Yael Engel

Avaliação *in vitro* do potencial do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a erosão em esmalte dental humano

São Paulo

2019

Yael Engel

Avaliação *in vitro* do potencial do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a erosão em esmalte dental humano

Versão Corrigida

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

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva

São Paulo

2019

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

Engel, Yael.

Avaliação *in vitro* do potencial do laser de CO₂(9.3 µm), associado ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a erosão em esmalte dental humano / Yael Engel; orientador Patricia Moreira de Freitas Costa e Silva -- São Paulo, 2019.

93 p. : 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. Lasers de gás. 3. Solução de NaF. 4. Solução de AmF/NaF/SnCl₂. 5. Esmalte dentário. I. Silva, Patricia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Engel Y. Avaliação *in vitro* do potencial do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a erosão em esmalte dental humano. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 04/08/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Rios Honório

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru – Usp

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo

Instituição: Laboratório Especial de Laser em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Tais Scaramucci Forlin

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

À minha mãe e minha irmã, mulheres incríveis, independentes e a frente do tempo
que são o meu porto seguro, me encham de amor e estão sempre ao meu lado.

Ao meu pai que incentiva todas as minhas ideias e permite que eu possa torná-las
realidades, independente do que for.

Ao meu irmão que traz alegria e amor incondicional.

O amor, a educação e os ensinamentos que vocês me deram, me tornaram quem eu
sou e cada etapa desse processo, só foi possível por causa de vocês, muito
obrigada. Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ela como aluna de iniciação científica e, depois, como de mestrado. Obrigada por me proporcionar o contato com a pesquisa, com diferentes conhecimentos, faculdades e professores. Sempre respeitando o nosso tempo e opiniões. Você é uma inspiração como professora, profissional, orientadora e mãe, nos trazendo calma nos momentos necessários e soluções quase que imediatas, muito obrigada por toda a ajuda.

À Camila, minha sub-chefe, você pegou a minha mão quando me orientou como aluna de iniciação científica e não largou até hoje. Muito obrigada por ter me ensinado tudo o que podia, ser extremamente paciente e uma ótima professora. Você se tornou uma grande amiga, exemplo de pessoa e profissional que gostaria seguir. Você está em cada parte desse projeto. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Reitor, Prof. Dr. Vahan Azopian. O ingresso na USP foi uma das minhas maiores conquistas.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representada pelo seu diretor Prof. Dr. Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, que se tornou um ambiente seguro desde 2012 e permitiu tantas experiências extraordinárias além da formação em odontologia.

Ao Departamento de Dentística, representado pela chefe do departamento, Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino, que me conquistou nos primeiros anos da faculdade e guiou a minha formação.

A todos os professores do Departamento de Dentística, por todos os ensinamentos transmitidos. Foi de extrema importância profissional e pessoal. Levo todos esses anos de aprendizado no meu dia-a-dia.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, David, Selminha, Aldo, Leandro e Silvana. Vocês são essenciais para que tudo ocorra da melhor maneira possível. Muito obrigada por toda a ajuda quanto às burocracias, conversas, achar amostras que caíram no chão. O dia fica muito melhor com vocês.

Ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) e as suas funcionárias, Lili, Ana e Leni. Ambiente acolhedor e que me trouxe muitos momentos bons.

Aos funcionários da Biblioteca, pelas orientações, dedicação e ajuda na correção deste trabalho.

A Faculdade de Medicina e Odontologia São Leopoldo Mandic, representada pela Prof. Dra. Cecília Pedroso Turssi por possibilitar o uso de seu laboratório e ser tão atenciosa.

Ao Prof. Dr. Peter Rechmann e Beate Rechmann pela colaboração no projeto e tornarem possível a irradiação das amostras na Universidade da Califórnia, São Francisco (São Francisco – USA). As discussões de metodologia, a hospitalidade e o amor pela pesquisa e pelo ensino foram energizantes nessa reta final.

Aos meus avós, Edward, Mathel, Persio e Lilinha (*in memorian*), vocês tornaram tudo isso possível, sempre deram amor, carinho, atenção e valor a educação e não economizaram para que seus filhos e netos tivessem o melhor que poderiam oferecer. À Dona Maria (*in memorian*), minha terceira avó que ajudou a me criar. Amo vocês!

Aos meus tios Jan, Renée, Sabrina e aos meus primos, sei que posso contar com vocês em qualquer momento.

Ao Ricardo, nesses muitos anos de convivência você se tornou um segundo pai, amigo e conselheiro. Obrigada por todas as conversas, carinho e ajuda. Você é muito especial e querido. A Sisvania, obrigada por fazer meu pai tão feliz e ter me dado o meu melhor presente, meu irmãozinho, que nos enche de tanto amor.

À minha psicóloga Débora, você me ajudou a me conhecer, achar meu equilíbrio e aprender a lidar com as situações. É incrível perceber como mudei nesse último ano graças a sua ajuda, muito obrigada!

Aos orientados e ex-orientados da Profa. Dra. Patricia, Camila, Eric, Fernanda, Juliane, Jair, Tais e Karol. Vocês são muito queridos!

À Juliane, agradeço por ter tido a oportunidade de te conhecer melhor durante a pesquisa, você é muito querida. Não poderia ter escolhido uma parceira melhor para dividir os momentos da pesquisa e da viagem, nós formamos um bom time com a sua serenidade, rapidez e senso de localização. Obrigada por toda a ajuda e companheirismo nesses anos!

Ao meu querido grupo Narguilim, que se formou quando éramos pequenos e continuamos juntos hoje. Cada um com profissões, cidades e estados diferentes, mas sempre apoiando uns aos outros, Muito obrigada por me ajudarem a florescer, não há amizade mais bonita que essa.

Às minhas amigas da vida, Marina, Steffy, Daniela, Aninha e Marianny, obrigada por compartilhar tantos momentos comigo, sempre torcendo pelo nosso melhor e por mantermos essa amizade e esse carinho por tantos anos!

Às minhas amigas da faculdade, Letícia, Marília, Monique, Juliana, Monique, Roberta e Sabrina, vocês foram um presente que ganhei ao entrar na faculdade, me acompanharam todos esses anos e continuamos juntas, nos bons e maus momentos! Muito obrigada por todos esses anos de amizade e companheirismo.

Aos meus amigos da pós-graduação, o percurso nesses 2 anos não foi fácil e poder dividir com vocês as alegrias, risadas, tristezas, decepções, monitorias e conversas tornaram tudo mais prazeroso. Obrigada Vinicius, Ítallo, Samuel, Raquel, Juliana, Laís, Mariana, Iandara, Giovana, Sávio, Carlinhos, Giovanni, Bruna, Olívia, Hermano, Diana e Sandra pela ajuda em todo esse processo.

À Letícia, uma das minhas primeiras amigas na faculdade que está ao meu lado até hoje. Passamos por tantos momentos juntas e tantas histórias que nos fortaleceu. Nós temos uma sintonia difícil de explicar. Obrigada por todos esses anos de amizade.

À Mirian, nunca achei que uma dupla em ortodontia me traria essa amizade tão maravilhosa. Obrigada por ser essa amiga companheira 7 dias por semana, partilhar todos os momentos comigo, acreditar e me motivar a ser sempre melhor. É um presente ser sua amiga.

Ao Leonardo, você me conquistou com o seu coração bondoso, sempre pronto a ajudar e certificando que todos a sua volta estão bem. Sou muito grata por ter te conhecido, seu futuro é brilhante!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2018/09716-2), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

"A palavra é o instrumento irresistível da conquista da liberdade".

Rui Barbosa

RESUMO

Engel Y. Avaliação *in vitro* do potencial do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a erosão em esmalte dental humano [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Considerando os resultados positivos da literatura quanto à utilização do laser de CO₂ na prevenção de lesões de cárie e os resultados promissores em relação à redução da erosão de esmalte, este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o potencial do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ao NaF ou ao AmF/NaF/SnCl₂, em controlar a lesão de erosão em esmalte dental humano. Cento e vinte fragmentos de esmalte dental foram selecionados e, após a formação de lesão inicial, divididos aleatoriamente em 12 grupos de tratamento (n=10): W - água destilada (controle negativo); E - solução de AmF/NaF/SnCl₂ (500 ppm F⁻ and 800 ppm Sn²⁺); R - solução de NaF 0,05% (225 ppm F⁻); S - *slurry* de NaF 1,1% (5000 ppm F⁻) ; L1 - laser de CO₂ (0.69 W); L1+E - laser de CO₂ + solução de AmF/NaF/SnCl₂; L1+R - laser de CO₂ + solução de NaF; L1+S - laser de CO₂ + *slurry* de NaF; L2 - laser de CO₂ (0.58 W); L2+E - laser de CO₂ + solução de AmF/NaF/SnCl₂; L2+R - laser de CO₂ + solução de NaF e L2+S - laser de CO₂ + *slurry* de NaF 1,1%. As amostras foram, então, submetidas a 10 dias de ciclagem erosiva através de imersões alternadas em solução de ácido cítrico (0,5%, pH 2,3, 2 minutos, 6x/dia, em intervalos de 1,5 h) e saliva artificial. Dois parâmetros de irradiação com o laser de CO₂ (9.3 μm) foram testados (L1 e L2), seguidos de imersão diária em 5 ml da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (E, L1+E e L2+E), em solução de NaF (R, L1+R e L2+R) ou em *slurry* de NaF (S, L1+S e L2+S). Imediatamente após os tratamentos de superfície, após 5 dias de ciclagem e ao final dos 10 dias de ciclagem erosiva, a perda de superfície (μm) foi obtida por meio de perfilometria óptica. Adicionalmente, foi realizada microscopia eletrônica de varredura em 36 amostras (n=3) submetidas aos 10 dias de ciclagem erosiva e 36 amostras extras (n=3), submetidas apenas ao tratamento de superfície. Os dados de desgaste de superfície foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade, seguidos da análise pelos testes de ANOVA dois fatores e *post-hoc* de Tukey, ao nível de significância de 5%. Não houve diferença entre os grupos após os tratamentos. Em 5

dias de ciclagem, os grupos E, L1+S, L2+E, L2+R e L2+S não apresentaram diferença estatística entre si, tendo apresentado os menores valores de perda de superfície. Em 10 dias, os grupos tratados com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (E, L1+E e L2+E) apresentaram menor perda de superfície, sendo que no grupo L2+E não houve aumento estatisticamente significativo durante os 3 tempos de análise. O laser de CO₂ (9.3 μm), em ambos os parâmetros, foi capaz de inibir a erosão dental quando associado ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂.

Palavras-chave: Erosão dental. Laser de CO₂ (9.3 μm). Solução de NaF. *Slurry* de NaF. Solução de AmF/NaF/SnCl₂. Esmalte humano.

ABSTRACT

Engel Y. *In vitro* evaluation of CO₂ laser (9.3 μ m), combined with NaF or AmF/NaF/SnCl₂, in controlling erosion on human dental enamel [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Considering the positive effects of high power lasers in preventing dental caries and the promising results regarding the reduction of enamel erosion, the purpose of this *in vitro* study was to evaluate the potential of a CO₂ laser (9.3 μ m), combined with NaF or AmF/NaF/SnCl₂, in controlling erosion on dental enamel. One-hundred and twenty slabs of human enamel were selected and, after erosive-like lesion formation, randomly allocated into 12 treatment groups (n=10): W - negative control (no treatment); E - AmF/NaF/SnCl₂ solution (500 ppm F⁻ and 800 ppm Sn²⁺); R - NaF rinse (225 ppm F⁻); S - NaF slurry (5000 ppm F⁻); L1 - CO₂ laser (0.69 W); L1+E - CO₂ laser + AmF/NaF/SnCl₂ solution; L1+R - CO₂ laser + NaF rinse; L1+S - CO₂ laser + NaF slurry; L2 - CO₂ laser (0.58 W); L2+E - CO₂ laser + AmF/NaF/SnCl₂ solution; L2+R - CO₂ laser + NaF rinse and L2+S - CO₂ laser + NaF slurry. Samples were subjected to 10 days of erosive cycling through alternate immersions in 0,5% citric acid (pH 2.3, 2 minutes, 6x/day, at intervals of 1,5 h) and artificial saliva. Two CO₂ irradiation parameters (9.3 μ m) were tested (L1 and L2), followed by daily immersions in 5 ml of AmF/NaF/SnCl₂ solution (E, L1+E and L2+E), or NaF rinse (R, L1+R and L2+R) or NaF slurry (S, L1+S and L2+S). Immediately after surface treatments, after 5 days of erosive cycling and at the end of the 10 days of erosive cycling, the superficial tissue loss was determined by non-contact optical profilometry (μ m). Additionally, 36 samples (n=3) submitted to 10 days erosive cycling and 36 extras samples (n=3) submitted only to surface treatments were evaluated qualitatively by scanning electron microscopy. Surface wear data were submitted to normality and homoscedasticity tests, followed by analysis two-way ANOVA and Tukey post-hoc tests, at a significance level of 5%. There was no difference between groups after treatments. After 5 days of erosive cycling, E, L1+S, L2+E, L2+R and L2+S groups did not show statistical difference among them, having presented the lowest surface loss. After 10 days, groups treated with AmF/NaF/SnCl₂ rinse (E, L1+E and L2+E) showed less surface loss, and in the

L2+E group there was no statistically significant increase at the three time points. The CO₂ laser (9.3 μm), in both parameters, was able to inhibit dental erosion when associated with NaF and AmF / NaF / SnCl₂.

Keywords: Dental erosion. CO₂ Laser (9.3 μm). NaF rinse. NaF slurry. AmF/NaF/SnCl₂ rinse. Human enamel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Interação dos fatores capazes de influenciar o desenvolvimento e progressão do desgaste dental erosivo.....	35
Figura 2.2 - Esquema dos diferentes estágios do processo erosivo: a) amolecimento inicial da superfície, sem perda clínica visível; b) perda da superfície do esmalte, formação da lesão de erosão clinicamente visível; c) dissolução da camada de esmalte até a exposição da camada de dentina.....	37
Figura 4.1 - Fluxograma do delineamento experimental do estudo.....	49
Figura 4.2 - Laser de CO ₂ (9.3 μm).....	53
Figura 4.3 - Dispositivo metálico utilizado durante a irradiação para a fixação das amostras e proteção das áreas de referência	54
Figura 4.4 - Dispositivo usado para aferir a potência do laser a cada uma das 10 irradiações	54
Figura 4.5 - Fluxograma do projeto: (a) obtenção dos dentes e limpeza com cureta e pedra pomes e água com escova de Robinson; (b) corte da coroa do dente e obtenção dos fragmentos de esmalte; (c) fragmentos de 3,0 X 3,0 X 1,0; (d) seleção das amostras por perfilometria óptica (<i>baseline</i>) – primeira análise - e microdureza, foram selecionadas 120 amostras; (e) delimitação da área de estudo das amostras por duas fitas adesivas, deixando uma janela de 3,0 X 1,0 mm e realização da lesão inicial; (f) análise da lesão inicial no perfilômetro óptico - segunda análise – randomização das amostras em 12 grupos; (g) irradiação das amostras dos grupos L1, L1+E, L1+R, L1+S, L2, L2+E, L2+R, L2+S; (h) imersão das amostras nos respectivos tratamentos de superfície de cada grupo com leitura imediata no perfilômetro óptico – terceira análise; (i) ciclagem erosiva de 10 dias; (j) leitura no perfilômetro óptico no quinto e no décimo dia de ciclagem – quarta e quinta análise – e (k) análise em microscopia eletrônica de varredura.....	59

Figura 5.1 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após tratamento de superfície. (W – Água destilada; E – Solução de AmF/NaF/SnCl₂; R – Solução de NaF; S - *Slurry* de NaF; L1 – Laser 1; L1+E - Laser 1 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂)..... 64

Figura 5.2 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após tratamento de superfície. (L1+R – Laser 1 + Solução de NaF; L1+S – Laser 1 + *Slurry* de NaF; L2 – Laser 2; L2+E - Laser 2 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂; L2+R – Laser 2 + Solução de NaF; L2+S- Laser 2 + *Slurry* de NaF). 65

Figura 5.3 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após ciclagem erosiva. (W – Água destilada; E – Solução de AmF/NaF/SnCl₂; R – Solução de NaF; S - *Slurry* de NaF; L1 – Laser 1; L1+E - Laser 1 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂)..... 66

Figura 5.4- Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após ciclagem erosiva. (L1+R – Laser 1 + Solução de NaF; L1+S – Laser 1 + *Slurry* de NaF; L2 – Laser 2; L2+E - Laser 2 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂; L2+R – Laser 2 + Solução de NaF; L2+S- Laser 2 + *Slurry* de NaF). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Grupos experimentais	52
Tabela 4.2- Protocolos de irradiação com o laser de CO ₂ (9.3 µm).....	55
Tabela 4.3- Composição das soluções utilizadas durante a ciclagem erosiva	56
Tabela 5.1- Média e desvio padrão, em µm, da perda de superfície para os diferentes tratamentos de superfície.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	micrometro
mm	milímetro
ml	mililitro
nm	nanometro
N	Newton
M	Molar
mM	milimolar
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
ppm	partes por milhão
s	segundo(s)
h	hora(s)
HMDS	hexametildissilazano
MEV	microscópio eletrônico de varredura
F	fluoreto
AmF	fluoreto de amina
NaF	fluoreto de sódio
SnCl ₂	cloreto de estanho
Sn	estanho
SnF ₂	fluoreto de estanho
Sn ₂ OHPO ₄	hidróxido fosfato de estanho 2
Sn ₃ F ₃ PO ₄	fosfato de flúor estanhoso
P	fósforo
PRP	prolina
CaF ₂	fluoreto de cálcio
Ca(SnF ₃) ₂	fluoreto estanhoso de cálcio
kg/mm ²	quilograma por milímetro quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

X	vezes
°C	graus Celsius
%	porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1	Desgaste dental erosivo	33
2.1.1	Patogenia do desgaste dental erosivo	35
2.1.2	A influência da saliva no desgaste dental erosivo.....	37
2.2	Prevenção e controle do desgaste dental erosivo.....	38
2.2.1	Fluoretos	39
2.2.2	Estanho associado a fluoretos	40
2.2.3	Laser de dióxido de carbono	41
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Aspectos éticos	47
4.2	Local de pesquisa	47
4.3	Delineamento experimental.....	47
4.4	Obtenção dos dentes e preparo das amostras	49
4.5	Seleção das amostras de esmalte para a perfilometria.....	50
4.6	Delimitação da área de estudo.....	51
4.7	Formação da lesão de erosão inicial.....	51
4.8	Tratamento de superfície.....	52
4.9	Ciclagem erosiva.....	56
4.10	Análise perfilométrica.....	57
4.11	Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	57
4.12	Análise estatística	58
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Análise perfilométrica.....	61
5.2	Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	62
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

O desgaste erosivo é uma condição em que ocorre a perda da superfície mineral por processos físicos ou químico-físicos (Schlueter et al., 2020). A erosão dental consiste no amolecimento da superfície dentária pela ação de ácidos intrínsecos e/ou extrínsecos de origem não-bacteriana ou por substâncias quelantes nas superfícies livres de biofilme (Imfeld, 1996; ten Cate; Imfeld, 1996; Amaechi; Higham 2005). O processo se inicia pelo amolecimento superficial do tecido mineralizado dental (Lussi et al., 2004; Schlueter et al., 2011, 2012), diminuindo sua dureza, e prossegue de forma que camada a camada é solubilizada irreversivelmente, restando apenas uma superfície desmineralizada (Schlueter et al., 2012).

O desgaste dental erosivo possui etiologia multifatorial no qual fatores químicos, biológicos e comportamentais interagem entre si (Meurman; ten Cate, 1996; Lussi, 2006; Lussi; Carvalho, 2015). Hábitos dietéticos e de higiene, desordens alimentares e gastroesofágicas, ingestão de alimentos e bebidas ácidas são exemplos dos fatores comportamentais que podem favorecer a progressão do desgaste por erosão; anatomia dental, posição dos dentes em relação aos tecidos moles e no arco dentário, formação de película adquirida, fluxo salivar e sua capacidade tampão, correspondem aos fatores biológicos e, tipo de ácido, pH, presença de agentes quelantes e concentração de íons cálcio, fosfato e flúor representam os fatores químicos (Zero, 1996; Johansson et al., 2002; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008; Lussi et al., 2011). Ao longo do tempo, a interação destes fatores pode levar à progressão ou mesmo à proteção da superfície dental (Lussi et al., 2011).

Com o aumento da prevalência da condição (Brusius et al., 2018) torna-se necessário o aperfeiçoamento dos métodos preventivos e de controle já existentes e o desenvolvimento de terapias capazes de inibir a perda mineral frente ao desafio erosivo, antes que a dissolução do substrato dental ocorra de forma irreversível (Magalhães et al., 2009; Lussi; Carvalho, 2015). Os compostos fluoretados, já bem estabelecidos na prevenção e controle da cárie dental (Øgaard et al., 1994; ten Cate, 1997; Marinho et al., 2013) podem ser utilizados com esta finalidade. A aplicação tópica do produto fluoretado sobre o dente forma um composto semelhante ao fluoreto de cálcio que é mais ácido resistente, atua como fonte de íons flúor e como barreira

física contra a dissolução ácida, conferindo maior resistência ao tecido mineral dentário no desgaste erosivo (Magalhães et al., 2011a; Ganss et al., 2012).

A obtenção do efeito protetor dos fluoretos depende de um regime intenso e prolongado e com alta concentração de fluoreto (Wiegand; Attin, 2003; Ganss et al., 2004; Lagerweij et al., 2006) e ainda assim, a camada de fluoreto de cálcio demonstrou baixa estabilidade quando exposta a sucessivos desafios ácidos (Ganss et al., 2001; Lussi; Carvalho, 2015). Dessa forma, alguns estudos têm investigado a associação de cátions metálicos às soluções fluoretadas, com objetivo de obter compostos mais eficazes contra o processo erosivo (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009d; Magalhães et al., 2011b; Lussi; Carvalho, 2015).

A associação do estanho com o fluoreto tem se destacado, demonstrando eficácia na redução da desmineralização (Ganss et al., 2004, 2010a; Hove et al., 2008; Ramos-Oliveira et al., 2014; da Silva et al., 2017a, 2017b), podendo ser considerada, atualmente, “padrão-ouro” para prevenção e controle do desgaste dental erosivo. Sua ação ocorre por meio da incorporação de íons de estanho ao esmalte dental durante os desafios cíclicos erosivos, criando uma camada amorfa estável mais resistente ao processo de desmineralização (Wei, 1974; Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2008), que é composta por sais Sn/F/P ou Ca/P/Sn, dependendo da fórmula da solução aplicada (Babcock et al., 1978). Há ainda a incorporação de estanho às camadas subsuperficiais do esmalte durante o processo de desmineralização e remineralização, aumentando a proteção do substrato em relação à perda mineral (Schlueter et al., 2009d). Quanto maior o tempo de contato da solução contendo o estanho com a superfície do esmalte (Wei, 1974) e sua concentração (Schlueter et al., 2009d), maior a formação de sais de estanho, resultando em resistência ácida superior.

Além dos produtos fluoretados, outras terapias são estudadas para controlar o desgaste erosivo, como o uso de lasers de alta potência. Estudos utilizando o laser de CO₂ demonstraram eficácia em inibir a desmineralização do esmalte diante de desafios cariogênicos (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Klein et al., 2005; Tagliaferro et al., 2007, 2009; Rechmann et al., 2011, 2013, 2016) e pelo desgaste erosivo (Esteves-Oliveira et al., 2011, 2015; Lepri et al., 2013; Scatolin et al., 2015; Ramalho et al., 2019). Apesar de seu mecanismo de ação permanecer incerto, a hipótese mais aceita é baseada na modificação química da camada superficial do esmalte, por meio do aumento de temperatura (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz

et al., 1998; Chin-Ying et al., 2004; Esteves-Oliveira et al., 2009, 2017; Tagliaferro et al., 2009; Rechmann et al., 2011; Nakagaki et al., 2015), tornando a superfície mais ácido-resistente, sem causar danos à polpa (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Fried et al., 2002; Steiner-Oliveira et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2017).

O laser de CO₂, disponível para uso em Odontologia, pode ser encontrado no comprimento de onda de 9.3 a 10.6 µm (espectro de emissão no infravermelho). Nos comprimentos de 9.3 e 9.6 µm, a luz emitida pelo laser de dióxido de carbono é altamente absorvida pelos grupos carbonato e fosfato da estrutura dental. Por este motivo, a irradiação nesses comprimentos de onda tem melhor absorção de energia na superfície com menor propagação de calor no interior do substrato, sendo superior quando comparados aos comprimentos de onda de 10.3 e 10.6 µm (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Fried et al., 2002; Rechmann et al., 2011, 2013).

Ademais, acredita-se no efeito sinérgico da associação do laser de dióxido de carbono com a aplicação de produtos fluoretados (Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2011; Jordão et al., 2016; Ramalho et al., 2019). A irradiação da superfície promove a captação do fluoreto na estrutura do cristal de hidroxiapatita na forma de fluorapatita, reduzindo a dissolução do esmalte dental (Mathews et al., 2012; Shellis et al., 2014).

Os fatores como potência, densidade de energia, duração, número e modo de emissão do pulso, taxa de repetição, além do comprimento de onda, são de extrema importância para reduzir a suscetibilidade do desgaste dental erosivo (Kantorowitz et al., 1998; Zuerlein et al., 1999). No entanto, a existência de poucos estudos, assim como a discrepância de protocolos descritos, dificulta a comparação destes. Dessa forma, considerando os resultados positivos do laser de dióxido de carbono (9.3 µm) na prevenção e controle da cárie dentária e o uso de substâncias fluoretadas para diminuir a desmineralização da superfície do esmalte, o objetivo deste estudo *in vitro* foi de avaliar o potencial do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, no controle da erosão em esmalte dental humano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Desgaste dental erosivo

A erosão dental é a amolecimento da superfície dental causada por ácidos de origem não-bacteriana ou por substâncias quelantes nas superfícies livres de biofilme (Imfeld, 1996; ten Cate; Imfeld, 1996). O desgaste dental erosivo é a condição em que a erosão dental é o principal fator do desgaste dental (Schlueter et al., 2020). Os ácidos podem ter origem intrínseca e/ou extrínseca (Imfeld 1996; Shellis et al., 2014). Os de origem extrínseca são aqueles presentes nos alimentos e bebidas ácidas (Lussi et al., 1991; Bartlett et al., 2011b), medicamentos e gases industriais - ácido hidrocloreídrico ou sulfúrico (Imfeld, 1996; Meurman; ten Cate, 1996; Zero, 1996). Já os de origem intrínseca estão presentes em desordens gastroesofágicas, como doença do refluxo gastroesofágico, e transtornos alimentares, como bulimia e anorexia, doenças associadas ao ácido clorídrico (Howden, 1971; Zero, 1996).

O processo erosivo ocorre de forma progressiva e crônica, se iniciando pelo amolecimento da superfície mineral (Schlueter et al., 2011), solubilizando, irreversivelmente, camada a camada (ten Cate; Imfeld, 1996) e gerando uma superfície desmineralizada (Schlueter et al., 2012), o que evidencia a importância do seu diagnóstico precoce.

O diagnóstico diferencial do desgaste erosivo dental é um desafio para o cirurgião-dentista porque a patologia pode estar associada com as outras formas de desgaste dental, como abrasão e atrição. Destaca-se seu caráter multifatorial e simultâneo (Imfeld, 1996; Grippo et al., 2004; Lussi, 2006) e que a associação entre as diferentes formas de desgaste pode agravar a severidade da patologia. Clinicamente, os dentes acometidos por erosão dental podem apresentar esmalte fino, translúcido e com perda de brilho. As faces palatinas e oclusais são as mais afetadas, de modo que há presença de depressões ou concavidades nestas faces e arredondamento ou aplainamento das cúspides (Grippo et al., 2004; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008). As superfícies lisas podem apresentar uma linha de esmalte íntegro na margem gengival (Lussi et al., 2004, 2011; Lussi; Jaeggi, 2008), que pode estar associada à existência constante do fluido sulcular, que possui pH neutro, (Lussi et al., 2004; Lussi; Jaeggi,

2008) ou, também, pela presença de placa bacteriana no terço cervical que poderia agir como uma barreira física para a difusão do ácido (Lussi et al., 2004; Lussi; Jaeggi, 2008).

A perda de anatomia pode causar alteração na dimensão vertical que, por consequência, gera mudanças nas funções oclusais e estética inadequada (Kidd; Smith, 1993; El Wazani et al., 2012; Olley et al., 2015), as restaurações tornam-se proeminentes - ou seja, acima do nível da superfície dentária devido ao desgaste da estrutura dental (Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008; Lussi et al., 2011) - e pode haver hipersensibilidade dentinária associada (Zero; Lussi, 2005; West et al., 2013).

A etiologia do desgaste erosivo é multifatorial (Zero, 1996; Ganss et al., 2012; Shellis et al., 2014), associando os fatores químicos, biológicos e comportamentais (figura 2.1). Ao longo do tempo, a associação deles pode levar à progressão ou à proteção da superfície dentária (Meurman; ten Cate, 1996; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008).

Os fatores químicos são representados pelo tipo de ácido, pH, capacidade tampão, concentração de íons cálcio, fosfato e flúor e temperatura (Meurman; ten Cate, 1996; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008). Os agentes quelantes também influenciam o processo erosivo. O íon citrato se liga ao íon cálcio presente na superfície dentária e na saliva (Grippio et al., 2004; Lussi; Jaeggi, 2008), reduzindo o grau de supersaturação em relação aos dentes (Meurman; ten Cate, 1996), e, conseqüentemente, aumentando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita (Lussi et al., 2004; Zero; Lussi, 2005).

Os fatores biológicos são exemplificados pela anatomia do dente e sua relação com os tecidos moles, fluxo salivar, capacidade tampão e película adquirida (Zero, 1996; Johansson et al., 2002; Lussi; Jaeggi, 2008). A película adquirida age como proteção mecânica contra a erosão, atuando como barreira semipermeável, de modo a impedir o contato do ácido com a superfície dental (Zahradnik et al., 1977; Amaechi et al., 1999) e, conseqüentemente, a dissolução da hidroxiapatita. A posição do dente com os tecidos moles e com a língua, assim como a deglutição, podem modificar o desgaste erosivo, influenciando a capacidade de *clearence* do ácido podendo ser diferente para cada indivíduo.

Os fatores comportamentais modificam o desenvolvimento do processo de erosão. Os hábitos dietéticos e de higiene, desordens alimentares e gastroesofágicas, ingestão de bebidas ou alimentos ácidos podem favorecer a progressão do desgaste.

A forma de ingestão, o tempo em que o alimento/bebida fica em contato com o dente (Johansson et al., 2002), assim como a frequência ou uso de medicamentos efervescentes, são fatores que desempenham um papel importante na progressão da erosão. (Levitch et al., 1994; Zero, 1996; Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008).

Figura 2.1- Interação dos fatores capazes de influenciar o desenvolvimento e progressão do desgaste dental erosivo

Fonte: Diagrama traduzido de Lussi et al., (2011).

2.1.1. Patogenia do desgaste dental erosivo

A patogenia do desgaste dental erosivo se baseia na dissociação irreversível da hidroxiapatita carbonatada, de acordo com a equação (p. 36). Quando a solução ácida entra em contato com o esmalte ou com a dentina, o pH diminui podendo tornar-se crítico para os tecidos duros dentais. Entretanto, diferentemente do processo de desenvolvimento da lesão de cárie, o valor do pH crítico para a erosão não foi determinado (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012). No entanto, West et al., (2001) demonstraram que abaixo de pH 3,5 o valor de dissolução aumenta exponencialmente

no substrato dental. O pH crítico é aquele em que os fluidos da cavidade oral encontram-se saturados em relação à superfície dental (Ganss et al., 2012). Quando os fluidos estão subsaturados em relação aos do tecido duro dental, inicia-se a desmineralização do dente.

Equação de reação de dissociação da hidroxiapatita

O processo erosivo inicia-se pelo amolecimento superficial do esmalte, descritos como tendo uma espessura de 0,2 a 0,3 μm (Amaechi; Higham, 2001; Eisenburger et al., 2001; Wiegand; Attin, 2007; Cheng et al., 2009), seguindo pela desmineralização camada a camada dos cristais de hidroxiapatita (Lussi et al., 2011) (figura 2.2). A dissolução ocorre, iniciando pela área interprismática e segue à região central do prisma de forma irregular (ten Cate; Imfeld, 1996), levando ao aumento de rugosidade do substrato, diminuição da microdureza da superfície (Schlueter et al., 2011) e, caso continue a progredir, há exposição da camada de dentina (Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2012).

Na dentina, a porção inorgânica é dissolvida pela substância ácida de modo que a dissolução inicia-se na dentina peritubular, alargando os túbulos dentinários, e, com a progressão do processo erosivo, a região intertubular pode ser afetada (ten Cate; Imfeld, 1996). Já a porção orgânica não é afetada pelos ácidos da cavidade bucal (Ganss et al., 2012), há a exposição de uma densa e fibrosa camada de fibras colágenas (Breschi et al., 2002), que funciona como uma barreira de proteção para a dentina que está em camadas mais inferiores (Ganss et al., 2004, 2012), desta forma, abaixo da trama, existe uma camada de dentina parcialmente desmineralizada, seguida por dentina hígida.

Figura 2.2 – Esquema dos diferentes estágios do processo erosivo: a) amolecimento inicial da superfície, sem perda clínica visível; b) perda da superfície do esmalte, formação da lesão de erosão clinicamente visível; c) dissolução da camada de esmalte até a exposição da camada de dentina.

Fonte: Schlueter et al. (2012, p.69)

2.1.2. A influência da saliva no desgaste dental erosivo

A saliva é um dos principais fatores biológicos que influencia a progressão do processo erosivo. Ela possui diversos mecanismos de defesa contra o processo erosivo: diluição e limpeza do agente erosivo na boca, neutralização e tamponamentos dos ácidos (ten Cate; Imfeld, 1996; Lussi; Jaeggi, 2008).

A saliva é secretada pelas glândulas salivares maiores - parótida, submandibular e sublingual - e pelas glândulas salivares menores e é constituída de porção orgânica e inorgânica. Dentre os compostos inorgânicos, o cálcio e o fosfato definem o grau de saturação, enquanto o bicarbonato está relacionado com a capacidade tampão da saliva (Buzalaf et al., 2012, 2018). A concentração destes compostos inorgânicos na saliva pode proporcionar a redeposição de minerais sobre o tecido dental e, conseqüentemente, remineralização dessa superfície (Meurman; ten Cate, 1996). Os produtos fluoretados podem cooperar na redeposição dos sais sobre a superfície (Amaechi; Higham, 2001; Lussi; Jaeggi, 2008).

Os compostos orgânicos compreendem diversas proteínas e glicoproteínas, muitas delas ricas em prolina (PRPs), estaterinas, histatinas e mucinas. As estaterinas permitem a manutenção da supersaturação em relação ao cálcio e o fosfato. As

histatinas foram identificadas na formação da película adquirida, possuindo propriedade de proteção contra a desmineralização. As mucinas são responsáveis pela lubrificação e são o maior componente, em quantidade e tamanho, da saliva produzida pelas glândulas submandibulares e sublinguais (Buzalaf et al., 2012).

Estudos clínicos demonstraram que o desgaste dental erosivo pode estar associada com o baixo fluxo de salivação, baixa capacidade de tamponamento (Jarvinen et al., 1991; Lussi; Schaffner, 2000; Lussi; Jaeggi, 2008; Lussi et al., 2011), respiração bucal e má posição dentária (Johansson et al., 2002). O baixo fluxo salivar pode ser encontrado em pacientes que fazem uso de medicamentos ou que receberam radioterapia de cabeça ou pescoço (Dreizen et al., 1977). Em pacientes com transtornos alimentares ou alcoolismo crônico, ocorre a hipersalivação para minimizar o efeito do ácido gástrico (Lussi; Jaeggi, 2008), mas isso não ocorre em pacientes com doenças gastroesofágicas onde, por se tratar de um ato reflexo e involuntário, não há tempo para a saliva desempenhar seu papel antes que inicie o processo erosivo (Saksena et al., 1999).

2.2 Prevenção e controle do desgaste dental erosivo

Com a mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares (El Wazani et al., 2012; Bartlett et al., 2013; Li; Bernabé, 2016) um aumento da prevalência do desgaste dental erosivo tem sido relatado (Brusius et al., 2018). Este aumento ocorreu em todas as idades e em diferentes lugares do mundo, devido ao elevado e frequente consumo de sucos de frutas, balas ácidas e refrigerantes (Salas et al., 2015).

Os hábitos diários e o modo de vida também trouxeram alterações para a patologia e questionamento aos pesquisadores. Em pacientes com refluxo gastroesofágico, por exemplo, a mudança no consumo de alguns alimentos, quanto aos horários de alimentação, uso de gomas de mascar e acompanhamento médico são terapias que previnem a presença da erosão (Lussi; Hellwig, 2014). O uso de medicações de longo prazo e de remédios efervescentes têm potencial erosivo e podem ainda agir indiretamente, diminuindo o fluxo salivar (Carvalho et al., 2015).

Dessa forma, é de extrema importância a avaliação e o diagnóstico adequado, reconhecer a origem dos ácidos e individualizar as estratégias para diminuir o impacto da doença no paciente. Diversos estudos procuram formas de prevenir ou controlar a

perda mineral por meio da alteração da superfície dental. Dentre estes, o uso de fluoretos (Vieira et al., 2005; Schlueter et al., 2009d; Wiegand et al., 2010a; Magalhães et al., 2016), soluções antiácidas (Turssi et al., 2012), lasers de alta potência (Wiegand et al., 2010c; Ramalho et al., 2013, 2019; Ramos-Oliveira et al., 2014; Scatolin et al., 2015), adesivos (Azzopardi et al. 2004) e selantes (Bartlett et al., 2011a) tem sido estudados para o controle do desgaste dental erosivo. Quando há perda tecidual severa, deve-se associar restaurações adesivas aos métodos preventivos (Carvalho et al. 2015).

2.2.1 Fluoretos

O papel do fluoreto na prevenção e controle da cárie dental já está estabelecido e aceito pela comunidade odontológica (Øgaard et al., 1994; ten Cate, 1997; Marinho et al., 2013). Entretanto, ele também possui papel importante no controle do desgaste dental erosivo (Vieira et al., 2005; Wiegand et al., 2010b; Jordão et al., 2016), atuando de forma a minimizar a perda mineral do tecido dentário, e não na remineralização da superfície amolecida (Magalhães et al., 2011a).

Quando a aplicação tópica de flúor é feita sobre o dente, ocorre a formação de composto semelhante ao fluoreto de cálcio (CaF_2 -like). Este tem o formato de glóbulos esféricos, mas é difícil encontrá-lo na sua forma mais pura porque proteínas e fosfatos podem se depositar no CaF_2 de forma a estabilizar e tornando-o mais ácido-resistente. Ele atua como uma fonte de íons de flúor; quando há queda de pH do fluido, libera os íons F^- , mantendo o pH da superfície dentária e do fluido neutro por mais tempo (Rölla; Ekstrand, 1996; ten Cate, 1997; Wiegand; Attin, 2003).

Os íons de F^- livres na saliva podem ser incorporados na hidroxiapatita - formando a hidroxifluorapatita - ou na fluorapatita. Estes cristais apresentam menor quantidade de impurezas que a hidroxiapatita carbonatada (Lussi et al., 2012; Shellis et al., 2014), além de promover o aumento no tamanho e na espessura dos cristais de hidroxiapatita (Featherstone; Lussi, 2006), aumentando a resistência ácida dos tecidos duros dentais e diminuindo a susceptibilidade à uma eventual dissolução (ten Cate, 1997). Entretanto, a incorporação do fluoreto às estruturas mineralizadas tem eficácia

limitada, sendo a adsorção dos íons de flúor fracamente ligados superior em relação à redução da desmineralização (Lussi et al., 2012).

O CaF_2 também pode atuar formando uma barreira física contra os ácidos, protegendo o reservatório mineral da superfície dental que seria exposto ao desafio ácido (Wiegand et al., 2010a). A barreira deve ser suficientemente densa e estável (Lussi; Carvalho, 2015) contra os desafios erosivos, dependendo do pH, concentração de flúor e frequência de aplicação, sendo que, quanto maior a frequência e a concentração, maior a precipitação do fluoreto de cálcio (Magalhães et al., 2011b).

Os fluoretos requerem um regime de uso mais intenso (Ganss et al., 2004) e prolongado para prevenir a perda mineral erosiva (Wiegand; Attin, 2003; Lagerweij et al., 2006), tendo demonstrado potencial limitado contra a erosão pela baixa estabilidade da camada de fluoreto de cálcio (Ganss et al., 2001; Lussi; Carvalho, 2015) e pela natureza agressiva do desafio erosivo (Magalhães et al., 2011b). Estudos recentes (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009c, 2009d; Magalhães et al., 2011b; Lussi; Carvalho, 2015; da Silva et al., 2017a, 2017b) têm focado em compostos de fluoretos mais eficazes contendo íons metálicos combinados aos fluoretos, tais como titânio, estanho, cobre, zinco, alumínio e ferro.

2.2.2 Estanho associado a fluoretos

Compostos fluoretados contendo a associação com o estanho têm demonstrado eficácia na redução da desmineralização (Ganss et al., 2004, 2010a; Hove et al., 2008; Ramos-Oliveira et al., 2014; da Silva et al. 2017a, 2017b), podendo ser considerados o “padrão-ouro” para prevenção e controle da erosão dental atualmente. Schlueter et al. (2009d) demonstraram que, em desafios erosivos cíclicos, a profundidade de penetração do estanho foi entre 10 a 20 μm , formando uma zona relativamente ampla de esmalte estruturalmente alterado e proporcionando a proteção do esmalte.

A reação dos íons de estanho com o tecido duro dental formam os sais 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), além do CaF_2 . Estes

sais são dependentes de diversos fatores como o pH, concentração, tempo de aplicação, composto do flúor e a razão entre F/Sn (Nelson; Bainbridge, 1973; Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2012). Dessa forma, sua ação ocorre por meio da precipitação dos íons de estanho ao esmalte dental durante os desafios erosivos, criando uma camada amorfa estável mais resistente ao processo de desmineralização (Wei, 1974; Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2008), de 500 nm de espessura aproximadamente (Schlueter et al., 2009a). Há ainda a incorporação do estanho às camadas subsuperficiais do esmalte durante o processo de desmineralização e remineralização, o que aumenta a proteção do substrato da perda mineral (Schlueter et al., 2009b). Quanto maior o tempo de contato do estanho com a superfície do esmalte (Wei, 1974) e concentração do estanho (Schlueter et al., 2009d), maior a formação de sais de estanho, resultando em melhor resistência ácida e, de acordo com alguns autores, aplicações repetidas reforçam a proteção do substrato dental (Khambe et al., 2014; Lussi; Carvalho, 2015).

O estanho associado ao fluoreto, tanto na forma de SnF_2 quanto de AmF/SnCl_2 , dificultam a perda mineral. Estudos *in vitro* (Gracia et al., 2010; Yu et al., 2010; Rakhmatullina et al., 2013; Carvalho; Lussi, 2014; da Silva et al. 2017b) utilizando a solução à base de AmF/NaF/SnCl_2 (Elmex Erosion Protection®, GABA, Therwi, Suíça), contendo 500 ppm de flúor e 800 ppm de estanho demonstraram a redução da perda de superfície entre 65 e 73% em esmalte, mesmo em condições severas de erosão. O fluoreto de amina tem propriedade estabilizadora (Mühlemann; Saxer, 1981) impedindo que os íons de estanho, em alta concentração e pH 4,5, fiquem instáveis e formem precipitados. O SnCl_2 associado com AmF/NaF age como fonte independente de estanho e fluoretos oferecendo uma maior disponibilidade desses íons (Schlueter et al., 2009c).

2.2.3 Laser de dióxido de carbono

Considerando que ainda não existe consenso sobre o melhor método de prevenção e controle da erosão, estudos usando a irradiação com lasers de alta potência têm sido conduzidos, devido à sua efetividade na prevenção de lesões de cárie em esmalte. Diversos autores (Kantorowitz et al., 1998; Chin-Ying et al., 2004;

Tagliaferro et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2009, 2015; Ramalho et al., 2013, 2019; Silva et al., 2020) mostraram resultados positivos na redução da desmineralização do esmalte durante os desafios ácidos após a irradiação do laser de CO₂, associado ou não a fluoretos.

Rechmann et al. (2011) demonstraram que o laser de CO₂ altera a estrutura química e morfológica da superfície de esmalte, por meio do aumento de temperatura (Nelson et al., 1987; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2000), tornando-a menos suscetível à dissolução ácida, sem causar injúrias à polpa. O mecanismo de ação do laser de CO₂ permanece incerto, ainda que algumas hipóteses tenham sido sugeridas para tentar explicar o aumento da resistência do esmalte após a sua irradiação.

A primeira hipótese sugere uma mudança física resultante da fusão dos cristais de hidroxiapatita pelo derretimento e recristalização que reduz os espaços interprismáticos e forma uma barreira parcial. Essa barreira seria capaz de reduzir a permeabilidade e solubilidade do tecido quando em contato com ácidos (Stern et al., 1972; Nelson et al., 1986b, 1987; Zuerlein et al., 1999; Klein et al., 2005). Entretanto, foi observado uma camada fina de 5 µm após a irradiação com o laser de CO₂ em comprimentos de onda de 9.3, 9.6, 10.3 e 10.6 µm e a presença de monóxido de difosfato de tetracálcio, Ca₄(PO₄)₂O, que é mais solúvel que a apatita do esmalte (Nelson et al., 1987).

A segunda hipótese é baseada na modificação e degradação da matriz orgânica interprismática quando submetida a temperaturas inferiores a 400° C. Os subprodutos dessa degradação obliteram os espaços inter e intraprismáticos do esmalte, bloqueando a entrada dos íons ácidos e, ao mesmo tempo, formando um reservatório mineral que diminuiria os efeitos da desmineralização (Nelson et al., 1986a, 1986b; Hsu et al., 2000, 2001).

A terceira hipótese e a mais aceita é baseada nas modificações na estrutura química do esmalte que ocorre durante a irradiação, na qual há evaporação dos carbonatos, decomposição das proteínas, formação de pirofosfatos (mais resistente à dissolução ácida), tornando a superfície menos solúvel ao ácido (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Featherstone et al., 1998).

Diversos estudos demonstraram a inibição da desmineralização quando potencializada por agentes fluoretados (Fox et al., 1992; Hsu et al., 1998, Hsu et al., 2001; Hossain et al., 2002; Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006, Esteves-Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2020). A irradiação do laser seria capaz de aumentar

o processo de difusão do flúor, melhorando sua absorção pelo esmalte dental (Oho; Marioka, 1990). A irradiação do laser forma microespaços, devido à remoção dos componentes orgânicos e carbonato e isto poderia criar sítios para a deposição do flúor na superfície (Yokoyama et al., 2001). Mathew et al. (2013) demonstraram o efeito sinérgico do laser com os fluoretos, de modo que os precipitados esféricos, CaF_2 -like, podem favorecer na incorporação do flúor na superfície do esmalte, na forma de flúor fortemente ligado, transformando a hidroxiapatita em fluorapatita, e esse efeito torna a superfície mais ácido-resistente (Meurman et al., 1997).

As diferentes transformações químicas estão associadas com a temperatura atingida pelo esmalte durante a irradiação. A partir de 100°C inicia a remoção do carbonato, até sua completa extinção em 1.100°C (Fowler; Kuroda, 1986). Quando a temperatura atinge entre 100° a 650°C , o carbonato é transformado em fosfato e, depois, em pirofosfato (Featherstone; Nelson, 1987; Fried et al., 1997); entre 800° a 1200°C ocorre o derretimento (*melting*) da superfície do esmalte irradiado (Zuerlein et al., 1999).

Os lasers de dióxido de carbono estão disponíveis nos comprimentos de onda de 9.3 a $10.6\text{ }\mu\text{m}$. Featherstone e Nelson (1987) demonstraram que os comprimentos de onda de 9.3 e $9.6\text{ }\mu\text{m}$ são melhores absorvidos pelos grupos carbonato e fosfato da estrutura dental. Por este motivo, a irradiação nesse comprimento de onda é melhor absorvida na superfície do esmalte comparado aos comprimentos de onda de 10.3 e $10.6\text{ }\mu\text{m}$ e com menor propagação de calor nos tecidos mais profundos do substrato (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Fried et al., 2002; Rechmann et al., 2011, 2013; Esteves-Oliveira et al., 2017).

O laser de CO_2 nos comprimentos de onda de 9.3 e $9.6\text{ }\mu\text{m}$ são quase dez vezes melhor absorvidos que nos comprimentos de onda de 10.3 e $10.6\text{ }\mu\text{m}$. O menor coeficiente de absorção demonstra a capacidade do laser de agir sobre a superfície do substrato irradiado e, dessa maneira, a quantidade de calor gerada terá incidência menor no tecido pulpar (Featherstone; Nelson, 1987; Featherstone 2000; Fried et al., 2001). Zuerlein et al. (1999) demonstraram que a irradiação poderia gerar uma camada modificada entre 10 a $20\text{ }\mu\text{m}$ e Silva e colaboradores (2020) demonstraram a atuação do laser entre 5 a $10\text{ }\mu\text{m}$ no esmalte dental.

A discrepância entre os protocolos utilizados e os resultados obtidos nos estudos da literatura mostraram que, além do comprimento de onda, outros fatores como

potência, densidade de energia, duração do pulso, número de pulsos e seu modo de emissão e taxa de repetição são de extrema importância para reduzir a suscetibilidade do esmalte à erosão dental (Kantorowitz et al., 1998; Zuerlein et al., 1999). No entanto, há indícios que densidades de energia mais baixas apresentam melhores resultados em inibir progressão de lesões de cárie (Featherstone et al., 1998; Rechmann et al., 2011, 2013, 2016).

Dessa maneira, considerando os promissores resultados na utilização da irradiação de laser de CO₂ na prevenção e controle da cárie dentária, a predominância do uso das substâncias fluoretadas para controlar a desmineralização da superfície e a pequena parcela de estudos quanto à utilização do laser de CO₂ (9.3 µm) no controle do desgaste dental erosivo, o objetivo deste estudo *in vitro* foi de avaliar o potencial do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ou não ao fluoreto de sódio e ao fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho, no controle da lesão de erosão em esmalte.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o efeito do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂, no controle da erosão em esmalte dental humano.

As hipóteses nulas testadas foram:

- (1) O laser de CO₂ (9.3 µm) não é capaz de controlar as lesões de erosão em esmalte dental humano;
- (2) A associação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (500 ppm de F⁻ e 800 ppm de Sn²⁺) e da irradiação com o laser de CO₂ (9.3 µm) não demonstra efeito sinérgico;
- (3) A associação da solução de NaF (225 ppm de F⁻) e da irradiação com o laser de CO₂ (9.3 µm) não demonstra efeito sinérgico.
- (4) A associação do *slurry* de NaF (5000 ppm de F⁻) e da irradiação com o laser de CO₂ (9.3 µm) não demonstra efeito sinérgico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Foram utilizados 90 terceiros molares humanos recém-extraídos, cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (CEP-FOUSP, Parecer nº 2.865.401) (Anexo A).

4.2 Local da pesquisa

Todas as fases do presente estudo foram realizadas no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Brasil), sob orientação da Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas, com exceção da irradiação das amostras com laser de CO₂ (9.3 µm), a qual foi realizada no Departamento de Dentística Preventiva e Restauradora da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF-EUA), sob orientação do Prof. Dr. Peter Rechmann.

4.3 Delineamento experimental

O fluxograma da pesquisa está ilustrado na Figura 4.1. As unidades experimentais foram compostas por 156 fragmentos de esmalte dental humano. Cento e vinte fragmentos foram selecionados através da microdureza e curvatura superficial e foram, então, divididos randomicamente em 12 grupos (n=10). Trinta e seis fragmentos adicionais foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura (n=3), para avaliação morfológica do substrato submetido apenas aos tratamentos de superfície.

Os fatores de estudo foram a influência do *tempo*, em 3 tempos: após tratamento de superfície, após 5 e 10 dias de ciclagem; e o *tratamento de superfície* do esmalte, em 12 níveis (n=10): W - água destilada (controle negativo); E - solução de AmF/NaF/SnCl₂ (500 ppm de F⁻ e 800 ppm de Sn²⁺); R - solução de NaF (225 ppm de F⁻); S - *slurry* de NaF (5000 ppm de F⁻); L1 - laser de CO₂ (0.69 W); L1+E - laser de CO₂ (0.69 W) + solução de AmF/NaF/SnCl₂ (500 ppm de F⁻ e 800 ppm de Sn²⁺); L1+R - laser de CO₂ (0.69 W) + solução de NaF (225 ppm de F⁻); L1+S - laser de CO₂ (0.69 W) + *slurry* de NaF (5000 ppm de F⁻); L2 - laser de CO₂ (0.58 W); L2+E - laser de CO₂ (0.58 W) + solução de AmF/NaF/SnCl₂ (500 ppm de F⁻ e 800 ppm de Sn²⁺); L2+R - laser de CO₂ (0.58 W) + solução de NaF (225 ppm de F⁻) e L2+S - laser de CO₂ (0.58 W) + *slurry* de NaF (5000 ppm de F⁻). Dois parâmetros de irradiação com o laser de CO₂ (9.3 µm) foram testados, como segue: L1 - duração de pulso de 18 µs, taxa de repetição de 100 Hz, densidade de energia de 2.2 J/cm², potência de 0,69 W, diâmetro da ponta de 0,63 mm e modo de irradiação focado com 10 mm da superfície da amostra e L2 - duração de pulso de 14,6 µs, taxa de repetição de 100 Hz, densidade de energia 1,9 J/cm², potência de 0,58 W, diâmetro da ponta de 0,63 mm e modo de irradiação focado com 10 mm da superfície da amostra.

A variável de resposta foi o desgaste da superfície (em µm), determinado por meio de perfilometria óptica, e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que consistiu em uma análise observacional.

Figura 4.1 - Fluxograma do delineamento experimental do estudo.

Fonte: A autora.

4.4 Obtenção dos dentes e preparo das amostras

Os molares humanos recém extraídos, hígidos, foram submetidos à profilaxia com a utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o polimento com pedra-pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água com o auxílio de escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada (figura 4.5a). Com a máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA) as coroas foram seccionadas e das superfícies lisas foram obtidos fragmentos de 3,0 X 3,0 X 1,0 mm dos molares humanos (figura 4.5b, c). Em seguida, os fragmentos foram polidos (Ecomet 6/Automet 2 – BuehlerLtd, Lake Bluff, IL, EUA) com lixa de carbeto de silício

com granulação de #800, #1200 e #4000 (Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA – Padrão FEPA), seguido da suspensão de alumina de 0,3 µm (Alfa Micropolish, Buehler Ltda., Lake Buff, IL, EUA), com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas. Entre cada série de polimento e ao final, os fragmentos foram lavados em água destilada-deionizada por 3 minutos em ultrassom (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil).

4.5 Seleção das amostras de esmalte para a perfilometria

Todos os espécimes foram observados em Lupa Estereoscópica com lente de aumento de 40x para verificar a existência de defeitos e trincas no esmalte. Os espécimes, devidamente planos, paralelos e polidos, foram analisados em perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Eagan, MN, EUA) para determinação da curvatura da superfície no início da fase experimental (*baseline*), e apenas amostras com valor de curvatura abaixo de 0,3 µm foram selecionadas para o estudo (Eisenburger et al., 2003).

Os espécimes selecionados na perfilometria tiveram sua microdureza superficial mensurada, a fim de padronizar a dureza do substrato obtido após a sequência de polimento. Foi utilizado um microdurômetro (Microdurômetro HMV-G21DT, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) com penetrador Knoop, com carga estática de 0,49 N (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. Os fragmentos que obtiveram valor médio 10% acima ou abaixo da média ($308,7 \pm 30,8 \text{ Kg/mm}^2$) foram eliminados (figura 4.5d). A partir desses dados, foram selecionadas 120 amostras para a fase experimental.

4.6 Delimitação da área de estudo

Para possibilitar a análise da perda de tecido mineral (em μm), que foi realizada em perfilômetro óptico, duas fitas adesivas (UPVC tapes - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foram posicionadas na superfície de cada fragmento de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 0,75 mm de largura para delimitação da área de estudo (Mathews et al., 2012). Por fim, todos os espécimes foram armazenados em umidade relativa a 5° C até o início da fase experimental.

4.7 Formação da lesão de erosão inicial

Para induzir a formação da lesão de erosão em estágio inicial, antes dos tratamentos de superfície, as amostras foram submetidas à uma imersão individual em 5 ml de solução de ácido cítrico a 1% (pH 2,3) (Ácido cítrico mono-hidratado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), em temperatura ambiente, sob constante agitação em mesa agitadora orbital (3D digital shaker with LCD SK-D3309-Pro, Scilogex, Berlin, NH, EUA, frequência de 35 rpm), durante 10 minutos (figura 4.5e). Em seguida, foram lavadas em água destilada por 30 segundos e secas com papel absorvente. Após o desafio erosivo, foi realizada uma nova leitura em perfilômetro óptico para padronizar as lesões formadas, sendo selecionadas amostras com perda superficial de, aproximadamente, 3.0 μm (figura 4.5f). As amostras foram então randomizadas nos grupos experimentais, de acordo com a lesão inicial obtida, e para garantir homogeneidade na distribuição, foi realizado o teste ANOVA 1-fator ($3.6033 \pm 0.16 \mu\text{m}$), ($p=0,508$).

4.8 Tratamentos de superfície

A distribuição das amostras, segundo os diferentes tratamentos de superfície, estão descritas na Tabela 4.1:

Tabela 4.1 - Grupos experimentais

Grupo experimental	Tratamento de superfície
W	Água destilada (controle negativo)
E	Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (500 ppm de F ⁻ e 800 ppm de Sn ²⁺) (controle positivo) Fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho
R	Solução de NaF 0,05% (225 ppm F ⁻) (controle positivo) Fluoreto de sódio e cloreto de cetilpiridínio
S	<i>Slurry</i> de NaF 1,1% (5000 ppm F ⁻) (controle positivo) Fluoreto de sódio, água, sorbitol, sílica hidratada, glicerina, sílica amorfa, glicol de polipropileno-polietileno, aroma, polietilenoglicol, laurilsulfato de sódio, dióxido de titânio, carboximetilcelulose, sacarina sódica e tri-cálcio fosfato
L1	Laser de CO ₂ (0.69 W)
L1 + E	Laser de CO ₂ (0.69 W) + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂
L1 + R	Laser de CO ₂ (0.69 W) + Solução de NaF
L1 + S	Laser de CO ₂ (0.69 W) + <i>Slurry</i> de NaF
L2	Laser de CO ₂ (0.58 W)
L2 + E	Laser de CO ₂ (0.58 W) + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂
L2 + R	Laser de CO ₂ (0.58 W) + Solução de NaF
L2 + S	Laser de CO ₂ (0.58 W) + <i>Slurry</i> de NaF

Fonte: A autora.

As amostras dos grupos L1, L1+E, L1+R, L1+S, L2, L2+E, L2+R e L2+S foram irradiadas manualmente com o laser de CO₂ ($\lambda = 9.3 \mu\text{m}$) (Solea, Convergent Dental, Inc., Needham, MA) (figura 4.2), em ziguezague, varrendo toda a área (3,0 x 0,75 mm), com pulsos curtos. Suas bordas foram protegidas por um dispositivo de metal (figuras 4.3 e 4.5g) durante as irradiações, evitando o contato do laser nas áreas de referência para a posterior leitura em perfilômetro óptico.

A cada 10 irradiações, a potência emitida pelo laser foi mensurada usando um medidor de potência (figura 4.4) e o tempo de irradiação foi de 10 segundos por amostra. As irradiações foram realizadas uma vez durante o estudo, antes do início da ciclagem erosiva. Os protocolos de irradiação testados estão descritos na tabela 4.2.

Figura 4.2 – Laser de CO₂ (9.3 µm)

Fonte: Convergent Dental.

Figura 4.3 – Dispositivo metálico utilizado durante a irradiação para a fixação das amostras e proteção das áreas de referência

Fonte: A autora.

Figura 4.4 – Dispositivo usado para aferir a potência do laser a cada uma das 10 irradiações

Fonte: A autora.

Tabela 4.2 - Protocolos de irradiação do laser de CO₂ (9.3 µm)

Parâmetro	Laser 1 (L1)	Laser 2 (L2)
Duração de pulso	18 µs	14.6 µs
Taxa de repetição	100 Hz	100 Hz
Densidade de energia	2.2 J/cm ²	1.9 J/cm ²
Potência (output)	0.69 W	0.58 W
Diâmetro da ponta nativa do laser	250 µm (90/10)	250 µm (90/10)
Diâmetro da ponta no momento da irradiação	0.63 mm	0.63 mm
Irrigação de ar/água	Sim/não	Sim/não
Modo de irradiação	Focado (10 mm da superfície da amostra)	Focado (10 mm da superfície da amostra)

Fonte: A autora.

Após as irradiações, as amostras foram submetidas, diariamente, aos tratamentos de superfície com os fluoretos previamente ao primeiro desafio erosivo diário, durante 10 dias, sob agitação orbital de 35 rpm (figura 4.5h). As amostra do grupo controle negativo (W) foram imersas em 5 ml de água destilada por 2 minutos.

As amostras submetidas ao tratamento com a solução de NaF (R, L1 + R e L2 + R) (pH 5,05; 225 ppm F⁻; cloreto de cetilpiridínio 0,075%; Plax Soft Mint; Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA) foram imersas 1x/dia em 5 ml, durante 2 minutos. As amostras dos grupos E, L1 + E e L2 + E, submetidas ao tratamento com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (pH 4,5; 500 ppm F⁻; 800 ppm Sn⁻²; Elmex Erosion Protection®, GABA, Therwi, Suíça), foram imersas de maneira semelhante, 1x/dia em 5 ml da solução por 2 minutos (Schlueter et al., 2010, 2016; Silva et al., 2020).

Os grupos S, L1 + S e L2 + S foram imersos em 5 ml de dentifrício, *slurry* de Clinpro™ 5000 (pH 6,12; 5000 ppm F⁻; Clinpro™ 5000; 3M ESPE; Minnessota, EUA) durante 1x/dia por 1 minuto. Este era preparado na proporção de 1:3 antes do início de cada dia de ciclagem, de modo que 45 g do dentifrício foi adicionado a 135 mg de água e misturado por 10 minutos com auxílio do peixe magnético, até obtenção de *slurry* homogêneo (Rechmann et al., 2016).

Após o primeiro tratamento de superfície e antes do início da ciclagem erosiva, as amostras foram avaliadas através da perfilometria óptica, para verificar alterações provocadas pelos tratamentos de superfície (figura 4.5j).

4.9 Ciclagem erosiva

Para a ciclagem erosiva foi utilizada uma solução de ácido cítrico para desmineralização erosiva (Ganss et al., 2008) e saliva artificial (Gerrad; Winter, 1986; Schlueter et al., 2009c) (Tabela 4.3). Durante o período de 10 dias, as amostras foram submetidas a ciclagens erosivas, alternando desafios ácidos e armazenamentos em saliva artificial.

Tabela 4.3 - Composição das soluções utilizadas durante a ciclagem erosiva

Solução	Composição	pH
Desmineralizadora	Ácido cítrico a 0,5%	2,3
Saliva artificial	4,08 mM H ₃ PO ₄ , 11,90 mM NaHCO ₃ , 20,10 mM KCl e 1,98 mM CaCl ₂	7,0

Fonte: A autora.

As amostras foram fixadas, com cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil), em uma placa de cultura de células de 12 poços, para proporcionar a imersão individual e simultânea das amostras em 5 ml de solução de ácido cítrico a 0,5% (pH 2,6, ácido cítrico mono-hidratado, Merck, Darmstadt, Alemanha) (figura 4.5i).

Os desafios erosivos foram realizados 6x/dia, durante 2 minutos, com intervalo de uma hora e meia entre eles, sob constante agitação orbital (35 rpm). Após cada desafio erosivo, as amostras foram lavadas em água destilada por 10 segundos e armazenadas na solução supersaturada até o desafio seguinte. Todas as soluções de ácido cítrico foram renovadas a cada imersão e tiveram o pH monitorado (figura 4.5i). Durante a noite, as amostras permaneceram imersas em saliva artificial, sob agitação

orbital de 35 rpm, que foi trocada no início e no fim de cada ciclo diário (Schlueter et al., 2009c).

4.10 Análise perfilométrica

Para a análise perfilométrica, as fitas de UPVC ácido-resistente foram removidas da superfície do esmalte cuidadosamente e as superfícies de esmalte hígido foram utilizadas como referência para análise através de um perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D - Processo FAPESP 2011/17699-1). O sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2,0 mm de comprimento (no eixo X) por 1,0 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 (tempo de escaneamento = 28 s). A profundidade da lesão (*3-pt step height*) foi calculada por um software específico (Proscan Application 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.

As amostras foram analisadas cinco vezes durante a fase experimental. A primeira análise foi realizada para a leitura *baseline*; a segunda, após a formação da lesão inicial de erosão; a terceira análise consistiu na avaliação imediatamente após a aplicação do tratamento de superfície de cada grupo; a quarta leitura foi feita após o quinto dia de ciclagem erosiva; e a última análise, após o décimo dia de ciclagem erosiva (figura 4.5j).

4.11 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A fim de se observar as características de superfície do esmalte promovidos pelos tratamentos de superfície, 3 amostras de cada grupo, selecionadas aleatoriamente, foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura. Outras 3 amostras de cada grupo, que não foram submetidas à ciclagem erosiva,

apenas aos tratamentos de superfície, foram selecionadas aleatoriamente e analisadas em MEV (figura 4.5k).

Cada uma das amostras foi submetida à desidratação química através da imersão em soluções crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 90%, 95% (2 banhos de 5 minutos cada) e álcool absoluto (4 banhos de 5 minutos). Posteriormente, foi feita a secagem química em solução de hexametildissilazano (HMDS) a 100% por 20 minutos e, depois, as amostras foram mantidas sobre papel absorvente, em capela, por mais 2 horas. Após a montagem em *stubs* e revestimento por pulverização com platina (MED 010, Balzers, BAL-TEC, Liechtenstein), cada amostra foi observada no Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI, QUANTA FEG 650, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), pertencente ao Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, operando a 15 kV, com aumento de 1.500x.

4.12 Análise estatística

Os dados de perda de superfície obtidos pela perfilometria óptica foram analisados em três tempos: após o tratamento de superfície, após 5 dias e 10 dias de ciclagem, em todos os grupos de tratamento. Os valores obtidos não passaram no teste de normalidade ($p < 0,050$) e de homocedasticidade ($p < 0,050$). Os dados foram avaliados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) 2-fatores com medidas repetidas (Cohen, 2001), considerando o tratamento de superfície e os diferentes tempos como as variáveis independentes; e a perda de superfície como variável dependente. Em seguida, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

O software utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

Figura 4.5 – Fluxograma do projeto: (a) obtenção dos dentes e limpeza com cureta e pedra pomes e água com escova de Robinson; (b) corte da coroa do dente e obtenção dos fragmentos de esmalte; (c) fragmentos de 3,0 X 3,0 X 1,0; (d) seleção das amostras por perfilometria óptica (*baseline*) – primeira análise - e microdureza, foram selecionadas 120 amostras; (e) delimitação da área de estudo das amostras por duas fitas adesivas, deixando uma janela de 3,0 X 1,0 mm e realização da lesão inicial; (f) análise da lesão inicial no perfilômetro óptico - segunda análise – randomização das amostras em 12 grupos; (g) irradiação das amostras dos grupos L1, L1+E, L1+R, L1+S, L2, L2+E, L2+R, L2+S; (h) imersão das amostras nos respectivos tratamentos de superfície de cada grupo com leitura imediata no perfilômetro óptico – terceira análise; (i) ciclagem erosiva de 10 dias; (j) leitura no perfilômetro óptico no quinto e no décimo dia de ciclagem – quarta e quinta análise – e (k) análise em microscopia eletrônica de varredura

Fonte: A autora; imagem e, h e i: FCiencias modificada; imagem h: Dental Cremer e Elearningerosion.

5 RESULTADOS

5.1 Análise perfilométrica

Os dados quantitativos de perda de superfície obtidos pela perfilometria óptica foram comparados entre os “Tratamentos de superfície” e os diferentes “Tempos” (imediatamente após o tratamento de superfície, 5 dias de ciclagem e 10 dias de ciclagem erosiva), demonstrados na tabela 5.1.

Quanto aos “Tratamentos de superfície” não houve diferença estatística entre eles, imediatamente após os tratamentos de superfície ($p > 0,05$).

Aos 5 dias de ciclagem, houve diferença estatística entre os grupos, ($p < 0,001$), sendo válida a expressão $W \geq R \geq S \geq L1 = L2 = L1+E = L1+R \geq L1+S = L2+S = L2+R = E = L2+E$. Dessa forma, os grupos E, L1+S e L2 associado ao NaF, na forma de *slurry* e na forma de bochecho, quanto à solução de AmF/NaF/SnCl₂ demonstraram a menor perda de superfície após a ciclagem erosiva.

Após 10 dias de ciclagem foi observado diferença estatística entre os grupos, ($p < 0,001$), no qual $W > R \geq L1 \geq L2 = S > L1+R \geq L2+R \geq L2+S = L1+S \geq L1+E \geq E \geq L2+E$. Sendo assim, os grupos submetidos ao tratamento com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ apresentaram a menor perda de superfície, sendo que a solução associada ao laser de dióxido de carbono (0.58 W), demonstrou a menor perda.

Analisando os “Tempos”, somente o grupo L2+E não apresentou diferença estatística nos três tempos de análise em perfilometria óptica. Os grupos E, L1+S, L2+R e L2+S não obtiveram diferença significativa entre 5 dias e pós tratamento; o grupo E e L1+E não diferiram quanto 5 dias e 10 dias de ciclagem erosiva.

Tabela 5.1 – Média e desvio padrão, em μm , da perda de superfície para os diferentes tratamentos de superfície

Tratamento de superfície	Após tratamento de superfície (μm)	5 dias (μm)	10 dias (μm)
W	3.8735 (± 0.64) Aa	8.8465 (± 1.25) Db	16.5657 (± 2.72) Gc
E	3.0674 (± 0.59) Aa	4.2676 (± 0.61) Aab	4.8433 (± 0.78) ABb
R	3.8902 (± 1.12) Aa	7.9522 (± 2.10) CDb	13.4453 (± 2.33) Fc
S	3.5172 (± 0.56) Aa	7.2309 (± 1.76) BCb	11.0032 (± 1.63) Ec
L1	4.2062 (± 0.44) Aa	5.7746 (± 1.64) ABb	11.7814 (± 2.55) EFc
L1+E	3.8905 (± 0.68) Aa	5.0449 (± 0.71) ABb	5.2526 (± 0.76) ABCb
L1+R	3.6085 (± 0.33) Aa	5.0106 (± 0.78) ABb	7.9264 (± 2.10) Dc
L1+S	3.6371 (± 0.70) Aa	4.7227 (± 0.59) Aa	6.1908 (± 1.35) BCDB
L2	3.7293 (± 0.44) Aa	5.5961 (± 0.91) ABb	11.0813 (± 3.23) Ec
L2+E	3.6721 (± 0.68) Aa	3.9000 (± 0.82) Aa	4.2148 (± 1.06) Aa
L2+R	3.6113 (± 0.53) Aa	4.3941 (± 0.68) Aa	6.9348 (± 1.56) CDb
L2+S	3.8235 (± 0.65) Aa	4.6592 (± 0.40) Aa	6.3749 (± 1.23) BCDB

* Letras maiúsculas representam a diferença entre os grupos no mesmo tempo (entre tratamentos) e as letras minúsculas representam a diferença dentro de cada grupos (entre tempos).

** Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Fonte: A autora.

5.2 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A análise qualitativa em MEV mostrou as características morfológicas da superfície de esmalte. Após o tratamento de superfície (figuras 5.1 e 5.2), os grupos W, E, R e S não demonstraram nenhuma alteração na superfície, podendo ser observados os prismas de esmalte, correspondendo ao padrão de lesão de erosão inicial, que se assemelha ao padrão de favos de mel. Os grupos tratados com o laser de dióxido de carbono ($9.3 \mu\text{m}$) associados ou não ao NaF e ao AmF/NaF/SnCl₂ evidenciaram uma mudança na morfologia da superfície descrita como “crazing”, as rachaduras maiores são potencialmente devidas à pressurização das amostras dentro da MEV. É possível observar zonas craqueladas associadas, provavelmente, com o caminho percorrido pelo laser durante a irradiação e um leve “melting” na superfície (figura 5.2).

Após a ciclagem erosiva, foi observado um padrão irregular e rugoso correspondente ao esperado pelos sucessivos desafios ácidos nos grupos W, R, S, L1 e L2 (figura 5.3). No grupo E demonstrou-se uma superfície com menos irregularidades e mais organizada em comparação a apresentada pelos grupos W, R, S, L1 e L2. A associação do laser com o fluoreto de sódio e com o fluoreto combinado com o estanho apresentou uma superfície de esmalte mais organizada, em que é possível observar as áreas irradiadas adjacentes à áreas erodidas, essas zonas apresentam áreas craqueladas e o trajeto percorrido pelo laser durante a irradiação manual (Figuras 5.3 e 5.4).

Figura 5.1 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após tratamento de superfície (W – Água destilada; E – Solução de AmF/NaF/SnCl₂; R – Solução de NaF; S - *Slurry* de NaF; L1 – Laser 1; L1+E- Laser 1 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂)

Fonte: A autora.

Figura 5.2 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após tratamento de superfície (L1+R – Laser 1 + Solução de NaF; L1+S – Laser 1 + *Slurry* de NaF; L2 – Laser 2; L2+E - Laser 2 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂; L2+R– Laser 2 + Solução de NaF; L2+S - Laser 2 + *Slurry* de NaF)

Fonte: A autora.

Figura 5.3 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após ciclagem erosiva (W – Água destilada; E – Solução de AmF/NaF/SnCl₂; R – Solução de NaF; S - *Slurry* de NaF; L1 – Laser 1; L1+E- Laser 1 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂)

Fonte: A autora.

Figura 5.4 - Eletromicrografias obtidas em MEV das amostras após ciclagem erosiva. (L1+R – Laser 1 + Solução de NaF; L1+S – Laser 1 + *Slurry* de NaF; L2 – Laser 2; L2+E - Laser 2 + Solução de AmF/NaF/SnCl₂; L2+R– Laser 2 + Solução de NaF; L2+S - Laser 2 + *Slurry* de NaF)

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

O desgaste dental erosivo é a perda por processos químicos da superfície mineralizada e, nas últimas décadas, métodos de controle e prevenção estão sendo estudados para se determinar quais destes seriam capazes de inibir os desafios erosivos (Schlueter et al., 2020). Dentre as terapias, existem aquelas realizadas em consultório, como o laser de alta potência, ou realizadas em ambiente caseiro, como os enxaguatórios e os dentifrícios fluoretados (Ganss et al., 2012). Sendo assim, este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o laser de CO₂ (9.3 µm), associado a diferentes composições e concentrações de fluoretos, no controle da erosão em esmalte dental humano. As condições utilizadas visaram simular um paciente com lesão de erosão dental e com alto risco desta doença, refletindo a situação clínica frequentemente encontrada (Schlueter et al., 2009a, 2009d).

A fim de simular os métodos caseiros e de controle mais comumente utilizados pelos pacientes, o fluoreto de sódio foi incluído neste estudo como controle positivo, sob a forma de dentifrício e enxaguatório. O dentifrício escolhido foi o de alta concentração de flúor (5000 ppm), pois existem relatos inconclusivos na literatura nos quais o NaF em alta concentração teve efeito positivo (Ren et al., 2011; Velo et al., 2018) ou negativo (Hove et al., 2015; Alencar et al., 2020) na prevenção de erosão dental.

Neste estudo, o fluoreto de sódio isolado não foi capaz de controlar a erosão dental em 5 dias de ciclagem erosiva (Schlueter et al., 2010), e em 10 dias teve efeito limitado, reduzindo-o apenas em 33% e 18%, sob forma de *slurry* e enxaguatório, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Ainda que o *slurry* tenha obtido melhores resultados, ele não foi capaz de reduzir a perda como a solução de AmF/NaF/SnCl₂, o que demonstra que mesmo sob alta concentração de fluoreto, o NaF não é eficaz no controle da erosão.

Os compostos de CaF₂-like, provenientes da aplicação de NaF, formam uma camada que não é suficientemente densa e estável contra a dissolução erosiva (Lussi; Carvalho, 2015), tendo seu potencial de proteção limitado, independente da concentração de flúor (Lussi, 2006; Lussi; Jaeggi, 2008; Hove et al., 2015), diferentemente do que ocorre em lesões de cárie dental (Schlueter et al. 2009). Na cárie dental, os precipitados de CaF₂-like devem estar em abundância para serem

fonte de íons livres F^- quando ocorrer a queda de pH e, posteriormente, serem incorporados como hidroxifluorapatita ou fluorapatita. No processo de erosão, os compostos de fluoreto de cálcio são dissolvidos e eliminados da superfície dentária durante os processos cíclicos de ataques ácidos, reduzindo, assim, o seu efeito (Ganss et al., 2007; Hove et al., 2015).

Por se tratar de um dentifrício de formulação complexa e diversos ingredientes que podem reagir entre si, fazendo com que a reação e os produtos da reação sejam inconclusivos, é possível hipotetizar que a formação de CaF_2 -like não ocorreu da forma esperada e que a adição do processo mecânico de escovação com a suspensão de NaF (Huysmans et al., 2014) ou o *slurry* realizado com saliva (Rios et al., 2008) apresentariam resultados efetivos no controle da erosão dental.

A solução de $AmF/NaF/SnCl_2$ foi escolhida também como controle positivo, por ser considerada, atualmente, o “padrão-ouro” para a prevenção e controle da erosão (Ganss et al., 2010b; Rakhmatullina et al., 2013). No presente estudo, os grupos tratados com esta solução apresentaram a menor perda de superfície em 5 (Rocha et al., 2016; da Silva et al., 2017b) e em 10 dias de ciclagem (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009a, 2009b, 2009c, 2010), sendo capaz, isoladamente, de inibir a desmineralização em 70% em relação ao controle negativo, o que corrobora com outros estudos da literatura que utilizaram o mesmo composto (Schlueter et al., 2009a; Ganss et al., 2010b; Wiegand et al., 2010a; Huysmans et al., 2014). Uma das justificativas para os resultados encontrados se baseia no modo de ação do estanho. O estanho associado aos fluoretos, quando entra em contato com a hidroxiapatita do esmalte, produz CaF_2 , Sn_2OHPO_4 , $Sn_3F_3PO_4$, $Ca(SnF_3)_2$ (Babcock et al., 1978). Esses sais se depositam na superfície dental formando uma camada protetora menos susceptível à desmineralização ácida (Schlueter et al., 2009d; Yu et al., 2010; Khambe et al., 2014; Lussi; Carvalho, 2015). Ademais, Schlueter et al. (2009d) demonstraram a presença de estanho em 20 μm de profundidade, tanto na superfície quanto na subsuperfície do esmalte erodido, potencializando o seu efeito contra a desmineralização.

É importante considerar que os produtos comerciais com composições e forma de aplicação diferentes, solução de NaF e de $AmF/NaF/SnCl_2$ por 2 minutos e *slurry* do dentifrício de NaF por 1 minuto dificulta a comparação entre eles. Por se tratar de um estudo *in vitro*, foi utilizado 2 minutos para compensar a falta de agitação da solução que ocorre no ato de bochechar; 1 minuto para o *slurry* de NaF, para simular

a escovação diária realizada com o dentífrício de 5000 ppm, como indicado na bula. Por mais que tenham essas divergências, os produtos foram escolhidos por serem comercialmente viáveis, terem bons resultados na literatura na prevenção e controle da desmineralização do esmalte (Schlueter et al., 2007, 2009a, 2009d; Ganss et al., 2008; Yu et al., 2010; Rakhmatullina et al., 2013; da Silva et al., 2017a, 2017b).

Para simular o procedimento clínico de aplicação profissional, foi utilizado o laser de CO₂ (9.3 µm) aplicado uma vez, previamente à ciclagem erosiva. Os protocolos de irradiação (0.69 W e 0. 58 W) utilizados neste estudo possuem baixas densidades de energia e pulso de duração curto, causando menor propagação de calor nos tecidos mais profundos do dente e diminuindo o potencial de dano na superfície do esmalte, como, por exemplo, as microfraturas (Esteves-Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2020).

O laser sozinho demonstrou capacidade limitada em reduzir a perda mineral quando comparado ao controle negativo, em ambos os protocolos, tendo se assemelhado aos resultados obtidos pelo *slurry* de NaF em 10 dias. Uma hipótese para justificar este resultado é a irradiação das amostras ter sido realizada uma única vez antes de uma ciclagem erosiva severa e de forma não homogênea na superfície, não sendo ideal para modificar quimicamente a superfície a ponto de controlar a progressão da lesão. Desta forma, o efeito do laser poderia ter sido mais positivo para um modelo de desmineralização mais brando (Chan et al., 2013; Esteves-Oliveira et al., 2015), sendo assim, a primeira hipótese nula não foi rejeitada.

Acredita-se que o laser de dióxido de carbono (9.3 µm) age modificando quimicamente a estrutura da superfície de esmalte, pois tem maior absorção pelos grupos carbonato e fosfato da hidroxiapatita (Featherstone; Nelson, 1987), reduzindo a fase carbonatada da superfície e tornando-a menos susceptível à desmineralização ácida (Nelson et al., 1987; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2000; Rechmann et al., 2011; Nakagaki et al., 2015; Kim et al., 2017). Estas modificações morfológicas podem ser observadas nas microscopias eletrônicas de varredura deste trabalho, quando os tratamentos de superfície foram combinados foi possível observar a conservação de áreas irradiadas após a ciclagem erosiva de 10 dias.

A irradiação do laser e a combinação com os diferentes tratamentos de superfície adicionais - imersão nas solução e dentífrícios de NaF ou solução de AmF/NaF/SnCL₂ - possibilitou uma melhor fixação dos íons de flúor na superfície dental quimicamente modificada pelo laser, formando fluorapatita, mais ácido-resistente que hidroxiapatita (Meurman et al., 1997; Hsu et al., 2000; Chin-Ying et al., 2004; Esteves-Oliveira et al.,

2015) e, possivelmente, aumentou a quantidade de flúor fracamente ligado na superfície erodida, podendo atuar como um reservatório de flúor durante os desafios erosivos. Essa reação pode explicar o sinergismo encontrado na irradiação do laser quando combinado com os produtos de NaF, independente da energia aplicada. Dessa forma, a terceira e quarta hipóteses nulas são rejeitadas, pois a associação dos tratamentos demonstraram menor perda de superfície do que quando comparados com a irradiação ou uso do bochecho/*slurry* de NaF sozinhos.

A irradiação com o laser de CO₂ (9.3 μm) quando associados com o NaF ou com o AmF/NaF/SnCl₂ demonstraram menor perda mineral do que o laser de maneira individual (Ramalho et al., 2019; Silva et al., 2020). Com esta última solução, o grupo L1+E reduziu 43% após 5 dias e 68% após 10 dias de ciclagem erosiva, sem aumento na perda mineral entre os 5 e 10 dias. Entretanto, a menor perda superficial ocorreu no grupo L2+E, com 54% e 74%, 5 e 10 dias respectivamente, em comparação com o grupo controle negativo, com perda mineral mínima e se mantendo estável em todos os tempos experimentais. Entretanto, por não haver diferença estatística entre os grupos L1+E e L2+E do grupo E, a segunda hipótese nula não foi rejeitada por não demonstrar sinergismo entre os tratamentos.

Esse achado leva à suposição que, além da melhor incorporação dos íons de flúor, há, também, a melhor deposição dos sais e estabilização dos íons de estanho no esmalte quando irradiado (Chin-Ying et al., 2004; Tepper; Schlueter et al., 2009a; Khambe et al., 2014), tornando-o menos susceptível à dissolução frente aos desafios ácidos (Nakagaki et al., 2015) pela formação de uma camada amorfa mais estável na superfície e, possivelmente, na subsuperfície (Schlueter et al., 2009d). Esse resultado corrobora com Esteves-Oliveira et al. (2015), no qual não houve diferença quando o laser foi aplicado 1 ou 2 vezes em associação com a solução fluoretada estanhosa.

Apesar da associação do laser com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ apresentar a menor perda de superfície neste estudo, a concentração de flúor nos tratamentos de superfície de escolha pode ter influenciado a redução da perda tecidual, de modo que quando a associação foi feita com o *slurry* de NaF (5000 ppm de F⁻) apresentou menor perda quando comparado com a associação com a solução de NaF (225 ppm de F⁻), para ambos os protocolos, tornando-se opções de tratamento em lugares onde a solução de AmF/NaF/SnCl₂ não é permitida e/ou encontrada.

Por se tratar de um estudo *in vitro*, os resultados devem ser interpretados com cautela já que a ação da saliva, película adquirida e processos abrasivos (Schlueter

et al., 2020) podem influenciar o processo de precipitação e deposição dos sais na superfície dental, devendo ser considerados, futuramente, em estudos *in situ* e *in vivo* (Ganss et al., 2008). Entretanto, este trabalho *in vitro* é um passo importante no estudo de controle de erosão dental, pois demonstrou resultados promissores na associação do laser de CO₂ (9.3 μm) com os diferentes produtos fluoretados.

7 CONCLUSÃO

Os protocolos de laser de CO₂ (9.3 μm) associados ao *slurry* e bochecho de NaF e à solução de AmF/NaF/SnCl₂ foram capazes de controlar a progressão da erosão dental no esmalte humano. A combinação do protocolo de menor potência com a solução de estanho associado a fluoretos apresentou os melhores resultados em relação à perda de tecido mineral.

REFERÊNCIAS¹

Alencar C. M., Leite K. L. F., Ortiz M. I. G., Magno M. B., Rocha G. M., Silva C. M., Maia L. C. Morphological and chemical effects of in-office and at-home desensitizing agents containing sodium fluoride on eroded root dentin. *Arch Oral Biol.* 2020 Feb;110:104619. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104619. Epub 2019 Nov 17.

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: Possible approaches to prevention and control. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):243-52. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.014>

Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent.* 2001 Jul;29(5):371–6. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(01\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(01)00026-4)

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. <https://doi.org/10.1177/00220345990780120901>

Azzopardi, A., Bartlett, D., Watson, T. et al. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. *Br Dent J* 196, 351–354 (2004) doi:10.1038/sj.bdj.4811083

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1978 Sep-Oct;57(9-10):933–8. <https://doi.org/10.1177/00220345780570092301>

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.* 2011a Jan;39(1):26-9. doi: 10.1016/j.jdent.2010.09.007.

Bartlett DW, Fares J, Shirodaria S, Chiu K, Ahmad N, Sherriff M. The association of tooth wear, diet and dietary habits in adults aged 18-30 years old. *J Dent.* 2011b Dec;39(12):811-6. doi: 10.1016/j.jdent.2011.08.014.

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.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002 Jan;18(1):26–35. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00017-3)

Brusius CD, Alves LS, Susin C, Maltz M. Dental erosion among South Brazilian adolescents: A 2.5-year longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2018 Feb;46(1):17-23. E: Tschammler C, Müller-Pflanz C, Attin T, Müller J, Wiegand A. Prevalence and risk factors of erosive tooth wear in 3-6 year old German kindergarten children-A comparison between 2004/05 and 2014/15. *J Dent*. 2016 Sep;52:45-9.

Buzalaf MA, Magalhães AC, Rios D. Prevention of erosive tooth wear: Targeting nutritional and patient-related risks factors. *Br Dent J*. 2018 Mar 9;224(5):371-378. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.173. doi:10.1038/sj.bdj.2018.173

Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Sep-Oct;20(5):493–502. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572012000500001>

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.

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.

Cohen M. E. Analysis of Ordinal Dental Data: Evaluation of Conflicting Recommendations. *J Dent Res*. 2001 Jan;80(1):309-13. doi: 10.1177/00220345010800010301.

Chan KH, Chan AC, Darling CL, Fried D. Methods for monitoring erosion using optical coherence tomography. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2013 Mar 25;8566:856606. doi: 10.1117/12.2011013

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 Feb;4(1):015020. doi: 10.1088/1748-6041/4/1/015020.

Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO₂ laser on fluoride uptake in enamel. *J Dent*. 2004 Feb;32(2):161–7. doi: 10.1016/j.jdent.2003.10.004

da Silva CV, Nazello JL, de Freitas PM. Frequency of application of AmF/NaF/SnCl₂ solution and its potential in inhibiting the progression of erosion in human dental enamel - An in vitro study. *Oral Heal Prev Dent*. 2017b;15(4):365–70. doi: 10.3290/j.ohpd.a38739.

da Silva CV., Ramos-Oliveira TM, Mantilla TF, de Freitas PM. Frequency of Application of AmF/NaF/SnCl₂ Solution and Its Potential in Controlling Human Enamel Erosion Progression: An in situ Study. *Caries Res*. 2017a;51(2):141–8. doi: 10.1159/000455051.

Dreizen S, Brown LR, Daly TE, Drane JB. Prevention of xerostomia-related dental caries in irradiated cancer patients. *J Dent Res*. 1977 Feb;56(2):99–104. doi: 10.1177/00220345770560022101

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.

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. doi: 10.1159/000047458

El Wazani B, Dodd MN, Milosevic A. The signs and symptoms of tooth wear in a referred group of patients. *Br Dent J*. 2012 Sep;213(6):3–6. doi: 10.1038/sj.bdj.2012.840.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent*. 2011 Jun;39(6):414–21. doi: 10.1016/j.jdent.2011.03.006.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, Eduardo CP, Apel C. CO₂ laser (10.6 µm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res*. 2009;43(4):261–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.11.019.

Esteves-Oliveira M, Witulski N, Hilgers RD, Apel C, Meyer-Lueckel H, De Paula Eduardo C. Combined tin-containing fluoride solution and CO₂ laser treatment reduces enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 2015;49(6):565-74. doi: 10.1159/000439316.

Esteves-Oliveira M, Wollgarten S, Liebegall S, Jansen P, Bilandzic M, Meyer-Lueckel H, Fischer H3, Stollenwerk J, Poprawe R.. A new laser-processing strategy for improving enamel erosion resistance. *J Dent Res*. 2017 Sep;96(10):1168-1175. doi: 10.1177/0022034517718532.

Featherstone J. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am*. 2000;Oct; 44(4):955–69.

Featherstone JD. Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:955-6. Review. doi: 10.1177/002203459207100S34.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:66-76. doi: 10.1159/000093351

Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. *Adv Dent Res*. 1987 Oct;1(1):21–6. doi: 10.1177/08959374870010010701.

Featherstone JDB, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO2 laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998 Jun;77(6):1397–403. doi: 10.1177/00220345980770060401.

Fowler B, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int*. 1986 Apr;38(4):197–208.

Fox JL, Yu D, Otsaka M, Higuchi WI, Wong J, Powell G. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO2 laser irradiation. *J Dent Res*. 1992 Jul;71(7):1389-98. doi: 10.1177/00220345920710070701.

Fried D, Glena R E, Featherstone J D B, Seka W. Permanent and Transient Changes in the Reflectance of CO2 Laser-Irradiated Dental Hard Tissues at $\lambda = 9.3, 9.6, 10.3,$ and $10.6 \mu\text{m}$ and at Fluences of 1–20 J/cm². *Lasers in Surgery and Medicine*. 1997 20:22–31

Fried D, Zuerlein MJ, Le CQ, Featherstone JDB. Thermal and chemical modification of dentin by 9-11- μm CO2 laser pulses of 5-100- μs duration. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):275–82. doi: 10.1002/lsm.10100.

Fried D, Ragadio J, Akrivou M, Featherstone JDB, Murray MW, Dickenson KM. Dental hard tissue modification and removal using sealed transverse excited atmospheric-pressure lasers operating at $\lambda=9.6$ and $10.6\ \mu\text{m}$. *J Biomed Opt.* 2001 Apr;6(2):231–8. doi: 10.1117/1.1344192.

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.

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. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.07.004.

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 Nov-Dec;38(6):561–6. doi: 10.1159/000080587.

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 Sep-Oct;35(5):325–30. doi: 10.1159/000047470.

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(1):2-7. doi: 10.1159/000111743.

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. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00742.x.

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. doi: 10.1177/0022034510375291.

Gerrad W, Winter P. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res.* 1986;20(3):209–16. doi: 10.1159/000260937.

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.

Grippio JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: A new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004 Aug;135(8):1109-18; quiz 1163-5. doi: 10.14219/jada.archive.2004.0369.

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.

Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Kinoshita J, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Apr;20(2):77-82. doi: 10.1089/104454702753768052.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res*. 2008;42(1):68-72. doi: 10.1159/000112816.

Hove LH, Stenhagen KR, Mulic A, Holme B, Tveit AB. May caries-preventive fluoride regimes have an effect on dental erosive wear? An in situ study. *Acta Odontol Scand*. 2015 Feb;73(2):114-20. doi: 10.3109/00016357.2014.956146.

Howden GF. Erosion as the presenting symptom in hiatus hernia. A case report. *Br Dent J*. 1971 Nov 16;131(10):455-6. doi: 10.1038/sj.bdj.4802772.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. *J Dent Res*. 2001 Sep;80(9):1797-801. doi: 10.1177/00220345010800090501.

Hsu CYS, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res*. 2000 Sep;79(9):1725-30. doi: 10.1177/00220345000790091401.

Hsu J, Fox JL, Wang Z, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI. Combined effects of laser irradiation/solution fluoride ion on enamel demineralization. *J Clin Laser Med Surg*. 1998 Apr;16(2):93-105. doi: 10.1089/clm.1998.16.93.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:230-43. doi: 10.1159/000360555.

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

Jarvinen VK, Rytomaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991;70(6):942-7. doi: 10.1177/00220345910700060601.

Johansson AK, Lingström P, Birkhed D. Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. *Eur J Oral Sci.* 2002 Jun;110(3):204-11. doi: 10.1034/j.1600-0447.2002.11211.x.

Jordão MC, Forti GM, Navarro RS, Freitas PM, Honório HM, Rios D. CO2 laser and/or fluoride enamel treatment against in situ/ex vivo erosive challenge. *J Appl Oral Sci.* 2016 May-Jun;24(3):223-8. doi: 10.1590/1678-775720150399.

Kantorowitz ZVI, Featherstone JDB, Fried D. Caries prevention by CO2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc.* 1998 May;129(9):585-91. doi: 10.14219/jada.archive.1998.0276.

Khambe D1, Eversole SL, Mills T, Faller RV. Protective effects of SnF2 - Part II. Deposition and retention on pellicle-coated enamel. *Int Dent J.* 2014 Mar;64 Suppl 1:11-5. doi: 10.1111/idj.12097.

Kim JW, Lee R, Chan KH, Jew JM, Fried D. Influence of a pulsed CO 2 laser operating at 9.4 μm on the surface morphology, reflectivity, and acid resistance of dental enamel below the threshold for melting. *J Biomed Opt.* 2017 Feb 1;22(2):28001. doi: 10.1117/1.JBO.22.2.028001.

Kidd EA, Smith BG. Toothwaer histories: a sensitive issue. *Dent Update.* 1993 May;20(4):174-8.

Klein ALL, Rodrigues LKA, Eduardo CP, Dos Santos MN, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci.* 2005 Jun;113(3):239-44. doi: 10.1111/j.1600-0722.2005.00212.x.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon ÁM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res.* 2006;40(2):148-53. doi: 10.1159/000091062.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO2 laser. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):235-40. doi: 10.1007/s10103-012-1123-2.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994 Aug;22(4):195–207. doi: 10.1016/0300-5712(94)90107-4.

Li MHM, Bernabé E. Tooth wear and quality of life among adults in the United Kingdom. *J Dent.* 2016 Dec;55:48-53. doi: 10.1016/j.jdent.2016.09.013. doi: 10.1016/j.jdent.2016.09.013

Lussi A. Erosive tooth wear: A multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8. doi: 10.1159/000093343.

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.

Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and causal preventive measures. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:220-9. doi: 10.1159/000360612. Epub 2014 Jun 26.

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, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res.* 2000 Mar-Apr;34(2):182–7. doi: 10.1159/000016587.

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

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. doi: 10.1159/000074360.

Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P. Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991 Oct;19(5):286–90. doi: 0.1111/j.1600-0528.1991.tb00169.x.

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. doi: 10.1159/000325915.

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. Review.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009 Mar-Apr;17(2):75-86. doi: 10.1590/s1678-77572009000200002.

Magalhães AC, Dos Santos MG, Comar LP, Buzalaf MAR, Ganss C, Schlueter N. Effect of a single application of tif4 varnish versus daily use of a low-concentrated TiF4/NaF solution on tooth erosion prevention in vitro. *Caries Res.* 2016;50(5):462-470. doi: 10.1159/000448146.

Magalhães, Ana Carolina, Annette Wiegand, Daniela Rios, Marília Afonso Rabelo Buzalaf, and Adrian Lussi. 2011a. "Fluoride in Dental Erosion." *Monographs in Oral Science* 22:158–70.

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.

Marinho VC, Woethington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jul 11;(7):CD002279. doi: 10.1002/14651858.CD002279.pub2.

Mathew A, Reddy NV, Sugumaran DK, Peter J, Shameer M, Dauravu LM. Acquired acid resistance of human enamel treated with laser (Er:YAG laser and CO2 laser) and acidulated phosphate fluoride treatment: An in vitro atomic emission spectrometry analysis. *Contemp Clin Dent.* 2013 Apr;4(2):170-5 doi: 10.4103/0976-237X.114864

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

Meurman J, Hemmerle J, Voegel J, Rauhamaa-Makinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO2 laser. *Calcif Tissue Int.* 1997;104(2):397–400. <https://doi.org/10.1159/000262425>.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):199–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00068.x>.

Mirhashemi A, Hakimi S, Ahmad Akhoundi MS, Chiniforush N. Prevention of enamel adjacent to bracket demineralization following carbon dioxide laser radiation and titanium tetra fluoride solution treatment: *J Lasers Med Sci.* 2016 Summer;7(3):192-196. doi: 10.15171/jlms.2016.33.

Mühlemann H, Saxer U. Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilized with amine fluoride [abstract]. *Caries Res.* 1981;15:186. Abstract n° 20.

Nakagaki S, Iijima M, Endo K, Saito T, Mizoguchi I. Effects of CO2 laser irradiation combined with fluoride application on the demineralization, mechanical properties, structure, and composition of enamel. *Dent Mater J.* 2015;34(3):287-93. doi: 10.4012/dmj.2014-225.

Nelson D, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone J. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. *Caries Res.* 1987;21(5):411–26. doi: 10.1159/000261047.

Nelson D, Jongebloed W, Featherstone J. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. *N Z Dent J.* 1986a Jul;82(369):74–7.

Nelson DG, Shariati M, Glena R, Shields CP, Featherstone JDB. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. *Caries Res.* 1986b;20:289–99. doi: 10.1159/000260948.

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. doi: 10.1177/00220345730520022101.

Øgaard B, Seppä L, Rølla G. Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):190–201. doi: 10.1177/08959374940080021001.

Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. *Caries Res.* 1990;24(2):86-92. doi: 10.1159/000261245.

Olley RC, Moazzez R, Bartlett D. The relationship between incisal/occlusal wear, dentine hypersensitivity and time after the last acid exposure in vivo. *J Dent.* 2015 Feb;43(2):248-52. doi: 10.1016/j.jdent.2014.11.002.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2013;123(3):192-8.

Ramalho KM, De Paula Eduardo C, Heussen N, Rocha RG, Lampert F, Apel C, Esteves-Oliveira M. Protective effect of CO2 laser (10.6 μ m) and fluoride on enamel erosion in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):71-8. doi: 10.1007/s10103-012-1071-x. Epub 2012 Feb 28.

Ramalho KM, Eduardo CP, Heussen N, Rocha RG, Meyer-Lueckel H, Lampert F, Apel C, Esteves-Oliveira M. Randomized in situ study on the efficacy of CO2 laser irradiation in increasing enamel erosion resistance. *Clin Oral Investig.* 2019 May;23(5):2103-2112. doi: 10.1007/s00784-018-2648-y.

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 μ m) associated with fluorides in inhibiting human enamel erosion. *Braz Oral Res.* 2014;28(1):1–6. doi: 10.1590/1807-3107bor-2014.vol28.0057

Ren Y. F., Liu X., Fadel N., Malmstrom H., Barnes V., Xu T. Preventive effects of dentifrice containing 5000ppm fluoride against dental erosion in situ. *J Dent.* 2011. Oct;39(10):672-8. doi: 10.1016/j.jdent.2011.07.009. Epub 2011 Aug 2.

Rechmann P, Charland DA, Rechmann BMT, Le CQ, Featherstone JDB. In-vivo occlusal caries prevention by pulsed CO2-laser and fluoride varnish treatment - A clinical pilot study. *Lasers Surg Med.* 2013 Jul;45(5):302-10. doi: 10.1002/lsm.22141.

Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BMT, Featherstone JDB, Nelson G. Caries inhibition in vital teeth using 9.6- μ m CO2-laser irradiation. *J Biomed Opt.* 2011 Jul;16(7):071405. doi: 10.1117/1.3564908.

Rechmann P, Rechmann BMT, Groves WH, Le CQ, Rapozo-Hilo ML, Kinsel R, Featherstone JDI. Caries inhibition with a CO2 9.3 μ m laser: An in vitro study. *Lasers Surg Med.* 2016 Jul;48(5):546-54. doi: 10.1002/lsm.22497.

Rios D., Magalhães A. C., Polo R. O. B., Wiegand A., Attin T., Buzalaf M. A. R. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. *Am Dent Assoc.* 2008 Dec;139(12):1652-6. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0107.

Rocha CT, Turssi CP, Rodrigues-Júnior AL, Corona SAM. Impact of CO2 laser and stannous fluoride on primary tooth erosion. *Lasers Med Sci.* 2016 Apr;31(3):567-71. doi: 10.1007/s10103-016-1903-1. Epub 2016 Feb 17.

Rodrigues LKA, Nobre Dos Santos M, Featherstone JDB. In situ mineral loss inhibition by CO2 laser and fluoride. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):617–21. doi: 10.1177/154405910608500707.

Rölla G, Ekstrand J. Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt AB, editors. *Fluoride in dentistry*. 2nd ed. Copenhagen; Munksgaard; 1996. p. 215–29.

Saksena R, Bartlett DW, Smith BG. The role of saliva in regurgitation erosion. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1999 Dec;7(4):121–4.

Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, Demarco FF. Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: Results of a meta-analysis and meta-regression. *J Dent.* 2015 Aug;43(8):865-75. doi: 10.1016/j.jdent.2015.05.012.

Scatolin RS, Alonso-Filho FL, Galo R, Rios D, Borsatto MC, Corona SAM. CO2 laser emission modes to control enamel erosion. *Microsc Res Tech.* 2015 Aug;78(8):654–9. doi: 10.1002/jemt.22518.

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. Review.

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.* 2009a May;54(5):432–6. doi: 10.1016/j.archoralbio.

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.* 2009b;37(12):944–8. doi:10.1016/j.jdent.2009.07.010

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.* 2009c;43(1):10–6. doi: 10.1159/000189702

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(2):141–5.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:13-23. doi: 10.1159/000326819.

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 microscopy study. *Eur J Oral Sci.* 2009d Aug;117(4):427–34. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00647.x.

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, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, Hara AT, Huysmans MDNJM, Lussi A, Moazzez R, Vieira AR, West NX, Wiegand A, Young A, Lippert F. Terminology of erosive tooth wear : consensus report of a workshop organized by the orca and the cariology research group of the IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):2-6. doi: 10.1159/000503308.

Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163–79. doi: 10.1159/000359943. Review.

Silva C V, Mantilla T F , Engel Y, Tavares J P, Freitas P M, Rechmann P. The effect of CO2 9.3 µm short-pulsed laser irradiation in enamel erosion reduction with and without fluoride applications—a randomized, controlled in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2020 Jul;35(5):1213-1222. doi: 10.1007/s10103-020-02979-3. Epub 2020 Feb 7.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zezell DM, Nobre-Dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO2 laser on the inhibition of enamel demineralization. *Dent Mater J.* 2006 Sep;25(3):455–62. doi: 10.4012/dmj.25.455.

Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res.* 1972 Mar-Apr;51(2):455–60. doi: 10.1177/00220345720510023501.

Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: An in vitro study. *Caries Res.* 2007;41(1):74–6.

Tagliaferro EP da S, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Nobre-Dos-Santos M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO2 laser. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug;27(4):585-90. doi: 10.1089/pho.2008.2311.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395110>

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

Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO 2 laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. *J Dent.* 2004 Nov;32(8):635–41. doi: 10.1016/j.jdent.2004.06.010.

Turssi CP, Vianna LMFF, Hara AT, do Amaral FLB, França FMG, 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.

Velo, M. M. A. C., Magalhães, A. C., Shiota, A., Farha, A. L. H., Grizzo, L. T., Honório, H. M., Wang, L. Profile of high-fluoride toothpastes combined or not with functionalized tri-calcium phosphate on root dentin caries control: An in vitro study. *American Journal of Dentistry.* 2018 31, 290–296.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2005 Sep-Oct;39(5):371–9. doi: 10.1159/000086843.

Wei SHY. Scanning electron microscope study of stannous fluoride-treated enamel surfaces. *J Dent Res.* 1974 Jan-Feb;53(1):57–63. doi: 10.1177/00220345740530013001.

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. doi: 10.1046/j.1365-2842.2001.00778.x.

West NX, Sanz M, Lussi A, Bartlett D, Bouchard P, Bourgeois D. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: A European population-based cross-sectional study. *J Dent.* 2013 Oct;41(10):841-51. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.017.

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions-a review. *Oral Heal Prev Dent.* 2003;1(4):245–53.

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

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.* 2010a;8(2):159-64.

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.* 2010b Mar;55(3):223–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.007.

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

Yokoyama K, Kimura Y, Matsumoto K, Fujishima A, Miyazaki T. Preventive effect of tooth fracture by pulsed Nd:YAG laser irradiation with diamine silver fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg.* 2001 Dec;19(6):315-8.

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.* 2010 Sep;55(9):702–5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.06.006

Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. In vitro enamel demineralization by streptococcus mutans in the presence of salivary pellicles. *J Dent Res.* 1977 Sep;56(9):1107–10. doi: 10.1177/00220345770560091601.

Zero DT. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2(Pt 2)):162–77. doi: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00065.x.

Zero DT, Lussi A. Erosion - chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005;55(4 Suppl. 1):285–90. doi: 10.1111/j.1875-595x.2005.tb00066.x.

Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg Med.* 1999;25(4):335–47. doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1999)25:4<335::aid-lsm8>3.0.co;2-f.
Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: Possible approaches to prevention and control. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):243-52. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.014>

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro do potencial do laser de CO₂ (9,3 μ m), associado ou não ao fluoreto estanhoso ou ao tetrafluoreto de titânio, em controlar a lesão de erosão em esmalte dental humano.

Pesquisador: Yael Engel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 92710618.7.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.865.401

Apresentação do Projeto:

Considerando os resultados positivos da literatura quanto à utilização do laser de CO₂ na prevenção de lesões de cárie e os resultados promissores em relação à redução da erosão de esmalte, este estudo in vitro tem como objetivo avaliar o potencial do laser de CO₂ (9,3 m) - associado ou não ao fluoreto estanhoso ou ao tetrafluoreto de titânio - em prevenir e controlar a lesão de erosão em esmalte dental humano. As unidades experimentais serão compostas por 234 fragmentos de esmalte dental humano selecionados através da microdureza e curvatura superficial e serão, então, divididos randomicamente em 09 grupos (n=10). As unidades experimentais serão compostas por 234 fragmentos de esmalte dental humano. Noventa fragmentos serão selecionados através da microdureza e curvatura superficial e serão, então, divididos randomicamente em 09 grupos (n=10). Cinquenta e quatro fragmentos (n=3) adicionais serão preparados

para análise em microscopia eletrônica de varredura, para avaliação do substrato submetido apenas aos tratamentos de superfície. Após a formação das lesões iniciais, imediatamente após os tratamentos de superfície, após 05 dias de ciclagem e ao final dos 10 dias de ciclagem erosiva, a perda de tecido superficial (m) será obtida por meio de perfilometria óptica sem contato. Após a perfilometria, serão avaliadas qualitativamente por meio de microscopia eletrônica de varredura, 54 amostras (n=3) submetidas

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.865.401

aos 10 dias de ciclagem erosiva e 54 amostras (n=3) submetidas apenas aos tratamentos de superfície. Os resultados da perfilometria óptica serão submetidos a testes de homogeneidade e normalidade para determinação do teste estatístico mais adequado ($\approx 5\%$).

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo *in vitro* visa avaliar o efeito do laser de CO₂ (9,3 m), associado ou não à solução de fluoreto estanhoso ou ao gel de tetrafluoreto de titânio, na prevenção e controle da lesão de erosão em esmalte dental humano. Pretende verificar se o laser de CO₂ (9,3 m) não será capaz de prevenir e controlar as lesões de erosão em esmalte dental humano; se a associação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ e da irradiação com o laser de CO₂ (9,3 m) não demonstra efeito sinérgico e se a associação do gel de tetrafluoreto de titânio e da irradiação com o laser de CO₂ (9,3 m) não demonstra efeito sinérgico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os envolvidos na cirurgia de extração dentária e não existem benefícios diretos ao participante da pesquisa, exceto os relacionados à extração do molar não-doente por motivo preventivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área de dentística, sobre o comportamento da estrutura do dente sob os tratamentos efetuados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto conforme, Informações Básicas do Projeto conformes, Projeto Detalhado conforme, TCLE conforme, autorização da FUNDECTO conforme.

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.

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.865.401

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1132557.pdf	28/08/2018 13:38:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Esp_Atua_Atlas.pdf	28/08/2018 13:36:30	Yael Engel	Aceito
Folha de Rosto	Atlas_folhaderosto.pdf	24/08/2018 11:34:48	Yael Engel	Aceito
Outros	Esp_Gayotto_Assinado.pdf	16/08/2018 16:19:24	Yael Engel	Aceito
Outros	Gayotto_cepassinado.pdf	15/08/2018 19:24:37	Yael Engel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_cep_3.pdf	29/06/2018 20:48:16	Yael Engel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.pdf	29/06/2018 20:29:41	Yael Engel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Hays Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br