

JULIANE DE PAULA TAVARES

Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano

São Paulo

2020

JULIANE DE PAULA TAVARES

Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de 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 (Laser em Odontologia) para obter o título de Mestre em Ciências.

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

São Paulo

2020

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

Tavares, Juliane de Paula.

Efeito in situ do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano / Juliane de Paula Tavares; orientador Patrícia Moreira de Freitas Costa e Silva. -- São Paulo, 2020.

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

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

Versão corrigida.

1. Esmalte dentário. 2. Erosão de dente. 3. Lasers de gás. 4. Solução de AmF/NaF/SnCl₂ I. Silva, Patrícia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Tavares JP. Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de 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: 17 / 08 / 2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Daniela Prócida Raggio

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Daniela Rios Honório

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP - Bauru Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Taís Scaramucci Forlin

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP Julgamento: Aprovada

À todas as mães que Deus me presenteou. Obrigada mãe, vovós, tias e minha madrasta por todo carinho, amor e dedicação. Vocês me estimulam a ser uma mulher forte e determinada. Em cada dificuldade vocês foram a minha fonte de inspiração. Obrigada! Amo vocês!

Ao meu pai, Alessandro, e meu padrinho, Adriano, por todo apoio e incentivo durante minha trajetória!

Aos meus irmãos, André e Pedro, por tantos momentos de amor e alegria compartilhados.

Ao meu namorado Muriel, fiel companheiro, que me estendeu a mão para tudo, que me apoia e incetiva no meu caminho, que trouxe mais alegria e amor à minha vida.

À minha Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas por possibilitar minha inserção em seu ambiente de trabalho e em sua equipe de orientadores desde a graduação. Agradeço pelas diversas oportunidades no meio acadêmico, por toda paciência e calma. Admiro muito sua tranquilidade, objetividade e foco! Obrigada por toda ajuda e dedicação! E por participar deste trabalho de forma integral!

À Taís Mantilla, minha guru da dentística e agora das cores, obrigada por toda a paciência e empenho durante as disciplinas da graduação, na minha iniciação científica e até mesmo na pós-graduação. Sua alegria, organização e dedicação me inspiraram no caminho da pesquisa e fizeram os dias de ciclagens muito mais leves!

Agradeço por toda ajuda!

À Camilinha, eterna sub-chefe, obrigada por todas as horas gastas, todas mensagens no WhatsApp, todos e-mails lidos e relidos, todas correções e re-correções. Obrigada por tanta dedicação! Você é uma das pessoas mais esforçadas que conheci, e você merece cada conquista até aqui. Você me encantou desde a dentística I por tanto conhecimento e esforço. Minha referência pessoal e profissional, obrigada e muito obrigada por tudo!

À Yael, agradeço muito muito por ter te conhecido, de ter sua companhia durante esta trajetória e por sua amizade! Você me mostrou um lado mais vivo, mais intenso, mais colorido da vida. Obrigada pela paciência, dedicação e companherismo. Adorei nossos momentos de dupla e espero ter outras vivências assim com você! Obrigada parceira do Mestrado!

Aos meus voluntários, Diana, Fernanda, Jair, Juliana, Laís, Leonardo, Letícia,
Mariana, Mirian, Profa. Patrícia e Yael, por aceitarem meu convite e se
comprometerem com tanto empenho e força de vontade! Sem vocês este estudo
não seria possível! Muito muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan. Uma das minhas grandes alegrias foi o ingresso na USP.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representada pelo seu diretor Prof. Dr. Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, que me proporcionou conhecimento, amizades, momentos felizes e grande desenvolvimento pessoal e cultural.

Ao Departamento de Dentística, representado pelo chefe do departamento, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, pelo esforço por melhorar constantemente nosso ambiente acadêmico.

A todos os professores do Departamento de Dentística, pela dedicação e paciência nas aulas e laboratórios da graduação; nas burocracias, dificuldades e aulas da pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, David, Selminha, seu Aldo, Leandro e Silvana. Obrigada pela colaboração, dedicação e companhia. E pelo trabalho constante, favorecendo um ambiente agradável e dinâmico.

Ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) e as suas funcionárias, Lili, Ana e Leni, que me proporcionaram diversas oportunidades de conhecimento e pesquisa.

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

À 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 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Peter Rechmann e Beate Rechmann pela colaboração no projeto. Obrigada pelas discussões e dedicação. O amor de vocês pela pesquisa me encantou!

Aos meus familiares que me incentivaram desde sempre ao estudo e ao trabalho. E que me apoiaram desde sempre nas minhas escolhas.

Aos orientados e ex-orientados da Profa. Dra. Patricia, Tais, Camila, Yael, Eric, Fernanda, Jair e Karol, pela companhia e auxílio de sempre!

Às minhas amigas da graduação Aline, Brunna, Carol, Letícia e Vitória, obrigada pelo companherismo durante 6 anos e pelos muitos momentos felizes compartilhados.

À minha amiga Julia que me encanta com a sua dedicação e foco, agradeço pela amizade e companherismo de longa data.

Aos meus companheiros e amigos da pós-graduação, Camila, Mirian, Vinicius e Yael pelos momentos de alegria durante esta trajetória. Com vocês esse caminho foi mais leve e divertido! Obrigada por toda ajuda!

"Então, nós todos somos importantes - talvez menos do que muito, mas sempre
mais do que nada"

John Green

RESUMO

Tavares JP. Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Diversas medidas vêm sendo propostas para a prevenção e controle do desgaste erosivo, como o uso de produtos fluoretados e lasers de alta potência. Este estudo *in situ*, cego e cruzado, visou avaliar o efeito do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não a solução de AmF/NaF/SnCl₂, na prevenção (Etapa 1: prevenção da lesão, amostras inicialmente híginas) e controle (Etapa 2: controle da progressão da lesão, amostras previamente erodidas) da erosão dental em esmalte dental humano. As etapas foram divididas em duas fases, uma sem a exposição à solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Fase I) e outra com (Fase II). Para tanto, 192 fragmentos de esmalte dental humano (3 x 3 x 1 mm) foram divididos, randomicamente, em 4 grupos experimentais em cada etapa (n=12): C – sem tratamento (controle negativo); F – solução de AmF/NaF/SnCl₂ (controle positivo); L - irradiação com laser de CO₂ (9.3 μm); L + F - laser de CO₂ (9.3 μm) + solução de AmF/NaF/SnCl₂. Doze voluntários utilizaram um dispositivo removível inferior bilateral contendo 8 amostras/fase. As amostras foram submetidas ao desafio erosivo *ex vivo* por meio de sua imersão em ácido cítrico (1,0%; pH 2,3; 5 minutos; 4x/dia em intervalos diferentes para cada fase, durante 5 dias). A perda de superfície foi determinada através da perfilometria óptica (n=12), e a morfologia de superfície foi observada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para MEV, foram selecionadas 24 amostras (n=3) submetidas aos 5 dias de ciclagem e, adicionalmente, 24 amostras extras (n=3), submetidas aos tratamentos de superfície. Os dados das amostras da Etapa 1 foram analisados estatisticamente através de ANOVA 1-fator, e as da Etapa 2, através de ANOVA 2-fatores para medidas repetidas (Tempo – lesão inicial e após 5 dias; e Tratamento – C, F, L, L + F); ambos com posterior comparação múltipla através do teste de Tukey. Na análise da Etapa 1, observou-se que os grupos L (4,59 ± 2,95 μm) e L + F (1,58 ± 1,24 μm) apresentaram melhores resultados na prevenção de lesão de erosão, diferindo estatisticamente dos grupos

C e F, os quais não diferiram entre si. E na etapa 2, o grupo L + F ($4,99 \pm 1,17 \mu\text{m}$) apresentou melhores resultados no controle da progressão da lesão, sendo o único grupo a não apresentar perda de superfície significativa entre lesão inicial e após 5 dias de ciclagem quando comparado com a lesão inicial. Portanto, o laser de CO_2 apresentou potencial em prevenir e controlar a progressão de erosão em esmalte dental humano, apresentando maior eficácia quando associado à solução de AmF/NaF/SnCl_2 .

Palavras-chave: Esmalte dental humano. Erosão dental. Laser de CO_2 . Solução de AmF/NaF/SnCl_2 .

ABSTRACT

Tavares JP. In situ effect of CO₂ laser (9.3 μm), combined or not with AmF/NaF/SnCl₂ solution in prevent and control erosion lesion in human dental enamel [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Several measures have been proposed for prevention and control of erosive tooth wear, such as the use of fluoride products and high-powered lasers. This in situ, single-blind and cross-over study aimed to evaluate the effect of CO₂ laser (9.3 μm), combined or not with AmF/NaF/SnCl₂ solution, in prevention (Stage 1: prevention of lesion, samples initially healthy) and control (Stage 2: control of lesion, samples initially eroded) of dental erosion in human dental enamel. The stages were divided in two phases, one without exposure to AmF/NaF/SnCl₂ solution (Phase I) and the other with (Phase II). For this, 192 fragments of human dental enamel (3 x 3 x 1 mm) were randomly divided into 4 experimental groups at each stage (n = 12): C - without treatment (negative control); F - AmF/NaF/SnCl₂ solution (positive control); L - CO₂ laser irradiation (9.3 μm); L + F - CO₂ laser (9.3 μm) + AmF/NaF/SnCl₂ solution. Twelve volunteers used a bilateral lower removable device containing 8 samples/phase. The samples were submitted to the erosive challenge ex vivo by immersion in citric acid (1.0%; pH 2.3; 5 minutes; 4x/day at different intervals for each phase; for 5 days). The surface loss was determined using optical profilometry (n = 12), and the surface morphology was observed in Scanning Electron Microscopy (SEM). For SEM, 24 samples submitted to the 5 days of cycling were selected (n = 3) and, in addition, 24 extra samples (n = 3), submitted to surface treatments. The data from the samples in Stage 1 were analyzed statistically using one-way ANOVA, and those in Stage 2, using two-way ANOVA for repeated measures (Time - initial erosive-like lesion and after 5 days; and Treatment - C, F, L, L + F); both with subsequent multiple comparison using the Tukey test. In Stage 1 analysis, it was observed that groups L (4.59 ± 2.95 μm) and L + F (1.58 ± 1.24 μm) showed better results in preventing erosion injury, differing statistically from groups C and F, which did not differ between them. And in stage 2, L + F group (4.99 ± 1.17 μm) showed better results in controlling the progression of the lesion, being the only group not to

present significant surface loss between initial erosive lesion and after 5 days of cycling. Therefore, CO₂ laser showed potential to prevent and control the progression of erosion in human dental enamel, showing greater efficiency when combined with AmF/NaF/SnCl₂ solution.

Keywords: Human dental enamel. Dental erosion. CO₂ laser. AmF/NaF/SnCl₂ solution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 - Etapas e fases do período experimental *in situ*.....51
- Figura 4.2 - Exemplo de distribuição das amostras utilizada nas Fases I e II para um mesmo participante da pesquisa (C1 e C2 - amostras do grupo C; L1 e L2 - amostras do grupo L; F1 e F2 - amostras do grupo F; L + F1 e L + F2 - amostras do grupo L + F; - 1 = amostras da etapa 1; - 2 = amostras da etapa 2)52
- Figura 4.3 - Sequência de preparo das amostras realizada após obtenção dos dentes recém-extraídos. A) Obtenção dos dentes. B) Limpeza dos dentes com curetas periodontais e profilaxia com pedra pomes. C) Secção das coroas e raízes. D) Secção de amostras nas faces livres das coroas. E) Obtenção das amostras de 3,0 x 3,0 x 1,5 mm. F) Polimento das amostras na politriz. G) Lavagem das amostras em cuba ultrassônica54
- Figura 4.4 - Sequência de procedimentos realizados para seleção das amostras. A) Fragmento de esmalte dental 3,0 x 3,0 x 1,0 mm. B) Observação em lupa estereoscópica. C) Análise em perfilômetro óptico. D) Mensuração da dureza superficial em microdurômetro com penetrador Knoop55
- Figura 4.5 - A) Irradiador multipropósito de Cobalto-60. B) Fontes seladas de Cobalto-60. C) Amostras armazenadas em placas de cultura (duas placas de 96 poços) envoltas com papel grau cirúrgico para esterilização56
- Figura 4.6 - Amostra com dimensão de 3,0 x 3,0 x 1,0 mm protegida com duas fitas adesivas, delimitando a janela central de 3,0 x 0,75 mm57
- Figura 4.7 - A) Dispositivo intraoral bilateral em posição no modelo de gesso. B) Amostra posicionada com recuo em relação ao limite externo do nicho 59
- Figura 4.8 - Sequência de passos para formação da lesão inicial de erosão para amostras da Etapa 2. A) Amostra protegida com fitas adesivas, delimitando janela central de 3,0 x 0,75 mm. B) Amostra submersa em ácido cítrico. C) Amostra após a formação de lesão inicial de erosão. D) Análise perfilométrica da amostra60

Figura 4.9 - A) Dispositivo metálico utilizado para realização das irradiações das amostras dos grupos L e L+F. B) Aparelho medidor de potência usado a cada 10 irradiações durante o preparo de amostras dos grupos L e L+F	62
Figura 4.10 - Ciclagem erosiva realizada pelos participantes durante a Fase I do estudo <i>in situ</i> (Grupos C e L), em ambas as etapas.....	64
Figura 4.11 - Ciclagem erosiva realizada pelos participantes durante a Fase II do estudo <i>in situ</i> (Grupos F e L+F), em ambas as etapas.....	65
Figura 4.12 - Microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 650 do LCT – Poli USP	67
Figura 5.1 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras hígidas submetidas apenas aos tratamentos dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (F), Laser de CO ₂ (L), Laser de CO ₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (L+F) (Etapa 1).....	70
Figura 5.2 - Eletromicrografias obtidas em MEV após ciclagem erosiva <i>in situ</i> dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (F), Laser de CO ₂ (L), Laser de CO ₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (L+F) (Etapa 1).....	71
Figura 5.3 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras com lesões iniciais de erosão submetidas apenas aos tratamentos dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (F), Laser de CO ₂ (L), Laser de CO ₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (L+F) (Etapa 2)	73
Figura 5.4 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras com lesões iniciais de erosão após ciclagem erosiva <i>in situ</i> dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (F), Laser CO ₂ (L), Laser CO ₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (L+F) (Etapa 2).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Descrição dos grupos, etapas e análises experimentais do estudo	51
Tabela 4.2 - Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa	58
Tabela 4.3 - Protocolo de irradiação do laser de CO ₂	62
Tabela 5.1 - Perda de superfície (µm) obtida após ciclagem erosiva <i>in situ</i> (Etapa 1) (média e desvio padrão).....	69
Tabela 5.2 - Perda de superfície (µm) obtida após lesão inicial <i>in vitro</i> e após 5 dias de ciclagem erosiva <i>ex vivo/in situ</i> (Etapa 2) (média e desvio padrão) ..	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmF	fluoreto de amina
AmF/SnF ₂	fluoreto de amina/fluoreto de estanho
AmF/NaF/SnCl ₂	fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho
APF	acidulated phosphate fluoride (flúor fosfato acidulado)
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CaF ₂ -like	semelhantes a fluoreto de cálcio
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ OH ₂	hidroxiapatita pura
Ca(SnF ₃) ₂	fluoreto estanhoso de cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	dióxido de carbono
DVO	Dimensão Vertical de Oclusão
Er,Cr: YSGG	érbio-cromo: ítrio-escândio-gálio-granada
F ⁻	íon flúor
FAP	fluorapatita
FHAP	fluoridroxapatita
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H	hora(s)
H ⁺	íon hidrogênio
HÁ	hidroxiapatita
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
H ₂ CO ₃	ácido carbônico
HMDS	hexametildissilazano
H ₂ O	água
Hz	hertz
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
kg/mm ²	quilograma por milímetro quadrado
kGy	quilogray
Kv	quilovolt
M	molar
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura

Min	minuto(s)
ml	mililitro
Mm	milímetro
mV	milivolt
μm	micrometro
μs	microsegundo (s)
mM	milimolar
NaF	fluoreto de sódio
Nm	nanometro
N	Newton
Nd:YAG	neodímio: ítrio-alumínio-granada
pH	potencial de hidrogênio
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)
SnCl_2	cloreto de estanho
Sn	estanho
SnF_2	fluoreto de estanho
Sn_2OHPO_4	hidróxido fosfato de estanho
$\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$	fosfato de flúor estanhoso
TiF_4	tetrafluoreto de titânio
x/dia	vezes por dia
W	watts
1 ^a	primeira
2 ^a	segunda
3 ^a	terceira
4 ^a	quarta
3D	três dimensões
3-pt step high	3 pontos de altura

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
X	vezes
°C	graus Celcius
%	porcentagem
nº	número
±	mais ou menos
≥	maior e igual
®	marca registrada
α	probabilidade alfa
β	probabilidade beta
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 Erosão dental – aspectos gerais e patológicos	31
2.2 Influência da saliva na erosão dental	34
2.3 Prevenção e controle da erosão dental	37
2.3.1 Fluoretos	37
2.3.1.1 <i>Estanho associado a fluoretos</i>	39
2.3.2 Lasers de alta potência	41
2.3.2.1 <i>Laser de CO₂ associado ou não a fluoretos</i>	42
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Aspectos éticos	49
4.2 Delineamento experimental	49
4.3 Cálculo amostral	53
4.4 Obtenção dos dentes e preparo das amostras	53
4.5 Seleção das amostras de esmalte para a perfilometria	54
4.6 Esterilização das amostras	55
4.7 Delimitação da área de estudo	56
4.8 Seleção dos Participantes da Pesquisa	57
4.9 Preparo dos Dispositivos Intraorais	58
4.10 Formação da lesão de erosão <i>in vitro</i> (apenas para Etapa 2)	59
4.11 Tratamento de superfície	61
4.11.1 <i>Sem tratamento (controle negativo)</i>	61
4.11.2 <i>Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (controle positivo)</i>	61
4.11.3 <i>Irradiação com Laser de CO₂</i>	61
4.11.4 <i>Irradiação com laser de CO₂, associada a solução de AmF/NaF/SnCl₂</i> ..	63
4.12 Desafio Erosivo <i>in situ</i>	63
4.13 Análise perfilométrica	66
4.14 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	66
4.15 Análise estatística dos dados	67

5 RESULTADOS	69
5.1 Etapa 1 (Prevenção)	69
5.1.1 <i>Perfilometria Óptica</i>	69
5.1.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	69
5.2 Etapa 2 (Controle da progressão)	71
5.2.1 <i>Perfilometria Óptica</i>	71
5.2.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	72
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	103
ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

A erosão dental é definida como a perda química da substância mineralizada do dente causada pela exposição a ácidos não derivados de bactérias orais (Buzalaf et al., 2012; Schlueter et al., 2020), resultante da interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais (Lussi; Jaeggi, 2008), tendo, portanto, origem multifatorial.

Esta patologia crônica é originada por causas extrínsecas e/ou intrínsecas, sendo que o primeiro grupo pode ser exemplificado pela ingestão frequente de alimentos e bebidas ácidas e pela respiração de ácidos gasosos em ambiente de trabalho. Já as causas intrínsecas, estão relacionadas a vômitos recorrentes em indivíduos com bulimia ou anorexia e indivíduos que apresentam a doença do refluxo gastroesofágico (Meurman; ten Cate, 1996; Buzalaf et al., 2018a).

Com a intenção de prevenir o desgaste erosivo e controlar a progressão da mesma, várias pesquisas preconizam o uso de produtos fluoretados (Magalhães et al., 2011b; Rakhmatullina et al., 2013). Dentre esses produtos, os mais utilizados na literatura são: fluoreto de sódio (NaF) (Hove et al., 2006, 2008; Magalhães et al., 2010, 2011a; Levy et al., 2012; Comar et al., 2015; Schlueter et al., 2016), fluoreto de amina (AmF) (Vieira et al., 2005; Ganss et al., 2010a), tetrafluoreto de titânio (TiF_4) (Vieira et al., 2005; Hove et al., 2006, 2008; Magalhães et al., 2010, 2011a; Wiegand et al., 2010a,b,c; Levy et al., 2012) e estanho associado a fluoretos (Ganss et al., 2004; Hove et al., 2006, 2008; Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e; Ganss et al., 2010a,b,c; Schlueter et al., 2016). As aplicações tópicas dos fluoretos convencionais (NaF e AmF) promovem a formação de *CaF₂-like*, que age como uma barreira física de proteção sobre a superfície dental (Schlueter et al., 2007; Wahengbam et al., 2011) e reservatório de íons. Entretanto, frente a desafios erosivos, esta proteção não é suficiente e a formação de uma camada mais ácido-resistente é necessária.

Nesse sentido, o íon estanho têm se destacado, demonstrando capacidade de reduzir a progressão do desgaste dental em tecidos dentários previamente erodidos, seja se apresentando em solução (Ganss et al., 2010b; Schlueter et al., 2011a; da Silva et al., 2017a,b) ou dentifrício (Faller et al., 2011; Schlueter et al., 2013, 2014), na forma de Cloreto de Estanho ($SnCl_2$) ou associados a fluoretos –

como os Fluoreto de Estanho (SnF_2), Fluoreto de Amina/Fluoreto de Estanho (AmF/SnF_2) e, com resultados muito efetivos, a combinação de Fluoreto de Amina/Fluoreto de Sódio/Cloreto de Estanho (AmF/NaF/SnCl_2) (Willumsen et al., 2004; Hove et al., 2006, 2008; Schlueter et al., 2009c,e; Ganss et al., 2010a,c).

Na superfície dental, o íon estanho se deposita e reage com os cristais de hidroxiapatita, formando, além do composto semelhante a Fluoreto de Cálcio (CaF_2 -like), sais como o Fluoreto Estanhoso de Cálcio ($\text{Ca(SnF}_3)_2$), o Hidróxido Fosfato de Estanho (Sn_2OHPO_4) e o Fosfato de Flúor Estanhoso ($\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$) (Babcock et al., 1978; Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008, 2012; Lussi; Carvalho, 2015), levando à menor solubilidade do tecido dental diante de ataques ácidos (Wachtel, 1964; Barbakow et al., 1985; Ganss et al., 2008).

O uso de lasers de alta potência também vem sendo estudado para diminuir a progressão da lesão de erosão em esmalte devido aos resultados promissores observados para a prevenção de perda mineral em esmalte submetido a desafios cariogênicos. Diversos autores (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Chin-Ying et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Klein et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2009; Tagliaferro et al., 2007; Scatolin et al., 2015) mostraram resultados positivos na redução da desmineralização do esmalte dental irradiado com o laser de CO_2 , associado ou não a fluoretos, quando submetido a desafios ácidos.

Os lasers de CO_2 podem modificar a composição e a morfologia da superfície do esmalte dentário e inibir a progressão de lesões cariosas (Fried et al., 1997), através do aumento da temperatura, sem causar injúrias à polpa (Nelson et al., 1987; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2000). Além disso, já foi demonstrada a capacidade do laser de CO_2 de reduzir a desmineralização do esmalte previamente erodido e aumentar a dureza da superfície erodida *in vitro* (Esteves-Oliveira et al., 2011; Ramalho et al., 2013).

Featherstone e Nelson (1987) demonstraram que os comprimentos de onda de 9.3 e 9.6 μm são melhores absorvidos pelos grupos carbonato e fosfato da estrutura dental por produzirem radiação no espectro do infravermelho que coincide com as bandas de absorção desses elementos e, assim, torna a interação da luz com o tecido mineralizado mais eficaz. Dessa forma, a irradiação nesse comprimento de onda é mais bem absorvida, comparado aos comprimentos de onda de 10.3 e 10.6 μm , resultando em melhor absorção de energia superficial com menor

propagação de calor no interior do substrato (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2002; Rechmann et al., 2011, 2013).

Quando associado ao flúor, o laser de CO₂ pode ter seu efeito de inibir a desmineralização potencializado (Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2009; Jordão et al., 2016). Para alguns autores (Chin-Ying et al., 2004; Tepper et al., 2004), isto pode estar relacionado à capacidade do laser de aumentar a absorção de flúor pelos tecidos dentais.

Apesar dos resultados positivos relacionados ao uso do laser de CO₂ (9.3 μm), em baixas densidades de energia, na prevenção e controle da desmineralização em esmalte (Rechmann et al., 2011, 2013, 2016), e da positiva associação à fluoretos convencionais (Steiner-Oliveira et al., 2010; Mirhashemi et al., 2016; Chen et al., 2017; Esteves-Oliveira et al., 2017; Kim et al., 2017), há poucos estudos que investigaram a combinação da irradiação do laser de CO₂ (9.3 μm) e o uso da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Esteves-Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2020). Estes estudos utilizaram uma metodologia *in vitro*, não havendo ainda estudos com metodologia do tipo *in situ*. Sendo assim, o objetivo deste estudo *in situ* é avaliar o efeito do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar a formação de lesões de erosão em esmalte dental humano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erosão Dental – aspectos gerais e patológicos

Erosão dental é definida pela dissolução do substrato dental por ácidos de origem não bacteriana (Meurman; ten Cate, 1996; Addy; Shellis, 2006), na qual a desmineralização de esmalte e dentina ocorrem devido à queda do pH da cavidade oral (Loke et al., 2016). Decorre da interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais (Lussi; Jaeggi, 2008). A erosão tem sido reportada em muitas populações (Isaksson et al., 2014; Jaeggi; Lussi, 2014; Muller-Bolla et al., 2015; Gopinath, 2016; Shahbaz et al., 2016; Mafla et al., 2017; Struzycka et al., 2017; Brusius et al., 2018; Warreth et al., 2020), acometendo diversas faixas etárias e se manifestando em graus diferentes de severidade.

A queda do pH intraoral está relacionada à introdução/exposição de ácidos na cavidade oral. Estes ácidos podem ter origens extrínsecas e/ou intrínsecas. Para o primeiro grupo, estão descritos na literatura: ingestão de alimentos ácidos (frutas, vinagre, chicletes e balas, molhos) e bebidas ácidas (refrigerantes, isotônicos, sucos naturais e artificiais); uso de medicações ácidas com modo de apresentação em tabletes ou efervescentes; trabalhar em locais em que haja exposição à substâncias erosivas, tais como degustadores de vinhos, ambiente contendo ácido sulfúrico vaporizado, como por baterias de carro. Já os de origem intrínseca podem ser exemplificados por desordens gastroesofágicas, doença do refluxo gastroesofágico, ou desordens alimentares, como bulimia ou anorexia (Zebrauskas et al., 2014; Carvalho et al., 2015; Buzalaf et al., 2018a).

Em seus estágios iniciais, o desgaste erosivo afeta a camada de esmalte, resultando em uma superfície rasa, lisa, vítrea e livre de depósitos de placa bacteriana (Hattab; Yassin, 2000). Com o seu agravamento, a anatomia das faces pode desaparecer completamente, apresentando-se achatadas. Nas faces oclusais, pode-se observar ausência das cúspides e “escavações” (*cupping*), enquanto nas faces vestibulares e linguais, além do achatamento, um esmalte intacto ao longo da margem gengival. Ademais, à medida que o desgaste progride, pode-se verificar

uma perda na Dimensão Vertical de Oclusão (DVO), restaurações sobressaindo do tecido dental e a cor da do tecido dentinário mais visível (Carvalho et al., 2015; Schlueter et al. 2020; Warreth et al, 2020).

Mesmo que na literatura haja um padrão descrito das características clínicas do desgaste erosivo, muitos estudos relatam que a perda tecidual dentária pode decorrer da combinação de erosão, atrição e abrasão, de forma simultânea e interagindo entre si, criando uma lesão mista (Harpenau et al., 2011; Shellis; Addy, 2014), dificultando o seu diagnóstico. Contudo, deve-se tentar definir as causas do desgaste dental por meio de uma detalhada anamnese, bem como exame clínico preciso, para que haja um diagnóstico final e a elaboração do plano de tratamento adequado (O'Sullivan et al., 2008). Quando o desgaste dental é mínimo, o monitoramento pode ser uma das opções de tratamento. No entanto, quando é grave, pode ser necessário tratamento restaurador mais complexo. Além de tudo, o diagnóstico e o plano de tratamento individualizado podem necessitar de atendimento interdisciplinar (Buzalaf et al., 2018a; Warreth et al., 2020).

Por haver diferentes origens etiológicas, são encontrados diferentes aspectos clínicos. No caso de indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico, o desgaste dental é comumente visto nas faces palatinas dos dentes anteriores. Já em indivíduos que ingerem frequentemente bebidas ácidas, é característico o desgaste se iniciar nas faces vestibulares dos dentes (Johansson et al., 2004). Quando causada por fatores extrínsecos, a erosão se desenvolve lentamente, sendo geralmente assintomática, o que posterga a procura para um tratamento e facilita sua progressão. Contudo, pode progredir mais rapidamente quando fatores intrínsecos estão envolvidos e há a procura mais rápida ao tratamento (Warreth et al., 2020).

As alterações causadas pela erosão nos tecidos dentais dependem de vários fatores, dentre eles, pode-se citar: o tipo, a concentração, a viscosidade, a temperatura do ácido envolvido, o tempo de contato do ácido com o substrato (West et al. 2000, Buzalaf et al., 2018a). Além disso, pH, concentração de íons, frequência e método de exposição ao ácido também interferem no potencial deste desgaste químico (Barbour; Rees, 2006).

A suscetibilidade à desmineralização do esmalte dental ocorre, no caso de lesão cariosa, em pH em torno de 5,5, denominado pH crítico. Este é definido como o pH mais alto no qual há troca equilibrada de íons entre um sólido e a solução saturada

em que está imerso (Lussi et al., 2011; Loke et al., 2016). Logo, quando o ácido cariogênico, com pH igual ou inferior a esse, entra em contato com frequência e em um período prolongado com o substrato dental, a lesão de cárie se inicia (Meurman; ten Cate, 1996). Já a dentina, por possuir um alto teor de carbonato e terem seus cristais de hidroxiapatita menores do que no esmalte (Featherstone; Lussi, 2006), está mais suscetível à desmineralização (Vanuspong et al., 2002, Zebrauskas et al., 2014). Na erosão, no entanto, não há pH crítico definido, sendo que a dissolução dos tecidos dentais ocorre sem o envolvimento de bactérias. Em decorrência disso, sugere-se que o valor crítico do pH para a erosão dental dependa da concentração de cálcio, fosfato e flúor presentes na solução (Lussi; Carvalho, 2014); e se sabe que a dissolução aumenta em valores de pH menores que 3,5 (Ganss et al., 2012).

Inicialmente, a desmineralização erosiva do esmalte ocorre com a perda de minerais da camada superficial que pode variar de 0,2 μm a 3,0 μm de profundidade (Lussi et al., 2011). Primeiramente, a área interprismática é afetada, seguida pela região central do prisma (Lussi; Jaeggi, 2008). A continuidade do processo erosivo leva ao aumento da rugosidade (Nekrashevych; Stösser, 2003) e amolecimento do substrato, decorrente da perda de dureza do tecido (Lussi et al., 2011). Essa camada amolecida é frágil e suscetível ao desgaste mecânico (Eisenburger et al., 2003). Se a perda de minerais se torna contínua, a camada superficial é dissolvida e inteiramente perdida (Barbour; Rees, 2006), podendo progredir para dentina (Schlueter et al., 2020).

2.2 Influência da saliva na erosão dental

Um dos primeiros mecanismos de proteção da saliva é a formação da película adquirida, definida como uma película acelular que se adere em segundos à superfície do dente após sua exposição à saliva, e é composta por lipídios, glicoproteínas e, principalmente, proteínas (Carvalho et al., 2016; Buzalaf et al., 2018a). Trata-se de uma barreira física que diminui o contato dos ácidos com a superfície dental, reduzindo a dissolução da hidroxiapatita (Featherstone; Lussi 2006; Hannig et al., 2007; Vukosavljevic et al., 2014; Buzalaf et al., 2012).

Durante a sua formação, algumas proteínas (estaterina, histatinas, proteínas ácidas ricas em prolina, mucinas, amilase, cistatinas, lisozima e lactoferrina) que apresentam alta afinidade pela hidroxiapatita aderem seletivamente à superfície dental, gerando uma fina camada de proteínas (Hannig; Joiner, 2006). Posteriormente, há o aumento de sua espessura devido à adsorção de agregados de proteína (Hannig et al., 2001). De acordo com alguns autores, a efetividade da película adquirida na proteção contra ataques ácidos depende de sua espessura (Amaechi et al., 1999).

A espessura da película adquirida pode variar de acordo com a localização. Em superfícies linguais dos dentes inferiores (Carlen et al., 1998), apresenta-se mais espessa enquanto que, nas superfícies palatinas dos dentes anteriores superiores, mais fina (Amaechi et al., 1999). Consequentemente, as regiões que apresentam películas com espessuras mais finas são as mais afetadas pela erosão dental, sendo geralmente as faces palatinas e oclusais as mais acometidas (Jaeggi; Lussi, 2014). Além da espessura, o conteúdo proteico da película de esmalte dental varia de acordo com sua localização (Buzalaf et al., 2018a), o que pode estar relacionado à especificidade do local do desgaste erosivo (Ventura et al., 2017).

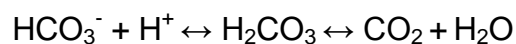
Quanto à sua composição, algumas proteínas vêm sendo relacionadas à capacidade desta película de proteção contra erosão. Naganagowda et al. (1998) observaram que estaterinas (proteínas de ligação ao cálcio) se ligam fortemente à hidroxiapatita por meio de seu terminal-N. Shah et al. (2011) demonstraram, ainda, que peptídeos do tipo estaterina que contêm 15 terminal-N ou mais são necessários para a proteção contra a desmineralização. Entre outras proteínas também

relacionadas à proteção contra perda mineral estão as mucinas, especialmente quando combinadas com caseína (Cheaib; Lussi, 2011) e ovalbumina (Hemingway et al., 2008). Carpenter et al. (2014) reportaram que indivíduos que apresentam desgaste erosivo possuem metade da quantidade de proteínas que compõem a película adquirida formada quando comparadas à indivíduos normais, dentre elas cistatinas e estaterinas.

Outro aspecto importante da saliva é o de favorecer a eliminação do ácido em que a superfície dental está exposta por meio da deglutição e o aumento de seu fluxo (Hara; Zero, 2014; Carvalho et al., 2016; Buzalaf et al., 2018a). Com isso, há também o aumento do conteúdo proteico e de alguns sistemas de tamponamento que auxiliam a neutralizar o ácido (Dodds et al., 2005) e restabelecer o pH bucal entre 6,8 e 7,8 (Preston; Edgar, 2005).

Os sistemas tampão regulam a capacidade tampão salivar de resistir a mudanças de pH, dentre eles estão o sistema ácido carbônico/bicarbonato, sistema fosfato e de proteínas. O principal componente tampão da saliva é o bicarbonato e sua concentração dependente do fluxo salivar; sua presença na saliva provoca, ainda, o aumento do pH e da capacidade tampão, tendo um importante papel no controle da desmineralização dos tecidos dentais (Dawes, 2008; Warreth et al., 2020).

O bicarbonato (HCO_3^-) reage com os íons hidrogênio (H^+ dos ácidos), removendo prótons para produzir ácido carbônico (H_2CO_3). Este é convertido, pela enzima anidrase carbônica, em gás dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) também presente na saliva (Murakami; Sly, 1987), como descrito pela reação:



Dentre outros componentes da saliva que empenham papel fundamental na remineralização das superfícies dentais estão: flúor, cálcio e fosfato (Buzalaf et al., 2012). O flúor auxilia melhorando a capacidade de remineralização da superfície dental e prevenindo a desmineralização por ataque ácido, contudo sua eficiência necessita de uma alta concentração (Larsen, 2001). Já o cálcio e o fosfato estão envolvidos na redução de dissolução dos minerais presentes em esmalte e dentina (Hara; Zero, 2014).

Os tecidos dentais (esmalte, dentina e cimento) são compostos por matrizes orgânicas e inorgânicas, em que nesta última a hidroxiapatita ($HA = Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$) se destaca, apresentando-se em maior quantidade no esmalte do que em dentina (ten Cate; Featherstone, 1991). No entanto, a fase deste mineral presente nos tecidos duros dentais é deficiente em cálcio, na qual outros íons são incorporados. Quando em contato com a saliva, trocas iônicas entre esta solução e as estruturas cristalinas ocorrem (Shellis et al., 2014). A introdução de íons fosfato de hidrogênio, carbonato e magnésio origina uma apatita menos estável e com maior predisposição à desmineralização. Porém, a substituição parcial de íons flúor por grupos hidroxila pode, de certa forma, estabilizar a estrutura da apatita. Desta maneira, em esmalte saudável, além da HA, a fluoridroxiapatita (FHAP) ou fluorapatita (FAP) também estão presentes (Lussi et al., 2012; Shellis et al., 2014).

A supersaturação ou a subsaturação da saliva é determinada pelas concentrações dos íons cálcio, fosfato, hidroxila e flúor. Na primeira situação, há a tendência de ocorrer a deposição de minerais da solução no esmalte enquanto, na segunda, há a tendência de dissolução do tecido dental. Logo, quando exposto à algum ataque ácido, a queda do pH devido ao aumento da presença de íons H^+ provoca a diminuição da concentração desses íons na saliva e ocorre um desequilíbrio da troca de minerais entre solução e dente, iniciando a dissolução da superfície dental (Dawes, 2003; Lussi et al., 2012).

Alguns aspectos individuais também têm sido relacionados às respostas entre pacientes diante de desafios erosivos. Entre eles, estão o fluxo salivar, o conteúdo eletrólito e de proteínas, e a capacidade tampão da saliva, que influenciam na velocidade de seu retorno ao estado saturado, favorecendo a recuperação de seu potencial de remineralização após presença de ácidos (Warreth et al., 2020).

Contudo, as diversas propriedades protetoras da saliva discutidas apresentam limitação diante da exposição a ácidos e à frequência do contato destes com o substrato dental (Dawes, 2008).

2.3 Prevenção e controle da erosão dental

Diversos tratamentos para prevenção e controle do desgaste erosivo vêm sendo propostos, como: uso de fluoretos (Wiegand et al. 2010a,b,c; Schlueter e al., 2011b; Mathews et al., 2012), suplementação (Min et al., 2011; Scaramucci et al, 2011; Barbosa et al., 2012), lasers de alta potência (Hsu et al., 2000; Ramalho et al., 2013; Esteves-Oliveira et al., 2011; Silva et al., 2020), selantes (Bartlett al., 2011) e, para casos com grande perda tecidual, restaurações adesivas (Schlueter et al., 2012). Na presente revisão, abordaremos os tópicos de interesse (relacionados ao tema do estudo), que são o uso de fluoretos e lasers de alta potência.

2.3.1 Fluoretos

A aplicação de fluoreto tem sido muito estudada como escolha para o controle da progressão do desgaste erosivo (Alexandria et al., 2017; Schlueter et al., 2016; Carvalho, Lussi, 2014). Sabe-se que a incorporação de fluoretos no esmalte reduz sua solubilidade frente aos desafios ácidos cariogênicos (ten Cate; Duijsters, 1983; ten Cate; Featherstone, 1991), já que por meio desta incorporação, o tecido se torna suscetível à dissolução em pH em torno de 4,7 (Lussi et al., 2012).

Os fluoretos formam uma camada de precipitados minerais sobre o tecido dental (Schlueter et al., 2007; Magalhães et al., 2011b; Schlueter et al., 2011a; Wahengbam et al, 2011). No caso de lesões de cárie dental, após contato com íons flúor, ocorre a deposição de material semelhante ao fluoreto de cálcio (CaF_2 -like) sobre a superfície dental, fato benéfico em momentos posteriores em que há queda do pH pelo biofilme, pois haverá liberação dos íons cálcio e flúor pela desmineralização do tecido (Saxegaard; Rolla, 1988; Wiegand et al., 2010b; Magalhães et al., 2011b). Posteriormente, a liberação desses íons aumenta o nível de saturação da solução do meio em relação ao dente, promovendo a remineralização (Magalhães et al., 2011b).

Fluoretos, com sódio (NaF) e amina (AmF), comumente utilizados na prevenção e controle da cárie dentária (ten Cate, 1997), também vem sendo testados para a mesma finalidade em erosão (Wiegand; Attin, 2003). Neste caso, além da liberação de íons flúor, a camada de CaF_2 formada pode atuar como uma importante barreira física durante o ataque ácido. Porém, tanto a formação desta camada quanto seu efeito protetor são dependentes do pH, da concentração do fluoreto e sua frequência de aplicação (Magalhães et al., 2011b). Observa-se que o uso de agentes com maior concentração de íons flúor e pH menores do 5, além de maior frequência de aplicação, favorecem a deposição de CaF_2 (Saxegaard; Rolla, 1988; Ganss et al., 2007), podendo ainda, levar à formação de uma camada mais espessa, densa e estável (Wiegand; Attin, 2003; Lagerweij et al., 2006). Todavia, devido à necessidade de maior frequência de aplicação por parte dos fluoretos convencionais e por apresentarem limitações no efeito anti-erosivo (Ganss et al., 2004; Vieira et al., 2005; Comar et al., 2012; Levy et al., 2012; Mathews et al., 2012), compostos fluoretados polivalentes contendo íons metálicos vêm sendo estudados, como o titânio (Vieira et al., 2005; Schlueter et al., 2007; Comar et al., 2012, 2015) e estanho (Schlueter et al., 2011a, 2014; Ganss et al., 2015).

O tetrafluoreto de titânio (TiF_4) tem demonstrando a capacidade de reduzir a progressão de desgaste dental em tecidos dentários previamente erodidos, seja na forma de verniz (Comar et al., 2015), solução (Schlueter et al., 2007) ou gel (Vieira et al., 2005), como também na associação de TiF_4 e NaF em cremes dentais (Comar et al., 2012). Pela alta afinidade entre os íons titânio e os átomos de oxigênio, o titânio, liberado após a hidrólise das moléculas de TiF_4 , pode se unir ao oxigênio derivado da água ou das moléculas de fosfato da superfície dental, levando à formação de uma camada ácido-resistente tipo *glaze*, capaz de aderir fortemente à superfície dental (Wei et al., 1976; Tveit et al., 1988). Especula-se que este *glaze* seja composto por complexos organometálicos formados entre titânio e matriz orgânica dental (Mundorff et al., 1972; Wiegand et al., 2010a). No entanto, poucos estudos *in situ* mostraram que este composto é eficaz como os fluoretos estanhosos ou convencionais na prevenção e controle de desgaste erosivo (Hove et al., 2008; Wiegand et al., 2010b; Silva et al. 2020). Além disso, o baixo pH dos produtos de TiF_4 pode ser um empecilho para indicação de auto-aplicação para o paciente (Magalhães et al., 2011a).

Além do titânio, outro fluoreto associado a íons metálicos, como o estanho, vêm provando sua eficácia na prevenção e controle do desgaste erosivo (Schlueter et al., 2011a, 2014; Ganss et al., 2015; da Silva et al., 2017a,b).

2.3.1.1 *Estanho associado a fluoretos*

O estanho associado a fluoretos vêm mostrando resultados muito positivos no controle do desgaste erosivo, seja em solução (Ganss et al., 2008; Hove et al., 2008; Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e; Ganss et al., 2010a,b,c; Schlueter et al., 2011a; da Silva et al., 2017a,b) ou creme dental (Faller et al., 2011), sendo objeto de estudo em pesquisas, na forma de: cloreto de estanho (SnCl_2), fluoreto de estanho (SnF_2) (Willumsen et al., 2004; Ganss et al., 2008; Hove et al., 2008) e associação de AmF/NaF/SnCl_2 (Schlueter et al., 2009c,e; Ganss et al., 2010a,c).

O efeito do estanho parece estar relacionado à formação de precipitados ricos em metal (Cooley, 1961; Ellingsen, 1986), como $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$, Sn_2OHPO_4 e $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, que apresentam alta resistência ácida (Babcock et al., 1978; Hove et al., 2006; Ganss et al., 2008, 2012). O íon estanho reage com a hidroxiapatita carbonatada na superfície dental (Jordan et al., 1971; Babcock et al., 1978), reduzindo sua solubilidade (Wachtel, 1964; Barbakow et al., 1985; Ganss et al., 2008). Além disso, quando em solução com alta concentração de flúor, o estanho consegue penetrar e se incorporar à superfície e sub-superfície desmineralizadas (Wei, 1974). Desta forma, diante de desafios ácidos, seu efeito protetor parece estar relacionado a um processo complexo de desmineralização e reprecipitação que modifica as camadas superficiais de esmalte e que promove uma maior resistência ao ácido (Ganss et al., 2010a).

Entretanto, em relação às soluções bucais contendo estanho em alta concentração (1.900 ppm de estanho), estas apresentam como efeitos adversos a descoloração do dente e sensação adstringente (Schlueter et al., 2009c). Desta forma, estudos propuseram utilizá-lo em concentrações menores. No estudo de Ganss et al. (2008), as soluções de SnCl_2 (815 ppm de Sn, pH 2.6) e SnF_2 (250 ppm de F, 809 ppm de Sn) mostraram-se capazes de reduzir lesões de erosão em esmalte, sem demonstrar efeitos adversos.

Outros trabalhos indicaram que a retenção de estanho parece estar relacionada aos princípios de saturação, sugerindo que a sua incorporação máxima é o fator limitante da eficácia e não, sua concentração (Cooley, 1961; Wachtel, 1964; Schlueter et al., 2009a), contribuindo para ideia de que a concentração de estanho possa ser reduzida sem haver comprometimento de sua eficácia (Schlueter et al., 2009a). No estudo de Schlueter et al. (2009a), os pesquisadores observaram que a quantidade de estanho nas superfícies dentais submetidas à ciclagem erosiva aumentava conforme aumento da concentração de estanho na solução testada e que, nas secções transversais das amostras tratadas com solução com concentração de 2.100 ppm e 1.400 ppm, o estanho estava presente nas camadas externa e intermediária. Contudo, a taxa de estanho diminuiu da camada externa para interna.

Além da concentração, outro aspecto importante de se discutir é que suas soluções de concentrações mais altas, normalmente, com pH 4,5 apresentam certa instabilidade. Devido a isso, o fluoreto de amina foi associado às soluções estanhosas por suas propriedades estabilizantes (Mühlemann; Saxer, 1981; Schlueter et al., 2009c,e). Ademais, alguns estudos demonstraram que o uso apenas de SnF_2 , mas também sua combinação com AmF , foram capazes de diminuir a solubilidade do esmalte mais do que o uso de apenas de NaF ou AmF (Barbakow et al., 1985, 1986, 1987).

Mesmo na ausência de flúor, o íon estanho também se mostrou capaz de reduzir perda mineral em 64% (Ganss et al., 2008). Neste mesmo estudo, os pesquisadores testaram diferentes materiais diante de ataque erosivos em esmalte e verificaram a efetividade das soluções de SnCl_2 (800 ppm de estanho), NaF (250 ppm de flúor), AmF/SnF_2 (250 ppm de flúor; 390 ppm de estanho) e SnF_2 (250 ppm de flúor; 809 ppm de estanho), tendo esta última melhor resultado anti-erosivo. Porém, sua associação com fluoretos de sódio e amina mostrou também resultados muito positivos, reduzindo de 50 a 90% a perda mineral (Hove et al., 2006; Ganss et al., 2010c). Contudo, ao que se refere à associação dos fluoretos ao estanho, Schlueter et al. (2009a) indicaram que a concentração dos fluoretos parece ter um papel secundário no efeito anti-erosivo dos agentes, sendo a concentração do íon estanho e a relação entre estanho e fluoretos mais relevantes aos resultados esperados. Ainda assim, autores recomendam o uso de agentes concentrados de flúor ou aplicações frequentes em casos de desgaste erosivo (Wiegand, Attin, 2003; Amaechi; Higham, 2005; Magalhães et al., 2011b), já que alguns estudos

encontraram resultados mais eficazes utilizando altas concentrações de flúor (Lagerweij et al., 2006).

Como discutido, as associações de estanho e fluoretos vêm mostrando bons resultados, tendo a solução de AmF/NaF/SnCl_2 , já disponível no mercado de produtos de higiene bucal em alguns países, mostrando resultados promissores e sendo considerado “padrão-ouro” para controlar desgaste erosivo (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009c,e; Yu et al., 2010a,b; Rakhmatullina et al., 2013; da Silva et al., 2017a,b). Entretanto, ainda que na literatura estudos comprovem o efeito desta solução na redução do desgaste erosivo, poucos estudos *in situ* foram conduzidos (Schlueter et al., 2009c; Ganss et al., 2010c; Schlueter et al., 2011a; da Silva et al., 2017a; Ramos-Oliveira et al., 2017) e, até o presente momento, nenhum (com modelo *in situ*) associou este agente a outros possíveis tratamentos para prevenção e controle deste desgaste dental.

2.3.2 Lasers de alta potência

Outro agente estudado para tratamento de erosão são os lasers de alta potência. Alguns estudos têm sido realizados a fim de verificar o efeito de lasers de alta potência na prevenção e no controle da desmineralização dental. Dentre eles, os que são frequentemente descritos e apresentam resultados positivos (Karandish, 2014; Al-maliky et al., 2020; Lombardo et al., 2019) são: CO_2 (Rechmann et al., 2011; Correa-Afonso et al., 2012a,b; Mirhashemi et al., 2016; Kim et al., 2017), Er,Cr:YSGG (de Oliveira et al., 2017; Dionysopoulos et al., 2019) e Nd:YAG (Raucci-Neto et al., 2015; Correa-Afonso et al., 2013; Pereira et al., 2017).

O laser Er,Cr:YSGG, apesar de ter apresentado eficácia na redução do amolecimento ácido do esmalte (de Freitas et al., 2010; Ana et al., 2012; Geraldo-Martins et al., 2013; de Oliveira et al., 2017) e da dissolução de íons hidroxiapatita (Ana et al., 2012), mostrou-se ineficaz na prevenção da desmineralização ácida (de Freitas et al., 2010). Adicionado a isso, este laser não apresentou diferença na prevenção de dissolução de esmalte quando comparado à aplicação de flúor, tal como o APF (Ana et al., 2012) e o gel de NaF 2% (de Freitas et al., 2010).

Em relação ao laser de Nd:YAG, resultados controversos são encontrados na literatura. Dentre os favoráveis, estão a redução de amolecimento do esmalte e da profundidade média da perda mineral (Azevedo et al., 2012; Correa-Alfonso et al., 2012b). Entretanto, em alguns trabalhos, este apresentou-se incapaz de melhorar a resistência ácida do esmalte, em termos de profundidade média das lesões (Chang et al., 2017), porcentagem de perda mineral (Seino et al., 2015) e de perda de microdureza do esmalte (Azevedo et al., 2012; Correa-Alfonso et al., 2012b). Mesmo quando combinado com fluoretos, como verniz NaF 5% (Azevedo et al., 2012) e APF 1,23% (Paulos et al., 2017), não foram apresentados bons resultados.

Contudo, em relação ao efeito protetor contra a dissolução ácida do esmalte, o laser de CO₂ é o que vem mostrando resultados mais favoráveis para esta função (Featherstone; Nelson, 1987; Featherstone et al., 1998; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2002; Al-maliky et al., 2020; Lombardo et al., 2019).

2.3.2.1 *Laser de CO₂ associado ou não a fluoretos*

Diversos estudos mostraram resultados positivos do laser de CO₂ no controle da desmineralização dental (Souza-Gabriel et al., 2010; Rechmann et al., 2011; Correa-Afonso et al., 2012a; Mirhashemi et al., 2016; Chang et al., 2017; Esteves-Oliveira et al., 2017; Kim et al., 2017).

Sua interação com os tecidos dentais deve-se ao fato de que o laser CO₂ produz radiação infravermelha que coincide com as bandas de absorção da apatita, presente nesses tecidos, devido aos grupos fosfato, carbonato e hidroxila (Nelson; Featherstone, 1982). Ademais, estudos descreveram alterações estruturais (Stern et al., 1972) e de fase na superfície do esmalte quando irradiados por esse laser (Kuroda; Fowler, 1984; Fowler; Kuroda, 1986), favorecendo o uso desse comprimento de onda em tecidos duros dentais (Featherstone; Nelson, 1987).

Em consequência dos picos de absorção dos cristais de apatita se concentrarem na região de 9.0 µm a 11.00 µm, estudos vêm sendo realizados com o uso de lasers de dióxido de carbono nos comprimentos de onda entre 9.3 e 10.6 µm, a fim de que haja absorção com maior eficiência pelo tecido (Nelson et al., 1986; Featherstone; Nelson, 1987). No entanto, Featherstone e Nelson (1987) verificaram

que dentre os comprimentos de onda 9.3, 9.6, 10.3 e 10.6 μm , o mais eficaz na redução da progressão da lesão de cárie foi o de 9.3 μm , utilizado com baixas densidades de energia, sendo capaz reduzir em 50% a perda mineral do esmalte submetido a desafios cariogênicos. Esses resultados corroboram com os de Nelson et al. (1986), que compararam o efeito dos mesmos comprimentos de onda na redução da desmineralização. Neste estudo, os autores também observaram que quando uma mesma densidade de energia foi empregada, enquanto laser de 10.6 μm atingia em maior profundidade o esmalte, o de 9.3 μm se restringia mais à superfície do tecido. Adicionalmente, verificou-se que dentre os comprimentos de onda existentes, os de 9.3 e 9.6 são melhores absorvidos pelos grupos carbonato e fosfato do esmalte dental (Featherstone; Nelson, 1987; Fried et al., 2002; Zuerlein et al., 1999) e nesses comprimentos de onda, os lasers podem emitir pulsos ultracurtos (em microssegundos), enquanto que os de 10.6 μm emitem pulsos na faixa de milissegundos ou uma luz de forma contínua, podendo provocar efeitos colaterais (Goodis et al., 2004; Rechmann et al., 2020).

Apesar da variação de protocolos no uso de laser de CO_2 apresentados na literatura quanto ao comprimento de onda, modo de irradiação, densidade de energia, potência, número e duração de pulsos e taxa de repetição (Al-maliky et al., 2020), estudos com baixa densidade de energia demonstraram resultados positivos na redução da desmineralização dental (Featherstone et al. 1998; Esteves-Oliveira et al., 2009; Rechmann et al. 2013; Chan et al., 2014; Rechmann et al. 2016; Silva et al., 2020).

Em relação às modificações provocadas pelo laser após irradiação, observou-se derretimento superficial, caracterizado pela fusão dos cristais de hidroxiapatita e que está, frequentemente, associado ao aumento de temperatura entre 800 e 1100 $^{\circ}\text{C}$ (Featherstone; Nelson, 1987). Apesar disso, pesquisas já demonstraram que seu aumento médio de temperatura não causa injúrias ao tecido pulpar (Goodis et al., 2004; González-Rodríguez et al., 2011).

Para alguns autores, essa fusão dos cristais de esmalte conferiria ao tecido a redução de sua permeabilidade e solubilidade à ácidos, decorrente da redução dos espaços interprismáticos, pelo derretimento e recristalização dos cristais, que formam uma espécie de barreira (Nelson et al., 1986; Zuerlein et al. 1999). Já para outros, a irradiação gera uma modificação e degradação da matriz orgânica prismática que promove a obliteração dos espaços inter e intraprisimáticos do

esmalte, ocasionando o bloqueio da entrada dos íons ácidos e, também, a formação de um reservatório mineral que atua desvaforecendo a desmineralização do tecido (Nelson et al., 1986; Hsu et al., 2000).

Contudo, o mecanismo de ação mais aceito e discutido na literatura atual é que a irradiação do laser causa alterações pelo aumento de temperatura, como a evaporação de carbonatos, decomposição de proteínas e formação de pirofosfatos, na estrutura química do esmalte, produzindo uma superfície menos solúvel ao ácido (Fowler; Kuroda 1986; Featherstone; Nelson 1987; Featherstone et al., 1998). Quanto aos carbonatos, quando ocorre aquecimento da superfície dental pela irradiação, há transformação da hidroxiapatita carbonatada em uma hidroxiapatita mais resistente aos ácidos (Fowler; Kuroda, 1986; Zuerlein et al., 1999). Diante da combinação do flúor no momento da decomposição das inclusões de carbonato mineral no esmalte, que ocorre a partir de 400 °C, a fluorapatita, que se apresenta menos solúvel em ácido, é formada (Meurman et al., 1997; Kawasaki et al., 2000).

Dessa maneira, mesmo com resultados positivos apresentados do uso individual do laser de CO₂, estudos vêm sendo realizados associando esse comprimento de onda à compostos fluoretados a fim de verificar o efeito desta combinação na prevenção e no controle do desgaste erosivo (Ramalho et al., 2019; Silva et al., 2020).

Quando utilizado sozinho, o CO₂ pode apresentar maior eficácia em reduzir a desmineralização em relação ao uso de somente à aplicação de fluoretos, como: fluoreto de fosfato acidulado 1,23% (APF) (Seino et al., 2015; Souza-Gabriel et al., 2010; Paulos et al., 2017) e verniz de fluoreto de sódio 5% (Noureldin et al., 2016).

No entanto, quando esse laser é associado aos fluoretos, pode-se encontrar resultados ainda mais positivos, como na associação com solução ou gel de APF 1,23% (Chang et al., 2017; Belcheva et al., 2018; Takate et al., 2019); solução de TiF₄ 4% (Mirhashemi et al., 2016), gel de TiF₄ 1% (Lepri et al., 2013) e solução de TiF₄ 1,64% (Wiegand et al., 2010b); gel de AmF/NaF 1,25% (Lepri et al., 2013; Ramalho et al., 2013); verniz de NaF 5% (Esteves-Oliveira et al., 2017) e gel de NaF 1,23% (Lepri et al., 2013).

Em relação à solução de AmF/NaF/SnCl₂, o estudo de Esteves-Oliveira et al. (2015) revelou que a combinação dessa solução com irradiação do laser CO₂ (10.6 µm) apresentou melhor resultado contra os ataques erosivos quando comparado ao uso somente da solução fluoretada contendo estanho ou do laser em dois protocolos

diferentes (1 irradiação ou 2 irradiações durante o experimento). Nesse trabalho, os autores verificaram que a solução fluoretada foi capaz de reduzir 88% do desgaste dental. No entanto, quando combinada ao laser foi capaz de quase inibir a perda tecidual, não apresentando diferença entre os grupos laser não associados ao fluoreto.

Silva et al. (2020), comparando o efeito de dois diferentes protocolos do laser CO₂ (9.3 µm), dois diferentes fluoretos (gel de TiF₄ e solução de AmF/NaF/SnCl₂) e a combinação entre eles na prevenção do desgaste erosivo, observaram que após 5 dias de ciclagem erosiva, os grupos tratados com a associação do laser, em ambos os parâmetros, com os diferentes fluoretos, apresentaram menor perda superficial quando comparados ao grupo controle. Ainda verificaram que, após 10 dias, os grupos tratados com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ apresentaram redução da perda superficial, principalmente, naqueles em que a associação foi realizada. Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, ainda com resultados não publicados, resultados semelhantes foram encontrados aos obtidos pelo estudo anterior, comparando o efeito de dois diferentes protocolos do laser CO₂, diferentes fluoretos (solução de AmF/NaF/SnCl₂, solução de NaF 1,1%, slurry de NaF 1,1%) e a combinação entre eles no controle do desgaste erosivo, relatando que os protocolos de laser de CO₂ (9.3 µm) associados com o NaF e com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ controlaram a progressão do desgaste erosivo em esmalte.

Alguns estudos mostram, ainda, que a irradiação com laser de CO₂ promove a melhoria da captação de flúor no esmalte, resultando na formação de fluorapatita (Chin-Ying et al., 2004). A captação de flúor viabilizada por esse laser pode ser maior, até mesmo, do que fluoretos aplicados sozinhos, como: NaF 5% (Bahrololoomi et al., 2015), AmF (González-Rodríguez et al., 2011); o que pode favorecer o tratamento de lesões desmineralizadas (Marinho et al., 2013, 2015).

Apesar dos resultados promissores na redução da desmineralização dental encontrados na utilização individual da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009c,e; Ganss et al., 2010c; Yu et al., 2010b; Schlueter et al., 2011a; Rakhmatullina et al., 2013; da Silva et al., 2017a,b; Ramos-Oliveira et al., 2017) e do laser de dióxido de carbono (Souza-Gabriel et al., 2010; Seino et al., 2015; Noureldin et al., 2016; Bahrololoomi et al., 2015; Paulos et al., 2017), poucos estudos realizaram a associação dos dois diferentes tratamentos no contexto de erosão dental (Esteves-Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2020) e, especificamente,

nenhum, estudo *in situ* foi reportado até o momento. Desse modo, faz-se necessário a realização de pesquisas que têm por objetivo avaliar o efeito da associação desses tratamentos na prevenção e controle da erosão dental, tendo em vista a sua aplicação clínica.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in situ* teve como objetivo avaliar o efeito do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano.

As hipóteses nulas testadas foram:

- (1) O laser de CO₂ (9.3 μm) não é capaz de prevenir a formação das lesões de erosão em esmalte dental humano;
- (2) O laser de CO₂ (9.3 μm) não é capaz de controlar a progressão das lesões de erosão em esmalte dental humano;
- (3) A associação do laser de CO₂ (9.3 μm) com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ não demonstra potencialização da prevenção da erosão dental;
- (4) A associação do laser de CO₂ (9.3 μm) com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ não demonstra potencialização do controle da progressão da lesão de erosão dental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Foram utilizados 123 terceiros molares humanos recém-extraídos, cedidos pelo bioanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (CEP-FOUSP/CAAE 01588818.7.0000.0075 – ANEXO A).

Aos participantes da pesquisa, informou-se os objetivos e metodologia do estudo, benefícios e riscos envolvidos no experimento e da confidencialidade dos dados. Todas as informações estavam presentes na carta de informação ao participante (APÊNDICE A) e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução nº. 466 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Distrito Federal, Brasil, 12/12/2012, APÊNDICE B), os quais foram assinados em duas vias, pertencendo uma ao participante, e outra aos pesquisadores.

4.2 Delineamento experimental

O presente estudo *in situ* consiste em um modelo cego e cruzado, que incluiu um período observacional total de 2 semanas X 5 dias, divididas em duas Etapas Experimentais (Etapa 1 e Etapa 2). As etapas foram divididas em duas fases, uma sem a exposição à solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Fase I) e outra com (Fase II).

Em cada uma das Etapas, foram considerados os fatores em estudo, como segue:

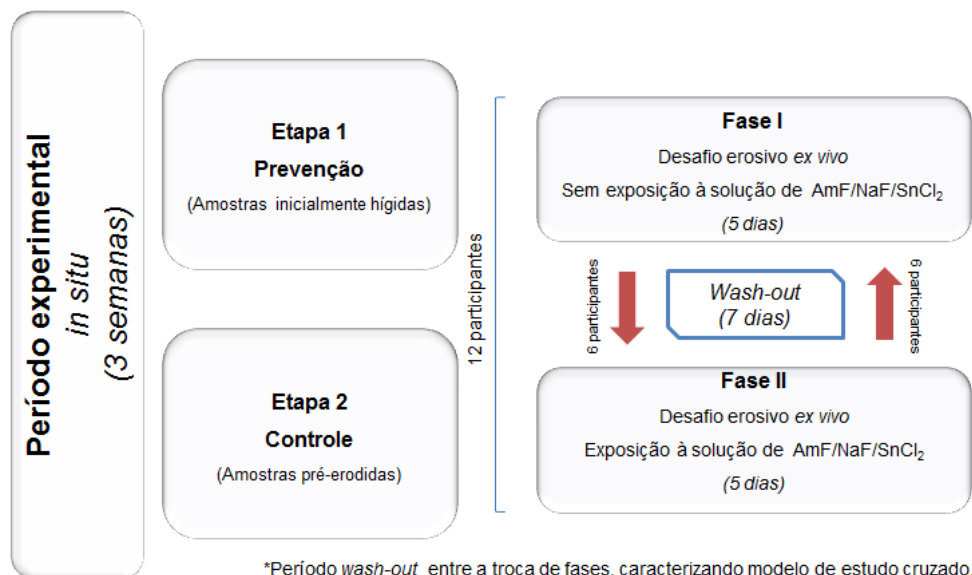
- Etapa 1 (Prevenção da lesão de erosão): 1 fator – *Tratamento de superfície*, em 4 níveis: C – sem tratamento (controle negativo); F – solução de AmF/NaF/SnCl₂ (controle positivo); L - irradiação com laser de CO₂ (9.3 μm); L + F - laser de CO₂ (9.3 μm) + solução de AmF/NaF/SnCl₂.
- Etapa 2 (Controle da progressão da lesão de erosão): 2 fatores - *Tratamento de superfície*, em 4 níveis: C – sem tratamento (controle negativo); F – solução de AmF/NaF/SnCl₂ (controle positivo); L - irradiação com laser de CO₂ (9.3 μm); L + F - laser de CO₂ (9.3 μm) + solução de AmF/NaF/SnCl₂; e *Tempo*, em 2 níveis: antes (lesão inicial) e após 5 dias de ciclagem erosiva.

As unidades amostrais foram compostas por um total de 216 fragmentos de esmalte dental humano, obtidos a partir de superfícies lisas dos dentes humanos, das quais 192 foram utilizados, em duplicata, para a análise de perfilometria (n=12) para as duas Etapas (Etapa 1 - Prevenção e Etapa 2 - Controle da progressão). Além disso, foram selecionadas 24 amostras (n=3) dentre as submetidas aos 5 dias de ciclagem erosiva, e, adicionalmente, 24 amostras extras (n=3), submetidas aos tratamentos de superfície, para análise por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Descrição dos grupos, etapas e análises experimentais do estudo

Grupos	Tratamentos de superfície	Etapa 1 (Prevenção)		Etapa 2 (Controle da progressão)	
		Perfilometria (duplicata)	MEV	Perfilometria (duplicata)	MEV
C	Sem tratamento (controle negativo)	n=12	n=3	n=12	n=3
F	Solução de AmF/NaF/SnCl ₂ (controle positivo)	n=12	n=3	n=12	n=3
L	Laser CO ₂	n=12	n=3	n=12	n=3
L + F	Laser CO ₂ + solução de AmF/NaF/SnCl ₂	n=12	n=3	n=12	n=3

Fonte: A autora.

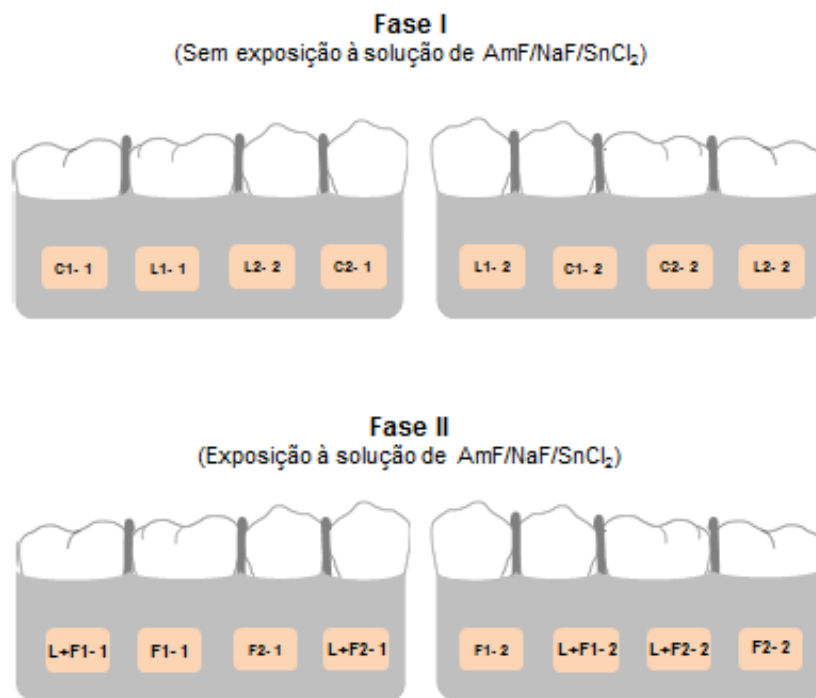
Figura 4.1 - Etapas e fases do período experimental *in situ*

Fonte: A autora.

Em cada etapa, os participantes utilizaram um dispositivo removível inferior bilateral, posicionado na região vestibular de pré-molares e molares, contendo 8

amostras de esmalte dental humano por dispositivo, sendo: 4 amostras inicialmente com superfície dental hígida (Etapa 1), e 4 amostras com lesão inicial de erosão (Etapa 2). Sendo que destas 4 de cada etapa, foram utilizadas 2 amostras de cada grupo de tratamento (considerando duplicata). Para cada fase, a posição das amostras nos nichos do dispositivo foi aleatorizada para cada um dos participantes (Figura 4.2). E para a análise estatística, em cada uma das Etapas (1 e 2) da pesquisa, foi obtida uma média dos valores das amostras preparadas para a perfilometria.

Figura 4.2 - Exemplo de distribuição das amostras utilizada nas Fases I e II para um mesmo participante da pesquisa (C1 e C2 - amostras do grupo C; L1 e L2 - amostras do grupo L; F1 e F2 - amostras do grupo F; L + F1 e L + F2 - amostras do grupo L + F; - 1 = amostras da etapa 1; - 2 = amostras da etapa 2)



Fonte: A autora.

Para que não houvesse influência de possível efeito residual dos tratamentos houve um período de *wash-out* de 7 dias (1 semana) entre as fases. Ao final do experimento, tratando-se de um modelo cruzado, todos os participantes foram submetidos a todos os tratamentos. A sequência de fases para cada um deles foi definida por sorteio aleatório.

O desfecho primário foi a perda superficial de tecido mineral (em μm), analisada de forma quantitativa, através de teste de perfilometria óptica. Adicionado

a isto, realizou-se análise observacional da morfologia de superfície, por meio de MEV.

4.3 Cálculo amostral

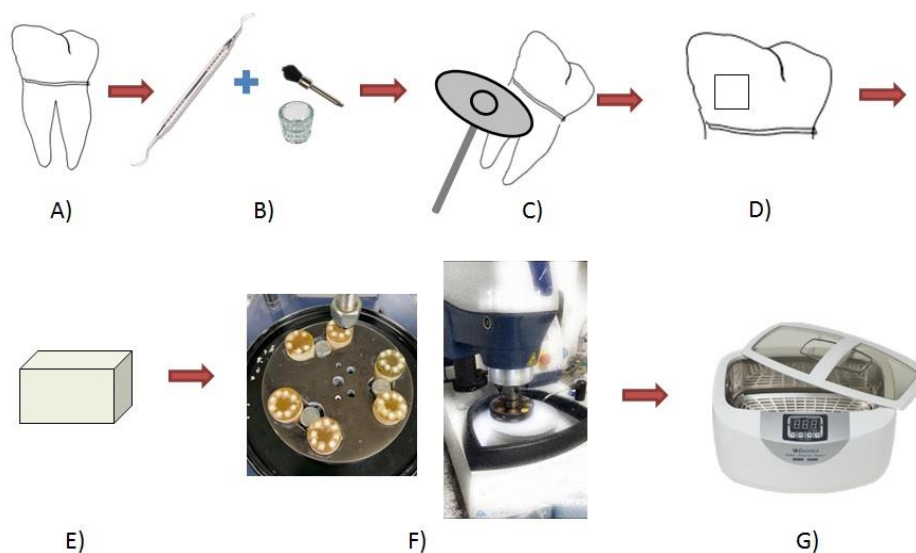
O cálculo amostral foi realizado com base em um estudo *in situ* concluído pelo grupo de pesquisa (da Silva et al., 2017a), e com modelo de ciclagem semelhante ao realizado no presente estudo, no qual foi registrada uma perda de superfície de esmalte de 4,5 μm no grupo controle. Neste estudo, o cálculo amostral foi realizado no programa G*Power 3.1.9.4, adotando-se o modelo de análise de variância a dois critérios para blocos casualizados. Para o tamanho de efeito de 0,753, obtido a partir dos dados do estudo piloto realizado com quatro sujeitos, nível de significância de 5% e poder de 80%, o cálculo amostral indicou a necessidade de 12 participantes. Desta forma, para o presente estudo foram recrutados 12 indivíduos.

4.4 Obtenção dos dentes e preparos das amostras

Para esta pesquisa, foram necessários 123 terceiros molares humanos hígidos recém-extraídos. Realizou-se a limpeza dos dentes com utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e profilaxia com pedrapomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água com auxílio de uma escova de Robson (KG, Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação. Após limpeza, as coroas foram seccionadas em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA) e das superfícies lisas foram obtidos 2 fragmentos quadrangulares de esmalte com dimensões aproximadas de 3,0 mm (altura) x 3,0 mm (comprimento) x 1,5 mm (espessura). Em seguida, as superfícies do fragmento foram polidas com lixa de carbeto de silício com granulação de #800, #1200 e #4000 (Buehler Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA – Padrão FEPA), seguido de feltro com pasta de Alumina em suspensão de granulometria 0,3 μm (Buehler, Ltd, Lake Buff, Illinois, EUA), com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas. Entre cada série de polimento, os fragmentos foram lavados em água

destilada por 8 minutos em ultrassom (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil). (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Sequência de preparo das amostras realizada após obtenção dos dentes recém-extraídos. A) Obtenção dos dentes. B) Limpeza dos dentes com curetas periodontais e profilaxia com pedra pomes. C) Secção das coroas e raízes. D) Secção de amostras nas faces livres das coroas. E) Obtenção das amostras de 3,0 x 3,0 x 1,5 mm. F) Polimento das amostras na politriz. G) Lavagem das amostras em cuba ultrassônica



Fonte: A autora.

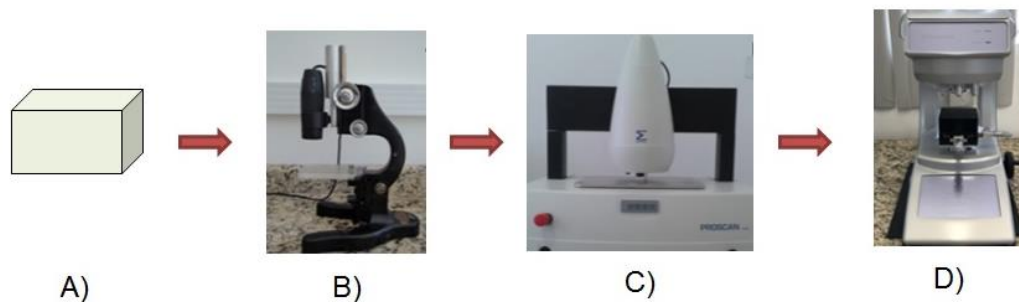
4.5 Seleção das amostras de esmalte para perfilometria

Para seleção das amostras, todos os fragmentos (Figura 4.4A) foram observados em lupa estereoscópica com magnificação de 40x (Figura 4.4B) para excluir a existência de defeitos e trincas no esmalte. Em seguida, realizou-se a análise em perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Tauton, England) para determinação da curvatura da superfície no início da fase experimental (*baseline*), e apenas aquelas com valor de curvatura $<0,3 \mu\text{m}$ foram selecionadas para o estudo (Eisenburger et al., 2003; Turssi et al., 2014) (Figura 4.4C).

Após a perfilometria, seguiu-se com a mensuração da microdureza superficial de cada espécime, a fim de padronizar a dureza do substrato obtido após a sequência de polimento. Para isso, utilizou-se um microdurômetro (Microdurômetro HMV-2000® 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 indentações a 100 μm de distância uma da outra e as médias dos valores de dureza foram consideradas para a seleção, sendo excluídas todas aquelas com um valor médio de microdureza 10% acima ou 10% abaixo da média (320 kg/mm^2) (Figura 4D). A partir desses dados, foram selecionadas 216 amostras para a fase experimental.

Figura 4.4 - Sequência de procedimentos realizados para seleção das amostras. A) Fragmento de esmalte dental 3,0 x 3,0 x 1,0 mm. B) Observação em lupa estereoscópica. C) Análise em perfilômetro óptico. D) Mensuração da dureza superficial em microdurômetro com penetrador Knoop

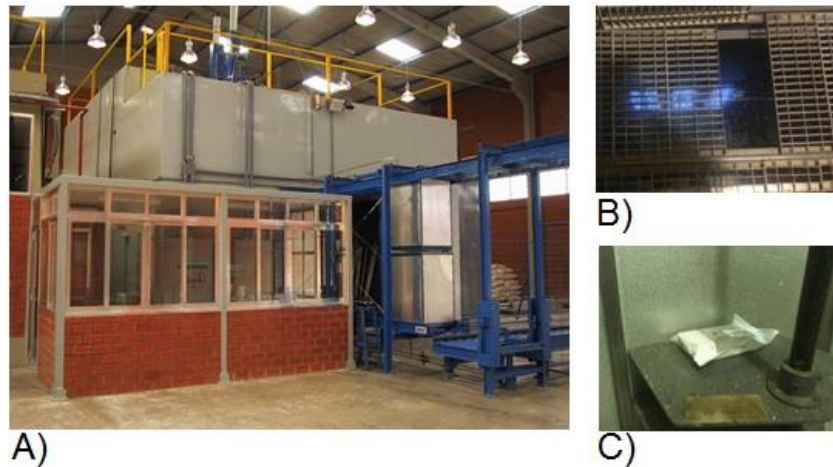


Fonte: A autora.

4.6 Esterilização das amostras

As amostras foram esterilizadas com radiação gama (Wegehaupt et al., 2012), cuja fonte de irradiação consiste de um irradiador multipropósito de Cobalto-60 tipo compacto, com 25 kGy de dose, pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.5).

Figura 4.5 - A) Irradiador multipropósito de Cobalto-60. B) Fontes seladas de Cobalto-60. C) Amostras armazenadas em placas de cultura (duas placas de 96 poços) envoltas com papel grau cirúrgico para esterilização



Fonte: A autora.

4.7 Delimitação da área de estudo

A fim de delimitar a área de estudo para o teste de perfilometria, 2 fitas adesivas de cloreto de polivinil não plastificada (UPVC tapes - Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) foram aplicadas na superfície de cada amostra de esmalte, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 mm de comprimento x 0,75 mm de largura (Mathews et al., 2012). Por fim, todos os espécimes foram armazenados em umidade relativa a 5 °C até o início da fase experimental, e divididos entre a Etapa 1 e Etapa 2.

Figura 4.6 - Amostra com dimensão de 3,0 x 3,0 x 1,0 mm protegida com duas fitas adesivas, delimitando a janela central de 3,0 x 0,75 mm



Fonte: A autora.

4.8 Seleção dos Participantes da Pesquisa

Foram considerados os critérios de inclusão e exclusão (Turssi et al., 2014) dos participantes da pesquisa de acordo com a tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

<i>Critérios de inclusão</i>	<i>Critérios de exclusão</i>
Idade entre 18 e 40 anos	Grávidas ou lactantes
Apresentar boa saúde bucal (ausência de placa bacteriana visível, cavidades, lesões cervicais não cariosas ou doença periodontal)	Estar sob tratamento ortodôntico (usar dispositivo ortodôntico) e próteses fixas ou removíveis
Residir na área urbana do município de São Paulo	Apresentar alergia a produtos de higiene oral
	Uso de medicamentos que interferem no fluxo salivar
	Presença de patologia sistêmica (principalmente doenças associadas à erosão dental)
	Uso sistemático de tabaco e bebidas alcoólicas

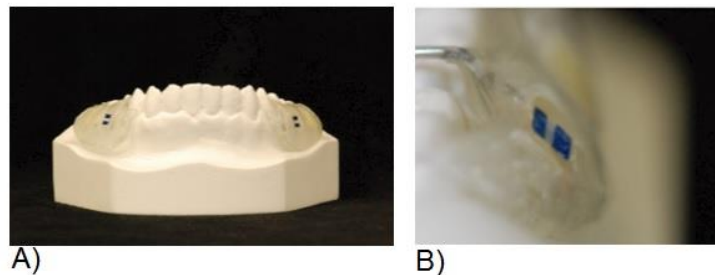
Fonte: a autora.

4.9 Preparo dos Dispositivos Intraorais

Para a confecção dos dispositivos intraorais, os 12 participantes da pesquisa tiveram suas arcadas inferiores moldadas com hidrocolóide irreversível (Jeltrate, Dentsply, York, Pensilvânia, EUA). Foram, então, confeccionados modelos de gesso (Herostone®, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nos quais foram preparados aparelhos intraorais inferiores bilaterais em resina acrílica. Nichos com altura e largura de aproximadamente 4,0 mm e profundidade de 2,0 mm foram realizados

nas faces vestibulares dos dispositivos, nas regiões de pré-molares e molares, bilateralmente (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong et al., 2013) (Figura 4.7A) Os dispositivos foram higienizados em ultrassom com 5 ml de detergente aniônico para 1 L de água destilada e deionizada antes da fixação das amostras nos mesmos para remoção de possíveis resíduos provenientes da fase de confecção. Foram fixadas, com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda, São Paulo, Brasil), 4 amostras no dispositivo, sendo 2 de cada lado, que foram trocadas a cada fase experimental. As superfícies das amostras foram posicionadas com recuo de 1 mm em relação aos limites externos dos nichos, para que não houvesse abrasão pelo contato com a mucosa da bochecha (Figura 4.7B). Os dispositivos foram instalados nos participantes da pesquisa após profilaxia e estes receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo (APÊNDICE A).

Figura 4.7 - A) Dispositivo intraoral bilateral em posição no modelo de gesso. B) Amostra posicionada com recuo em relação ao limite externo do nicho



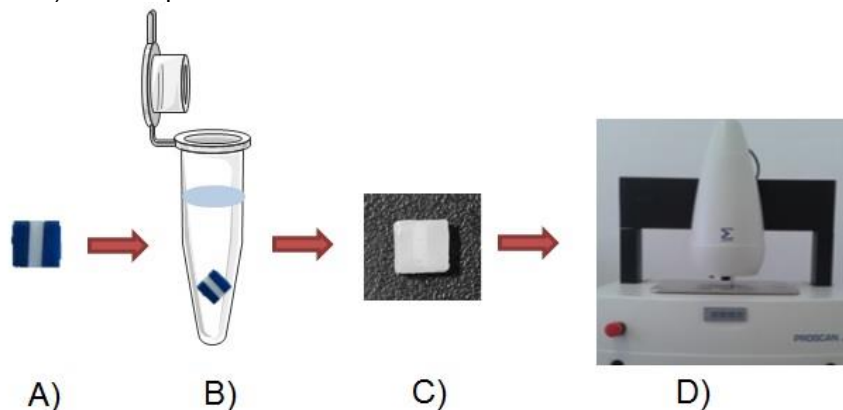
Fonte: A autora.

4.10 Formação da lesão de erosão *in vitro* (apenas para Etapa 2)

Nas amostras da Etapa 2 (Controle da progressão da lesão de erosão), previamente à realização dos tratamentos de superfície, foi induzida a formação de lesão inicial de erosão (perda superficial de aproximadamente 3,0 μm). Após proteção com fitas adesivas (descrito no item 4.8), as amostras foram submetidas a uma imersão em 5 ml de solução de ácido cítrico a 1% (pH 2,3) (Ácido cítrico monohidratado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.11B), em temperatura ambiente, sob constante agitação em mesa agitadora orbital (SK-D3309-Pro LCD Digital 3D Shaker, Scilogex, Berlin, NH, EUA), a 35 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada por 30

segundos, secas com papel absorvente e armazenadas em umidade relativa na geladeira a 4°C até a próxima etapa. Para padronizar a lesão de erosão inicial, uma segunda leitura em perfilômetro óptica foi realizada (Figura 4.11D). Após a remoção da fita, o sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (no eixo X) por 1 mm de largura (eixo Y) no centro do espécime, que corresponde à área tratada e às superfícies de referências de ambos os lados. O aparelho foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm no eixo X e 10 passos de 0,1 mm no eixo Y. A profundidade da lesão (*3-pt step high*) foi calculada por um software específico (ProscanApplication software version 2,0,17), com base na subtração da média da altura da área teste em relação à média da altura das superfícies de referência (Silva et al., 2020). Imediatamente antes da análise, as amostras foram secas com o auxílio de um papel absorvente (Magalhães et al., 2010). Sendo aceitas para o estudo aquelas com perda superficial de aproximadamente 3,0 µm (média obtida: 3,721 µm ±0,416). A partir destes dados, foi realizado teste ANOVA 1-fator que constatou a homogeneidade da distribuição das amostras no baseline ($p > 0,05$).

Figura 4.8 - Sequência de passos para formação da lesão inicial de erosão para amostras da Etapa 2. A) Amostra protegida com fitas adesivas, delimitando janela central de 3,0 x 0,75 mm. B) Amostra submersa em ácido cítrico. C) Amostra após a formação de lesão inicial de erosão. D) Análise perfilométrica da amostra



Fonte: A autora.

4.11 Tratamentos de superfície

As amostras foram tratadas de acordo com o grupo experimental, como segue:

4.11.1 *Sem tratamento (controle negativo)*

As amostras do grupo controle (C) não receberam tratamento de superfície;

4.11.2 *Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (controle positivo)*

Com o dispositivo em boca, os participantes realizaram bochechos com 15 ml da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (800 ppm Sn²⁺, 500 ppm F⁻, pH = 4,5, Elmex® Erosion Protection, GABA Int. AG, Switzerland), por 30 segundos, revezando a solução entre lado direito e esquerdo. Este tratamento foi realizado em horários pré-determinados, sempre posteriormente à primeira imersão diária em ácido cítrico para os participantes da Fase II, em ambas as Etapas;

4.11.3 *Irradiação com Laser de CO₂*

A irradiação das amostras dos grupos de Laser CO₂ (L) foi realizada segundo Silva et al. (2020), em um período prévio à inserção das amostras no dispositivo intraoral, com um laser pulsado de CO₂ (Pulse System, Inc (PSI), modelo LPS-500 (Los Alamos, NM). Este equipamento possui comprimento de onda de 9.3 µm e os parâmetros de irradiação utilizados estão descritos na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Protocolo de irradiação do laser de CO₂

Parâmetros	
Duração de pulso	18 μ s
Taxa de repetição	100 Hz
Densidade de energia	2,21 J/cm ²
Potência (output)	0.69 W
Diâmetro da ponta	0.63 mm
Irrigação de água/ar	ar (baixo resfriamento de ar 25psi)
Modo de irradiação	Focado (15-18 mm da superfície da amostra)

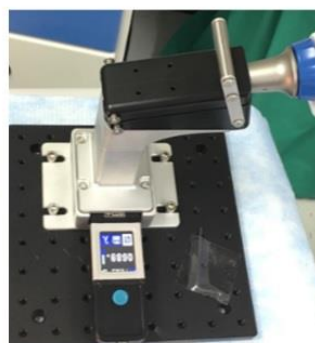
Fonte: A autora.

Para irradiação, as amostras foram inseridas em um dispositivo metálico (Figura 4.8A), promovendo a exposição apenas da janela central de 3,0 x 1,0 mm e a proteção das áreas de referência para a posterior leitura em perfilômetro óptico.

Figura 4.9 - A) Dispositivo metálico utilizado para realização das irradiações das amostras dos grupos L e L+F. B) Aparelho medidor de potência usado a cada 10 irradiações durante o preparo de amostras dos grupos L e L+F



A)



B)

Fonte: A autora.

A cada 10 irradiações, a potência emitida pelo laser foi mensurada usando um medidor de potência (Figura 4.8B) e o tempo irradiação foi de 10 segundos por amostra.

4.11.4 Irradiação com laser de CO₂, associada a solução de AmF/NaF/SnCl₂

Para as amostras do grupo L + F, a irradiação com laser de CO₂ ocorreu como descrito no item 4.12.3, previamente à exposição à solução de AmF/NaF/SnCl₂. Com o dispositivo em boca, os participantes realizaram bochechos com 15 ml da solução de AmF/NaF/SnCl₂ (800 ppm Sn²⁺, 500 ppm F⁻, pH = 4,5, Elmex® Erosion Protection, GABA Int. AG, Switzerland), por 30 segundos, revezando a solução entre lado direito e esquerdo. Este tratamento foi realizado em horários pré-determinados, sempre posteriormente à primeira imersão diária em ácido cítrico para os participantes da Fase II, em ambas as Etapas.

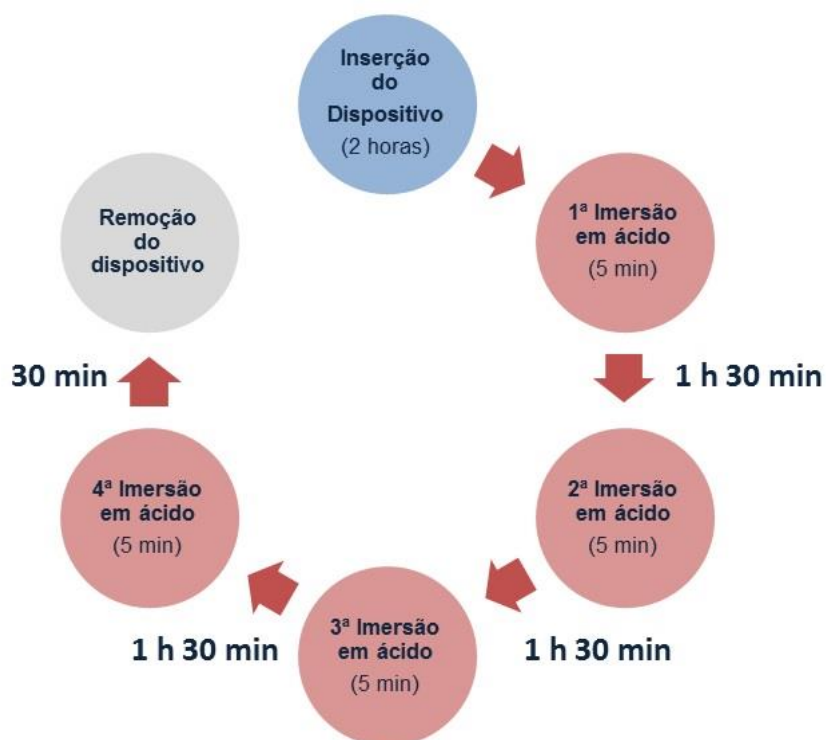
4.12 Desafio Erosivo *in situ*

O tempo de estudo total foi de 3 semanas (Etapas 1 e 2): 2 semanas de período observacional e 1 semana de período wash-out, para que não houvesse efeito residual de flúor. O estudo consistiu em duas fases (Fase I e Fase II) com duração de 5 dias cada.

Durante as fases, em ambas as Etapas, os dispositivos removíveis contendo as amostras de esmalte foram inseridos em boca 2 horas antes do primeiro desafio erosivo para formação de película adquirida (Lendenmann et al., 2000; Hove et al., 2008). As imersões em solução desmineralizadora foram realizadas extraoralmente (*ex-vivo*), com o objetivo de aumentar a padronização do experimento e evitar o contato dos dentes naturais com a solução ácida (Wiegand; Attin, 2011).

Na Fase I, composta por grupos experimentais não expostos à solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Grupos C e L), os participantes realizaram o desafio erosivo por 5 dias consecutivos, 4x/dia, por 5 min com intervalos de 1,5 h entre cada desafio. Para tanto, receberam um recipiente previamente demarcado para a deposição de 20 ml de ácido cítrico a 1,0% (pH 2,3, ácido cítrico mono-hidratado, Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo respeitadas as 2 horas com aparelho em boca previamente à 1ª imersão em ácido (baseado em um estudo anterior do grupo de pesquisa) (Figura 4.9). Após a desmineralização, os participantes de pesquisa foram orientados a secar cuidadosamente os dispositivos com papel absorvente e reinserí-los em boca.

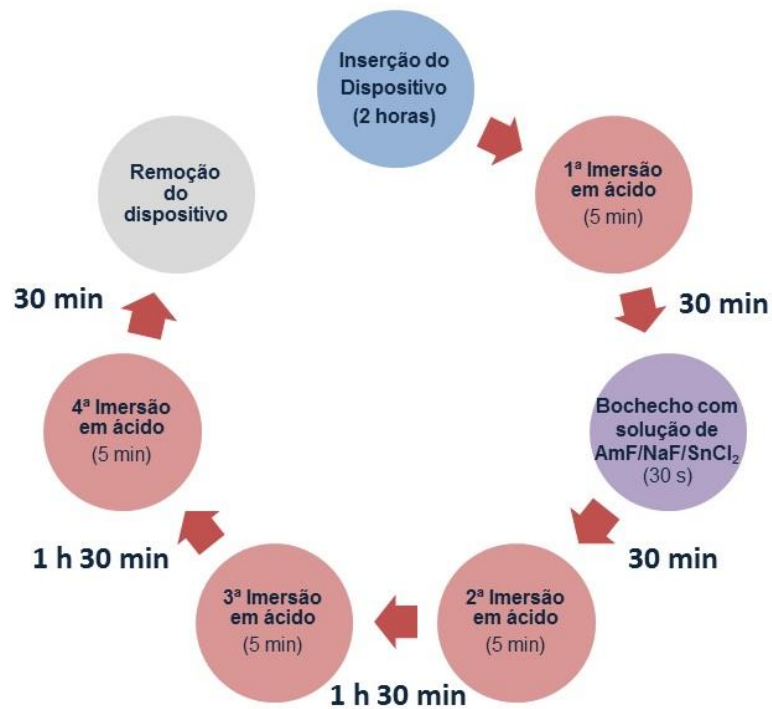
Figura 4.10 - Ciclagem erosiva realizada pelos participantes durante a Fase I do estudo *in situ* (Grupos C e L), em ambas as etapas



Fonte: A autora.

Já para Fase II, composta por grupos experimentais expostos à solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Grupos F e L+F), os participantes realizaram o desafio erosivo também por 5 dias consecutivos, 4x/dia, durante 5 min cada, em 20 ml de ácido cítrico a 1,0%. Após a espera de 2 horas com o dispositivo em boca, os participantes foram instruídos a realizar 1ª imersão em ácido cítrico. Após a espera de 30 min, realizou-se bochechos com 15 ml da solução estanhosa, durante 30 segundos, revezando entre os lados direito e esquerdo. Após 30 minutos seguintes, as imersões restantes foram realizadas (baseado em um estudo anterior do grupo de pesquisa) (Figura 4.10).

Figura 4.11 - Ciclagem erosiva realizada pelos participantes durante a Fase II do estudo *in situ* (Grupos F e L+F), em ambas as etapas



Fonte: A autora.

A solução ácida foi renovada a cada imersão. Os dispositivos foram usados durante o dia, por um período aproximado de 7 horas. À noite, durante as refeições e para a higiene oral os dispositivos foram armazenados em gaze umidificada com água destilada. Os participantes foram orientados a beber apenas água durante o uso dos dispositivos. Após as refeições, ingestão de bebidas e higiene oral, deveriam aguardar 15 minutos para reinserção do dispositivo na boca (Ganss et al., 2004; Schlueter et al., 2009c, 2014).

Durante o estudo *in situ*, todos os participantes realizaram higiene dental sem os dispositivos intraorais, com o auxílio de um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries® com 1.500 ppm F-, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), escova de dentes macia nº. 30 (Colgate Twister Fresh®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), fio dental (Colgate, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), os quais foram doados na forma de kit. O objetivo da doação desses materiais foi de padronizar todos os participantes, que se comprometeram a usar somente esses produtos fornecidos pela pesquisadora durante o período do experimento, evitando a utilização de bochechos e outros produtos de higiene bucal.

Os participantes foram orientados em relação a todos os procedimentos. Eles também receberam um protocolo escrito e um cronograma (APÊNDICE C e D) e instruídos a não consumir alimentos ácidos durante o estudo (APÊNDICE A).

4.13 Análise Perfilométrica

Ao final de cada fase experimental, em ambas as Etapas, as amostras foram removidas cuidadosamente do dispositivo intraoral, as fitas para delimitação de estudo também foram removidas e uma última análise perfilométrica foi realizada, seguindo mesmo protocolo descrito no item 4.10.

Para tanto, as superfícies de esmalte híginas (preservadas pela fita de UPVC) foram utilizadas como referência.

4.14 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A fim de observar as alterações morfológicas da superfície do esmalte após a ciclagem erosiva *in situ*, 3 amostras representativas de cada grupo, selecionadas aleatoriamente, foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução. Para observar o efeito de cada tratamento isolado sobre a superfície do esmalte dental, outras 3 amostras novas, para cada grupo experimental, submetidas apenas aos tratamentos de superfície, foram analisadas através de MEV.

As amostras foram submetidas 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 realizada 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. Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa (37 °C) por mais 24h para posterior revestimento por pulverização com carbono (MED 010, Balzers, BAL-TEC, Liechtenstein). As eletromicrografias foram obtidas no

microscópio Eletrônico de Varredura (FEI, QUANTA FEG 650, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), localizado no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (Poli-USP) (Figura 4.12), operando a 15 kV com aumento de 1.500x.

Figura 4.12 - Microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 650 do LCT – Poli USP



Fonte: A autora.

4.15 Análise estatística dos dados

Todos os participantes completaram o estudo *in situ*. Para cada participante do estudo, foi calculada a média da perda de superfície das duas amostras (duplicata) obtida pela análise perfilométrica, para cada etapa separadamente.

Para ambas as etapas, os dados foram avaliados quanto à homocedasticidade (teste Brown Forsythe, $p > 0,05$) e distribuição normal (teste Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) por meio do software SigmaPlot versão 12.5 (Systat Software, San Jose, CA). Para

Etapa 1, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) 1-fator e, para Etapa 2, submetidos a ANOVA 2-fatores de medidas repetidas. Para comparações múltiplas, empregou-se o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Etapa 1 (Prevenção)

5.1.1 Perfilometria Óptica

A análise inicial dos dados revelou que os mesmos atendiam à homocedasticidade e à distribuição normal. A ANOVA 1-fator demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos propostos neste estudo ($p < 0,001$). O Teste de Tukey mostrou que os grupos L+F e L apresentaram os melhores resultados na prevenção de lesão de erosão, não diferindo entre si. Ambos apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo F, o qual também diferiu do grupo C (sem tratamento) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Perda de superfície (μm) obtida após ciclagem erosiva *in situ* (Etapa 1) (média e desvio padrão)

Tratamento	Perda de superfície
Controle (C)	15.24 (4.08) A
Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (F)	9.05 (4.45) B
Laser de CO₂ (L)	4.59 (2.95) C
Laser de CO₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (L+F)	1.58 (1.24) C

Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Fonte: A autora.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

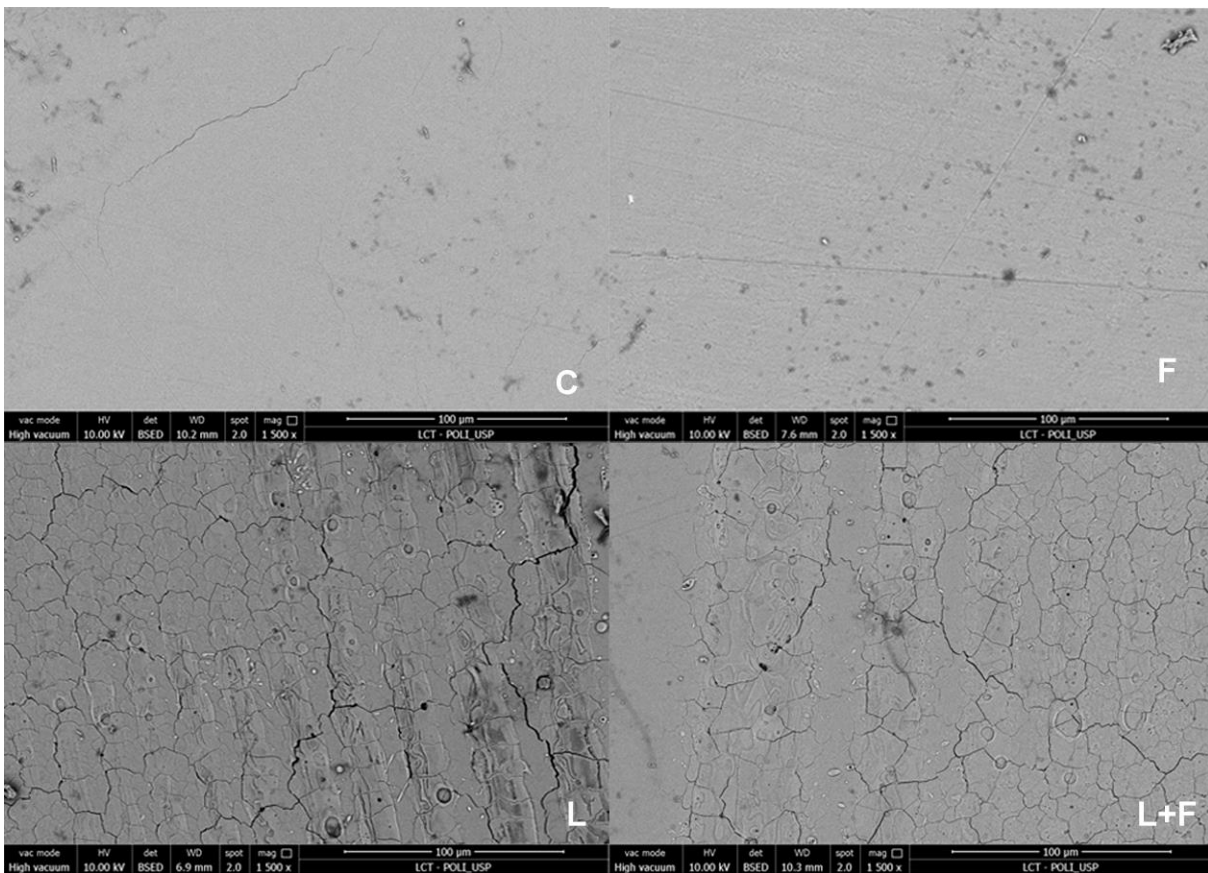
As figuras 5.1 e 5.2 representam as características morfológicas superficiais do esmalte apresentadas pelas amostras dos grupos experimentais na Etapa 1.

As amostras híidas do grupo sem tratamento (grupo C) apresentaram aspecto liso e homogêneo, sem alterações na superfície, assim como as amostras tratadas

com a solução de AmF/NaF/SnCl_2 (grupo F). Já as amostras dos grupos submetidos à irradiação (L e L+F) apresentaram um padrão de superfície craquelada, riscos verticais que indicam possivelmente o efeito da interação entre o feixe de luz laser e o esmalte dental.

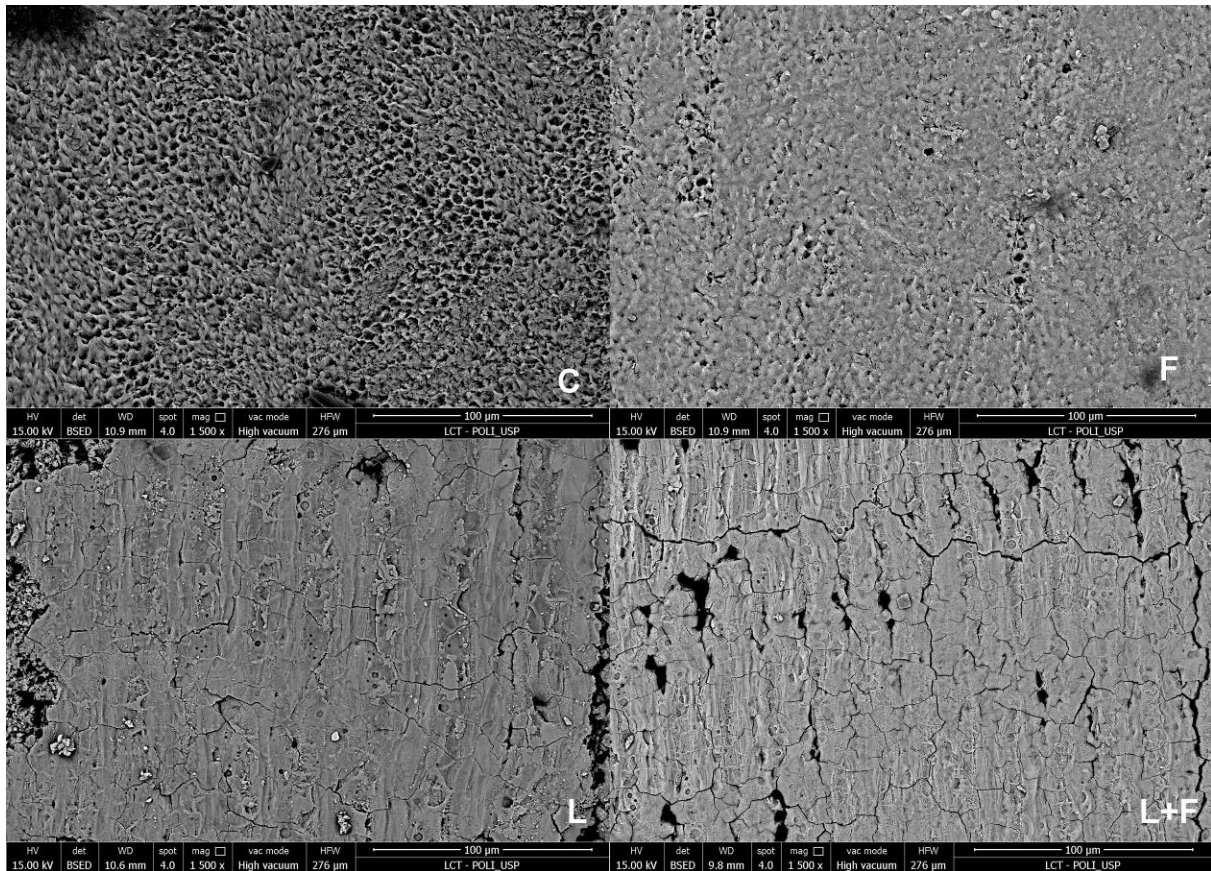
Já nas amostras submetidas à ciclagem erosiva, o Grupo C apresentou uma superfície irregular e rugosa, com aspecto de favo de mel, equivalente a uma superfície erodida. Nas amostras tratadas somente com a solução de AmF/NaF/SnCl_2 (grupo F), observou-se uma superfície com superfície mais homogênea e um padrão de aparente menor de desgaste erosivo se comparado ao grupo C. Nas amostras tratadas com laser, associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl_2 (grupos L e L+F), notou-se um aspecto similar ao encontrado no respectivo grupo de amostras que não foram cicladas, mas de forma mais evidente.

Figura 5.1 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras hígidas submetidas apenas aos tratamentos dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl_2 (F), Laser de CO_2 (L), Laser de CO_2 + Solução de AmF/NaF/SnCl_2 (L+F) (Etapa 1)



Fonte: A autora.

Figura 5.2 - Eletromicrografias obtidas em MEV após ciclagem erosiva *in situ* dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (F), Laser de CO₂ (L), Laser de CO₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (L+F) (Etapa 1)



Fonte: A autora.

5.2 Etapa 2 (Controle da progressão)

5.2.1 Perfilometria Óptica

A análise inicial dos dados revelou que os mesmos atendiam à homocedasticidade e à distribuição normal. Utilizou-se a ANOVA 2-fatores para medidas repetidas, sendo os fatores: *Tempo* (Lesão inicial e Após 5 dias) e *Tratamento de Superfície* (C, F, L e L+F). A análise demonstrou interação significativa entre as variáveis independentes “Tempo” e “Tratamento” ($p < 0,001$). Pela posterior comparação pareada dos tratamentos, por meio do teste de Tukey, observou-se que nenhum dos grupos revelou diferença significativa após formação da lesão inicial de erosão (*in vitro*). No entanto, após 5 dias de ciclagem erosiva *in*

situ, o grupo L+F apresentou melhores resultados no controle da perda de superfície, diferindo dos demais grupos. O grupo L, por sua vez, diferiu do controle negativo (C) e positivo (F), os quais diferiram entre si. A associação do laser e solução fluoretada foi o único tratamento que não demonstrou aumento significativo da perda de superfície após 5 dias quando comparada com a lesão inicial. (tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Perda de superfície (μm) obtida após lesão inicial *in vitro* e após 5 dias de ciclagem erosiva *ex vivo/in situ* (Etapa 2) (média e desvio padrão)

Tratamento	Lesão Inicial	Após 5 dias
Controle	3.91 (0.47) Ab	19.46 (4.29) Aa
Solução de AmF/NaF/SnCl₂	3.78 (0.37) Ab	11.25 (4.10) Ba
Laser CO₂	3.56 (0.31) Ab	8.05 (4.63) Ca
Laser CO₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl₂	3.65 (0.16) Aa	4.99 (1.17) Da

Diferentes letras minúsculas para um mesmo tratamento (entre colunas) representam diferença estatisticamente significante ($p < 0.05$).

Diferentes letras maiúsculas para um mesmo tempo (entre linhas) representam diferença estatisticamente significante ($p < 0.05$).

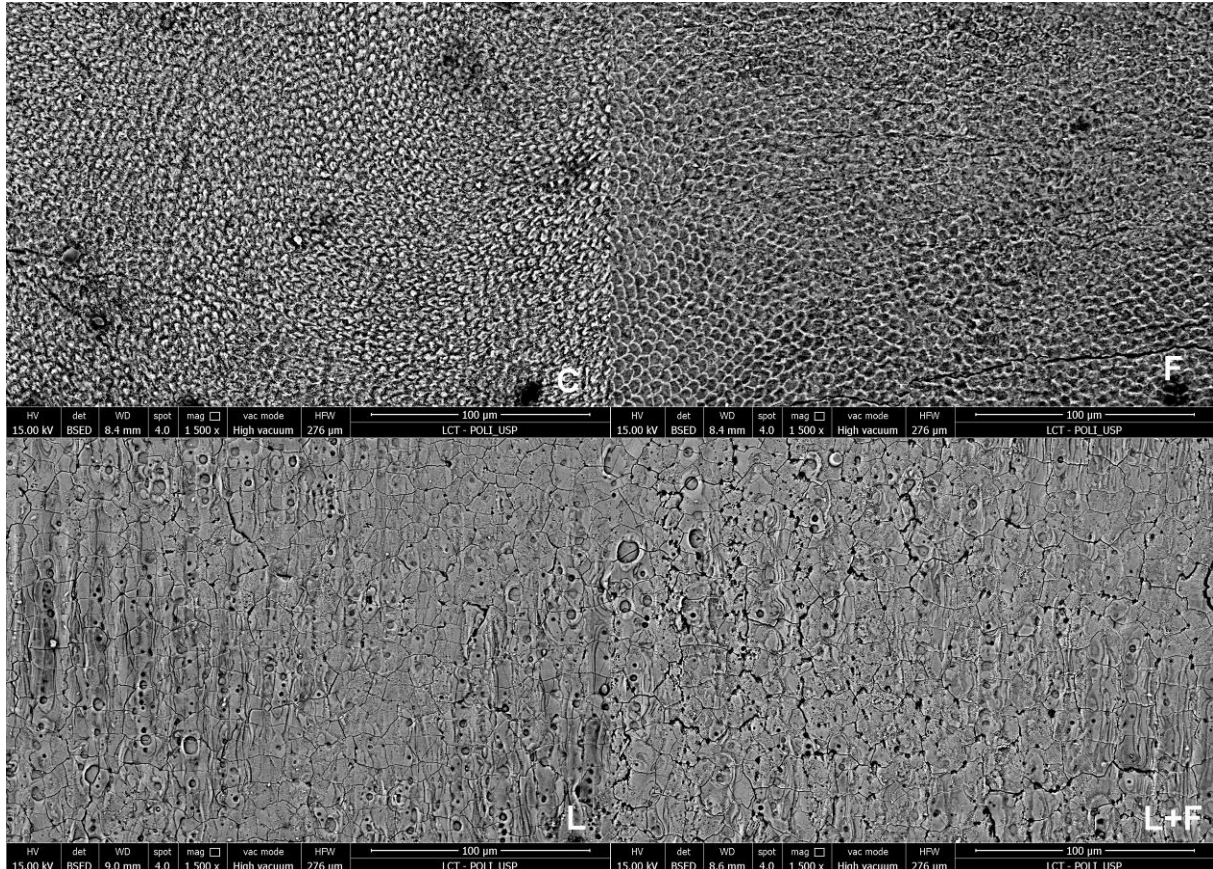
Fonte: A autora.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As figuras 5.3 e 5.4 representam as características morfológicas superficiais do esmalte apresentadas pelas amostras dos grupos experimentais na Etapa 2.

As amostras com lesões iniciais que não foram submetidas à ciclagem (figura 5.3), apresentaram, no grupo sem tratamento (grupo C), uma superfície de aspecto de favo mel, irregular e rugosa, o que corresponde a uma superfície erodida, do mesmo modo que as amostras tratadas com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (grupo F). Já, as amostras irradiadas (L e L+F) apresentaram um padrão semelhante às amostras da Etapa 1, de superfície craquelada e riscos verticais que indicam ser o resultado do efeito da interação do feixe de luz laser com o substrato dental (figura 5.1).

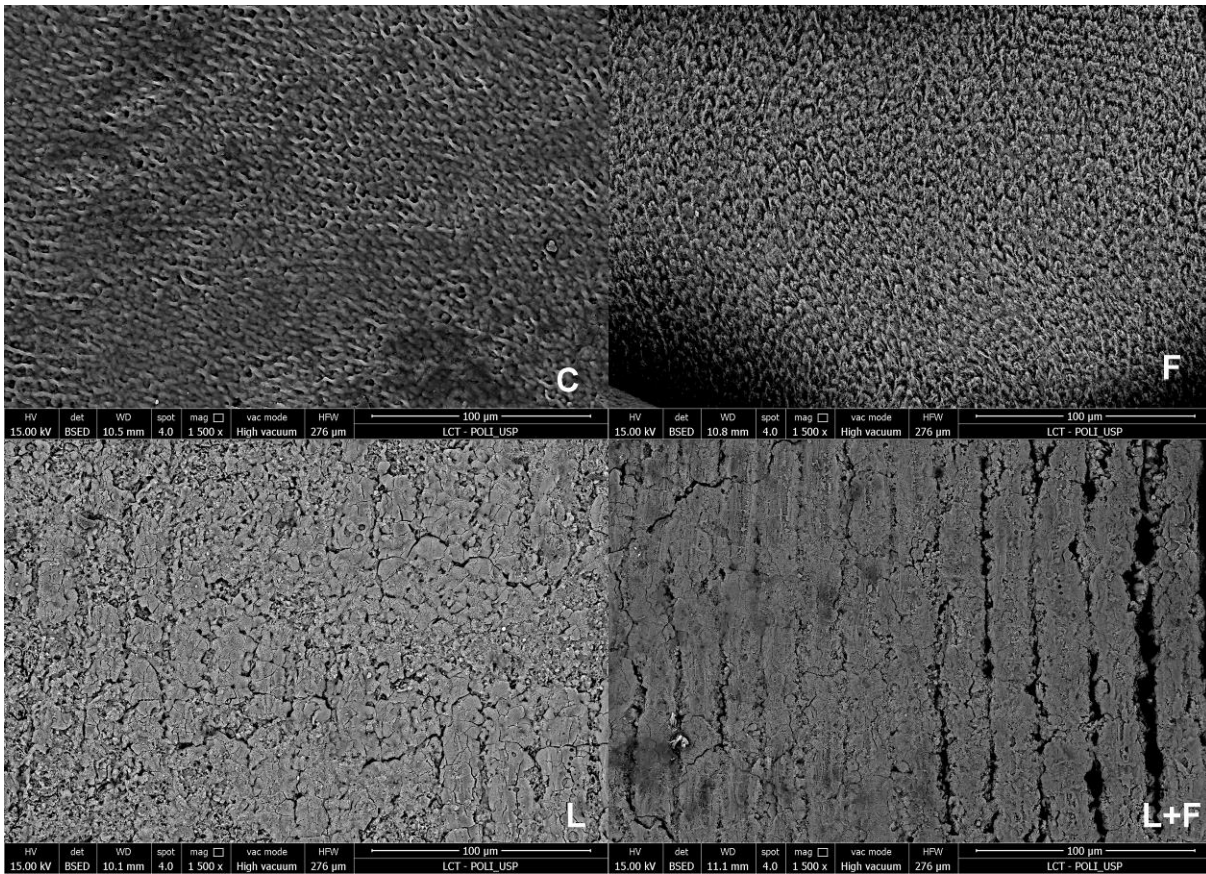
Figura 5.3 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras com lesões iniciais de erosão submetidas apenas aos tratamentos dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (F), Laser de CO₂ (L), Laser de CO₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (L+F) (Etapa 2)



Fonte: A autora.

A figura 5.4, representativa das amostras selecionadas dentre as submetidas aos 5 dias de ciclagem, demonstrou no grupo C uma superfície irregular e rugosa, correspondente a uma superfície erodida, assim como as amostras tratadas somente com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (grupo F). Nas tratadas com laser somente (grupo L) e com associação dos agentes fluoretados (grupo L+F), notou-se um aspecto similar ao encontrado no respectivo grupo de amostras que não foram submetidas aos 5 dias de ciclagem, ainda podendo observar os trajetos da irradiação com o laser, mesmo após a ciclagem, sendo mais evidentes no grupo L + F. Além disso, a área ao redor destes trajetos apresentou sinais iniciais de desgaste erosivo, enquanto a área irradiada se mostrou preservada.

Figura 5.4 - Eletromicrografias obtidas em MEV de amostras com lesões iniciais de erosão após ciclagem erosiva *in situ* dos grupos Controle (C), Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (F), Laser de CO₂ (L), Laser de CO₂ + Solução de AmF/NaF/SnCl₂ (L+F) (Etapa 2)



Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A ocorrência da erosão dental tem sido cada vez mais relatada em diferentes populações em todo o mundo (Isaksson et al., 2014; Jaeggi; Lussi, 2014; Muller-Bolla et al., 2015; Gopinath, 2016; Shahbaz et al., 2016; Mafla et al., 2017; Struzycka et al., 2017; Brusius et al., 2018; Warreth et al., 2020). Assim, faz-se necessária a realização de pesquisas que visem avaliar o efeito de aplicações de tratamentos clínicos para prevenção e controle do desgaste erosivo. A literatura apresenta resultados promissores na redução da desmineralização dental pelo laser de CO₂ e aplicação da solução AmF/NaF/SnCl₂ (Rechmann et al., 2011, 2013; Esteves-Oliveira et al., 2015; Rechmann et al., 2016; Silva et al., 2020). Este estudo *in situ* teve como objetivo avaliar o efeito do laser de CO₂ (9,3 µm), combinado ou não com a solução AmF/ NaF/SnCl₂, na prevenção da formação de erosão ou controle de lesões erosivas existentes no esmalte dental humano.

Para o presente estudo, o ácido cítrico foi escolhido para execução do desafio erosivo por ser o ácido extrínseco mais comumente encontrado na indústria alimentícia e utilizado em estudos de erosão (West et al., 2001; Schlueter et al., 2016), empregado em pH nativo, entre 2,3 e 2,5, evitando influência desse fator nos resultados (Schlueter et al., 2016) e na concentração de 1,0%, (Ganss et al., 2011; Schlueter et al., 2016). Afim de simplificar o modelo experimental *in situ* e contar com maior colaboração dos participantes desta pesquisa, a ciclagem erosiva *in situ* seguiu o protocolo desenvolvido em outro estudo, do mesmo grupo de pesquisa (Silva, 2019), que utilizou o ácido cítrico à 1%, em 4 imersões diárias durante 5 min. A combinação dessa concentração do ácido com a frequência e o tempo de imersões proposta no estudo citado, além de ter simplificado a ciclagem, obteve valores de perda de superfície (20,27 µm ±1,18) próximos aos obtidos (24,03 µm ±0,99) quando realizado os protocolos geralmente encontrados na literatura (imersões em ácido cítrico a 0,5%, 6x ao dia, por 5 min) (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009c).

Há décadas, o uso de agentes fluoretados em lesões cariosas vem sendo estudado (ten Cate; Featherstone, 1991; ten Cate, 1997) e demonstram efetividade na prevenção e controle dessas lesões. Contudo, tais agentes convencionais apresentam efeito limitado no contexto da erosão dental. Por conseguinte, alguns

trabalhos vêm testando o potencial anti-erosivo de compostos fluoretados polivalentes contendo íons metálicos (Schlueter et al., 2009a,b,c,d,e). Dentre eles, o estanho associado a fluoretos se tornou o “padrão ouro” na abordagem da prevenção/control de lesões de erosão dental, sendo esta a solução de AmF/NaF/SnCl₂, encontrada comercialmente em alguns países, destaque entre suas outras formas de apresentação (SnCl₂, SnF₂, AmF/SnF₂) (Schlueter et al., 2009c,e; Ganss et al, 2010a,c). Por esses motivos, foi escolhida como controle positivo para este estudo.

No presente trabalho, a solução de AmF/NaF/SnCl₂ utilizada sozinha foi capaz de reduzir o desgaste da superfície quando comparado ao grupo controle (sem tratamento), tanto na prevenção como no controle da progressão das lesões de erosão, o que corrobora com os resultados de outros estudos *in situ* da literatura (Schlueter et al., 2009c, 2011a; Ganss et al., 2010c; da Silva et al., 2017a; Ramos-Oliveira et al., 2017). Ainda que a solução de AmF/NaF/SnCl₂ tenha revelado resultados superiores ao grupo controle negativo em ambas as Etapas do estudo (Etapas 1 e 2), verificou-se que, na Etapa 2, que a mesma não foi capaz de inibir a perda de superfície em lesões pré-existentes, mas apenas reduziu a sua progressão. Essa redução pode ser justificada pelo mecanismo de ação do estanho associado a fluoretos, que além de formar o fluoreto convencional, composto semelhante a CaF₂ na superfície dental, também forma sais (Ca(SnF₃)₂, Sn₂OHPO₄, Sn₃F₃PO₄), gerando uma camada mais ácido resistente (Wachtel, 1964; Barbakow et al., 1985; Ganss et al., 2008).

Em relação ao protocolo de uso da solução estanhosa, apesar de alguns estudos mostrarem resultados melhores empregando esta solução duas vezes ao dia (Schlueter et al., 2013; Rakhmatullina et al., 2013, da Silva et al., 2017a,b), optou-se por apenas uma exposição ao bochecho diário durante o período experimental, considerando que há estudos que mostraram bons resultados com apenas um contato diário com a solução (Esteves-Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2020). Esse protocolo (bochecho diário, 30 min após a 1ª imersão em ácido) foi considerado seguindo modelo simplificado e de curta duração desenvolvido pelo grupo de pesquisa em estudo anterior (Silva, 2019), em que não houve diferença dos valores de perda tecidual entre o uso da solução 30 min antes (8,00 µm ±4,09) ou depois da 1ª imersão em ácido (8,86 µm ±4,37).

Outras abordagens, também estudadas no controle de processos desmineralizantes, são os lasers de alta potência, sendo os lasers de CO₂ mais elegíveis para esta função (Featherstone; Nelson, 1987; Featherstone et al., 1998; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2002; Al-maliky et al., 2020; Lombardo et al., 2019). A radiação infravermelha emitida por ele coincide com as bandas de absorção da apatita o que lhe confere melhor interação com os tecidos dentais duros (Nelson; Featherstone, 1982). Dentre os comprimentos de onda presentes, os de 9.3 µm e 9.6 µm se destacam pela melhor absorção pelos grupos carbonato e fosfato do esmalte dental (Featherstone; Nelson, 1987; Nelson et al., 1987; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2002) e por terem melhor absorção pela superfície (esmalte) do que o comprimento de onda de 10.6 µm (Nelson et al., 1986; Fried et al., 2002). O laser de CO₂ no comprimento de onda de 9.3 µm foi, então, o escolhido para o presente trabalho devido a seus benefícios descritos.

O laser como tratamento isolado, em ambas as Etapas do estudo, foi capaz de reduzir a perda mineral quando comparado ao grupo controle negativo. Sendo assim, a primeira e segunda hipóteses nulas foram rejeitadas. Entretanto, contrariamente ao que Silva et al. (2020) encontraram em seu estudo *in vitro*, neste trabalho, na Etapa 1 (prevenção da lesão de erosão), o tratamento com o laser de CO₂ (grupo L) foi mais eficaz em reduzir a perda de superfície do que a solução estanhosa (grupo F), assim como na Etapa 2 (controle da progressão da lesão de erosão). As diferenças entre os resultados dos estudos deve-se, provavelmente, ao fato de que o trabalho mencionado foi desenvolvido em modelo *in vitro*, enquanto o presente estudo possuiu um modelo *in situ*, apresentando a saliva como fator de proteção, por meio da formação da película adquirida (Carvalho et al., 2016; Buzalaf et al., 2018a). Ainda, fatores extrínsecos como, por exemplo, a variação entre a forma e intensidade com que o bochecho da solução é realizado, mesmo havendo instrução padronizada para todos os participantes, pode interferir nos achados. O modelo *in situ* é considerado, portanto, um modelo mais preciso por se aproximar das condições clínicas para o surgimento de lesões de erosão.

Outros estudos da literatura não encontraram a eficácia do laser de dióxido de carbono utilizado sozinho (Steiner-Oliveira et al., 2010; Wiegand et al., 2010b; Jordão et al., 2016), o que sugere que o protocolo utilizado neste estudo, com baixa densidade de energia, pode ter favorecido o efeito benéfico encontrado. Alguns autores demonstraram melhores resultados do laser de CO₂ em baixas fluências,

modo pulsado e duração curta dos pulsos no uso preventivo de processos desmineralizantes (Featherstone et al. 1998; Esteves-Oliveira et al., 2009; Rechmann et al., 2013; Chan et al., 2014; Rechmann et al., 2016). Esse protocolo não gerou danos à estrutura dental, como pode ser observado nas eletromicrografias obtidas após o tratamento.

A fim de buscar resultados ainda melhores, pesquisadores vêm estudando o efeito da associação de fluoretos e laser de CO₂ contra a desmineralização de tecidos dentais. Pela diversidade de protocolos utilizados, não há consenso na literatura sobre a irradiação do laser previamente ou após a aplicação de agentes fluoretados. Alguns autores obtiveram efeitos positivos quando a irradiação do tecido foi feita posteriormente à aplicação do agente fluoretado (Steiner-Oliveira et al., 2010; Esteves-Oliveira et al., 2011). Entretanto, seguindo protocolo viável ao modelo *in situ*, envolvendo o uso de soluções pelos participantes, e estudos realizados pelo grupo de pesquisa (Silva et al., 2020), optou-se pela aplicação prévia do laser.

Para ambas as Etapas da pesquisa, prevenção ou controle da progressão das lesões de erosão, os grupos que apresentaram menor desgaste da superfície foram aqueles submetidos à irradiação e bochechos com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (grupo L+F). Sendo assim, as terceira e quarta hipóteses nulas foram rejeitadas. Na Etapa 1 (prevenção da lesão de erosão), esse grupo apresentou resultado semelhante (1,58 µm ± 1,24) ao encontrado por Silva e colaboradores (2020) (1,48 µm ± 0,88). Apesar de apresentar os menores valores de perda de superfície, não se diferenciou do grupo tratado apenas com o laser de de CO₂. Na Etapa 2 (controle da progressão da lesão de erosão), o desgaste encontrado foi um pouco maior do que na Etapa 1, conforme era esperado (4,99 µm ± 1,17), já que houve formação de lesões iniciais de erosão previamente à ciclagem erosiva. Interessante verificar que, na Etapa 2, o tratamento com laser associado à solução estanhosa demonstrou-se muito eficaz, sendo o único a não demonstrar diferença de perda de superfície entre as lesões formadas inicialmente e ao final do experimento, comprovando seu efeito de inibição da progressão do desgaste erosivo em esmalte. Esse achado pode ser fundamentado pela formação de uma superfície dental menos solúvel a ácidos (Fowler; Kuroda, 1986; Featherstone; Nelson 1987; Featherstone et al., 1998), gerada por meio de alterações na estrutura química do esmalte decorrentes do aumento de temperatura e pela melhoria da captação de flúor no esmalte, pela combinação da irradiação com o uso da solução estanhosa. Os resultados de perda

de superfície se relacionam com as alterações morfológicas de superfície, nas quais é possível observar a diferença no padrão morfológico, com áreas alteradas pela interação do feixe de luz com o substrato, sendo que no grupo em que houve associação de tratamentos, esse padrão ainda pode ser observado, quase intacto, mesmo após ser submetido à ciclagem erosiva.

O presente estudo mostrou efeitos promissores da associação do laser de dióxido de carbono com a solução de AmF/NaF/SnCl₂ na prevenção e controle da progressão da lesão de erosão em esmalte dental humano, utilizando-se de uma ciclagem erosiva considerada severa. No entanto, outros estudos *in situ* devem ser conduzidos para corroborar com os resultados aqui obtidos. Estudos futuros que alterem o período de aplicação das soluções e considerem a análise dos efeitos desses tratamentos a longo prazo e com fatores adicionais, como forças abrasivas, podem encontrar resultados que somem informações importantes ao presente achado.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo *in situ*, conclui-se que protocolo de laser de CO₂ (9.3 μm) foi capaz de prevenir e controlar a progressão da lesão de erosão dental em esmalte dental humano, sendo mais eficaz quando associado à solução de AmF/NaF/SnCl₂, principalmente, no controle da progressão desta lesão.

REFERÊNCIAS

Addy M, Shellis RP. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:17-31. doi: 10.1159/000093348.

Al-Maliky MA, Frentzen M, Meister J. Laser-assisted prevention of enamel caries: a 10-year review of the literature. *Lasers Med Sci.* 2020 Feb;35(1):13-30. doi: 10.1007/s10103-019-02859-5.

Alexandria AK, Nassur C, Nobrega CBC, Valenca AMG, Rosalen PL, Maia LC. In situ effect of titanium tetrafluoride varnish on enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2017 Nov 6;31:e86. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0086.

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. doi: 10.1177/00220345990780120901.

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

Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Res.* 2012;46(5):441-51. doi: 10.1159/000333603.

Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli Jdos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J.* 2012;23(2):104-9. doi: 10.1590/s0103-64402012000200003.

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

Bahrololoomi Z, Fotuhi Ardakani F, Sorouri M. In Vitro Comparison of the Effects of Diode Laser and CO2 Laser on Topical Fluoride Uptake in Primary Teeth. *J Dent (Tehran).* 2015 Aug;12(8):585-91.

Barbakow F, Lutz F, Sener B. In vitro dissolution of human enamel after application of a mixture of stannous fluoride and amine fluoride 297: a pilot study. *ASDC J Dent Child*. 1985 Nov-Dec;52(6):444-8.

Barbakow F, Lutz F, Scherle W, Ransberger M. Solubility changes of human enamel treated with precipitate-free, aged SnF₂/amine fluoride 297 solutions. *ASDC J Dent Child*. 1986 Nov-Dec;53(6):415-9.

Barbakow F, Sener B, Lutz F. Dissolution of phosphorus from human enamel pretreated in vitro using SnF₂ stabilized with amine fluoride 297. *Clin Prev Dent*. 1987 Sep-Oct;9(5):3-6.

Barbosa CS, Montagnolli LG, Kato MT, Sampaio FC, Buzalaf MA. Calcium glycerophosphate supplemented to soft drinks reduces bovine enamel erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Jul-Aug;20(4):410-3. doi: 10.1590/s1678-77572012000400004.

Barbour ME, Rees GD. The role of erosion, abrasion and attrition in tooth wear. *J Clin Dent*. 2006;17(4):88-93.

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

Belcheva A, El Feghali R, Nihtianova T, Parker S. Effect of the carbon dioxide 10,600-nm laser and topical fluoride gel application on enamel microstructure and microhardness after acid challenge: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2018 Jul;33(5):1009-17. doi: 10.1007/s10103-018-2446-4.

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. doi: 10.1111/cdoe.12322.

Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Sep-Oct;20(5):493-502. doi: 10.1590/s1678-77572012000500001.

Buzalaf MAR, Magalhaes AC, Rios D. Prevention of erosive tooth wear: targeting nutritional and patient-related risks factors. *Br Dent J*. 2018a Mar 9;224(5):371-8. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.173.

Buzalaf MAR. Review of Fluoride Intake and Appropriateness of Current Guidelines. *Adv Dent Res*. 2018b Mar;29(2):157-66. doi: 10.1177/0022034517750850.

Carlen A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res.* 1998;32(6):447-55. doi: 10.1159/000016486.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, et al. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. *Caries Res.* 2014;48(5):361-7. doi: 10.1159/000356973.

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, et al. 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.

Carvalho TS, Baumann T, Lussi A. In vitro salivary pellicles from adults and children have different protective effects against erosion. *Clin Oral Investig.* 2016 Nov;20(8):1973-9. doi: 10.1007/s00784-015-1703-1.

Chan KH, Tom H, Fried D. Monitoring the inhibition of erosion by a CO2 laser with OCT. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2014 Feb 18;8929:89290F. doi: 10.1117/12.2045679.

Chang NN, Jew JM, Simon JC, Chen KH, Lee RC, Fried WA, et al. Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4 μm on surface morphology, permeability, and acid resistance. *Lasers Surg Med.* 2017 Dec;49(10):913-27. doi: 10.1002/lsm.22700.

Cheib Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res.* 2011;45(2):107-12. doi: 10.1159/000324803.

Chen KH, Tam KW, Chen IF, Huang SK, Tzeng PC, Wang HJ, et al. A systematic review of comparative studies of CO2 and erbium:YAG lasers in resurfacing facial rhytides (wrinkles). *J Cosmet Laser Ther.* 2017 Aug;19(4):199-204. doi: 10.1080/14764172.2017.1288261.

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.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomao PA, Grizzo LT, Magalhaes AC. Effect of NaF, SnF(2), and TiF(4) Toothpastes on Bovine Enamel and Dentin Erosion-Abrasion In Vitro. *Int J Dent*. 2012;2012:134350. doi: 10.1155/2012/134350.

Comar LP, Cardoso Cde A, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MA, Magalhaes AC. TiF4 and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression in vitro. *J Appl Oral Sci*. 2015 Jan-Feb;23(1):14-8. doi: 10.1590/1678-775720140124.

Cooley W. Reactions of tin(II) and fluoride ions with etched enamel. *J Dent Res*. 1961;40.

Correa-Afonso AM, Bachmann L, Almeida CG, Corona SA, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO2 laser irradiated human enamel. *Arch Oral Biol*. 2012a Sep;57(9):1153-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.004.

Correa-Afonso AM, Ciconne-Nogueira JC, Pecora JD, Palma-Dibb RG. In vitro assessment of laser efficiency for caries prevention in pits and fissures. *Microsc Res Tech*. 2012b Feb;75(2):245-52. doi: 10.1002/jemt.21050.

Correa-Afonso AM, Pecora JD, Palma-Dibb RG. Influence of laser irradiation on pits and fissures: an in situ study. *Photomed Laser Surg*. 2013 Feb;31(2):82-9. doi: 10.1089/pho.2012.3304.

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.

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 Health Prev Dent*. 2017b;15(4):365-70. doi: 10.3290/j.ohpd.a38739.

Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc*. 2003 Dec;69(11):722-4. doi:

Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008 May;139 Suppl:18S-24S. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0351.

de Freitas PM, Rapozo-Hilo M, Eduardo Cde P, Featherstone JD. In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-treated enamel demineralization. *Lasers Med Sci.* 2010 Mar;25(2):165-70. doi: 10.1007/s10103-008-0597-4.

de Oliveira RM, de Souza VM, Esteves CM, de Oliveira Lima-Arsati YB, Cassoni A, Rodrigues JA, et al. Er,Cr:YSGG Laser Energy Delivery: Pulse and Power Effects on Enamel Surface and Erosive Resistance. *Photomed Laser Surg.* 2017 Nov;35(11):639-46. doi: 10.1089/pho.2017.4347.

Dionysopoulos D, Tolidis K, Strakas D, Sfeikos T. Evaluation of a clinical preventive treatment using Er,Cr:YSGG (2780 nm) laser on the susceptibility of enamel to erosive challenge. *Lasers Med Sci.* 2019 Aug;34(6):1089-97. doi: 10.1007/s10103-018-2679-2.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.

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. doi: 10.1159/000073399.

Ellingsen JE. Scanning electron microscope and electron microprobe study of reactions of stannous fluoride and stannous chloride with dental enamel. *Scand J Dent Res.* 1986 Aug;94(4):299-305. doi: 10.1111/j.1600-0722.1986.tb01767.x.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, et al. CO₂ Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res.* 2009;43(4):261-8. doi: 10.1159/000217858.

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, Witulski N, Hilgers RD, Apel C, Meyer-Lueckel H, Eduardo Cde P. 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, et al. A New Laser-Processing Strategy for Improving Enamel Erosion Resistance. *J Dent Res*. 2017 Sep;96(10):1168-75. doi: 10.1177/0022034517718532.

Faller RV, Eversole SL, Tzeghai GE. Enamel protection: a comparison of marketed dentifrice performance against dental erosion. *Am J Dent*. 2011 Aug;24(4):205-10.

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

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

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

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

Fowler BO, 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. doi: 10.1007/bf02556711.

Fried D, Glana RE, Featherstone JD, 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 microns and at fluences of $1-20 \text{ J/cm}^2$. *Lasers Surg Med*. 1997;20(1):22-31. doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1997)20:1<22::aid-lsm4>3.0.co;2-0.

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

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schurmann 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, 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, 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, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res.* 2010a;44(3):248-52. doi: 10.1159/000314671.

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.* 2010b 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.* 2010c Nov;89(11):1214-8. doi: 10.1177/0022034510375291.

Ganss C, Young A, Lussi A. Tooth wear and erosion: methodological issues in epidemiological and public health research and the future research agenda. *Community Dent Health.* 2011 Sep;28(3):191-5.

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, Lussi A, Peutzfeldt A, Naguib Attia N, Schlueter N. Impact of Sn/F Pre-Treatments on the Durability of Protective Coatings against Dentine Erosion/Abrasion. *PLoS One.* 2015;10(6):e0123889. doi: 10.1371/journal.pone.0123889.

Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Palma-Dibb RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):33-9. doi: 10.1007/s10103-012-1056-9.

Gonzalez-Rodriguez A, de Dios Lopez-Gonzalez J, del Castillo Jde D, Villalba-Moreno J. Comparison of effects of diode laser and CO2 laser on human teeth and their usefulness in topical fluoridation. *Lasers Med Sci.* 2011 May;26(3):317-24. doi: 10.1007/s10103-010-0784-y.

Goodis HE, Fried D, Gansky S, Rechmann P, Featherstone JD. Pulpal safety of 9.6 microm TEA CO2 laser used for caries prevention. *Lasers Surg Med.* 2004;35(2):104-10. doi: 10.1002/lsm.20043.

Hannig C, Becker K, Hausler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol.* 2007 May;52(5):444-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.10.015.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res.* 2001 Mar-Apr;35(2):142-8. doi: 10.1159/000047446.

Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci.* 2006;19:29-64. doi: 10.1159/000090585.

Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:197-205. doi: 10.1159/000360372.

Harpenau LA, Noble WH, Kao RT. Diagnosis and management of dental wear. *J Calif Dent Assoc.* 2011 Apr;39(4):225-31.

Hattab FN, Yassin OM. Etiology and diagnosis of tooth wear: a literature review and presentation of selected cases. *Int J Prosthodont.* 2000 Mar-Apr;13(2):101-7.

Hemingway CA, Shellis RP, Parker DM, Addy M, Barbour ME. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by ovalbumin as a function of pH, calcium concentration, protein concentration and acid type. *Caries Res.* 2008;42(5):348-53. doi: 10.1159/000151440.

Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF4, SnF2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. *Caries Res.* 2006;40(5):440-3. doi: 10.1159/000094291.

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.

Hsu CY, 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.

Isaksson H, Birkhed D, Wendt LK, Alm A, Nilsson M, Koch G. Prevalence of dental erosion and association with lifestyle factors in Swedish 20-year olds. *Acta Odontol Scand.* 2014 Aug;72(6):448-57. doi: 10.3109/00016357.2013.859727.

Johansson AK, Lingstrom P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 2004 Dec;112(6):484-9. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00172.x.

Jordan TH, Wei SH, Bromberger SH, King JC. Sn₃-F₃-PO₄: the product of the reaction between stannous fluoride and hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1971 Mar;16(3):241-6. doi: 10.1016/0003-9969(71)90017-3.

Jordao MC, Forti GM, Navarro RS, Freitas PM, Honorio 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 Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc.* 1998 May;129(5):585-91. doi: 10.14219/jada.archive.1998.0276.

Karandish M. The efficiency of laser application on the enamel surface: a systematic review. *J Lasers Med Sci.* 2014 Summer;5(3):108-14.

Kawasaki K, Tanaka Y, Takagi O. Crystallographic analysis of demineralized human enamel treated by laser-irradiation or remineralization. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):797-804. doi: 10.1016/s0003-9969(00)00034-0.

Kim JW, Lee R, Chan KH, Jew JM, Fried D. Influence of a pulsed CO₂ 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.

Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, 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.

Kuroda S, Fowler BO. Compositional, structural, and phase changes in in vitro laser-irradiated human tooth enamel. *Calcif Tissue Int.* 1984 Jul;36(4):361-9. doi: 10.1007/bf02405347.

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

Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):229-34. doi: 10.1159/000047461.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.* 2000 Dec;14:22-8. doi: 10.1177/08959374000140010301.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SA. 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.

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

Loke C, Lee J, Sander S, Mei L, Farella M. Factors affecting intra-oral pH - a review. *J Oral Rehabil.* 2016 Oct;43(10):778-85. doi: 10.1111/joor.12429.

Lombardo G, Pagano S, Cianetti S, Capobianco B, Orso M, Negri P, et al. Sub-ablative laser irradiation to prevent acid demineralisation of dental enamel. A systematic review of literature reporting in vitro studies. *Eur J Paediatr Dent.* 2019 Dec;20(4):295-301. doi: 10.23804/ejpd.2019.20.04.07.

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.

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.

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

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:1-15. doi: 10.1159/000360380.

Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:18-29. doi: 10.1159/000380886.

Macdonald E, North A, Maggio B, Sufi F, Mason S, Moore C, et al. Clinical study investigating abrasive effects of three toothpastes and water in an in situ model. *J Dent.* 2010 Jun;38(6):509-16. doi: 10.1016/j.jdent.2010.03.007.

Magalhaes AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of a single application of TiF(4) and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent.* 2010 Feb;38(2):153-7. doi: 10.1016/j.jdent.2009.09.015.

Magalhaes AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, et al. 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.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011b;22:158-70. doi: 10.1159/000325167.

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

Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Chong LY. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Jun 15(6):CD002280. doi: 10.1002/14651858.CD002280.pub2.

Mathews MS, Amaechi BT, Ramalingam K, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu IP, Mackey AC, et al. 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 JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):199-206. doi: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00068.x.

Meurman JH, Hemmerle J, Voegel JC, Rauhamaa-Makinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO₂ laser. *Caries Res.* 1997;31(5):397-400. doi: 10.1159/000262425.

Min JH, Kwon HK, Kim BI. The addition of nano-sized hydroxyapatite to a sports drink to inhibit dental erosion: in vitro study using bovine enamel. *J Dent.* 2011 Sep;39(9):629-35. doi: 10.1016/j.jdent.2011.07.001.

Mirhashemi AH, 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: An In Vitro Study. *J Lasers Med Sci.* 2016 Summer;7(3):192-6. doi: 10.15171/jlms.2016.33.

Mühlemann HR SU. Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilized with amine fluoride. *Caries Res.* 1981;15.

Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. *J Dent Res.* 1972 Nov-Dec;51(6):1567-71. doi: 10.1177/00220345720510061001.

Murakami H, Sly WS. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J Biol Chem.* 1987 Jan 25;262(3):1382-8.

Naganagowda GA, Gururaja TL, Levine MJ. Delineation of conformational preferences in human salivary statherin by ¹H, ³¹P NMR and CD studies: sequential assignment and structure-function correlations. *J Biomol Struct Dyn.* 1998 Aug;16(1):91-107. doi: 10.1080/07391102.1998.10508230.

Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res.* 2003 May-Jun;37(3):225-31. doi: 10.1159/000070449.

Nelson DG, Featherstone JD. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. *Calcif Tissue Int.* 1982;34 Suppl 2:S69-81.

Nelson DG, Shariati M, Glana R, Shields CP, Featherstone JD. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. *Caries Res.* 1986;20(4):289-99. doi: 10.1159/000260948.

Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JD. 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.

Noureldin A, Quintanilla I, Kontogiorgos E, Jones D. Enamel-Caries Prevention Using Two Applications of Fluoride-Laser Sequence. *Tex Dent J.* 2016 Mar;133(3):184-9.

O'Sullivan E, Milosevic A, British Society of Paediatric D. UK National Clinical Guidelines in Paediatric Dentistry: diagnosis, prevention and management of dental erosion. *Int J Paediatr Dent.* 2008 Nov;18 Suppl 1:29-38. doi: 10.1111/j.1365-263X.2008.00936.x.

Olley RC, Pilecki P, Hughes N, Jeffery P, Austin RS, Moazzez R, et al. An in situ study investigating dentine tubule occlusion of dentifrices following acid challenge. *J Dent.* 2012 Jul;40(7):585-93. doi: 10.1016/j.jdent.2012.03.008.

Paulos RS, Seino PY, Fukushima KA, Marques MM, de Almeida FCS, Ramalho KM, et al. Effect of Nd:YAG and CO₂ Laser Irradiation on Prevention of Enamel Demineralization in Orthodontics: In Vitro Study. *Photomed Laser Surg.* 2017 May;35(5):282-6. doi: 10.1089/pho.2016.4235.

Pereira L, Joao-Souza SH, Bezerra S, Borges AB, Aranha A, Scaramucci T. Nd:YAG laser irradiation associated with fluoridated gels containing photo absorbers in the prevention of enamel erosion. *Lasers Med Sci.* 2017 Sep;32(7):1453-9. doi: 10.1007/s10103-017-2226-6.

Preston AJ, Edgar WM. Developments in dental plaque pH modelling. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):209-22. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.008.

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

Ramalho KM, Eduardo Cde P, Heussen N, Rocha RG, Lampert F, Apel C, et al. Protective effect of CO₂ laser (10.6 μm) and fluoride on enamel erosion in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):71-8. doi: 10.1007/s10103-012-1071-x.

Ramalho KM, Eduardo CP, Heussen N, Rocha RG, Meyer-Lueckel H, Lampert F, et al. Randomized in situ study on the efficacy of CO₂ laser irradiation in increasing enamel erosion resistance. *Clin Oral Investig*. 2019 May;23(5):2103-12. doi: 10.1007/s00784-018-2648-y.

Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Nunes PM, Turssi CP, Rechmann P, Freitas PM. AmF/NaF/SnCl₂ solution reduces in situ enamel erosion - profilometry and cross-sectional nanoindentation analysis. *Braz Oral Res*. 2017 Mar 6;31:e20. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0020.

Raucci-Neto W, de Castro-Raucci LM, Lepri CP, Faraoni-Romano JJ, Gomes da Silva JM, Palma-Dibb RG. Nd:YAG laser in occlusal caries prevention of primary teeth: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):761-8. doi: 10.1007/s10103-013-1417-z.

Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BM, et al. 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, Charland DA, Rechmann BM, Le CQ, Featherstone JD. 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, Rechmann BM, Groves WH, Jr., Le CQ, Rapozo-Hilo ML, Kinsel R, et al. 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.

Rechmann P, Le CQ, Kinsel R, Kerbage C, Rechmann BMT. In vitro CO₂ 9.3- μ m short-pulsed laser caries prevention-effects of a newly developed laser irradiation pattern. *Lasers Med Sci*. 2020 Jan 3. doi: 10.1007/s10103-019-02940-z.

Rodrigues LK, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent*. 2004 Sep;32(7):531-40. doi: 10.1016/j.jdent.2004.04.004.

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

Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res*. 1988 Dec;96(6):523-35. doi: 10.1111/j.1600-0722.1988.tb01592.x.

Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. *J Dent*. 2011 Dec;39(12):841-8. doi: 10.1016/j.jdent.2011.09.004.

Scatolin RS, Alonso-Filho FL, Galo R, Rios D, Borsatto MC, Corona SA. CO(2) laser emission modes to control enamel erosion. *Microsc Res Tech*. 2015 Aug;78(8):654-9. doi: 10.1002/jemt.22518.

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. doi: 10.1159/000098048.

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.2009.01.019.

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 Dec;37(12):944-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.010.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res*. 2009c;43(6):415-21. doi: 10.1159/000252974.

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

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*. 2009e;43(1):10-6. doi: 10.1159/000189702.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. *Clin Oral Investig*. 2011 Jun;15(3):361-7. doi: 10.1007/s00784-010-0386-x.

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

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

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

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn²⁺-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy--a controlled randomised in situ trial. *Clin Oral Investig.* 2014 Jan;18(1):107-15. doi: 10.1007/s00784-013-0941-3.

Schlueter N, Lussi A, Tolle A, Ganss C. Effects of Erosion Protocol Design on Erosion/Abrasion Study Outcome and on Active Agent (NaF and SnF₂) Efficacy. *Caries Res.* 2016;50(2):170-9. doi: 10.1159/000445169.

Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. 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.

Seino PY, Freitas PM, Marques MM, de Souza Almeida FC, Botta SB, Moreira MS. Influence of CO₂ (10.6 μm) and Nd:YAG laser irradiation on the prevention of enamel caries around orthodontic brackets. *Lasers Med Sci.* 2015 Feb;30(2):611-6. doi: 10.1007/s10103-013-1380-8.

Seong J, Macdonald E, Newcombe RG, Davies M, Jones SB, Johnson S, et al. In situ randomised trial to investigate the occluding properties of two desensitising toothpastes on dentine after subsequent acid challenge. *Clin Oral Investig.* 2013 Jan;17(1):195-203. doi: 10.1007/s00784-012-0683-7.

Shah S, Kosoric J, Hector MP, Anderson P. An in vitro scanning microradiography study of the reduction in hydroxyapatite demineralization rate by statherin-like peptides as a function of increasing N-terminal length. *Eur J Oral Sci.* 2011 Dec;119 Suppl 1:13-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00899.x.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:32-45. doi: 10.1159/000359936.

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

Silva CV. Influência da película adquirida e do momento da aplicação da solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da lesão de erosão em esmalte [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019.

Silva CV, Mantilla TF, Engel Y, Tavares JP, Freitas PM, 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 Feb 7. doi: 10.1007/s10103-020-02979-3.

Souza-Gabriel AE, Colucci V, Turssi CP, Serra MC, Corona SA. Microhardness and SEM after CO₂ laser irradiation or fluoride treatment in human and bovine enamel. *Microsc Res Tech.* 2010 Oct;73(11):1030-5. doi: 10.1002/jemt.20827.

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.

Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO₂ laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2010 Feb;55(2):127-33. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.010.

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. doi: 10.1159/000096109.

Takate V, Kakade A, Bheda P, Dighe K, Rathore NS, Chauhan NS. Assessment of Inhibition of Mineral Loss from Human Tooth Enamel by Carbon Dioxide Laser and 1.23% Acidulated Phosphate Fluoride. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2019 Jan-Feb;9(1):47-54. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD_333_18.

ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res.* 1983;17(3):193-9. doi: 10.1159/000260667.

ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):283-96. doi: 10.1177/10454411910020030101.

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. doi: 10.1111/j.1600-0722.1997.tb00231.x.

Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ 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, Hara AT, Amaral FL, Franca FM, Basting RT. Calcium lactate pre-rinse increased fluoride protection against enamel erosion in a randomized controlled in situ trial. *J Dent.* 2014 May;42(5):534-9. doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.012.

Tveit AB, Klinge B, Totdal B, Selvig KA. Long-term retention of TiF₄ and SnF₂ after topical application to dentin in dogs. *Scand J Dent Res.* 1988 Dec;96(6):536-40.

Vanuspong W, Eisenburger M, Addy M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. *J Clin Periodontol.* 2002 Apr;29(4):351-7. doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.290411.x.

Ventura T, Cassiano LPS, Souza ESCM, Taira EA, Leite AL, Rios D, et al. The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches. *Arch Oral Biol.* 2017 Jul;79:20-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.001.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. 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.

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

Wachtel LW. In Vitro Comparison of Effects of Topical Stannic Fluoride and Stannous Fluoride Solutions on Enamel Solubility. *Arch Oral Biol.* 1964 Jul-Aug;9:439-45. doi: 10.1016/0003-9969(64)90029-9.

Wahengbam P, Tikku AP, Lee WB. Role of titanium tetrafluoride (TiF₄) in conservative dentistry: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2011 Apr;14(2):98-102. doi: 10.4103/0972-0707.82598.

Warreth A, Abuhijleh E, Almaghribi MA, Mahwal G, Ashawish A. Tooth surface loss: A review of literature. *Saudi Dent J.* 2020 Feb;32(2):53-60. doi: 10.1016/j.sdentj.2019.09.004.

Wegehaupt FJ, Taubock TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odontol Scand.* 2012 May;70(3):177-83. doi: 10.3109/00016357.2011.600713.

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

Wei SH, Soboroff DM, Wefel JS. Effects of titanium tetrafluoride on human enamel. *J Dent Res.* 1976 May-Jun;55(3):426-31. doi: 10.1177/00220345760550032101.

West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil.* 2000 Oct;27(10):875-80. doi: 10.1046/j.1365-2842.2000.00583.x.

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.

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

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

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

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhaes 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.* 2010c Mar;55(3):223-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.007.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:53-9. doi: 10.1159/000325946.

Willumsen T, Ogaard B, Hansen BF, Rolla G. Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid. *Acta Odontol Scand.* 2004 Oct;62(5):278-81. doi: 10.1080/00016350410000174.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2010a;44(4):390-401. doi: 10.1159/000316539.

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

Zebrauskas A, Birskute R, Maciulskiene V. Prevalence of Dental Erosion among the Young Regular Swimmers in Kaunas, Lithuania. *J Oral Maxillofac Res.* 2014 Apr;5(2):e6. doi: 10.5037/jomr.2014.5206.

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.

APÊNDICE A – Carta de informação ao participante

INSTRUÇÕES AOS PARTICIPANTES

Primeiramente, obrigada por ter aceitado participar deste in situ! Sua participação é mais do que fundamental para o desenvolvimento do meu projeto, então muito obrigada!

Vamos começar explicando em que consiste sua participação (instruções gerais):

- A fase experimental *in situ* terá duração total de **4 semanas de experimento, intercaladas de 1 semana de descanso entre elas**, em que o aparelho não será utilizado;
- Você deverá realizar devidamente os procedimentos instruídos durante **as 4 fases experimentais de 5 dias:**
 - **30/09/2019 a 04/10/2019**
 - **14 a 18/10/2019**
 - **28/10/2019 a 01/11/2019**
 - **11 a 15/11/2019**
- Em dias previamente combinados, você deverá comparecer na FOU SP para recebimento de novo kit de pesquisa;

- **O seu kit in situ contém:**

- ✓ Nécessaire térmica
 - ✓ Caixa contendo o aparelho com as amostras
 - ✓ Garrafa com ácido cítrico
 - ✓ Pote para imersão extra oral do aparelho em ácido cítrico
 - ✓ Caixa de lenços
 - ✓ Garrafa com a solução experimental + dosador para bochecho da solução
 - ✓ Frasco com água destilada
 - ✓ Gaze estéril
 - ✓ Kit de higiene bucal (estojo, escova com capinha, dentífrico, fio dental)
 - ✓ Cronograma da semana
 - ✓ Caneta
 - ✓ Timer
 - ✓ Chocolatinho motivacional ;)
- O aparelho deverá ser utilizado por aproximadamente **7 horas**, devendo ser **armazenado na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada** (que foi fornecido no kit da pesquisa) em geladeira durante a noite;
 - Antes de qualquer refeição e/ou lanche e/ou ingestão de bebidas, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada;
 - Você poderá beber **APENAS ÁGUA** com o aparelho em boca;

- **Após a ingestão de alimentos e bebidas** (exceto água) entre as refeições principais, **realize a higiene bucal ou enxágue a boca com água corrente e aguarde 15 minutos** antes de colocar novamente o aparelho na boca;
- Realize a **higienização** dos dentes naturais normalmente 3x/dia (após café da manhã, almoço e antes de dormir) **com a escova de dente, creme dental e fio dental fornecidos pela pesquisadora;**
- **A porção interna do aparelho**, que fica em contato com a mandíbula, **poderá ser escovada** com a mesma escova de dente e creme dental fornecidos no kit de higiene oral diária;
- **Não escove a superfície que contém os fragmentos de esmalte dental, e evite também, que o creme dental entre em contato com as amostras;**
- Durante o experimento, **interrompa o uso de qualquer enxaguatório bucal;**
- Durante o experimento, **você não deverá fazer uso de qualquer medicação sistêmica.** Caso seja necessário, avisar à pesquisadora;
- Caso você tenha algum desconforto ou alguma dúvida sobre os procedimentos durante o experimento, me comunique imediatamente pelo telefone: **(11) 97445-9068 (Vivo) ou pelo email: juliane.tavares@usp.br;**
- Sua colaboração é de extrema importância para o bom andamento deste experimento. Os horários e número de imersões na solução de ácido cítrico e na soluções experimental, bem como o uso ininterrupto do aparelho, são essenciais para que a pesquisa forneça resultados confiáveis;

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

Juliane de Paula Tavares

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, de forma voluntária, da pesquisa: “Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano”, a ser realizada pela aluna do curso de Mestrado em Dentística área de concentração Laser Juliane de Paula Tavares, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas, no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP).

Objetivo: Este estudo *in situ* tem como objetivo avaliar o efeito do laser de CO₂ (9.3 µm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, na prevenção e controle da erosão em esmalte dental humano.

Justificativa: Poucos estudos investigam a possível interação entre a irradiação do esmalte dental com o laser de CO₂ e o uso da solução de AmF/NaF/SnCl₂ e os resultados apresentados ainda são controversos. Considerando os resultados positivos apresentados pelo laser de CO₂ (9.3 µm) em baixas densidades de energia na prevenção e controle da desmineralização em esmalte, mesmo quando associado a fluoretos convencionais, considera-se a possibilidade da geração de resultados promissores pela associação destes fatores.

Procedimentos: Os participantes selecionados terão suas arcadas dentais moldadas para a confecção de um aparelho removível em resina acrílica que ficará em contato com a porção vestibular de pré-molares e molares inferiores, contendo 08 fragmentos de esmalte dental humano (devidamente esterilizados em radiações gama). Três dias antes do início do experimento e durante todo o experimento, você, participante da pesquisa, deverá utilizar exclusivamente a escova de dente, a pasta de dente e o fio dental fornecidos pela pesquisadora.

O experimento total irá durar 28 dias, sem interrupção. Na prática, cada participante utilizará o dispositivo removível durante 2 fases de 5 dias cada, totalizando 10 dias de uso. Antes de cada fase, haverá um período de descanso de 7 dias, chamado de wash-out, em que os dispositivos não serão utilizados.

No desafio erosivo *in situ*, você irá imergir o aparelho removível, contendo os fragmentos de esmalte, em ácido cítrico 1% (pH 2,3) por 5 minutos, 4 vezes ao dia,

em intervalos de 1,5 h, durante os dias e horários pré-determinados. Após a desmineralização, os dispositivos serão cuidadosamente secos com papel absorvente e reinseridos na boca. Em uma das fases, os dispositivos deverão permanecer em boca e o participante deverá realizar bochechos de 30 segundos de duração, também em horários pré-determinados, com a solução-teste, entregue antecipadamente pela pesquisadora. Você continuará higienizando seus dentes normalmente com creme dental com flúor.

O aparelho removível só poderá ser escovado na porção que fica em contato com a mucosa, ou seja, os fragmentos de dente, não deverão ser escovados. As análises das amostras serão realizadas antes do início da fase in situ e logo após a retirada dos fragmentos do aparelho.

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

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

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

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

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

Garantia de esclarecimentos, Liberdade de Recusa: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. A sua participação é voluntária

e você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem prejuízos.

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

Qualquer dúvida ou problema relativo à pesquisa deve ser comunicado com a maior brevidade possível à Juliane de Paula Tavares através do telefone (11) 97445-9068 (Vivo) ou pelo e-mail juliane.tavares@usp.br

Se houverem dúvidas sobre ética em pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP) – Avenida Professor Lineu Prestes n° 2227 – 05508-000 – São Paulo - SP – Telefone (11) 3091.7960 – email: cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisador é: segunda a sexta-feira das 9h-12h e 14h-16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS n° 466 d 2012).

Consentimento: Li e entendi as informações contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Ficaram claros os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, garantia de confidencialidade e outros esclarecimentos. Ficou claro, também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho meus direitos de atendimento na FOU SP garantidos. CONCORDO VOLUNTARIAMENTE EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO intitulado “Efeito *in situ* do laser de CO₂ (9.3 μm), associado ou não à solução de AmF/NaF/SnCl₂, em prevenir e controlar lesão de erosão em esmalte dental humano” e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento sem penalidades ou prejuízo de qualquer natureza. Declaro ainda que nesta data recebi uma via do TCLE para eventuais consultas.

Local e Data

Nome do participante
RG ou CPF

Assinatura

Pesquisadora Responsável

Assinatura

CRO/SP

Orientadora

Assinatura

CRO/SP

APÊNDICE C – Procolo e cronograma com instruções para Fase I, em ambas as etapas

Etapa (1 ou 2) - Fase I

Instruções para esta semana:

- Você deverá inicialmente inserir o dispositivo intra-oral e aguardar, com ele em boca, um período de 2 horas;
- Após estas 2 horas, proporcionar o ácido cítrico no potinho e imergir os dois aparelhos por 5 minutos com as amostras viradas para cima. Após este tempo, secar levemente com o lenço e reinserir na boca (1^a imersão em ácido);
- Após 1h 30 min, imergir os dois aparelhos em ácido cítrico por 5 min. Repetir 2 vezes, em intervalos de 1h30min (total de 4 imersões em ácido cítrico diárias);
- Após a última imersão em ácido, aguardar 30 min em boca, e armazenar o aparelho em gaze umedecida na caixa até o dia seguinte.

Horário sugerido	Horário Realizado					PROCEDIMENTO
	Data	Data	Data	Data	Data	
08:00						Inserção do aparelho em boca
10:00						1ª imersão em ácido cítrico (5 min)
11:30						2ª imersão em ácido cítrico (5 min)
13:00						3ª imersão em ácido cítrico (5 min)
14:30						4ª imersão em ácido cítrico (5 min)
15:00						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada em geladeira.

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

Etapa (1 ou 2) - Fase II

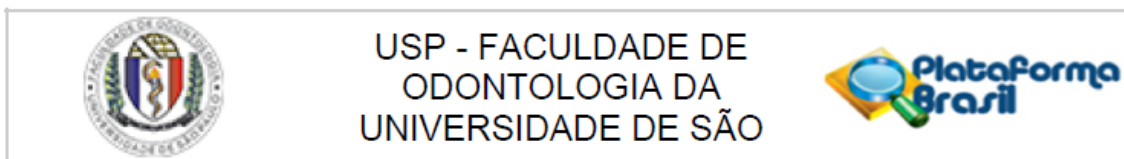
Instruções para esta semana:

- Você deverá inicialmente inserir o dispositivo intra-oral e aguardar, com ele em boca, um período de 2 horas;
- Após estas 2 horas, proporcionar o ácido cítrico no potinho e imergir os dois aparelhos por 5 minutos com as amostras viradas para cima. Após este tempo, secar levemente com o lenço e reinserir na boca (1ª imersão em ácido);
- Após 30 minutos, proporcionar a solução no dosador e fazer bochecho por 30 segundos (15 seg de cada lado, com os dois aparelhos em boca). Aguardar 30 min;
- Após 30 minutos, imergir os dois aparelhos em ácido cítrico por 5 min. Repetir 2 vezes, em intervalos de 1h30min (total de 4 imersões em ácido cítrico diárias);
- Após a última imersão em ácido, aguardar 30 min em boca, e armazenar o aparelho em gaze umedecida na caixa até o dia seguinte.

Horário sugerido	Horário Realizado					PROCEDIMENTO
	Data	Data	Data	Data	Data	
08:00						Inserção do aparelho em boca
10:00						1ª imersão em ácido cítrico (5 min)
10:30						Bochecho com a solução (15 ml, 15 s de cada lado, com os dois aparelhos em boca)
11:00						2ª imersão em ácido cítrico (5 min)
12:30						3ª imersão em ácido cítrico (5 min)
14:00						4ª imersão em ácido cítrico (5 min)
14:30						Armazenamento do aparelho em gaze umedecida com água destilada em geladeira.

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Avaliação in situ do efeito do laser de CO₂ (9,3 μm), associado ou não ao gel de TiF₄, na prevenção da lesão de erosão em esmalte dental humano.

Pesquisador: Juliane de Paula Tavares

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01588818.7.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.141.279

Apresentação do Projeto:

"O presente estudo in situ, apresenta modelo cross-over e duplo-cego, no qual serão testados 2 fatores independentes: modalidade de prevenção - prevenção na Etapa I e controle na Etapa II; e tratamento (em ambas etapas), em 4 níveis (água destilada – controle negativo (C), aplicação de gel de TiF₄ 4% (F); irradiação com laser CO₂ (L); irradiação com laser CO₂ + gel de TiF₄ 4% (L+F)). Para tanto, serão convidados 12 pós-graduandos do departamento de dentística para participarem da pesquisa. Os participantes serão divididos aleatoriamente em 4 fases de tratamentos (02 fases de cada etapa – Etapa I e Etapa II) de 5 dias cada, e utilizarão um dispositivo removível inferior bilateral, posicionado na região vestibular de pré-molares e molares contendo 02 amostras de esmalte dental humano de cada lado do dispositivo, sendo as 4 inicialmente hígidas nas duas fases da Etapa I e 4 com formação de lesão inicial de erosão nas duas fases da Etapa II."

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo in situ tem como objetivo avaliar o efeito do laser de CO₂ (9,3 μm), associado ou não ao gel de TiF₄, na prevenção e controle da erosão em esmalte dental humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram bem avaliados.

Riscos: "Os participantes poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que

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: 3.141.279

é semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel, mas que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo."

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências foram sanadas e a pesquisa não apresenta comprometimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão adequados: Folha de Rosto; TCLE (participante); TCLE (dentes); Autorizações da Clínica Odontológica, da Clínica de Cirurgia Pós e da Fundectó; Projeto Detalhado.

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

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_1223733.pdf	26/11/2018 22:18:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecido_doadordedente.pdf	26/11/2018 22:15:24	Juliane de Paula Tavares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestrado_Juliane_Tavares_CEP.pdf	26/11/2018 22:08:11	Juliane de Paula Tavares	Aceito
TCLE / Termos de	TermodeConsentimentoLivreeEsclare	26/11/2018	Juliane de Paula	Aceito

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: 3.141.279

Assentimento / Justificativa de Ausência	cido_participanteinsitu.pdf	22:06:39	Tavares	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoFundecto.pdf	26/11/2018 22:03:54	Juliane de Paula Tavares	Aceito
Outros	Instrucoes_aos_participantes.pdf	22/10/2018 15:54:40	Juliane de Paula Tavares	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoClinicaPos.pdf	22/10/2018 15:52:48	Juliane de Paula Tavares	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoClinica.pdf	22/10/2018 15:52:33	Juliane de Paula Tavares	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	22/10/2018 15:50:28	Juliane de Paula Tavares	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

**Décio dos Santos Pinto Junior
(Coordenador(a))**

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