Lussi et al., 2012; Lussi; Carvalho, 2015), que é proveniente da saliva e, em parte, do mineral do dente quando soluções fluoretadas levemente ácidas são aplicadas (Saxegaard; Rolla, 1989; Larsen; Richards, 2001). Esses precipitados são dissolvidos rapidamente quando há queda do pH, o que é fundamental para prevenção de cárie, pois agem como íons flúor livres (ten Cate, 1997; Wiegand et al. 2010c). Estes são posteriormente incorporados no esmalte como hidroxifluorapatita ou fluorapatita, resultando em diminuição da susceptibilidade à dissolução (ten Cate, 1997). Entretanto, tal incorporação de uma pequena quantidade de fluoreto para os componentes minerais do esmalte reduz a solubilidade até determinado limite, sendo a adsorção dos íons flúor na superfície mais eficaz na inibição da desmineralização (ten Cate; Duijsters, 1983; Lussi et al., 2012).

Além de funcionar como um reservatório mineral, a camada de CaF_2 comporta-se como uma barreira física frente à redução significativa de pH que ocorre em desafios erosivos, dificultando o contato do ácido com o esmalte adjacente (Magalhães et al., 2011b; Ganss et al., 2012). Para tanto, esta camada deve ser suficientemente densa e estável (Lussi; Carvalho, 2015). A

formação dessa camada depende do pH, da concentração de fluoreto e da frequência de aplicação. Quanto maior a frequência de aplicação e a concentração de fluoreto, maior é a precipitação de fluoreto de cálcio (Magalhães et al., 2011b). Agentes fluoretados com pH abaixo de 5 induzem maior deposição de CaF_2 do que os com pH neutro (Saxegaard; Rølla, 1988).

Visto que o efeito anti-erosivo de fluoretos convencionais, como fluoreto de sódio (Hove et al., 2008; Levy et al., 2012; Comar et al., 2012; Mathews et al., 2012) e fluoreto de amina (Vieira et al., 2005; Ganss et al., 2010b), requer um regime de fluoretação intensivo (Ganss et al., 2004), e ainda assim têm potencial limitado contra a erosão (Lussi; Carvalho, 2015), estudos recentes têm se focado em compostos de fluoretos mais eficazes (Magalhães et al., 2011b; Ganss et al., 2012; Lussi; Carvalho, 2015). Neste contexto, os compostos contendo íons metálicos polivalentes combinados a fluoretos vêm sendo testados, tais como titânio, estanho, cobre, zinco, alumínio e ferro (Schlueter et al., 2009c).

Dentre eles, preparações contendo estanho associado a fluoretos provaram ser muito eficazes na redução da desmineralização erosiva (Ganss et al. 2004, 2008, 2010a, 2010b, 2012b, 2014, 2015; Schlueter et al., 2009a, 2009b, 2009c, 2009d, 2009e, 2010, 2011a, 2013, 2014; Hove et al., 2006, 2008; Wiegand et al., 2009; Yu et al., 2010a, 2010b; Comar et al., 2012; Huysmans et al., 2011; Stenhagen et al., 2013; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014).

2.3.1.2 Estanho associado a fluoretos

A eficácia do estanho na proteção contra a desmineralização (Rølla; Ellingsen, 1994) é atribuída a sua capacidade de reagir com a superfície do dente (Cooley, 1961; Babcock et al., 1978) e modificá-la (Krutchkoff et al., 1972), e este efeito provavelmente resulta em uma maior resistência à desmineralização (Schlueter et al., 2009d).

Além do fluoreto de cálcio (CaF_2), a reação entre os íons de estanho e o tecido duro dental, pode formar sais de Sn_2OHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$ (Babcock et al., 1978), $\text{Sn}(\text{OH})_2$, $\text{Sn}_2(\text{PO}_4)\text{OH}$ (Hercules e Craig, 1976) ou SnHPO_4 (Nelson e Bainbridge, 1973). Estes resultados variáveis indicam que os sais minerais resultantes são altamente dependentes de fatores como pH, concentração, tempo de aplicação, o composto de flúor e a razão F/Sn (Ganss et al., 2012). com ciclagem ácida é usado. De acordo com alguns autores, o processo de desmineralização e remineralização leva à incorporação de estanho até 20 μm de profundidade no esmalte, e a formação de uma zona relativamente densa e ampla de esmalte estruturalmente alterado, que é a principal responsável por conferir a notável eficácia das soluções de fluoreto associado à estanho em proteger a superfície de esmalte da desmineralização (Schlueter et al., 2009b). Mesmo após desafios erosivos, a quantidade de estanho retido é alta, mas é limitada pelo fenômeno de saturação (Schlueter et al., 2009b). Isso é relevante para a determinação de concentração dos ingredientes ativos (estanho e fluoreto) para produtos comerciais, visto que o estanho em altas concentrações podem gerar efeitos adversos como sensação adstringente e descoloração dos dentes (Schlueter et al., 2011b).

Além dessa incorporação do estanho no esmalte, os sais provenientes da reação do estanho com a hidroxiapatita se depositam sobre a superfície do dente, formando uma camada amorfa estável (Hove et al., 2006) de aproximadamente 500 nm (Schlueter et al., 2009b). Esses depósitos ricos em estanho possuem uma taxa de dissolução muito baixa (Hove et al., 2006), podendo ser reforçados por aplicações repetidas, e eventualmente, resultar em maior proteção do substrato dental subjacente (Khambe et al., 2014; Lussi; Carvalho, 2015).

Assim como o fluoreto tem efeito protetor limitado contra a desmineralização erosiva, o estanho sozinho tem capacidade semelhante (Ganss et al., 2008); no entanto, quando associados (tanto o SnF_2 quanto AmF/SnCl_2), a inibição da perda mineral é significativamente maior (Schlueter et al., 2009e, 2010). Estudos *in vitro* (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009b,c,d,e, 2010; Gracia et al., 2010; Yu et al., 2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014) e *in situ* (Schlueter et al., 2009a; Ganss et al.,

2010b; Schlueter et al., 2011b) que utilizam solução de SnCl_2 e AmF/NaF como fonte independente de estanho e fluoreto têm demonstrado a capacidade de reduzir entre 65 e 73% a perda de esmalte superficial. Essa associação permite que a eficácia dessa solução seja otimizada ao dispor a taxa mais efetiva entre o fluoreto e o estanho (Schlueter et al., 2009a). Nessas soluções, o fluoreto de amina é necessário devido às suas propriedades estabilizadoras (Mühlemann; Saxer, 1981), visto que soluções com íons de estanho em altas concentrações são instáveis em pH 4,5 e tendem a formar precipitados (Schlueter et al., 2009a). O estanho inorgânico não apresenta toxicidade sistêmica, sua absorção pelo trato gastrointestinal é muito limitada e é rapidamente eliminado, sendo seguro para uso como enxaguatório bucal (European Food Safety Authority, 2005).

Estudos recentes buscam uma padronização nos procedimentos experimentais a fim de simular as condições que ocorrem na cavidade bucal durante os desafios erosivos (Wiegand; Attin, 2011). Baseado no conhecimento de todos os fatores envolvidos no processo de erosão dental (hábitos do indivíduo, substrato dental, saliva, etc), estudos *in situ* se mostram mais adequados devido a sua aproximação com as condições fundamentais para o surgimento de lesões de erosão sem afetar a dentição natural (Wiegand; Attin, 2011). Apesar dos resultados promissores da solução de $\text{AmF/SnCl}_2/\text{NaF}$ em reduzir consideravelmente a desmineralização erosiva, poucos estudos *in situ* foram conduzidos. Objetivando potencializar a eficácia dessa solução em inibir a progressão de lesões de erosão, um recurso poderia ser o aumento da frequência de uso, já que, considerando os efeitos adversos relatados por Schlueter et al. 2011b, o aumento da concentração de estanho não é uma opção. Embora poucos estudos *in vitro* (Rakhmatullina et al., 2013; Schlueter et al., 2013) tenham obtido bons resultados utilizando esta solução duas vezes ao dia, até o momento nenhum estudo, *in vitro* ou *in situ*, comparou a influência da frequência de uso na eficácia desta solução. Com vistas a sua aplicação clínica, estudos que almejem intensificar a eficácia dessa solução frente a desafios erosivos são fundamentais.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in situ* a influência da frequência de aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (1 ou 2 vezes) no seu potencial em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Foram utilizados 115 terceiros molares humanos recém-extraídos, cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo). Vinte e cinco foram utilizados para o estudo *in vitro* (CAAE 42629815.3.0000.0075) (ANEXO A) e noventa para o estudo *in situ* (CAAE 34245214.1.0000.0075) (ANEXO B).

No estudo *in situ*, cada voluntário foi informado dos objetivos e metodologia do estudo, benefícios e possíveis riscos envolvidos no experimento e da confidencialidade dos dados. Todas as informações constaram nas instruções aos voluntários e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução no. 466 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Distrito Federal, Brasil, 12/12/2012), o qual foi assinado em duas vias, pertencendo uma ao voluntário, e outra aos pesquisadores (APÊNDICE A).

4.2 Estudo *in vitro*

4.2.1 Delineamento experimental *in vitro*

Foram utilizados 60 fragmentos de esmalte dental humano, com valores de dureza superficial entre 300 e 400 kg/mm² e curvatura de superfície inicial de até 0,3 µm, para avaliação da perda de tecido mineral das superfícies tratadas com os fluoretos.

Após a formação de lesão incipiente, as amostras foram divididas em cinco grupos experimentais (n=12), de acordo com os tratamentos para proteção do esmalte dental (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Caracterização dos tratamentos

Grupos	Soluções	pH	Concentração	Composição	Frequência
G1	Água destilada	7,0	-	Água destilada	1 x/dia
G2	NaF	4,5	500 ppm F ⁻	Fluoreto de sódio	1 x/dia
G3	NaF	4,5	500 ppm F ⁻	Fluoreto de sódio	2 x/dia
G4	AmF/NaF/SnCl ₂ (Elmex Erosion®)	4,5	500 ppm F ⁻ 800 ppm Sn ⁻²	Cloreto estanhoso, Fluoreto de amina e Fluoreto de sódio	1 x/dia
G5	AmF/NaF/SnCl ₂ (Elmex Erosion®)	4,5	500 ppm F ⁻ 800 ppm Sn ⁻²	Cloreto estanhoso, Fluoreto de amina e Fluoreto de sódio	2 x/dia

Concluída a fase experimental, foi realizada a análise quantitativa da perda de tecido mineral (em µm) por meio de perfilometria.

4.2.2 Obtenção dos dentes e preparo das amostras

Foram utilizados 25 terceiros molares humanos recém-extraídos, hígidos, os quais foram submetidos à limpeza com curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e à profilaxia com pedra-pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água com auxílio de uma escova de

Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada.

Após a limpeza, as coroas foram seccionadas em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltda, Lake Buff, Illinois, EUA) e das superfícies lisas de cada dente foram obtidos fragmentos quadrangulares de esmalte com dimensões aproximadas de 4,0 mm de altura, 4,0 mm de comprimento e 1,5 mm de espessura. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em resina acrílica (SamplKwick Resin, Buehler Ltda, Lake Buff, Illinois, EUA) com o auxílio de matrizes quadrangulares. As amostras tiveram ambas as superfícies polidas (Ecomet/Automet 250 grinder-polisher, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) com lixas de óxido de alumínio com granulações de # 800, # 1200 e # 4000 (Buehler Ltda., Lake Buff, Illinois, EUA – Padrão FEPA), com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas. Entre cada série de polimento e após o polimento final, as amostras foram lavadas em água destilada por 8 minutos em cuba-ultrassônica (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil).

4.2.3 Seleção das amostras de esmalte

Todas as 85 amostras obtidas foram observadas em Lupa Estereoscópica com magnificação de 40 vezes para verificar a existência de defeitos e trincas no esmalte dental. As amostras foram levadas ao perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido) para determinação da curvatura da superfície no início da fase experimental (t_0 - *baseline*), e foram selecionadas as amostras que apresentaram valores abaixo de 0,3 μm (Eisenburger et al., 2003). As amostras selecionadas na perfilometria tiveram sua microdureza superficial mensurada (t_0 - *baseline*), a fim de padronizar a dureza do substrato obtido após a sequência de polimento. Foi utilizado um microdurômetro (Microdurômetro HMV-2000® Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) com penetrador Knoop, com carga estática de 50 g aplicada durante 20 segundos (Featherstone, 1992). Foram realizadas três endentações a 100 μm de distância uma da outra e as médias dos valores de

dureza foram consideradas para a seleção das amostras, sendo considerados valores de dureza superficial de $350 \text{ kg/mm}^2 \pm 10\%$. A partir destes dados, foram selecionadas as 60 amostras para serem utilizadas na etapa *in vitro*.

4.2.4 Delimitação da Área de Estudo

Para o teste de perfilometria, 02 fitas adesivas de cloreto de polivinil não plastificada (UPVC tapes - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foram aplicadas na superfície de cada amostra de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 4,0 mm de comprimento x 1,0 mm de largura, para delimitação da área de estudo (Turssi et al., 2014). Por fim, todos os espécimes foram armazenados em umidade relativa a 5 °C até o início da fase experimental.

4.2.5 Formação de lesão de erosão incipiente

As amostras foram fixadas com cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil) na tampa de uma placa de cultura de 12 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça), para permitir a imersão simultânea e individual das amostras nas soluções ácidas.

Para induzir uma lesão incipiente de erosão, as amostras foram submetidas a um amolecimento superficial através da imersão em solução de ácido cítrico a 1% (pH 4,0), a 25 °C, sob constante agitação em mesa agitadora, durante 3 minutos. Em seguida, todas as amostras foram lavadas em água destilada por 30 segundos e secas com papel absorvente (Lussi et al., 2008).

Após o desafio erosivo, foi realizada uma nova leitura de microdureza superficial (t_1) para que se pudesse confirmar a homogeneidade das lesões formadas, e a média de valor de dureza obtida foi de $275 \pm 10\%$. As amostras foram então distribuídas aleatoriamente nos grupos experimentais.

4.2.6 Ciclagem erosiva

Durante um período de cinco dias, as amostras foram submetidas a procedimentos cíclicos, alternando desafios ácidos e armazenamentos em solução remineralizadora (Gerrard; Winter, 1986; Schlueter et al., 2009c) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Descrição das soluções de ciclagem *in vitro*

Solução	Composição	pH
Desmineralizadora	0,05 M de ácido cítrico monohidratado	2,6
Remineralizadora	4,08 mM H ₃ PO ₄ , 11,90 mM NaHCO ₃ , 20, 10 mM KCl e 1,98 mM CaCl ₂	7,0

Os desafios erosivos foram realizados seis vezes ao dia com imersões das amostras em solução de ácido cítrico durante 2 minutos cada, com intervalos de 1,5 h entre elas, em temperatura ambiente, sob constante agitação (35 rpm). As amostras foram imersas individualmente e simultaneamente em recipientes contendo 4 mL de solução ácida. As soluções de ácido cítrico foram renovadas a cada novo desafio. Após cada desafio erosivo, as amostras foram lavadas em água destilada por 30 segundos e armazenadas na solução remineralizadora até o próximo desafio. Durante a noite, as amostras também permaneceram imersas em solução remineralizadora, que foi trocada no início e no fim de cada ciclo diário (Schlueter et al., 2009c).

4.2.7 Tratamentos de Superfície

4.2.7.1 Controle negativo - Água destilada (G1)

As amostras foram submetidas a uma imersão diária de 2 minutos em 04 mL de água destilada, durante os cinco dias de ciclagem erosiva.

4.2.7.2 *Solução de fluoreto de sódio (G2 e G3)*

As amostras foram imersas uma (G2) ou duas (G3) vezes ao dia, durante 2 minutos, em 04 mL de solução de fluoreto de sódio, que foi preparada através da dissolução de NaF em água destilada, seguida de ajuste do pH.

4.2.7.3 *Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (G4 e G5)*

As amostras foram imersas durante 2 minutos em 04 mL de AmF/NaF/SnCl₂ (Elmex® Erosion Protection, GABA Int. AG, Switzerland), uma (G4) ou duas (G5) vezes ao dia.

Todos os tratamentos foram realizados em horários pré-determinados, sendo a primeira imersão realizada no início do ciclo, e a segunda, 30 minutos após a última imersão diária em ácido cítrico.

4.2.8 *Análise Perfilométrica*

A análise perfilométrica foi realizada em um perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido), considerando as superfícies de esmalte hígido (preservadas pela fita de UPVC) como referência. Após a remoção da fita, o sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (no eixo X) por 1 mm de largura (eixo Y) no centro da amostra, que corresponde à área tratada e às superfícies de referências de ambos os lados. O aparelho foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm, no eixo X, e 10 passos de 0,1 mm, no eixo Y. A profundidade da lesão (3-pt *step height*) foi calculada por um

software específico (ProscanApplication software version 2,0,17), com base na subtração da média da altura da área teste, em relação à média da altura das superfícies de referência.

Todas as amostras foram analisadas em perfilômetro óptico duas vezes durante o experimento. Inicialmente, todas passaram pela análise de curvatura (*baseline*). A segunda varredura ocorreu ao final do 5º dia de ciclagem erosiva para avaliação dos tratamentos. As amostras foram mantidas em umidade relativa até o momento da leitura a fim de se evitar a formação de trincas no esmalte. Imediatamente antes da análise, as amostras foram secas cuidadosamente com o auxílio de um papel absorvente.

4.3 Estudo *in situ*

4.3.1 Delineamento experimental *in situ*

Para o estudo *in situ*, foram selecionadas 96 amostras de esmalte dental humano através de análise da curvatura por perfilometria e de dureza superficial por microdureza superficial (t_0).

Os 12 voluntários foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de tratamentos de 05 dias cada, e utilizaram um dispositivo removível inferior unilateral, posicionado na região vestibular de pré-molares e molares [34-36], contendo 02 fragmentos de esmalte dental humano (duplicata), dos quais foi obtida uma média dos valores de perfilometria para análise estatística.

As amostras receberam os mesmos tratamentos do *in vitro* para proteção de esmalte dental erodido ($n=12$), com exceção do grupo com duas aplicações diárias de fluoreto de sódio, que não foi levado ao estudo *in situ*:

- G1 - água destilada;
- G2 - solução de NaF uma vez ao dia;
- G3 - solução de AmF/NaF/SnCl₂ uma vez ao dia;
- G4 - solução de AmF/NaF/SnCl₂ duas vezes ao dia.

Para que não houvesse influência de possível efeito residual dos tratamentos, o estudo foi realizado seguindo um modelo *crossover*, e com um período de *wash-out* de 10 dias entre os tratamentos. Ao final do experimento, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos (Tabela 4.3).

Após a etapa experimental, as amostras erodidas *in situ* foram analisadas em perfilômetro óptico, assim como as amostras *in vitro*.

Tabela 4.3 - Delineamento experimental *in situ* – Modelo *crossover*

Fase	G1	G2	G3	G4
1ª semana	A, B, C	D, E, F	G, H, I	J, K, L
2ª semana	J, K, L	A, B, C	D, E, F	G, H, I
3ª semana	G, H, I	J, K, L	A, B, C	D, E, F
4ª semana	D, E, F	G, H, I	J, K, L	A, B, C

* As letras representam os voluntários.

4.3.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado com base em estudo de Schlueter et al., 2013, os quais relataram uma perda de superfície de esmalte de 11 μm no grupo controle. Este estudo foi desenvolvido com 11 voluntários sob a suposição de que o desvio-padrão foi de 4 e $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,2$. Para assegurar que este tamanho amostral estivesse disponível até o final do estudo, 12 voluntários foram recrutados para o presente estudo.

4.3.3 Obtenção dos dentes e preparos das amostras

Foram utilizados 90 terceiros molares humanos recém-extraídos, hígidos, os quais foram limpos e as coroas seccionadas. Os fragmentos de esmalte de aproximadamente 3,0 mm X 3,0 mm X 1,5 mm, obtidos a partir das faces lisas, foram polidos com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas (ver item 4.2.2).

4.3.4 Seleção das amostras de esmalte

Dos 160 fragmentos de esmalte dental humano obtidos, 96 foram selecionados para o estudo *in situ* através de observação em lupa estereoscópica, análise de curvatura por perfilometria e determinação da dureza superficial, da mesma maneira como descrito no item 4.2.3. Por fim, todos foram armazenados em água destilada em geladeira a 5 °C até o início da fase experimental.

4.3.5 Delimitação da área de estudo

A área de estudo dos fragmentos selecionados foi delimitada com auxílio de duas tiras de uma fita de UPVC, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 0,75 mm de largura (Mathews et al., 2012) (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Amostra de esmalte humano com área delimitada

4.3.6 Formação da lesão incipiente

O amolecimento superficial foi induzido *in vitro*, e os espécimes foram fixados em *ependorfs* (Axygen Scientific Inc, Union City, CA, EUA) com auxílio de cera pegajosa, para permitir a imersão individual das amostras (Figura 4.2) e submetidos a um amolecimento superficial através da imersão em 4 mL de solução de ácido cítrico a 1% (pH 4,0), a 25 °C, sob constante agitação em mesa agitadora, durante 3 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada por 30 segundos e secas com papel absorvente (Lussi et al., 2008).

Após o desafio erosivo *in vitro*, os fragmentos foram removidos cuidadosamente do *ependorf*, e uma nova leitura de microdureza superficial (t_1) foi realizada para padronizar as lesões formadas.

Figura 4.2 – Amostra fixada no ependorf para formação da lesão de erosão incipiente

4.3.7 Esterilização das amostras

As amostras foram esterilizadas com radiação gama (Wiegand et al., 2008b; Wegehaupt et al., 2012), cuja fonte de irradiação consiste de um irradiador experimental de Cobalto-60, modelo Gamacell 220, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil).

4.3.8 Seleção dos Voluntários

Este estudo incluiu 12 voluntários (idade média de 28 ± 8 anos). Foram considerados os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa:

4.3.8.1 Critérios de inclusão

- Idade mínima para poder consentir como voluntário (18 anos);
- Tendo dentição saudável ou suficientemente restaurada
- Sem patologia sistêmica (principalmente doenças que interfiram no fluxo salivar);
- Não devem apresentar dispositivo ortodôntico;
- Residirem na área urbana do município de São Paulo;
- Não devem fazer uso sistemático de tabaco e bebidas alcoólicas;

4.3.8.2 Critérios de exclusão:

- Estar grávida ou lactante;

- Apresentarem alergia a produtos de higiene oral;
- Estar tomando medicamentos que interferem no fluxo salivar.

4.3.9 Preparo dos Dispositivos Intra-Orais

Para a realização do estudo *in situ*, os doze voluntários da pesquisa tiveram suas arcadas inferiores moldadas com silicone de condensação de consistência pesada (Clonage[®], DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A partir dos moldes foram obtidos modelos de gesso (Herostone[®], Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nos quais foram confeccionados dispositivos inferiores intra-orais em resina acrílica. Nichos com altura e largura de aproximadamente 4,0 mm e profundidade de 2,0 mm foram confeccionados nos dispositivos na porção vestibular das regiões de pré-molares e molares (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong et al., 2013) (Figura 4.3). Os dispositivos foram higienizados em ultrassom com 05 mL de detergente aniônico para 1 L de água destilada para remoção de possíveis resíduos provenientes da fase de confecção e em seguida imersos em clorexidina 0,2% para descontaminação. Foram fixadas com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda, São Paulo, Brasil), duas amostras no dispositivo, que foram trocadas a cada fase experimental (Figura 4.4). As superfícies das amostras foram posicionadas recuadas em relação aos limites dos nichos para evitar a abrasão da mucosa da bochecha (Figura 4.5). Os voluntários receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo e os procedimentos experimentais que seriam realizados (APÊNDICE B).

Figura 4.3 – Dispositivo intra-oral unilateral

Figura 4.4 – Amostras posicionadas no dispositivo intra-oral

Figura 4.5 – Amostra posicionada recuada em relação ao limite do nicho

4.3.10 Desafio Erosivo *in situ*

Após a inserção do aparelho, os voluntários foram orientados a aguardar 2 horas para formação da película adquirida (Lendenmann et al., 2000; Hove et al., 2008); só então iniciavam a ciclagem erosiva. Com o objetivo de aumentar a padronização do experimento e evitar o contato dos dentes naturais com a solução ácida (Wiegand; Attin, 2011) durante a desmineralização erosiva, os dispositivos removíveis contendo as amostras de esmalte erodidas foram imersas extra-oralmente (*ex vivo*) - 6x/dia em intervalos de 1,5 h, durante 2 min cada - em 20 mL de ácido cítrico a 0,5% (pH 2,6, ácido cítrico mono-hidratado,

Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a desmineralização, os dispositivos intra-orais eram cuidadosamente secos com papel absorvente e reinserido na boca (Schlueter et al., 2013).

A solução desmineralizadora foi renovada em cada imersão. Os dispositivos foram usados durante o dia, por um período aproximado de 11 horas. À noite, durante as refeições e higiene oral, os dispositivos eram armazenados em gaze umidificada com água destilada. Os voluntários foram permitidos a beber apenas água com os dispositivos *in situ*. Após as refeições, ingestão de bebidas e higiene oral, os voluntários deveriam aguardar 15 minutos para reinserção do dispositivo na boca (Ganss et al., 2004; Schlueter et al., 2009a, 2014).

O tempo de estudo total foi de 04 fases de 05 dias cada, com um período de *wash-out* de 10 dias antes de cada ciclo, totalizando 08 semanas de fase experimental. Durante este período, e em todas as fases *in situ*, os voluntários fizeram a higiene dental, sem os dispositivos *in situ*, com o auxílio de um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries® com 1.500 ppm F-, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), escova de dentes macia n. 30 (Colgate Twister Fresh®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), fio dental (Colgate, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), os quais foram fornecidos na forma de um kit. O objetivo da doação desses materiais foi padronizar todos os voluntários, que se comprometeram a usar somente esses produtos fornecidos pelo pesquisador durante o período do experimento, evitando a utilização de bochechos e outros produtos de higiene bucal.

Os participantes foram treinados em relação a todos os procedimentos (em especial, os processos de imersão nas soluções, a limpeza dos dispositivos intra-orais e procedimento de secagem com papel absorvente após desmineralização), foram instruídos a não consumir alimentos ácidos durante o estudo, e receberam um protocolo escrito e um cronograma semanal (APÊNDICE B).

4.3.11 Tratamentos com as soluções experimentais

Os dispositivos intra-orais contendo as amostras de esmalte humano foram submetidos a uma imersão extra-oral diária, durante 2 minutos, em 20 mL da solução correspondente a cada grupo (G1 - água destilada; G2 – solução de NaF; G3 – solução de AmF/NaF/SnCl_2 1x/dia) ou a duas imersões diárias (G4 - solução de AmF/NaF/SnCl_2 2x/dia).

Os tratamentos foram realizados em horários pré-determinados, sendo a primeira imersão realizada no início do ciclo, após a formação da película adquirida, e a segunda, 30 minutos após a última imersão diária em ácido cítrico. Os voluntários eram cegos para a solução utilizada em cada fase experimental.

4.3.12 Análise Perfilométrica

Ao final de cada fase experimental, as amostras foram removidas cuidadosamente do dispositivo intra-oral, as fitas para delimitação da área de estudo foram removidas (Figura 4.6) e as amostras foram levadas ao perfilômetro óptico para análise do perfil da lesão. A análise perfilométrica foi realizada da mesma maneira já descrita no item 4.9.

Figura 4.6 – Amostra com lesão formada *in situ*, após a remoção das fitas de UPVC

4.4 Análise estatística

Para cada participante do estudo *in situ*, foi calculada a média da perda das duas amostras (duplicata) por fase experimental, o fator voluntário foi considerado para a análise.

Os dados foram testados quanto à distribuição normal, e não foi necessária qualquer transformação nos dados. Tanto *in vitro* quanto *in situ*, foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) para medir a diferença entre os grupos, com relação à medida da lesão final. Quando houve diferença estatística entre os grupos, foi utilizado as comparações múltiplas pelo método de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Todos os resultados foram obtidos utilizando-se o software estatístico Minitab, versão 16.1.

5 RESULTADOS

O critério de avaliação foi a medida de perda de substrato, expressa em micrometros, obtida a partir da perfilometria.

5.1 Estudo *in vitro*

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,01$), e os testes de comparação múltiplas demonstraram diferenças entre eles, sendo válida a expressão $G1 > G2 = G3 > G4 > G5$ (Tabela 5.1). O resultado indica que não houve diferença na aplicação do fluoreto de sódio 1 (G2) ou 2 vezes (G3), e que estes grupos tiveram menor perda de substrato em comparação ao controle (G1). Quanto aos grupos G4 e G5, ambos apresentarem menor perda em relação ao controle e ao NaF; no entanto, o grupo em que houve duas aplicações (G5) obteve melhores resultados em comparação ao de uma aplicação (G4).

Tabela 5.1 – Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato da análise perfilométrica *in vitro* (μm)

Grupos Experimentais (n=12)	Valores de perda de substrato
G1 – Água destilada	$20,36 \pm 1,56^D$
G2 – NaF 1x/dia	$16,21 \pm 1,47^C$
G3 - NaF 2x/dia	$15,39 \pm 1,01^C$
G4 - AmF/NaF/SnCl ₂ 1x/dia	$10,40 \pm 2,36^B$
G5 - AmF/NaF/SnCl ₂ 2x/dia	$7,27 \pm 3,29^A$

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

5.2 Estudo *in situ*

Todos os participantes completaram o estudo *in situ*. Apenas duas amostras foram perdidas e não puderam ser analisadas. Houve diferença estatística significativa entre os 4 grupos no geral ($p < 0,001$), sendo que as comparações múltiplas indicaram diferenças entre os grupos G1 (água destilada) e G2 (NaF 1x/dia) versus o grupo G4 (AmF/NaF/SnCl₂ 2x/dia) e o grupo G3 (AmF/NaF/SnCl₂ 1x/dia) foi semelhante estatisticamente aos grupos G1 e G2 e ao grupo G4. Observa-se que não houve diferença entre NaF e água destilada, e apesar da média no grupo G4 ter sido um pouco menor do que no grupo G3, também não houve diferença estatística significativa entre eles (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Média e desvio padrão dos valores de perda de substrato da análise perfilométrica *in situ* (μm)

Grupos Experimentais (n=12)	Valores de perda de substrato
G1 – Água destilada	4,55 ± 2,75 ^B
G2 – NaF 1x/dia	4,59 ± 2,13 ^B
G3 - AmF/NaF/SnCl ₂ 1x/dia	2,64 ± 1,55 ^{AB}
G4 - AmF/NaF/SnCl ₂ 2x/dia	1,34 ± 1,16 ^A

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

As imagens representativas do perfil das amostras em cada grupo *in vitro* estão apresentadas na Figura 5.1, e dos grupos *in situ*, na Figura 5.2.

Figura 5.1 – Imagens obtidas na perfilometria das amostras antes e após erosão *in vitro*. (A – *baseline*; B – água destilada; C - NaF 1x/dia; D - NaF 1x/dia; E - AmF/NaF/SnCl₂ 1x/dia; F - AmF/NaF/SnCl₂ 2x/dia)

Figura 5.2 – Imagens obtidas na perfilometria das amostras antes e após erosão *in situ*. (A – *baseline*; B – água destilada; C - NaF 1x/dia; D - AmF/NaF/SnCl₂ 1x/dia; E- AmF/NaF/SnCl₂ 2x/dia)

6 DISCUSSÃO

Apesar de ainda não existir um protocolo padrão para tratamento e controle das lesões erosivas, estudos comprovaram a eficácia de soluções contendo estanho associado a fluoretos na proteção do esmalte dental quando diante de desafios erosivos (Ganss et al., 2008, 2010b; Schlueter et al., 2009a, b, c, d, e, 2010, 2011b; Gracia et al., 2010; Yu et al., 2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014). Considerando que um regime de fluoretação intenso pode ser mais efetivo frente a desafios erosivos, e que a frequência ou a duração da aplicação diária influencia nesta eficácia (Ganss et al., 2004), este estudo, realizado em modelos *in vitro* e *in situ*, avaliou se o aumento da frequência de utilização da solução de AmF/SnCl₂/NaF aumenta seu efeito protetor contra a erosão em esmalte dental.

A solução de NaF, com o mesmo pH e concentração de fluoreto da solução de AmF/NaF/SnCl₂, foi utilizada para comparação, pois é um composto de fluoreto amplamente utilizado em produtos de higiene oral comercialmente disponíveis, e é amplamente utilizado na literatura como controle positivo, além de não possuir cátions metálicos polivalentes (Schlueter et al., 2009a). Na parte *in vitro* deste estudo, o NaF demonstrou uma eficácia limitada na redução da perda erosiva de tecido mineral, resultados comparáveis aos obtidos em outros estudos *in vitro* na literatura (Hove et al., 2006, Ganss et al., 2008; Ganss et al., 2010b; Rakhmatullina et al., 2013; Stenhagen et al., 2013). Esse efeito protetor se deve à deposição do CaF₂ na superfície dental (Petzold, 2001), que funciona como reservatório mineral e comporta-se como uma barreira física, diminuindo o contato do ácido com o esmalte subjacente (Magalhães et al., 2011b). Entretanto, esses precipitados são dissolvidos rapidamente quando há queda do pH, e em desafios agressivos como os erosivos, não são suficientes para inibir a perda tecidual e conferem apenas uma baixa proteção (Ganss et al., 2012).

Em contrapartida, a solução de AmF/NaF/SnCl_2 demonstrou um alto potencial em inibir a perda de tecido mineral *in vitro*. Este resultado corrobora com outros estudos da literatura (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009b,c,d,e, 2010; Gracia et al., 2010; Yu et al., 2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho e Lussi, 2014). A diferença na eficácia entre o NaF e o estanho associado a fluoretos se deve a diferenças no modo de ação. A reação entre os íons de estanho e a hidroxiapatita do esmalte produz, além do CaF_2 , sais de Sn_2OHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$ (Babcock et al., 1978), $\text{Sn}(\text{OH})_2$, $\text{Sn}_2(\text{PO}_4)\text{OH}$ (Hercules; Craig, 1976) ou SnHPO_4 (Nelson; Bainbridge, 1973), que se precipitam na superfície dental, formando uma camada estável relativamente ácido-resistente (Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008). Essa camada rica em estanho se forma em superfícies de esmalte erodidas e não erodidas (Lussi; Carvalho, 2015), e sua formação está diretamente relacionada a fatores como pH, concentração, tempo de aplicação, e razão Sn/F. Em esmalte erodido, essa deposição de sais de estanho não se restringe à superfície, podendo ser incorporado e formar zonas superficiais estruturalmente modificadas menos susceptíveis à dissolução ácida (Schlueter et al., 2009b). Na superfície, esta zona estabelecida é fracamente estruturada, tornando-se mais densa em direção ao tecido sadio subjacente. Acredita-se que esta estrutura se desenvolve devido a um processo contínuo no qual íons H^+ difundem-se através da zona de superfície rica em estanho menos denso, mas mais insolúvel, induzindo a dissolução e reprecipitação de sais minerais contendo estanho nas áreas mais profundas (Ganss et al., 2010a) Esta estrutura que se forma com a aplicação de compostos de estanho associado a fluoretos no esmalte é mais resistente à desmineralização erosiva, conferindo maior potencial anti-erosivo às soluções que utilizam estes compostos (Schlueter et al., 2009b).

A aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl_2 duas vezes ao dia *in vitro* potencializou o efeito anti-erosivo deste composto, mesmo diante de desafio ácido agressivo, reduzindo a perda de substrato em comparação com a aplicação apenas uma vez ao dia. Visto que, mesmo após múltiplos desafios ácidos, a quantidade de estanho retido na superfície é alta (Schlueter et al., 2009b), as aplicações repetidas provavelmente intensificam a deposição e a

incorporação da camada rica em estanho na superfície do esmalte, resultando em maior proteção do dente subjacente e menor perda de superfície após ataques ácidos (Khambe et al., 2014).

Diferente da solução de AmF/NaF/SnCl_2 , a eficácia, mesmo que limitada, da solução de NaF foi independente da frequência de aplicação. Consequentemente, visando diminuir o número de grupos experimentais e o desconforto para os voluntários, no estudo *in situ* a solução de fluoreto de sódio foi aplicada apenas uma vez ao dia.

Considerando que a presença da película adquirida e da saliva pode afetar a interação do estanho com o esmalte e o comportamento de deposição e dissolução dos precipitados de superfície, resultados *in vitro* devem ser interpretados com cautela (Ganss et al., 2007; Rakhmatullina et al., 2013). Sendo assim, este estudo também foi conduzido com um modelo *in situ*, visando avaliar se essas condições modificam o potencial anti-erosivo do fluoreto de sódio e do estanho associado a fluoretos. A diminuição da perda de substrato neste estudo *in situ* em comparação com o *in vitro*, mesmo no grupo controle (água destilada), demonstra a importância do fator protetor da saliva frente a desafios ácidos, devido a sua capacidade tampão, a depuração salivar e por favorecer a remineralização pela supersaturação em relação ao conteúdo mineral dos dentes, além da formação da película adquirida que funciona como uma barreira de difusão e previne o contato direto do ácido com a superfície dental (Buzalaf et al., 2012).

A solução de NaF não demonstrou ser eficaz na proteção do substrato dental sob desafios erosivos *in situ*. Este resultado é semelhante aos obtidos por Hove et al., 2007 e 2008, no qual, diferente do seu estudo *in vitro* prévio (Hove et al., 2006), o fluoreto de sódio não demonstrou potencial anti-erosivo *in situ* ou *in vitro* com formação de película adquirida, não diferindo do grupo controle (sem tratamento). Diferente dos demais estudos *in situ* que obtiveram uma proteção relativa da solução de NaF (Ganss et al., 2010b; Schlueter et al., 2009a) mas que não consideraram a formação da película adquirida previamente à ciclagem diária, estes estudos de Hove et al., 2007 e 2008

sugerem que a película pode interferir na deposição dos sais de CaF_2 e, portanto, na proteção do substrato dental durante a desmineralização.

Embora alguns estudos sugiram que o fluoreto de sódio tem maior efeito protetor contra erosão em maiores concentrações como 1000 ppm F^- (Schlueter et al., 2009a), 5000 ppm F^- e 19000 ppm F^- (Austin et al., 2010), outros demonstraram *in situ* uma eficácia limitada do NaF em concentração entre 450 e 500 ppm F^- (Ganss et al., 2010b; Mathews et al., 2012). Outra hipótese para a solução de NaF (500 ppm F) *in situ* ter obtido resultados semelhantes ao controle negativo (água destilada) é a possibilidade do dentífrício fluoretado utilizado por todos os voluntários durante o experimento, e que contém 1500 ppm F^- , ter mascarado a ação da solução de fluoreto de sódio. De acordo com Zero et al., 1992, o fluoreto, aplicado como dentífrício ou enxaguatório, permanece na saliva por aproximadamente 2 h, e por até 24 h no fluido da placa, até reestabelecer seus valores basais. Dessa forma, o bochecho com a solução de NaF, 2 h após os voluntários escovarem os seus dentes com o dentífrício fluoretado, pode não ter influenciado de maneira significativa o nível de fluoreto na região adjacente ao substrato dental.

A solução de AmF/NaF/SnCl_2 demonstrou ser eficaz na redução da perda de tecido mineral sob desafios erosivos *in situ*, ainda que o grupo de apenas uma aplicação da solução não tenha demonstrado um potencial tão notável quanto o evidenciado na parte *in vitro* e nos estudos *in situ* da literatura (Ganss et al., 2010b; Schlueter et al., 2009a, 2011b). Entretanto, como estes estudos não consideraram a formação da película adquirida antes da ciclagem, este resultado sugere que a película pode ter interferido na deposição dos sais Sn/F/P , assim como dos sais CaF_2 , sendo possível que a aplicação da solução após a formação da película e antes do ciclagem erosiva diária não tenha sido tão efetiva. Talvez, se a única aplicação tivesse sido realizada após o primeiro desafio erosivo, ou ao final da ciclagem diária, a solução de AmF/NaF/SnCl_2 pudesse ter reduzido ainda mais a perda de substrato.

Apesar dos resultados dos grupos de aplicação uma e duas vezes da solução de AmF/NaF/SnCl_2 terem sido similares, os valores de perda de substrato, o perfil das amostras de esmalte e a diferença em relação aos

grupos controle, sugerem uma tendência à menor perda no grupo em que a solução foi administrada duas vezes ao dia. O aumento da oferta de desses compostos após a ciclagem provavelmente favoreceu a deposição e a incorporação dos sais Sn/F/P na zona superficial do esmalte, aumentando assim sua resistência anti-erosiva. É possível que esta diferença relativa demonstrada se deva ao período de aplicação, pois a segunda aplicação foi realizada no final da ciclagem erosiva diária, quando possivelmente não havia mais película adquirida madura, esta não interferindo na deposição dos sais formados na interação do estanho associado a fluoretos com a hidroxiapatita. Apesar de ainda não ter sido demonstrado na literatura, há ainda que considerar que a presença do conteúdo mineral da saliva pode interferir na reação desses compostos de estanho associado a fluoretos com a hidroxiapatita, podendo aumentar esta deposição mineral, e isto pode ter influenciado na segunda aplicação, visto que esta teve contato apenas com saliva, sem interferência do desafio erosivo.

Ainda que este estudo tenha demonstrado a tendência da solução de AmF/NaF/SnCl₂ ter maior potencial em reduzir a desmineralização frente a desafios erosivos com duas aplicações diárias, outros estudos devem ser conduzidos para comprovar essa possível diferença *in situ*. Estudos futuros que considerem uma ciclagem erosiva mais severa ou que alterem o período de aplicação das soluções talvez possam evidenciar uma maior diferença entre os grupos de uma e duas vezes ao dia.

7 CONCLUSÃO

A solução de AmF/NaF/SnCl_2 demonstrou ser eficaz em proteger o esmalte da progressão da erosão dental *in vitro*, tendo o aumento da frequência de aplicação potencializado seu efeito anti-erosivo. No modelo *in situ*, esta solução foi eficaz em proteger o esmalte do desgaste erosivo apenas quando utilizada 2 vezes ao dia.

REFERÊNCIAS¹

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res*. 1999 Dec; 78(12):1821-8.

Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent*. 2001 Jul;29(5):371-6.

Armstrong WG. Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc R Soc Med*. 1968 Sep;61(9):923-30.

Attin T, Deifuss H, Hellwig E. Influence of acidified fluoride gel on abrasion resistance of eroded enamel. *Caries Res*. 1999;33(2):135-9.

Attin T, Lennon AM, Yakin M, Becker K, Buchalla W, Attin R, Wiegand A. Deposition of fluoride on enamel surfaces released from varnishes is limited to vicinity of fluoridation site. *Clin Oral Investig*. 2007 Mar;11(1):83-8. Epub 2006 Oct 17.

Austin RS, Rodriguez JM, Dunne S, Moazzez R, Bartlett DW. The effect of increasing sodium fluoride concentrations on erosion and attrition of enamel and dentine in vitro. *J Dent*. 2010 Oct;38(10):782-7. doi: 10.1016/j.jdent.2010.06.009. Epub 2010 Jun 30.

Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. *Br Dent J*. 2004 Mar 27;196(6):351-4; discussion 339.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous Fluoride and hidroxyapatite. *J Dent Res*. 1978 Sep-Oct;57(9-10):933-8.

Bartlett D, Sundaram G, Moazzez R. Trial of protective effect of fissure sealants, in vivo, on the palatal surfaces of anterior teeth, in patients suffering from erosion. *J Dent*. 2011 Jan;39(1):26-9. doi: 10.1016/j.jdent.2010.09.007. Epub 2010 Oct 7.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent*. 2013 Nov;41(11):1007-13. doi: 10.1016/j.jdent.2013.08.018. Epub 2013 Sep 1.

Büyükyilmaz T, Øgaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetrafluoride- treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:473–7.

Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Sep-Oct;20(5):493-502. Review.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, Zaidel L, Bartlett D, Proctor G. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. *Caries Res*. 2014;48(5):361-7. doi: 10.1159/000356973. Epub 2014 Mar 6.

Carvalho TS, Lussi A. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *J Dent*. 2014 Apr;42(4):450-9. doi: 10.1016/j.jdent.2014.01.004. Epub 2014 Jan 15.

Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Tveit AB, Wiegand A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear- diagnosis and management. *Clin Oral Investig*. 2015 Sep;19(7):1557-61. doi: 10.1007/s00784-015-1511-7. Epub 2015 Jul 1.

Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge J, Yan JX: The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomed Mater* 2009; 4: 1–7. doi: 10.1088/1748-6041/4/1/015020. Epub 2009 Feb 4.

Cooley WE. Reactions of tin(II) and fluoride ions with etched enamel. *J Dent Res*. 1961; 40: 1199–210.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomão PA, Grizzo LT, Magalhães AC. Effect of NaF, SnF(2), and TiF(4) toothpastes on bovine enamel and dentin erosion-abrasion in vitro. *Int J Dent*. 2012;2012:134350. doi: 10.1155/2012/134350. Epub 2012 Nov 8.

- Dawes C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Arch Oral Biol.* 1969 Mar;14(3):277-94.
- Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 2005;33:223-33.
- Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):211-5.
- Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res.* 2003 Nov-Dec;37(6):450-5.
- European Food Safety Authority (EFSA): Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Tin. *EFSA J* 2005; 254: 1–25.
- Featherstone JDB. Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71(Spec Iss):955-56.
- Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001; 35:325-30.
- Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2004;38:561-6.
- Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol.* 2007 Jan;52(1):9-14. Epub 2006 Oct 17.
- Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42:2-7.

Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks AK, Klimek J, Schlueter N. Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine - an in vitro tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. *Eur J Oral Sci.* 2010a Aug;118(4):376-84.

Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res.* 2010b Nov;89(11):1214-8.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. Dental erosion as oral disease. Insights in etiological factors and pathomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. *Am J Dent.* 2012 Dec;25(6):351-64. Review.

Gerrard WA, Winter PJ. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res.* 1986;20(3):209-16.

Gracia LH, Rees GD, Brown A, Fowler CE. An in vitro evaluation of a novel high fluoride daily mouthrinse using a combination of microindentation, 3D profilometry and DSIMS. *J Dent.* 2010 Nov;38 Suppl 3:S12-20. doi: 10.1016/S0300-5712(11)70004-5.

Gron P, Hay DI. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary secretions. *Arch Oral Biol.* 1976;21(3):201-5.

Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1999 Sep-Oct;33(5):372-9.

Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res.* 2006;85:612-6.

Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1973 Dec;18(12):1517-29.

Hercules DM, Craig NL. Composition of fluoridated dental enamel studied by x-ray photoelectron spectroscopy (ESCA). *J Dent Res.* 1976 Sep-Oct;55(5):829-35.

Hove L, Holme B, Øgaard 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;40:440-3.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF_4 , SnF_2 and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res.* 2008;42(1):68-72. Epub 2007 Dec 21.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF_4 , SnF_2 and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res.* 2008;42(1):68-72.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. *Caries Res.* 2011;45(6):518-23. doi: 10.1159/000331391. Epub 2011 Oct 5.

Imfeld T. Dental erosion - definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:151-5.

Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res.* 1999;33(6):455-61.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:44-65. Review.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:55-73. doi: 10.1159/000360973. Epub 2014 Jun 26. Review.

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res.* 1992 Sep;71(9):1569-76.

Khambe D, Eversole SL, Mills T, Faller RV: Protective effects of SnF_2 . II. Deposition and retention on pellicle-coated enamel. *Int Dent J* 2014; 64(suppl 1):11–5.

Kreulen CM, Van 't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Res.* 2010;44(2):151-9. doi: 10.1159/000308567. Epub 2010 Apr 10. Review.

Krutchkoff DJ, Jordan TH, Wei SH, Nordquist WD. Surface characterization of the stannous fluoride-enamel interaction. *Arch Oral Biol.* 1972 Jun;17(6):923-30.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res.* 2006;40:148–53.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res.* 1990 Feb;69 Spec No:575-80; discussion 634-6. Review.

Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):57-60.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.* 2000 Dec;14:22-8. Review.

Lepri TP, Scatolin RS, Colucci V, De Alexandria AK, Maia LC, Turssi CP, Corona SA. In Situ analysis of CO₂ laser irradiation on controlling progression of erosive lesions on dental enamel. *Microsc Res Tech.* 2014 Aug;77(8):586-93. doi: 10.1002/jemt.22377. Epub 2014 May 14.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994 Aug;22(4):195-207.

Levy FM, Magalhães AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, Buzalaf MA. The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on enamel in vitro. *Int J Paediatr Dent.* 2012 Jan;22(1):11-6. doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01151.x. Epub 2011 Jun 20.

Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44. Review.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. Clin Oral Investig. 2008 Mar;12 Suppl 1:S5-13. doi: 10.1007/s00784-007-0179-z. Epub 2008 Jan 29. Review.

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. Caries Res. 2008; 42:62-7.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental Erosion – An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res. 2011;45(suppl 1): 2-12.

Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides - mode of action and recommendations for use. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2012;122(11):1030-42. Review.

Lussi A, Carvalho TS. The Future of Fluorides and Other Protective Agents in Erosion Prevention. Caries Res 2015;49(suppl 1):18–29. doi: 10.1159/000380886

Macdonald E, North A, Maggio B, Sufi F, Mason S, Moore C, Addy M, West NX. Clinical study investigating abrasive effects of three toothpastes and water in an in situ model. J Dent. 2010 Jun;38(6):509-16.

Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. Caries Res. 2007;41(1):77-9.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. J Appl Oral Sci. 2009;17(2):75-86.

Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha AC, Buzalaf MA. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion in vitro. Photomed Laser Surg. 2011a Aug;29(8):537-44. doi: 10.1089/pho.2010.2886. Epub 2011 May 19.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. Monogr Oral Sci. 2011b;22:158-70. doi: 10.1159/000325167. Epub 2011 Jun 23. Review.

Mathews MS, Amaechi BT, Ramalingam K, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu IP, Mackey AC, Karlinsey RL. In situ remineralization of eroded enamel lesions by NaF rinses. *Arch Oral Biol*. 2012 May;57(5):525-30. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.010. Epub 2011 Oct 29.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 1996;104:199-206.

Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, Zaidel L, Bartlett DW. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. *Caries Res*. 2014;48(1):57-62. doi: 10.1159/000352042. Epub 2013 Nov 6.

Moss SJ. Dental Erosion. *Int Dent J*. 1998 Dec;48(6):529-39.

Mühlemann HR, Saxer UP: Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilized with amine fluoride (abstract). *Caries Res* 1981;15:186.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res*. 2003 May-Jun;37(3):225-31.

Nelson KG, Bainbridge CA. SnHPO₄ from the reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite at a low pH. *J Dent Res*. 1973 Mar-Apr;52(2):318-21.

Olley RC, Pilecki P, Hughes N, Jeffery P, Austin RS, Moazzez R, Bartlett D. An in situ study investigating dentine tubule occlusion of dentifrices following acid challenge. *J Dent*. 2012 Jul;40(7):585-93.

Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res*. 2001;35 Suppl 1:45-51.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous fluoride containing rinsing solutions. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2013;123(4):296-302.

Ramos-Oliveira TM, Ramos TM, Esteves-Oliveira M, Apel C, Fischer H, Eduardo Cde P, Steagall W, Freitas PM. Potential of CO₂ lasers (10.6 µm) associated with fluorides in inhibiting human enamel erosion. *Braz Oral Res.* 2014;28:1-6. Epub 2014 Oct 17.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, Buzalaf MA. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2006;40(3):218-23.

Rølla G, Ellingsen JE. Clinical effects and possible mechanisms of action of stannous fluoride. *Int Dent J.* 1994 Feb;44(1 Suppl 1):99-105. Review.

Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent.* 2015 Jan;43(1):42-50. doi: 10.1016/j.jdent.2014.10.012. Epub 2014 Nov 8. Review.

Saxegaard E, Rølla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988 Dec;96(6):523-35.

Saxegaard E, Rølla G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Res.* 1989;23(6):406-11.

Scatolin RS, Colucci V, Lepri TP, Alexandria AK, Maia LC, Galo R, Borsatto MC, Corona SA. Er:YAG laser irradiation to control the progression of enamel erosion: an in situ study. *Lasers Med Sci.* 2015 Jul;30(5):1465-73. doi: 10.1007/s10103-014-1620-6. Epub 2014 Jul 2.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion – intrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:178-90.

Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2007;41:141-5.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2009a;43:415-21.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci.* 2009b Aug;117(4):427-34. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00647.x.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2009c May;54(5):432-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.01.019. Epub 2009 Mar 10.

Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Caries Res.* 2009d;43(1):10-6. doi: 10.1159/000189702. Epub 2009 Jan 9.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. *J Dent.* 2009e Dec;37(12):944-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.010. Epub 2009 Aug 4.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2010 May;68(3):180-4. doi: 10.3109/00016350903555395. Epub 2010 Jan 25.

Schlueter N, Hara A, Shellis RRP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011a;45(suppl 1):13-23.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. *Clin Oral Invest.* 2011b;15:361-7.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):68-71. doi: 10.1177/0022034512449836.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Caries Res.* 2013;47(6):574-81. doi: 10.1159/000351654. Epub 2013 Aug 17.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn(2+)-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy-a controlled randomised in situ trial. *Clin Oral Investig*. 2014 Jan;18(1):107-15.

Schweizer-Hirt CM, Scheit A, Schmid R, Imfeld T, Lutz F, Mühlemann HR. Erosion und Abrasion des Schmelzes: Eine experimentelle Studie. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 1978;88:497–529.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:69-77. doi: 10.1159/000325971. Epub 2011 May 31.

Seong J, Macdonald E, Newcombe RG, Davies M, Jones SB, Johnson S, West NX. In situ randomised trial to investigate the occluding properties of two desensitising toothpastes on dentine after subsequent acid challenge. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):195-203.

Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098:504-9. Review.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1110-8. doi: 10.1177/0022034512462578. Epub 2012 Sep 26.

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 1994;28:227–32.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. *Caries Res*. 2013;47(1):2-8. doi: 10.1159/000342619. Epub 2012 Sep 21.

Stephen K, McCrossan J, Mackenzie D, Macfarlane CB, Speirs CF. Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. *Br Dent Clin Pharmacol*. 1980;9:51–5.

Sundaram G, Wilson R, Watson TF, Bartlett D. Clinical measurement of palatal tooth wear following coating by a resin sealing system. *Oper Dent*. 2007 Nov-Dec;32(6):539-43.

ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res*. 1983;17(3):193-9. No abstract available.

ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2 (Pt 2):241-4.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 2):461-5. Review.

Turssi CP, Vianna LM, Hara AT, do Amaral FL, França FM, Basting RT. Counteractive effect of antacid suspensions on intrinsic dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 2012 Aug;120(4):349-52. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00972.x. Epub 2012 Jun 25.

Turssi CP, Hara AT, Amaral FL, França FM, Basting RT. Calcium lactate pre-rinse increased fluoride protection against enamel erosion in a randomized controlled in situ trial. *J Dent*. 2014 May;42(5):534-9. doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.012. Epub 2014 Feb 26.

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*. 2004;38:247-53.

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

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 2005;39: 371-9.

Voronets J, Jaeggi T, Buerger W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Res*. 2008;42(4):286-90. doi: 10.1159/000148160. Epub 2008 Jul 29.

Voronets J, Lussi A: Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2010 Jun;14(3):251-6. doi: 10.1007/s00784-009-0288-y. Epub 2009 Jun 5.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2014 Jun;59(6):631-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.002. Epub 2014 Feb 10. Review.

Wang X, Lussi A. Functional foods/ingredients on dental erosion. *Eur J Nutr.* 2012 Jul;51 Suppl 2:S39-48. doi: 10.1007/s00394-012-0326-4.

Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odont Scand.* 2012;70:177-83.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil.* 2001 Sep;28(9):860-4.

Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond).* 2007 May;57(3):169-76. Epub 2007 Feb 16. Review. doi: 10.1093/occmed/kql163

Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T: Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontol Scand.* 2008a; 66: 225–30.

Wiegand A, Egert S, Attin T. Toothbrushing before or after an acidic challenge to minimize tooth wear? An in situ/ex vivo study. *Am J Dent.* 2008b; 21:13-6.

Wiegand A, Bichsel D, Magalhães AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. *J Dent.* 2009;37:591-5.

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Attin T. Effect of TiF₄, ZrF₄, HfF₄ and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. *Arch Oral Biol.* 2010a;55:223-8.

Wiegand A, Magalhães AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MA, Attin T. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. *Photomed Laser Surg.* 2010b Apr;28(2):219-26. doi: 10.1089/pho.2009.2551.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF₄) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent.* 2010c;8(2):159-64. Review.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies – insights and rational concepts. *Caries Res.* 2011;45(suppl 1):53-9.

Young WG, Khan F. Sites of dental erosion are saliva-dependent. *J Oral Rehabil.* 2002 Jan;29(1):35-43.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2010a;44: 390-401.

Yu H, Wegehaupt FJ, Zaruba M, Becker K, Roos M, Attin T, Wiegand A. Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro. *Arch Oral Biol.* 2010b Sep;55(9):702-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.06.006. Epub 2010 Jul 11.

Zahradnik RT. Modification by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. *J Dent Res.* 1979 Nov;58(11):2066-73. *J Dent Res.* 1992 Nov;71(11):1768-75.

Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides [published eerratum appears in *J Dent Res* 1993 Jan;72(1):87]. *J Dent Res.* 1992 Nov;71(11):1768-75.

Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104: 162-77.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do estudo *in vitro* **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL DA SOLUÇÃO DE AmF/NaF/SnCl_2 EM INIBIR A PROGRESSÃO DA LESÃO DE EROÇÃO NO ESMALTE DENTAL HUMANO.

Pesquisador: CAMILA VIEIRA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42629815.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 981.087

Data da Relatoria: 11/03/2015

Apresentação do Projeto:

A erosão dental é um processo químico, caracterizado pela dissolução dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a ácidos de origem não bacteriana. No esmalte dental, o processo de erosão se inicia com a desmineralização parcial da superfície resultando na diminuição de sua dureza e no aumento da rugosidade superficial, podendo levar à perda irreversível de tecido duro dental e resultar em problemas estéticos e/ou funcionais.

Estudos têm sido realizados para investigar como estas lesões podem ser prevenidas ou controladas e mostraram a eficácia de diferentes produtos fluoretados. Dentre eles, o estanho associado a fluoretos tem se destacado. Atualmente, estudos têm demonstrado resultados promissores utilizando a solução de AmF/NaF/SnCl_2 na inibição do processo erosivo; no entanto, ainda não se sabe se a frequência de uso (uma ou duas vezes

por dia) influencia a sua efetividade de ação. Desta forma, este estudo *in vitro* foi delineado para avaliar a solução de AmF/NaF/SnCl_2 na proteção do esmalte dental humano e estabelecer a frequência de utilização mais adequada.

Para isto, cinquenta fragmentos de esmalte humano serão selecionados, através de Microdureza de Superfície e Perfilometria, e divididos aleatoriamente em 05 grupos de tratamento ($n=10$). As amostras serão submetidas a ciclagem erosiva em solução de ácido cítrico

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 801.007

(0,65%, pH 3.6). Os resultados obtidos serão submetidos a testes de homogeneidade e normalidade para determinação do teste estatístico mais adequado (~5%).

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo in vitro tem como objetivo avaliar o potencial da solução de AmF/NaF/SnCl_2 , utilizado uma ou duas vezes ao dia, de proteger o esmalte dental humano erodido de futuros episódios ácidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, não há riscos vinculados ao projeto, pois se trata de um estudo com dentes extraídos. Com relação aos benefícios, não haverá benefícios diretos aos pacientes, no entanto, os resultados da pesquisa contribuirão para o maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente e está bem delineada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação foram enviados: Carta do Banco de Dentes, Folha de Rosto, Informações Básicas do Projeto e Projeto Completo.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O cronograma digitado no Plataforma Brasil deve ser idêntico ao do projeto anexado no sistema.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 901.007

SÃO PAULO, 11 de Março de 2015

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do estudo *in situ* **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN SITU DO POTENCIAL DA SOLUÇÃO DE SnF₂ EM INIBIR A PROGRESSÃO DA LESÃO DE EROÇÃO NO ESMALTE DENTAL HUMANO.

Pesquisador: CAMILA VIEIRA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34245214.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 961.075

Data da Relatoria: 11/03/2015

Apresentação do Projeto:

Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores da solução de fluoreto de estanho na inibição da progressão da lesão de erosão, ainda não há um consenso sobre o protocolo de utilização.

Quatorze voluntários utilizando um

dispositivo removível inferior bilateral contendo 3 amostras de esmalte dental bovino participarão deste estudo *in situ* e cruzado, dividido em quatro fases de 5 dias cada. Os voluntários serão submetidos aos tratamentos (n=14): T1 – controle (sem tratamento); T2 – enxaguar bucal com flúor (500 ppm); T3 – solução de SnF₂

1x/dia; T4 – solução de SnF₂ 2x/dia. Durante a fase experimental *in situ* o dispositivo contendo as amostras serão imersos em ácido cítrico 0,5%, pH 2,6, 2 minutos, 6x/dia em intervalos de 1,5 h. As amostras serão avaliadas através de Microdureza Superficial (n=14) no início da fase experimental (baseline, t0) e após o desafio erosivo *in vitro* (solução de ácido cítrico a 1%, pH 4,0, 3 minutos) (t1); através da Perfiometria em todos os tempos experimentais (t0, t1 e t2); e através da Microdureza Transversal após o desafio erosivo *in situ* (t2).

Adicionalmente, em algumas amostras, será realizada análise por Microscopia Eletrônica de Varredura, que permitirá a observação da morfologia de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 961.075

superfície nos 03 tempos experimentais. Os resultados obtidos serão avaliados de acordo com os conceitos da estatística clássica.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo *in situ* tem como objetivo avaliar o potencial do fluoreto de estanho (SnF_2), utilizado uma ou duas vezes ao dia, de proteger o esmalte dental bovino erodido de futuros episódios ácidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, pois os participantes terão apenas que usar um aparelho móvel passivo que carregará os fragmentos de esmalte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho útil, pois a erosão é um problema que tem afetado muitos pacientes jovens.

A razão da presente Emenda foi adequar e substituir o título uma vez que houve substituição de dentes bovinos para humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apropriado, contempla todas as formalidades e é bem esclarecedor.

Apresentou-se a carta do Banco de Dentes.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 501.075

Considerações Finais a critério do CEP:

SÃO PAULO, 11 de Março de 2015

Assinado por:
Marta Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa: “**Avaliação *in situ* do potencial da solução de AmF/NaF/SnCl₂ em inibir a progressão da lesão de erosão no esmalte dental humano.**”, a ser realizada pela aluna do curso de Mestrado em Dentística Camila Vieira da Silva, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas, no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP).

As informações contidas neste formulário têm objetivo de firmar acordo escrito mediante o qual você – o(a) voluntário(a) da pesquisa - autoriza a sua participação na pesquisa, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre-arbítrio e sem qualquer coação.

Objetivo: Este estudo *in situ* tem como objetivo avaliar o potencial da solução de AmF/NaF/SnCl₂, utilizada uma ou duas vezes ao dia, de proteger o esmalte dental humano erodido de futuros episódios ácidos.

Justificativa: Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores da utilização da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na proteção do esmalte dental de processos de desmineralização por erosão, não há um consenso quanto à frequência de utilização. Cabendo assim uma avaliação *in situ* para determinação da melhor frequência de uso para tratamento do esmalte dental erodido.

Procedimentos: Os voluntários selecionados terão suas arcadas dentais moldadas para a confecção de um aparelho removível em resina acrílica que ficará em contato com a porção vestibular de pré-molares e molares inferiores, contendo 02 fragmentos de esmalte dental humano (devidamente esterilizados em radiações gama). Três dias antes do início do experimento e durante todo o experimento, você, voluntário(a) da pesquisa, deverá utilizar exclusivamente a escova de dente, a pasta de dente e o fio dental fornecidos pela pesquisadora.

O experimento total irá durar 50 dias, sem interrupção. Na prática, cada voluntário utilizará o dispositivo removível durante 4 fases de 5 dias cada, totalizando 20 dias de uso. Antes de cada fase, haverá um período de descanso de 10 dias, chamado de *wash-out*, em que os dispositivos não serão utilizados.

No desafio erosivo *in situ*, você irá imergir o aparelho removível, contendo os fragmentos de esmalte, em ácido cítrico 0,5% (pH 2,6) por 2 minutos, 6 vezes ao dia, em intervalos de 1,5 h, durante os dias e horários pré-determinados. Após a desmineralização, os dispositivos serão cuidadosamente secos com papel absorvente e reinseridos na boca. Em cada fase, os dispositivos deverão ser imersos durante 2 minutos, também em horários pré-determinados, na solução-teste, entregue antecipadamente pela pesquisadora. Você continuará higienizando seus dentes normalmente com creme dental com flúor. O aparelho removível só poderá ser escovado na porção que fica em contato com a mucosa, ou seja, os fragmentos de dente, não deverão ser escovados. As análises das amostras serão realizadas antes do início da fase *in situ* e logo após a retirada dos fragmentos do aparelho.

Riscos e Desconforto: Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel, mas que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo.

Benefícios: Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico, sem benefício direto para você. Clinicamente, pacientes com predisposição à erosão dental ou com sinais clínicos de erosão poderão ser beneficiados com os avanços das pesquisas nesta área.

Forma de acompanhamento e assistência: Todos os procedimentos serão acompanhados pelas pesquisadoras. Além disso, as mesmas oferecerão toda a assistência necessária durante a pesquisa, se o voluntário tiver qualquer problema com o uso do dispositivo intra-oral.

Garantia de Sigilo da identidade do sujeito da pesquisa: A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. As informações fornecidas e o material que indique a sua participação serão confidenciais e de conhecimento apenas das pesquisadoras responsáveis.

Nada será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Garantia de esclarecimentos, Liberdade de Recusa: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. A sua participação é voluntária e você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem prejuízos.

Custos da Participação, Ressarcimento ou indenização: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Você será ressarcido(a) de eventuais despesas com transporte para comparecimento na FOU SP para realização dos procedimentos laboratoriais. Não há indenização prevista, pois a presente pesquisa não oferece qualquer dano ao indivíduo.

Qualquer dúvida ou problema relativo à pesquisa deve ser comunicado com a maior brevidade possível à Camila Vieira da Silva através dos telefones (11) 97206-9972 (Vivo) ou pelo e-mail camila.vieira.silva@usp.br

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Prof. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone (11)3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br.

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora, declaro que concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local e Data

Nome do participante

Assinatura

RG ou CPF

Pesquisadora Responsável

Assinatura

CRO/SP

Orientadora

Assinatura

CRO/SP

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- A fase experimental *in situ* terá duração total de 50 dias. Os dispositivos deverão ser utilizados durante 4 fases pré-determinadas de 5 dias cada, visto que antes de cada fase, haverá um período de preparo/descanso (wash-out) de 10 dias, em que o aparelho não será utilizado;
- O aparelho deverá ser utilizado aproximadamente das 8h $\pm$ 30 min às 19h $\pm$ 30 min, devendo ser armazenado na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada-deionizada (que foi fornecida no kit da pesquisa) em geladeira durante à noite;
- Antes de qualquer refeição e/ou lanche e/ou ingestão de bebidas, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada-deionizada;
- Você poderá beber APENAS ÁGUA com o aparelho em boca;
- Após a ingestão de alimentos e bebidas (exceto água) entre as refeições principais, enxágue a boca com água corrente e aguarde 15 minutos antes de colocar novamente o aparelho na boca;
- Realize a higienização dos dentes naturais normalmente 3x/dia (após café da manhã, almoço e antes de dormir) com a escova de dente, creme dental e fio dental fornecidos pela pesquisadora;
- A porção interna do aparelho, que fica em contato com a mandíbula, poderá ser escovada com a mesma escova de dente e creme dental fornecidos no kit de higiene oral diária;

- Não escove a superfície que contém os fragmentos de esmalte dental, e evite também, que o creme dental entre em contato com as amostras;
- Durante o experimento, interrompa o uso de qualquer enxaguatório bucal;
- Durante o experimento, você não deverá fazer uso de qualquer medicação sistêmica. Caso seja necessário, avisar à pesquisadora;
- Você deverá realizar devidamente os procedimentos instruídos durante as 4 fases experimentais de 5 dias:
 - ✓ 06 a 10/07/2015;
 - ✓ 20 a 24/07/2015;
 - ✓ 03 a 07/08/2015;
 - ✓ 17 a 21/08/2015.
- Nas sextas-feiras (dia 10/07, 24/07, 07/08 e 21/08) ou em outro dia previamente combinado, os dispositivos deverão ser entregues a mim, para recolhimento das amostras e as análises em laboratório;
- Em dias previamente combinados, você deverá comparecer na FOU SP para recebimento de novo kit de pesquisa (aparelho contendo novas amostras e potes contendo novo ácido cítrico e nova solução-teste para a fase experimental seguinte);
- Caso você tenha algum desconforto ou alguma dúvida sobre os procedimentos durante o experimento, me comunique imediatamente pelo telefone: (11) 97206-9972 (Vivo) ou pelo email: camila.vieira.silva@usp.br;
- Sua colaboração de extrema importância para o bom andamento deste experimento. Os horários e número de imersões na solução de ácido cítrico e nas soluções experimentais, bem como o uso ininterrupto do aparelho, são essenciais para que a pesquisa forneça resultados confiáveis;

AGRADEÇO IMENSAMENTE SUA COLABORAÇÃO E
DISPONIBILIDADE, E ESTOU À DISPOSIÇÃO PARA QUAISQUER
ESCLARECIMENTOS.

Camila Vieira da Silva

Horário	Horário Realizado					PROCEDIMENTO
	Segunda (06/07)	Terça (07/07)	Quarta (08/07)	Quinta (09/07)	Sexta (10/07)	
08:00						Inserção do aparelho em boca
10:00						1ª imersão na solução experimental (2 min)
10:30						1ª imersão em ácido cítrico (2 min)
12:00						2ª imersão em ácido cítrico (2 min)
13:30						3ª imersão em ácido cítrico (2 min)
15:00						4ª imersão em ácido cítrico (2 min)
16:30						5ª imersão em ácido cítrico (2 min)
18:00						6ª imersão em ácido cítrico (2 min)
18:30						2ª imersão na solução experimental (2 min)
19:00						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada em geladeira.

- Após cada imersão na solução experimental e em ácido cítrico, o excesso de solução deve ser removido através de secagem leve e cuidadosa em papel absorvente.
- Os horários do cronograma são sugestões, porém os intervalos propostos devem ser seguidos corretamente para garantir resultados confiáveis. Os horários que os procedimentos foram efetivamente realizados deverão ser anotados.