

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUIZ RICARDO PERO VECCHIA

**Efeito protetor das soluções contendo TiF_4/NaF e quitosana sobre o
desgaste erosivo do esmalte e dentina *in vitro***

BAURU

2021

LUIZ RICARDO PERO VECCHIA

**Efeito protetor das soluções contendo TiF_4/NaF e quitosana sobre o
desgaste erosivo do esmalte e dentina *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães

BAURU

2021

Pero Vecchia, Luiz Ricardo

Efeito protetor das soluções contendo TiF_4/NaF e quitosana sobre o desgaste erosivo do esmalte e dentina *in vitro*. -- Bauru, 2021.

82 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Magalhães

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:015/2019 e 018/2019
Data:16/05/2019 e 26/08/2019

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho. Gratidão aos meus pais, meu irmão e minha querida companheira, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana Carolina e aos professores Rodrigo e Marília, por todos os ensinamentos, conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. A todos (Bia, Paula, Caren, Carlos, Larissa, Thelma) que participaram, direta ou indiretamente desta etapa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, e também à Universidade de São Paulo, essencial no meu processo de formação profissional, pela oportunidade, e por tudo o que aprendi neste período. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Pensamentos conduzem a sentimentos. Sentimentos conduzem a ações. Ações conduzem a resultados.”

T. Harv Eker

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito protetor de soluções experimentais contendo TiF_4/NaF e quitosana com diferentes viscosidades sobre o desgaste erosivo de esmalte e dentina *in vitro*. Para tal, duzentos e dez amostras no total, sendo cento e cinco de esmalte e cento e cinco de dentina radicular bovina foram distribuídas entre os seguintes grupos de tratamento (n=15): (1) solução comercial com $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ (800 ppm Sn^{2+} , 500 ppm F^- , pH 4,5, Elmex[®], GABA Int. AG, Switzerland, controle positivo); (2) 0,042% NaF e 0,049% TiF_4 (NaF: 190 ppm F^- ; TiF_4 : 190 ppm Ti^{4+} e 300 ppm F^-); (3) similar ao grupo 2 mas com adição de 0,5% quitosana (CH 500 mPas), (4) similar ao grupo 2 mas com adição de 0,5% quitosana (CH 2000 mPas), (5) sem tratamento, (6) 0,5% quitosana (CH 500 mPas) e (7) 0,5% quitosana (CH 2000 mPas). As quitosanas tinham 75% de desacetilação. As amostras foram submetidas à ciclagem de pH (ácido cítrico a 0,1%, 4 x 90s/dia, intercalado com saliva artificial de Klimek modificada) e a aplicação diária das soluções de tratamento (após o último desafio erosivo, 1 x 30s/dia) durante 7 dias. Ao final do 7^o dia, os desgastes do esmalte e dentina erodidos foram quantificados utilizando perfilometria de contato. Duas amostras de esmalte e três amostras de dentina por grupo foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e EDX (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*). Os dados foram comparados estatisticamente (ANOVA ou Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). As amostras de esmalte tratadas com $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$ (controle positivo) apresentaram o menor valor mediano de perda (0,72 μm) seguida pelas soluções de $\text{TiF}_4/\text{NaF} + \text{CH}$ (1,24-1,28 μm) que diferiram significativamente do controle negativo (1,70 μm). Para dentina, apenas a quitosana 500 mPas foi capaz de reduzir estatisticamente a perda (0,60 μm) em relação ao controle negativo (1,20 μm), sendo semelhante ao controle positivo (0,53 μm). As soluções testadas tiveram comportamentos diferentes sobre os tecidos dentários, de forma que para o esmalte a adição de quitosana à solução contendo TiF_4/NaF melhorou seu efeito protetor contra o desgaste erosivo, já para dentina apenas a solução contendo CH 500 mPas teve efeito protetor contra o desgaste de forma compatível ao controle comercial positivo (Elmex[®]), neste modelo de estudo.

Palavras chaves: Erosão de dente; Flúor; Quitosana; Titânio; Viscosidade.

ABSTRACT

This study evaluated the protective effect of experimental solutions containing TiF₄/NaF and chitosan with different viscosities on the erosive enamel and dentin wear *in vitro*. For this, two hundred and ten samples in total, one hundred and five enamel and one hundred and five bovine root dentin were distributed among the following treatment groups (n = 15): (1) commercial solution with SnCl₂/NaF/AmF (800 ppm Sn²⁺, 500 ppm F⁻, pH 4.5, Elmex[®], GABA Int. AG, Switzerland, positive control); (2) 0.042% NaF and 0.049% TiF₄ (NaF: 190 ppm F⁻; TiF₄: 190 ppm Ti⁴⁺ and 300 ppm F⁻); (3) similar to group 2 but with the addition of 0.5% chitosan (CH 500 mPas), (4) similar to group 2 but with the addition of 0.5% chitosan (CH 2000 mPas), (5) without treatment, (6) 0.5% chitosan (CH 500 mPas) and (7) 0.5% chitosan (CH 2000 mPas). The chitosans had 75% deacetylation. The samples were subjected to pH cycling (0.1% citric acid, 4 x 90s/day, intercalated with modified Klimek artificial saliva) and the daily application of treatment solutions (after the last erosive challenge, 1 x 30s/day) for 7 days. At the end of the 7th day, erosive enamel and dentin wear were quantified using contact profilometry. Two enamel samples and three dentin samples per group were evaluated by scanning electron microscopy and EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). The data were compared statistically (ANOVA or Kruskal-Wallis, p<0.05). Enamel samples treated with SnCl₂/NaF/AmF solution (positive control) had the lowest median loss value (0.72 μm) followed by TiF₄/NaF + CH solutions (1.24-1.28 μm) and both significantly differed from the negative control (1.70 μm). For dentin, only chitosan 500 mPas (0.60 μm) was able to significantly reduce the loss compared to the negative control (1.20 μm), being similar to the positive control (0.53 μm). The tested solutions have different behavior on dental tissues, so that for enamel the addition of chitosan to the solution containing TiF₄/NaF improved its protective effect against erosive wear; for dentin only solution containing CH 500 mPas had a protective effect against wear compatible with the positive commercial control (Elmex[®]), under this study model.

Key words: Chitosan; Fluorine; Titanium; Tooth erosion; Viscosity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A) Molde de silicone e resina acrílica auto-polimerizável utilizados para embutir as coroas e raízes; B) Politriz Metalográfica utilizada no polimento das amostras; C) Amostras de esmalte embutidas e polidas e com 2/3 da superfície protegidos; D) Amostras de dentina embutidas e polidas e com 2/3 da superfície protegidos..... 40
- Figura 2** - A) Amostras imersas em solução de ácido cítrico (0,1%, pH 2,5) por 90 s; B) Recipientes usados para a ciclagem, na ordem, para imersão em ácido (frente) e para imersão em saliva artificial de Klimek modificada (atrás); C) Soluções de tratamento; D) Aplicação da solução de tratamento utilizando pipeta (v =0,5 ml/amostra) sobre a superfície exposta por 30s.. 41
- Figura 3** - Viscosímetro capilar de vidro Ubbelohde 42
- Figura 4** - A) Análise da Perfilometria final. B) Perfis inicial e final superpostos para comparação e medição da perda de estrutura dentária..... 43
- Figura 5** - A) Amostras metalizadas com cobertura de ouro. B) Microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30 FEG (EUA). C) Amostra posicionada no microscópio para análise 44
- Figura 6** - Imagens do MEV de esmalte representativas de cada grupo: A) Elmex[®] (SnCl₂/NaF/AmF); B) TiF₄/NaF; C) TiF₄/NaF + CH 500 mPas; D) TiF₄/NaF + CH 2000 mPas; E) Água (controle negativo); F) CH 500 mPas; G) CH 2000 mPas 50
- Figura 7** - Imagens do MEV de dentina representativas de cada grupo: A) Elmex[®] (SnCl₂/NaF/AmF); B) TiF₄/NaF; C) TiF₄/NaF + CH 500 mPas; D) TiF₄/NaF + CH 2000 mPas; E) Água (controle negativo); F) CH 500 mPas; G) CH 2000 mPas 53
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores de pH e viscosidade (mm^2/s) das soluções de tratamento..... 42
- Tabela 2** - Valores medianos (intervalo interquartil, II) de perda de esmalte (μm) de acordo com cada tratamento 49
- Tabela 3** - Valores de média e desvio padrão da porcentagem (%) de elementos químicos presentes no esmalte tratado com as diferentes soluções 51
- Tabela 4** - Valores de média e desvio padrão do desgaste da dentina (μm) de acordo com cada tratamento..... 52
- Tabela 5** - Valores de média e desvio padrão da porcentagem (%) de elementos químicos presentes na dentina tratada com as diferentes soluções 54
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DDE	Desgaste dentário erosivo
COD	Camada orgânica desmineralizada
TiF ₄	Tetrafluoreto titânio
NaF	Fluoreto de sódio
ppm	Partes por milhão
mPas	miliPascal
Min	Minutos
pH	Potencial Hidrogeniônico
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
G5	Grupo 5
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
Mm ² /s	Milimetro ao quadrado por segundo
µm	Micrometro
S	Segundos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO	19
2.2	EFEITO DO FLUORETO NA PREVENÇÃO DO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO.....	22
2.3	EFEITO DOS FLUORETOS METÁLICOS NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO (ESPECIALMENTE DO TETRAFLUORETO TITÂNIO)	24
2.4	EFEITO DA QUITOSANA NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO.....	27
2.5	EFEITO DA QUITOSANA ASSOCIADA AO FLUORETO NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO.....	29
3	OBJETIVO	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	39
4.2	CICLAGEM DE pH E TRATAMENTOS COM AS SOLUÇÕES FLUORETADAS	40
4.3	PERFILOMETRIA PARA AFERIÇÃO DA PERDA DE SUPERFÍCIE DENTÁRIA.....	43
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDX).....	44
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	49
5.1	ESMALTE	49
5.1.1	PERFILOMETRIA.....	49
5.1.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	49
5.2	DENTINA	52
5.2.1	PERFILOMETRIA.....	52
5.2.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	52
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tetrafluoreto de titânio (TiF₄) voltou a ser de interesse na Odontologia, devido ao desenvolvimento de novas formulações que se mostraram mais eficazes contra a desmineralização dentária (cárie dentária e erosão dentária) comparadas com formulações de fluoreto de sódio (NaF) *in vitro* e *in situ*.¹⁻⁸ Uma das novas formulações, um verniz experimental de TiF₄ a 4%, foi desenvolvida em 2007 e avaliada pela primeira vez contra a erosão do esmalte *in vitro*, mostrando ser mais eficaz em comparação à solução de TiF₄ a 4% e a vernizes comerciais de NaF na redução do desgaste erosivo do esmalte.¹ Desde então, alguns estudos foram realizados para testar o efeito do verniz experimental de TiF₄ contra erosão e abrasão do esmalte e dentina *in vitro* e *in situ*, com resultados promissores.^{2,3,6,9} Em relação à toxicidade, o verniz de TiF₄ também mostrou ser menos citotóxico.¹⁰ do que o que foi previamente atestado com a solução¹¹, induzindo baixo nível de apoptose (<5%) em fibroblastos humanos.¹² Além disso, este verniz experimental não induz à alteração de cor clinicamente relevante em comparação ao verniz de NaF e ao verniz placebo.¹³

Por outro lado, pacientes com erosão dentária poderiam ser beneficiados com aplicações diárias de fluoreto.¹⁴ A aplicação profissional de verniz, 2 a 4 vezes por ano, por exemplo, pode não ser a melhor opção para pacientes com altos desafios erosivos diários. Nesse sentido, Magalhães et al.⁶ (2016) investigaram o efeito isolado e combinado de uma única aplicação de verniz de TiF₄ ou NaF (24.500 ppm F⁻) versus o uso diário de uma solução para bochecho contendo uma baixa concentração de TiF₄/NaF (500 ppm F⁻) sobre a erosão dentária *in vitro*. Ambos os tipos de aplicações de TiF₄, isoladas ou combinadas, foram eficazes contra a erosão dentária. No entanto, o verniz perdeu seu efeito protetor sobre o esmalte após 10 dias de desafios erosivos, enquanto o efeito protetor da solução ficou evidente até o final do estudo (14 dias).

Para entender melhor o desempenho desta solução experimental contendo TiF₄/NaF, dois estudos *in vitro* foram conduzidos para comparar esta solução experimental com um conhecido enxaguante bucal comercial contendo fluoreto e estanho (Elmex[®]).^{3,4} A solução fluoretada contendo estanho tem demonstrado efeito protetor contra a erosão dentária,¹⁴⁻¹⁸ devido à incorporação de estanho na camada desmineralizada e formação de precipitados sobre

a superfície dentária (como $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$, SnOHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$), que são mais resistentes ao ácido do que as partículas de CaF_2 induzidas pela aplicação de NaF .¹⁹ Com relação ao mecanismo de ação do TiF_4 , nosso conhecimento vem de um estudo recente que elucidou a reação do verniz de TiF_4 com o esmalte. O titânio é capaz de reduzir a desmineralização, uma vez que se liga ao fosfato da apatita, formando uma camada tipo *glaze* rica em óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado que é mais resistente ao ácido que a camada de CaF_2 .²⁰ Além disso, o TiF_4 é capaz de produzir uma maior quantidade de CaF_2 no esmalte comparado ao NaF , devido ao seu baixo pH.²⁰ Portanto, assumimos que um mecanismo de ação semelhante poderia ocorrer se a solução de TiF_4/NaF fosse aplicada diariamente.

Estudos anteriores *in vitro* mostraram que a aplicação diária da solução de TiF_4/NaF foi inferior ou similar à de uma solução fluoretada comercial contendo estanho (Elmex[®], GABA) na redução do desgaste erosivo do esmalte e da dentina, respectivamente.^{3,4} Um estudo *in situ*, conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, comparou o efeito protetor da solução de TiF_4/NaF com a de uma solução fluoretada comercial contendo estanho (Elmex[®], GABA) na erosão e abrasão do esmalte e dentina, mostrando que ambas as soluções de fluoreto têm efeito protetor similar sobre o desgaste dentário.⁸

A fim de melhorar o efeito protetor de nossa solução experimental de TiF_4/NaF em comparação à comercial, a ideia do presente projeto é testar o efeito da solução de TiF_4/NaF com diferentes viscosidades na prevenção do desgaste erosivo do esmalte e dentina *in vitro*. Trabalhos anteriores mostraram que o aumento da viscosidade de soluções fluoretadas reduziu a erosão do esmalte em experimento de 5 dias (4 x 5 min/dia, 0,3% de ácido cítrico)²¹ e de 10 dias (6 x 2 min/dia, 0,5% de ácido cítrico)²²; entretanto, não há estudos testando o aumento de viscosidade de soluções fluoretadas contendo TiF_4 , e tão pouco sobre a prevenção da erosão em dentina, independentemente do tipo de sal fluoretado.

A quitosana, extraída das conchas de quitina de crustáceos, por ser solúvel em água e biocompatível, tem sido incorporada a dentifrícios e soluções produzidos na Europa.²³ Além de aumentar a viscosidade de soluções, apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e de inibição de biofilme dentário.²⁴⁻²⁹

Ainda a quitosana pode formar uma película sobre a estrutura dentária protegendo-a contra desafios erosivos e abrasivos, porém tal ação não superou o efeito do fluoreto pelo menos

para o esmalte.^{30,31} Por outro lado, a quitosana parece reduzir a degradação de fibrilas de colágeno, sugerindo que este polímero em condições específicas poderia aumentar a resistência da superfície dentinária ao desafio erosivo e enzimático.³¹ Um estudo realizado com quitosana nas concentrações de 2,5 e 5,0%, com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (5000 X), permitiu verificar a presença de partículas de quitosana depositadas na superfície e dentro dos túbulos dentinários. A quitosana, portanto, forma uma barreira sobre a superfície dentária, permitindo a deposição de íons de cálcio e a formação de fosfato de cálcio sobre a dentina desmineralizada.³² Considerando isso, a associação de uma solução de quitosana com um fluoreto metálico poderia ter um efeito promissor na prevenção da erosão dentinária, uma vez que a quitosana controla a liberação de fluoreto.³³

A quitosana tem sido frequentemente testada como forma de aumentar a viscosidade e reduzir o efeito abrasivo dos dentifrícios, controlando a liberação de fluoreto com melhoria no efeito protetor contra o desgaste dentário. Pini et al.²² (2016) sugeriram que a quitosana aumenta a retenção de estanho e flúor na estrutura desmineralizada. Quando associada ao fluoreto, a quitosana tem apresentado um melhor efeito sobre a redução da erosão do esmalte²², mas nenhuma informação sobre a associação entre fluoreto e quitosana, na forma de solução, existe para a prevenção da erosão da dentina. A maioria dos estudos tem testado a associação da quitosana e fluoreto em dentifrícios.^{31,34-36} É importante enfatizar que a maioria das associações com o fluoreto foram estabelecidas com NaF ou NaF/AmF/SnCl₂, o que justifica o presente trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO

O desgaste dentário é uma condição clínica multifatorial caracterizada pela perda da morfologia anatômica dentária original decorrente de exposição química ou/e mecânica, ocasionada por condições como: erosão (exposição repetitiva a ácidos de origem não microbiana); atrição (atrito dente com dente) que pode ser visto nas cúspides durante os movimentos de “ranger” os dentes; abrasão que é ocasionada por ação mecânica de um agente externo (escovas, palitos de dente, lápis); e a abfração que ocorre por flexão e quebra dos cristais de apatita devido a trauma oclusal e tensões de tração, resultando em microfraturas dos cristais de hidroxiapatita na junção esmalte e dentina na região cervical, ocasionando deformação da estrutura dentária. Essa condição faz com que haja mudanças graduais na aparência (morfologia) e coloração da superfície dentária e perdas de estrutura em lascas conforme a condição progride.³⁷⁻⁴⁰

A etiologia da erosão dentária pode ser intrínseca quando envolve a ocorrência de vômitos constantes, como é o caso de pacientes acometidos por refluxo gastro-esofágico, anorexia e bulimia, e a extrínseca, quando os ácidos são provenientes do consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas, ou uso de produtos de higiene oral e medicamentos que possuam pH ácido.⁴¹⁻⁴³

Estes agentes citados possuem ácidos e, conseqüentemente, um baixo valor de pH (alta quantidade de H^+) e são subsaturados em relação à hidroxiapatita-HA (possuem baixa concentração de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^-), promovendo um desequilíbrio com o ambiente bucal (interface saliva-dente). Os íons de H^+ dos agentes erosivos reagem com o esmalte, dissolvendo a HA e liberando Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- para a saliva na tentativa de restaurar o equilíbrio, ocorrendo a desmineralização dentária.⁴⁴

O processo contínuo da erosão pode ocorrer em diferentes estágios, iniciando-se com amolecimento da superfície do esmalte (chamado de erosão dentária propriamente dita), podendo evoluir para remoção das camadas de cristais do esmalte e a perda permanente do volume (perda em lasca ou desgaste), devido à associação não só de fatores químicos, mas também mecânicos, chamando-se neste momento de desgaste dentário erosivo (DDE). A lesão

visível clinicamente é o DDE. Conforme ocorre a perda do esmalte e exposição de dentina, esta sofre desmineralização expondo a porção orgânica, isto é, a camada orgânica desmineralizada (COD), que tampona os ácidos e protege da perda mineral subsequente, sendo relativamente resistente às forças mecânicas⁴⁵, porém altamente susceptível à ação de enzimas proteolíticas como as collagenases e gelatinases (metaloproteínas da matriz e cisteínas catepsinas).⁴⁶

O aumento do consumo de alimentos ácidos nos últimos anos tem sido apontado como um fator de risco significativo para o DDE³⁷; apesar de ser uma condição que tenha uma taxa de progressão lenta, os impactos potenciais ocorrem progressivamente. Muitos fatores têm influência sobre o desenvolvimento do DDE, desde a forma como a lesão é medida clinicamente quanto os fatores causadores e predisponentes (nacionalidade, idade, gênero, questões socioeconômicas, tipo de dentição, escolaridade, hábitos alimentares, escolaridades dos pais, esportes, fatores biológicos, hábitos de higiene, mal oclusão, consumo de medicamentos, hipoplasia do esmalte, vômitos, problemas gástricos e psicológicos e condições médicas).⁴⁷

O relato de prevalência de lesões ocasionadas pela DDE é variável; Stangvaltaite-Mouhat et al.⁴⁸ (2020) encontraram resultados expressivos sobre a prevalência de DDE em adultos e idosos, com cerca de 67,5% da população acometida. Resultado similar também foi visto por Bartlett et al.³⁹ (2019), onde $\frac{3}{4}$ dos adultos europeus apresentaram desgaste dentário. No Brasil, Salas et al.⁴⁹ (2017) avaliaram a prevalência de DDE em crianças de 8 a 12 de escolas públicas e privadas, observando que o DDE acometeu 25,1% dos examinados, em concordância com trabalho anterior⁴⁷, que apontou uma variação de prevalência entre 7,2% e 55,5% na dentição permanente. Outro estudo realizado por Okunseri et al.⁵⁰ (2011), nos EUA, mostrou prevalência de 55,5% para jovens adultos (em torno de 18 anos), 44,5% para jovens de 16 a 17 anos e 39,6% para jovens de 13 a 15 anos, apontando progressão com o avanço da idade.

Para que medidas preventivas e interceptivas possam ser instauradas, os dentistas têm que investigar todos os fatores de risco relacionados ao paciente (desde fatores químicos relacionados ao ácido como fatores comportamentais) e iniciar o mais cedo possível o acompanhamento (com diário alimentar, orientações, exames clínicos, fotografias e modelos de estudos) para reduzir a progressão do DDE e permitir que medidas restauradoras sejam instauradas, caso necessárias.^{37,44,51}

A progressão do DDE pode levar a alterações na aparência do dente ou até mesmo a perda da função, em estágios avançados, o que pode ser indicativo de terapia restauradora.⁵²

Dependendo do grau de desgaste, tratamentos reabilitadores extensos podem ser necessários, que demandam várias consultas e alto custo, que muitos pacientes não conseguem arcar. Devido à necessidade de se sentir aceito, qualquer desvio fora dos “padrões”, como a alteração na aparência dentária, pode resultar em sentimentos de insegurança, a falta de interação social e comparação de si mesmo com os outros, o que pode negativamente afetar a qualidade de vida do indivíduo.^{53,54} O avanço do DDE leva ao amarelamento e encurtamento dos incisivos superiores.⁵² Desta forma, a percepção de características como cor, formato, tamanho e posição dos dentes pelos pacientes torna-se psicossocialmente importante, independentemente se há um aspecto funcional envolvido.⁵⁴ Como citado por Schlueter et al.⁵² (2012), conforme Smith e Knight⁵⁵ (1984), o desgaste dentário pode ser considerado como patologia se os dentes ficarem tão desgastados até o ponto de mecanicamente não serem mais eficazes ou prejudicarem gravemente a aparência. A distinção entre o desgaste dentário “aceitável” e patológico em uma determinada idade é baseada na previsão se o dente sobreviverá à taxa de desgaste.

Devido às consequências do DDE progressivo^{43,56}, é muito importante o diagnóstico precoce a partir da anamnese e sinais clínicos, para que estratégias preventivas possam ser abordadas focando especialmente na redução da exposição ao ácido, a partir de uma reorientação dietética (para os casos extrínsecos) ou tratamento médico (nos casos intrínsecos).⁵⁷ Além disso, o paciente deve ser periodicamente acompanhado para verificar se a lesão está progredindo ou se está paralisada.

O desgaste dentário em si pode ser considerado fisiológico, dependendo do grau de perda estrutural e idade do paciente. Um desgaste em esmalte em um indivíduo idoso pode ser considerado fisiológico, porém o mesmo desgaste em dente permanente jovem pode ser sinal de alerta pois a condição é progressiva. Portanto, é necessário o acompanhamento do paciente, para averiguar algumas características que podem ser indicativas de progressão, com a luminosidade, cor e presença de sensibilidade dentária.^{37,52,54}

Quando o DDE é considerado patológico, devem ser instauradas estratégias para controlar a exposição ao ácido, assim como estratégias para proteger a estrutura dentária, pela formação de precipitados ácido-resistentes. Dentre as estratégias envolvendo este mecanismo de ação, a aplicação frequente de fluoretos é a mais estudada.^{57,58}

2.2 EFEITO DO FLUORETO NA PREVENÇÃO DO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO

A descoberta do fluoreto ocorreu na metade do século XX pela sua presença em água potável; estudos relacionados comprovaram o seu importante papel no controle da cárie dentária, estimulando a sua incorporação em diferentes produtos de aplicação tópica para otimizar a exposição a este íon e proteção contra a cárie dentária.⁵⁹

Com o conhecimento mais profundo sobre o mecanismo de ação do fluoreto, pesquisadores da área de erosão dentária passaram a investiga-lo para controle desta lesão com base no fato que ambas lesões (cárie e erosão dentária) estão relacionadas a processos de desmineralização.⁶⁰⁻⁶² No entanto, com o desenvolvimento exponencial de pesquisas nesta área descobriu-se que o mecanismo de ação do fluoreto na erosão dentária é completamente diferente do relacionado à cárie dentária, tendo como base a proteção mecânica da superfície e não a interação química com a estrutura da hidroxiapatita como bem conhecida para a cárie dentária.⁶³⁻⁶⁷

Um dos fluoretos mais presentes em produtos de aplicação profissional e caseira é o NaF (Fluoreto de sódio), cujo mecanismo de ação para a erosão dentária se dá pela formação de uma camada globular rica em partículas de CaF₂ (fluoreto de cálcio) protegendo mecanicamente e temporariamente o esmalte contra a dissolução ácida até a sua completa eliminação.⁶⁶⁻⁶⁸ No entanto, a resistência ácida desta camada é baixa, isto é, ela é facilmente perdida diante a ataques erosivos frequentes.^{18,45} O efeito do NaF sobre a dentina parece ser dependente da preservação da camada orgânica desmineralizada (COD), conforme discutido por Ganss et al.⁶² (2004), isto é, quando esta COD é removida enzimaticamente, o efeito protetor do NaF é reduzido.

O efeito do NaF também depende de outros fatores inerentes ao próprio produto como a concentração de F e o pH. Quanto maior a concentração de F e menor o pH, melhor o efeito. Como pacientes com DDE podem ser beneficiados com aplicações diárias de fluoreto¹⁴ e como são submetidos a altos desafios erosivos diários, nesse sentido, as aplicações profissionais, de duas vezes a quatro vezes ao ano, seriam menos eficazes do que a aplicação de uma solução menos concentrada, que poderia ser realizada diariamente, além de ser mais acessível e prática.⁶

Austin et al.⁶⁹ (2010) investigaram o efeito de uma solução aquosa de fluoreto de sódio de concentração crescente na erosão e atrição de esmalte e dentina *in vitro*. Esmalte e dentina humanos ($n = 10$ por grupo) foram submetidos a protocolos de desgaste experimental em 2 níveis (atrição e atrição mais erosão) com 3 níveis de agressividade (5, 10 e 15 ciclos). Esmalte e dentina foram tratados com solução de NaF 225 ppm F, solução de NaF 1450 ppm F, solução de NaF 5.000 ppm F e solução de NaF 19.000 ppm F. Água deionizada (pH 7,0 com 0 ppm de NaF) foi usada como controle negativo. As soluções de NaF contendo 5.000 ppm e 19.000 ppm F tiveram o melhor efeito protetor sobre o desgaste dentário erosivo do esmalte *in vitro*. No entanto, para dentina, nenhum efeito protetor foi demonstrado.

Murakami et al.⁷⁰ (2009) avaliaram o efeito de verniz de NaF no DDE de dentes decíduos e permanentes. Os espécimes de esmalte foram expostos à desmineralização erosiva durante 5 minutos, 6 x ao dia, e 30 minutos em saliva artificial nos intervalos, durante 7 dias. As amostras foram previamente tratadas com fluoreto de sódio (NaF) em verniz (2,26% F) ou com gel fluoretado (APF, 1,23% F). A desmineralização foi mensurada por microdureza após 48 h e 7 dias. Para o esmalte dos dentes decíduos, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo de controle e os grupos de tratamento com fluoreto em 48 h e em 7 dias. Já para o esmalte oriundo do dente permanente, ambos produtos fluoretados tiveram efeito protetor.

Ganss et al.³⁴ (2011) também avaliaram o efeito do NaF na erosão e erosão + abrasão realizando dois experimentos *in vitro*. As amostras de esmalte humano foram desmineralizadas (10 dias, 6×2 min / dia; ácido cítrico, pH 2,4), expostas aos dentifrícios (2×2 min / dia), seguidamente armazenadas em uma solução mineral. No outro experimento, as amostras foram adicionalmente escovadas por 15 s durante o tempo de imersão na suspensão dos dentifrícios, sendo oito dentifrícios à base de NaF (1400 ppm – 1490 ppm) e mais oito diversificados. Os dentifrícios à base de NaF reduziram a perda de tecido, porém tiveram eficácia limitada em relação à redução do desgaste pela associação entre erosão e abrasão por escovação. Um estudo *in situ* prévio do mesmo grupo de pesquisa utilizando esmalte e dentina humanos, os quais foram erodidos (ácido cítrico, 6×5 min/ dia) e tratados com enxaguatórios bucais (1 x 30 s/ dia), durante 3 períodos de 7 dias totalizando 21 dias, mostrou que o NaF reduziu a perda de substância em 19% no esmalte enquanto na dentina foi de 23%, quando comparado ao placebo, mostrando ter uma eficácia limitada.¹⁵

Com base na baixa eficácia de produtos contendo NaF, a utilização de outros sais fluoretados associados a metais polivalentes começou a ser investigada com o objetivo de proporcionar o depósito de uma camada sobre o esmalte e dentina mais ácido-resistente.^{13,16,65}

2.3 EFEITO DOS FLUORETOS METÁLICOS NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO (ESPECIALMENTE DO TETRAFLUORETO TITÂNIO)

Dentes tratados com fluoretos contendo metais polivalentes, quando comparados ao fluoreto convencional, têm demonstrado maior resistência ao ataque erosivo.^{8,17,45,71} Um dos fluoretos contendo metais polivalentes é a base de uma solução comercial chamada Erosion Protection (GABA), que contém NaF, AmF e SnCl₂ e tem demonstrado reduzir o DDE tanto no esmalte como na dentina *in vitro* e *in situ*.^{13,14,16} Seu mecanismo de ação deve-se à incorporação de estanho ao tecido e à formação de precipitados, como Ca(SnF₃)₂, SnOHPO₄, Sn₃F₃PO₄, na superfície dentária, tornando-a mais resistente a exposição aos ácidos comparativamente a partículas de CaF₂ induzidas pela aplicação de NaF.¹⁹ Diferentemente do NaF, o fluoreto contendo metal polivalente reduz o desenvolvimento da erosão dentinária independente da preservação da COD.^{8,18} Neste sentido, vários trabalhos foram realizados testando esta solução em esmalte e dentina em protocolos *in vitro* e *in situ*.¹⁴⁻¹⁷

Com base na ideia deste produto comercial (Erosion Protection, GABA) que é inexistente no Brasil, sendo comercializado apenas na Europa, nosso grupo de pesquisa testou soluções experimentais contendo uma mistura de NaF e TiF₄ em esmalte e dentina em comparação com esse produto comercial como controle positivo.^{3,4} Esta associação entre NaF e TiF₄ foi realizada para minimizar o baixo pH de soluções que contém somente TiF₄, tendo a preocupação de manter a concentração de F em torno de 500 ppm para aplicação caseira, o que é compatível à solução comercial Erosion Protection. Esta solução foi formulada com base na experiência do nosso grupo com a formulação, testagem e patente do verniz de TiF₄.

O 1º trabalho realizado foi o de Magalhães et al.¹ (2008), que comparou o verniz de TiF₄ à solução contendo TiF₄ a 4% e aos vernizes comerciais de NaF. O tratamento foi realizado por 6 h e, após sua remoção, foi realizada uma ciclagem de pH erosiva por 5 dias. O desgaste do esmalte foi quantificado, demonstrando que o verniz de TiF₄ teve efeito protetor superior aos vernizes comerciais de NaF (Duraphat e Duofluorid) e à solução de TiF₄, que por sua vez não obteve o mesmo êxito, não diferindo significativamente do controle negativo.

O verniz de TiF_4 também foi testado para prevenção do DDE na dentina. Martines de Souza et al.⁹ (2017) investigaram o efeito do verniz de TiF_4 a 4% aplicado em dentina pré-erodida com e sem COD, comparativamente ao verniz de NaF. As amostras com e sem COD, já tratadas com os diferentes vernizes, foram submetidas à ciclagem de pH erosiva durante 7 dias. Os resultados de perfilometria mostraram que o verniz de TiF_4 e o verniz de NaF foram eficazes na redução da progressão do desgaste da dentina, independentemente da presença ou não da COD, porém quando comparados, o verniz de TiF_4 teve um melhor efeito, especialmente em dentina com COD.

Considerando que apesar dos bons resultados, o efeito do verniz pode ser limitado por ser um produto para aplicação profissional que demanda ao paciente visitas periódicas ao dentista e que o DDE é um processo progressivo, pacientes com alto risco se beneficiariam muito mais de aplicações diárias (em domicílio) de soluções em comparação a aplicações profissionais feitas esporadicamente em consultório.⁶ A partir disso, surgiu a mistura de TiF_4 e NaF, para possibilitar um tratamento constante do paciente.

Em 2014, investigou-se o efeito anti-erosivo de soluções contendo TiF_4 e NaF associadas ou não entre si (4 grupos com 500 ppm F^- : TiF_4 0,0815%; NaF 0,105%; NaF 0,042% + TiF_4 0,049%; NaF 0,063% + TiF_4 0,036%), tendo como controle positivo a solução Erosion Protection ($SnCl_2/NaF/AmF$) e o controle negativo a água, durante 7 dias de desafios erosivos em esmalte. O melhor resultado foi encontrado para o TiF_4 (0,0815%) reduzindo em 99% o desgaste do esmalte, seguido do controle positivo que apresentou uma redução de 78% e da combinação de NaF/ TiF_4 (0,042% + 0,049%) que reduziu em 41% o desgaste do esmalte. As demais soluções não diferiram do controle negativo.³ Trabalho similar foi realizado em dentina, no qual todas as soluções diminuíram significativamente a perda erosiva quando comparadas ao controle negativo, exceto a solução de NaF apenas. A formulação de 0,0815 % de TiF_4 também resultou em 100% de prevenção, já a combinação de TiF_4/NaF (0,042% + 0,049%) teve uma fração de prevenção de 58,3%, ambas sendo melhores que o controle positivo Erosion Protection ($SnCl_2/NaF/AmF$) com 52% de prevenção.⁴ Apesar do resultado promissor com a solução pura de TiF_4 , o seu valor de pH é muito baixo (2,5) o que inviabiliza o uso clínico, diferentemente das combinações $TiF_4 + NaF$ que têm valor de pH 4,5, similar à solução comercial Erosion Protection.

Para entender o benefício de aplicações profissionais (verniz) versus caseiras (soluções), Magalhães et al.⁶ (2016) avaliaram o efeito isolado e combinado de uma única aplicação

de verniz TiF_4 ou NaF versus o uso diário de uma solução contendo baixa concentração de TiF_4/NaF sozinha e em combinação com vernizes contra a erosão dentária *in vitro*. As amostras de esmalte e dentina tratadas com vernizes (1 x 6h), soluções (2x/dia) ou vernizes + soluções foram submetidas à ciclagem erosiva de pH por 7, 10 e 14 dias. Após 7 dias, no esmalte pode-se perceber que todos os tratamentos foram capazes de reduzir o desgaste, exceto o verniz de NaF. Notou-se que o verniz de TiF_4 combinado com a solução de TiF_4/NaF foi mais eficaz do que todos os outros tratamentos. No 10º dia, a solução de TiF_4/NaF mostrou ser potencialmente eficaz, enquanto o verniz de TiF_4 perdeu seu efeito protetor. Notavelmente percebeu-se que o verniz de TiF_4 + solução TiF_4/NaF e o verniz de NaF + solução de TiF_4/NaF foram semelhantes à solução de TiF_4/NaF na redução do desgaste, porém após 14 dias, a aplicação isolada dos vernizes de TiF_4 e NaF perdeu completamente o efeito, o que também ocorreu com a combinação de verniz de NaF + solução de TiF_4/NaF . Por outro lado, a combinação do verniz de TiF_4 + solução de TiF_4/NaF perdeu parcialmente seu efeito, já a solução de TiF_4/NaF manteve o efeito protetor após os 14 dias, mostrando ser a mais eficaz sobre o esmalte. Em relação à dentina, observou que após 7 dias experimentais, todos os tratamentos reduziram significativamente o desgaste. Aplicações isoladas da solução de TiF_4/NaF e de verniz de NaF apenas foram igualmente eficazes na redução do desgaste, porém com menor eficácia quando comparadas com todas as outras. A combinação de verniz de NaF + solução TiF_4/NaF e combinação do verniz de TiF_4 + solução TiF_4/NaF foram as melhores alternativas apresentando melhor efeito protetor, seguida pelo verniz de TiF_4 apenas. Em conclusão percebeu-se que para a dentina, a aplicação de verniz de TiF_4 , associada ou não à solução TiF_4/NaF , apresentou proteção contra o desgaste.

Com base nos bons resultados laboratoriais da solução de TiF_4/NaF , um estudo *in situ* comparou o efeito da solução TiF_4/NaF com a solução Erosion Protection ($NaF/AmF/SnCl_2$) na prevenção do desgaste em esmalte e dentina. A solução de TiF_4/NaF e a solução comercial foram capazes de reduzir igualmente e significativamente o desgaste dentário erosivo e erosivo-abrasivo em esmalte e dentina comparadas ao controle negativo.⁸

Em relação ao mecanismo de ação do TiF_4 , o conhecimento do seu mecanismo de ação vem de estudo com o verniz de TiF_4 . Sua ação deve-se à formação de uma camada tipo glaze rica em óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado que é mais resistente ao ácido que a camada de CaF_2 , protegendo mecanicamente o esmalte da dissolução por ácido. Além disto, o TiF_4 induz uma maior precipitação de CaF_2 comparado ao NaF, devido ao seu baixo pH.²⁰

Portanto, presume-se que o mecanismo de ação semelhante poderia ocorrer pela aplicação diária da solução de TiF_4/NaF .

Apesar dos resultados positivos, o efeito da solução de TiF_4/NaF está muito aquém do encontrado para a solução de TiF_4 isolada, porém esta última solução é inviável de ser utilizada clinicamente devido ao seu baixo pH. Para melhorar o efeito desta solução experimental, a ideia do presente trabalho foi associar esta combinação de fluoretos à quitosana.

2.4 EFEITO DA QUITOSANA NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO

De inúmeras aplicações biomédicas descritas na literatura, a quitosana despertou interesse em muitas áreas da saúde, inclusive na odontologia, podendo ser aplicada em várias áreas, como: odontologia preventiva, endodontia, cirurgia, periodontia, prótese dentária e ortodontia, por ter propriedades regenerativas, de fácil tratamento químico, ter biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas, atividade anti-inflamatória, capacidade de induzir a regeneração e cicatrização de feridas, hemostasia, inibição de biofilme, propriedades antioxidantes e de reparo ósseo.^{24-29,72-75}

A quitosana é um polissacarídeo natural extraído das conchas de quitina de crustáceos que passa por um processo de N-desacetilação, tornando-a uma molécula com caráter policatiônico de cadeia linear (podendo se unir a moléculas carregadas negativamente)²³, formada por copolímeros catiônicos como 2-amino-2-desoxi- β -D-glicose e 2-acetamino-2-desoxi- β -D-glicosídeo, unidos por ligações β (1 \rightarrow 4).⁷⁶ Além de ter uma estrutura flexível da cadeia de polímero, a quitosana contém grupos funcionais que podem ter grande afinidade com água devido à presença várias hidroxilas e do grupo amino.⁷⁷

As propriedades da quitosana são dependentes de muitos fatores, especialmente do grau de desacetilação, ou seja, da quantidade de grupos aminos livres (que são responsáveis por adsorver cátions metálicos), tendo em vista que o alto grau de desacetilação está relacionado ao grande potencial zeta positivo.⁷⁸ O grau de desacetilação é medido pelo número médio de 2-acetamida-2-dexosi-D-glicopiranosose juntamente com unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, onde a porcentagem relativa dessas unidades tem grande influência nas propriedades físicas, químicas, biológicas⁷⁶, e até mesmo na atividade antimicrobiana da quitosana.⁷⁹ No entanto, não apenas o grau de desacetilação é importante neste contexto, mas

também a distribuição dos grupos de acetila na molécula⁸⁰ e o valor do pH do ambiente onde a mesma está inserida (quanto menor o pH, maior carga positiva).⁷⁸

Este polímero tem sido adicionado a produtos odontológicos, especialmente a dentifrícios, pois tem alta interação com a estrutura dentária devido ao seu potencial zeta positivo, podendo inclusive ser incorporado à película adquirida e ter potencial para proteger mecanicamente a estrutura dentária contra o ácido.^{23,81} Além do mais, se dissolve em estruturas com potenciais zeta negativo e tem alta afinidade pelo esmalte^{82,83} levando à formação de uma camada orgânica, especialmente na presença da mucina, que se adsorve em superfícies carregadas negativamente, permitindo o acúmulo de ambas e formação de multicamadas, que podem resultar em uma melhor proteção contra o DDE.⁸⁴ Quanto à dentina, esta por sua vez tem um potencial zeta negativo menor que o esmalte e a interação com a quitosana pode ser reduzida por consequência. A quitosana na forma fosforilada, se torna mais eletronegativa, diminuindo o potencial zeta positivo, o que permite uma maior interação com as fibrilas de colágeno (cargas positivas), favorecendo a ação da molécula na dentina.⁸⁵ O mecanismo de ação principal de proteção contra DDE se dá pela formação de barreira mecânica e, em relação à dentina, a quitosana ainda pode ter ação protetora sobre a degradação de fibrilas de colágeno, aumentando a resistência da superfície dentinária aos desafios erosivo e enzimático, devido a sua presença dentro e entre os túbulos dentinários, permitindo a deposição de íons de cálcio e a formação de fosfato de cálcio sobre a dentina desmineralizada.^{31,32}

Arnauld et al.⁸⁶ (2010) realizaram um estudo para avaliar se a quitosana ($\geq 85\%$ de desacetilação) era capaz de reduzir a desmineralização do esmalte, variando concentração e tempo de tratamento. A quitosana mostrou ser capaz de reduzir a liberação de fósforo do esmalte, sendo influenciada pelo tempo de exposição e concentração, tendo como melhor tempo entre 60s a 90s de aplicação e na concentração de 2,5 mg/ml e 5,0 mg/ml.

Ganss et al.³⁴ (2011) realizaram um estudo com dentifrícios comercializados voltados para a prevenção da erosão sendo um deles à base de quitosana (Chitodent – 0,5%), pela realização de dois experimentos independentes, um simulando apenas erosão (1) e outro, a erosão associada à abrasão (2). Os autores verificaram que o dentifrício de quitosana teve efeito semelhante aos dentifrícios contendo NaF (entre 1400 ppm – 1490 ppm), tanto no experimento 1 quanto ao 2, diminuindo a perda de tecido em cerca de 30%, porém com reduzido efeito na presença da abrasão.

Beltrame et al.³¹ (2018) investigaram o efeito antierosivo da quitosana na dentina, em 3 tipos formulações diferentes: solução de quitosana (0,5%), quitosana fosforilada neutra (0,5%) e quitosana fosforilada alcalina (0,5%). As amostras de dentina foram submetidas à ciclagem erosiva de pH intercalada pelos tratamentos (6 ciclos de 2 min), por 5 dias. Os autores verificaram que a quitosana nas diversas formas de apresentação foram mais eficazes na redução do DDE em comparação ao controle negativo, sendo mais efetivas as soluções de quitosana fosforiladas neutra e alcalina (32% de redução) do que a solução de quitosana convencional (18%), sendo que estas soluções não superaram o efeito da solução contendo fluoreto e estanho (Elmex[®]).

Os trabalhos citados acima foram realizados com produtos contendo apenas a quitosana. No próximo tópico abordaremos os trabalhos que fizeram associação entre a quitosana e o fluoreto na prevenção da erosão dentária.

2.5 EFEITO DA QUITOSANA ASSOCIADA AO FLUORETO NO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO

A associação entre fluoreto e quitosana pode ser uma estratégia interessante para fortalecer a proteção mecânica proporcionada pelos dois agentes isoladamente^{17,37,45} sendo esta associação mais comum em dentifrícios, inclusive há um dentifrício comercial contendo AmF/NaF/SnCl₂ (1400 ppm F⁻ e 3500 ppm Sn²⁺) e quitosana a 0,5% no mercado Europeu (Elmex).^{34,35}

A presença de quitosana parece facilitar a liberação de fluoreto dos veículos de aplicação³³, melhorando a eficácia do produto.³⁵ Ainda a quitosana pode atrair íons de fluoreto carregados negativamente (alta eletronegatividade) à superfície dentária.⁸⁷ Além do mais, Pini et al.²² (2016) sugeriram que a quitosana aumenta a retenção de estanho e fluoreto na estrutura desmineralizada. Quando associada ao fluoreto, a quitosana tem apresentado um melhor efeito sobre a redução da erosão do esmalte²², mas nenhuma informação sobre a associação entre fluoreto e quitosana, na forma de solução, existe para a prevenção da erosão da dentina. A maioria dos estudos tem testado a associação da quitosana e fluoreto em dentifrícios.^{31,34-36} É importante enfatizar que a maioria das associações com o fluoreto foram estabelecidas com NaF ou NaF/AmF/SnCl₂.

Um experimento executado com a formulação de dentifrício contendo AmF/NaF/SnCl₂ (1400 ppm F⁻ e 3500 ppm Sn²⁺) + 0,5 % de quitosana (80% desacetilação) foi realizado a fim de compará-lo a: 1) dentifrícios ácidos e neutros contendo NaF, Sn²⁺ de diferentes fontes (SnF₂ ou SnCl₂) associado a diferentes compostos de fluoreto (NaF e/ou AmF), 2) dentifrícios contendo apenas 0,5% de quitosana, 3) dentifrício placebo, 4) erosão apenas e 5) gel SnF₂, como controle positivo. As amostras de esmalte foram submetidas à ciclagem erosiva de pH (6 x 2 min/dia) e tratadas com escovação (2 × 15s/dia, carga 200 g) durante imersão nas suspensões dos dentifrícios ou gel (2 min/escovação), durante 10 dias. A formulação AmF/NaF/SnCl₂ e quitosana foi mais eficaz na inibição da perda de tecido quando comparada a todos os outros seis dentifrícios, exceto ao controle positivo (gel SnF₂) que obteve o melhor resultado. Todos os outros dentifrícios mostraram-se ter efeitos protetores significativos (entre 27-67% na redução), exceto um dentifrício de NaF (1400 ppm e pH 4,7) que não diferiu do controle negativo.³⁵

Outros estudos também buscaram avaliar a quitosana associada ao F⁻ e Sn²⁺. Schlueter et al.⁸⁸ (2013) avaliaram o efeito protetor de dentifrício com quitosana associada ao F⁻ e ao Sn²⁺ (1400 ppm F⁻, 3500 ppm Sn²⁺, 0,5% quitosana, pH 4,4) na proteção do esmalte contra a erosão e abrasão *in situ*, comparando-o com dentifrícios contendo NaF e placebo. O efeito protetor mais significativo foi visto para o dentifrício com quitosana e fluoreto (50-60% de proteção no desgaste) comparado aos dentifrícios NaF (21%) e placebo, que não diferiram entre si.

Carvalho e Lussi⁸⁴ (2014) também testaram a formulação de dentifrício contendo F/ Sn/ quitosana em associação com solução de Sn²⁺. Neste experimento foram testados cinco grupos, variando o tipo de dentifrício (preparadas como suspensões) em associação ou não ao enxaguante bucal: G1: dentifrício placebo e enxágue com água corrente; G2: dentifrício com fluoreto de sódio (NaF – 1400 ppm) e enxágue com água corrente; G3: dentifrício com F (1400 ppm)/ Sn (3500 ppm)/ quitosana (0,5%) e enxágue com água da torneira; G4: dentifrício com F/ Sn/ quitosana e enxágue com Sn²⁺ (800 ppm); G5: dentifrício com NaF e enxágue com NaF (500 ppm). As amostras de esmalte (pré-molares de humanos) foram submetidas à ciclagem erosiva de pH por 8 dias e foram submetidas ao tratamento (abrasão - 2 min de incubação em suspensão de dentifrício; escovação com 20 movimentos de vai-e-vem). A perda de microdureza foi avaliada diariamente, inicialmente e após cada tratamento. A formulação de dentifrício contendo F/Sn/ quitosana em combinação com a solução de Sn²⁺ mostrou melhor resultado quanto à proteção, reduzindo a perda de esmalte por erosão e abrasão em 75% quando

comparada ao placebo, sendo superior aos demais tratamentos propostos na redução da perda de microdureza de superfície.

Pini et al.²² (2016) avaliaram o efeito de soluções contendo AmF (500 ppm F⁻), SnCl₂ (800 ppm Sn²⁺) e quitosana (diferindo na viscosidade: CH 50, CH500, CH1000 e CH 2000 mPas) sobre o DDE do esmalte. Metade dos grupos foi desmineralizada (experimento 1, E1; 10 dias, 6 × 2 min/dia, ácido cítrico de 0,5%, pH 2,8) e exposta a soluções (2 × 2 min/dia); a outra metade foi adicionalmente escovada (15 s, 200 g) com dentifrício não fluoretado antes da imersão nas soluções (experimento 2, E2). As soluções experimentais em E1 resultaram em proteção da perda do esmalte entre 77 a 80%; no caso da CH2000 a perda de esmalte foi completamente inibida pela formação de precipitados, sugerindo que a quitosana poderia ajudar a reter estanho e flúor na área desmineralizada. Não houve diferenças significantes entre as demais soluções experimentais quando comparadas. Em E2, as soluções reduziram a perda do esmalte entre 51 a 62% em comparação ao controle negativo, sendo os melhores resultados encontrados para CH50 e CH500 (62 e 61%, respectivamente). Pela análise por MEV e EDX, notou-se um aumento de carbono e estanho nas amostras tratadas com a solução contendo CH 2000 mPas, indicando deposição de matéria orgânica e estanho proveniente da solução, especialmente em E1, pois em E2 devido à escovação, os teores de carbono e estanho diminuíram em todos os grupos tratados.²²

Os mesmos autores testaram suspensões de dentifrícios (1g de dentifrício para 3 mL de água) contendo F / Sn (500 ppm F⁻ na forma de AmF, 800 de ppm Sn²⁺ na forma de SnCl₂) e quitosana (0,5%, viscosidade: 50, 500, 1000 ou 2000 mPas). As amostras de esmalte foram submetidas à ciclagem erosiva de pH associada ao tratamento e abrasão. No experimento 1 (somente erosão), todas as suspensões de dentifrícios experimentais inibiram completamente a perda de tecido em comparação ao controle negativo. No experimento 2 (erosão + abrasão), as suspensões de dentifrícios reduziram significativamente a perda de tecido em todos os grupos variando entre 68 a 100% em comparação com o controle negativo. CH 500 e CH 1000 foram capazes de inibir completamente a perda de tecido. A eficácia das formulações de quitosana foi comparável ao grupo de controle positivo, exceto para CH1000, que mostrou um efeito superior.⁸⁹

O mecanismo de ação da associação entre fluoreto/estanho e a quitosana ainda permanece obscuro e não há estudos sobre a associação entre quitosana e TiF₄/NaF em solução em relação à prevenção do DDE do esmalte e dentina, o que pode ser interessante de ser testado

com base em toda a revisão apresentada. Também temos pouca informação sobre a associação entre fluoreto e quitosana sobre o DDE da dentina, o que também justificou a realização do presente trabalho.

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

Este trabalho avaliou o efeito do TiF_4/NaF associado ou não com a quitosana (com duas viscosidades) sobre a prevenção da erosão dentária, na tentativa de melhorar a sua performance, aumentando a chance da mesma ser comercializada e aplicada clinicamente na forma de solução para bochecho. A hipótese nula formulada é que as soluções de TiF_4/NaF contendo quitosana não teriam a mesma eficácia que a solução comercial contendo fluoreto e estanho sobre a prevenção do desgaste erosivo do esmalte e da dentina *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O estudo foi primeiramente aprovado pelo Comitê de Ética Local de Uso de Animais (Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, números 015/2019 e 018/2019). Cento e cinquenta incisivos bovinos foram previamente mantidos em solução de timol a 0,1% durante o período de preparo das amostras. As amostras de dentina (n = 105) foram preparadas considerando a porção cervical vestibular da raiz enquanto as amostras de esmalte (n = 105) foram obtidas da superfície bucal das coroas de incisivos bovinos. As amostras foram embutidas em resina acrílica e polidas (Figura 1A) usando lixas para polimento (320, 600 e 1200 de granulação, contendo óxido de alumínio; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) refrigeradas com água e o papel de feltro molhado com spray de diamante (1 μ m; Buehler, EUA). O polimento foi controlado para remover 200-300 μ m de camada mais externa da superfície dentária (Figura 1B). As áreas de referência (áreas de controle) na superfície polida foram marcadas com duas linhas paralelas feitas com uma lâmina de bisturi, a 2,0 mm de distância uma da outra. Uma pequena perfuração foi realizada em uma das áreas de referência para padronizar o início da análise do perfil (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha). Após a análise do perfil inicial, 2/3 da superfície externa das amostras foram protegidos com esmalte cosmético de unha vermelho, deixando apenas 1/3 da área central (2 mm) exposta (Figura 1C). As amostras de esmalte e dentina foram divididas aleatoriamente em sete grupos (n = 15) e armazenadas em água deionizada (a 4°C) por um curto período de tempo (7 dias) até serem utilizadas para o experimento. Figura 1 ilustra o processo de preparo das amostras.

O tamanho da amostra foi calculado com base no estudo anterior³ considerando as diferenças entre TiF_4/NaF e controle, uma força amostral de 80% e um erro alfa de 5% (o resultado foi de 5 amostras por grupo). Os grupos foram: (1) solução comercial com SnCl_2/NaF (800 ppm Sn^{2+} , 500 ppm F^- , pH 4,5, Elmex[®], GABA Int. AG, Switzerland, controle positivo); (2) 0,042% NaF e 0,049% TiF_4 (NaF: 190 ppm F^- ; TiF_4 : 190 ppm Ti^{4+} e 300 ppm F^-); (3) similar ao grupo 2 mas com adição de 0,5% quitosana (75% desacetilação, CH 500 mPas), (4) similar ao grupo 2 mas com adição de 0,5% quitosana (75% desacetilação, CH 2000 mPas), (5) sem tratamento, (6) 0,5% quitosana (75% desacetilação, CH 500 mPas) e (7) 0,5% quitosana (75% desacetilação, CH 2000 mPas).

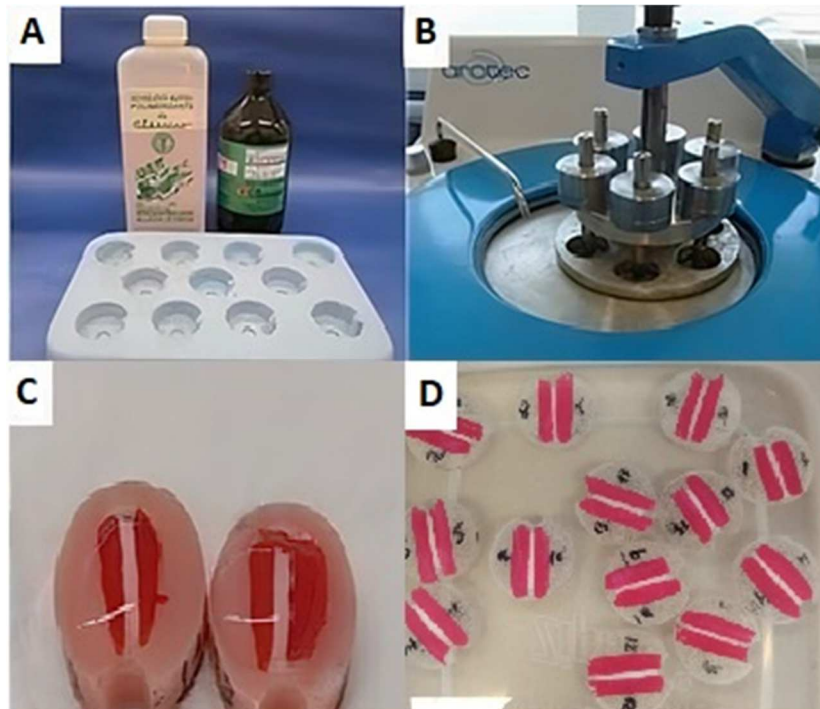


Figura 1- A) Molde de silicone e resina acrílica auto-polimerizável utilizados para embutir as coroas e raízes; B) Politriz Metalográfica utilizada no polimento das amostras; C) Amostras de esmalte embutidas, polidas e com 2/3 da superfície protegidos; D) Amostras de dentina embutidas, polidas e com 2/3 da superfície protegidos.

4.2 CICLAGEM DE pH E TRATAMENTOS COM AS SOLUÇÕES FLUORETADAS

As amostras foram submetidas a um modelo de ciclagem de pH por 7 dias. Os desafios erosivos foram feitos quatro vezes ao dia por imersão em solução de ácido cítrico (0,1%, pH 2,5, sem agitação mecânica) por 90 s cada (Figura 2A), em um recipiente contendo 30 ml da solução erosiva por amostra, a 25°C. Entre cada desafio erosivo (2 h de intervalo) e durante a noite (entre o último desafio erosivo e o primeiro do dia seguinte), as amostras foram expostas à saliva artificial de Klimek modificada (Figura 2B) (pH 6,8, 30 mL/amostra). A saliva artificial de Klimek modificada foi composta pelos seguintes reagentes: 0,001 g de ácido ascórbico, 0,015 g de glicose, 0,29 g de NaCl, 0,085 g de CaCl₂, 0,08 g de NH₄Cl, 0,635 g de KCl, 0,08 g de NaSCN, 0,165 g de KH₂PO₄, 0,1 g de carbamida e 0,17 g de Na₂PO₄ em 500 mL de água destilada.^{3,4} A saliva artificial de Klimek modificada foi trocada diariamente e a solução de ácido cítrico foi substituída a cada desafio.

Os tratamentos foram realizados uma vez por dia (Figuras 2C e 2D) (imediatamente após o último desafio erosivo) expondo as amostras às respectivas soluções de tratamento

(Figura 2C) ($v = 0,5$ ml/amostra) por 30 s ($n=15$ por grupo): (1) solução comercial com SnCl_2/NaF (800 ppm Sn^{2+} , 500 ppm F^- , Elmex[®], GABA Int. AG, Suíça, controle positivo); (2) 0,042% NaF e 0,049% TiF_4 (NaF: 190 ppm F^- ; TiF_4 : 190 ppm Ti^{4+} e 300 ppm F^-); (3) semelhante a 2, mas com acréscimo de 0,5% de quitosana (CH 500 mPas, 75% desacetilação); (4) semelhante a 2, mas com acréscimo de 0,5% de quitosana (CH 2000 mPas, 75% de desacetilação), (5) sem tratamento (controle negativo, água deionizada); (6) 0,5% quitosana (CH 500 mPas, 75% desacetilação) e (7) 0,5% quitosana (CH 2000 mPas, 75% de desacetilação).



Figuras 2 – A) Amostras imersas em solução de ácido cítrico (0,1%, pH 2,5) por 90 s; B) Recipientes usados para a ciclagem, na ordem, para imersão em ácido (frente) e para imersão em saliva artificial de Klimek modificada (atrás); C) Soluções de tratamento; D) Aplicação da solução de tratamento utilizando pipeta ($v = 0,5$ ml/amostra) sobre a superfície exposta por 30 s.

A viscosidade das soluções de tratamento (Tabela 1) foi verificada previamente na Universidade de Berna (BEPE - Processo Fapesp 2019/0078-8) utilizando-se um viscosímetro capilar de vidro (Ubbelohde 501 01, 08 – 5 mm²/s, Gerber Instruments AG, Suíça, Figura 3). As soluções experimentais de flúor foram preparadas utilizando-se reagentes de grau analítico de Sigma-Aldrich e seus valores de pH foram medidos utilizando pHmetro após a calibração com padrão 4 e 7. Para o preparo das soluções contendo quitosana, diluiu-se 1% do respectivo tipo de quitosana (Hepe Medical Chitosan GmbH, Halle, Alemanha) em solução de ácido acético a 1% e, em seguida, essa solução foi misturada com água 1:1.

Após o tratamento, o excesso de solução foi removido com haste flexível de plástico contendo algodão na ponta (cotonete), tomando cuidado para não danificar as superfícies expostas. Na sequência, as mesmas foram imersas em saliva artificial de Klimek modificada. O pH das soluções de tratamento foi mensurado no dia do preparo (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de pH e viscosidade (mm^2/s) das soluções de tratamento.

Tratamento	pH	Viscosidade (mm^2/s)
Elmex[®] (SnCl₂/NaF/AmF)	4,5	1,22 mm^2/s
TiF₄/NaF	3,8	0,92 mm^2/s
TiF₄/NaF + CH 500 mPas	4,5	25,4 mm^2/s
TiF₄/NaF + CH 2000 mPas	4,5	115,9 mm^2/s
CH 500 mPas	4,0	43,1 mm^2/s
CH 2000 mPas	4,0	84,5 mm^2/s



Figura 3 – Viscosímetro capilar de vidro Ubbelohde.

4.3 PERFILOMETRIA PARA AFERIÇÃO DA PERDA DE SUPERFÍCIE DENTÁRIA

Os perfis das superfícies do esmalte e da dentina foram obtidos utilizando um perfilômetro de contato (Figura 4A) (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha), inicialmente e após 7 dias de ciclo erosivo (final). Em cada leitura, foram realizadas cinco varreduras de superfície equidistantes de cada amostra (4 mm de corrida para dentina e 6 mm de corrida para esmalte, com 250 μm de distância entre as varreduras). Para realizar a medição final, o esmalte cosmético de unha foi removido com haste flexível de plástico contendo algodão e uma solução de acetona diluída em água deionizada (proporção 1:1).

Para permitir a comparação adequada e reprodução fiel das leituras inicial e final, as amostras apresentaram uma marca de identificação (furo para determinação de Z inicial) e foram inseridas em um dispositivo metálico (para determinação dos eixos x e y), de forma que a ponta do perfilômetro fosse reposicionada com precisão em cada medição.^{3,4,8} Em adição, todas as leituras de perfil em amostras de dentina foram realizadas com umidade, para evitar colapso das fibras de colágeno (1 gota de água deionizada antes do início da leitura).

Os perfis inicial e final foram sobrepostos e comparados usando o software MahrSurf CXR20 (Figura 4B). Calculou-se a profundidade média da área abaixo da curva de sobreposição dos dois perfis e uma média das 5 leituras foi obtida (μm), sendo o limite mínimo de detecção em torno de 0,5 μm .

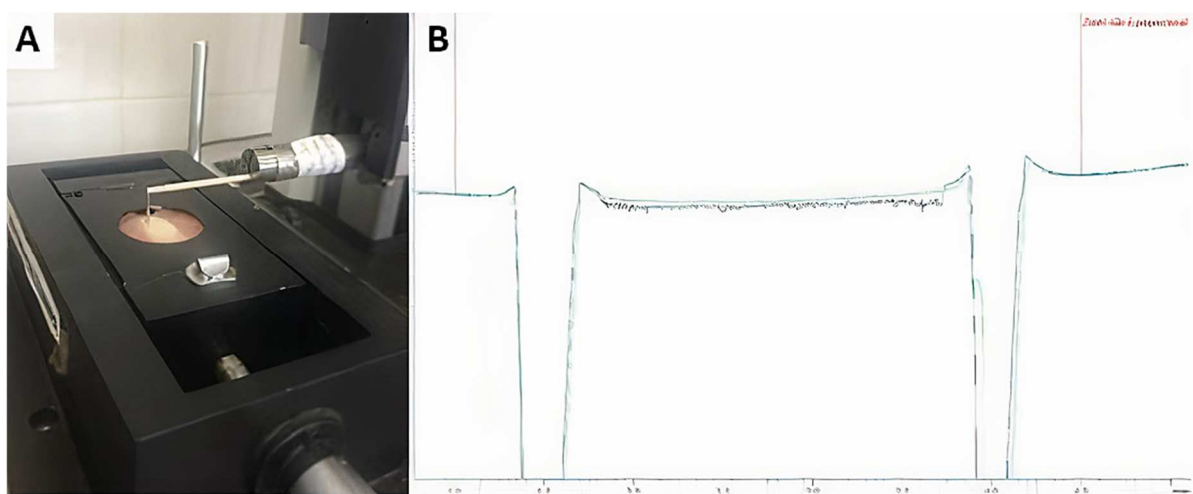


Figura 4 - A) Análise da Perfilometria final. B) Perfis inicial e final superpostos para comparação e medição da perda de estrutura dentária.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDX)

Após a realização da avaliação do perfil, três espécimes de dentina e dois espécimes de esmalte de cada grupo foram submetidos à avaliação morfológica da superfície por microscopia eletrônica de varredura-MEV. Os espécimes permaneceram 12 h em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram cuidadosamente desidratadas em um dessecador a vácuo contínuo durante um período de dois dias e, logo depois, metalizadas com cobertura de ouro como ilustrado na Figura 5A (DentronVacuum – Desk IV Moostestonn/NJ – EUA).

Em seguida, todas as amostras foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura - MEV (Figura 5B) (Philips XL 30 FEG, EUA) utilizando modos de imagens de elétrons retro espalhados (BSE) e elétrons secundários (SE). Desta forma, fotos digitais foram obtidas com a distribuição das fases formadas nas superfícies dentárias tratadas. As análises por MEV-EDX foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural, Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, na cidade de São Carlos-SP. Fotos digitais foram obtidas nos aumentos de 500, 2.000, 5.000, 10.000 e 20.000 x de cada amostra e então selecionadas imagens representativas no tamanho de 5.000 x para as amostras tratadas com as diferentes soluções experimentais (Figura 5C). Foi realizada a microanálise química, com mapeamento de composição química utilizando EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy –Bruker), no aumento de 1000 x, referente aos elementos Cálcio, Fósforo, Oxigênio, Hidrogênio, Sódio, Magnésio, Carbono, Flúor, Titânio e Estanho. Esta leitura foi realizada em 3 áreas diferentes da amostra, para o cálculo de uma média da porcentagem dos elementos citados.



Figura 5 - A) Amostras metalizadas com cobertura de ouro. B) Microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30 FEG (EUA). C) Amostra posicionada no microscópio para análise.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Graph Pad Prism (Graph Pad, EUA). Foram verificadas a distribuição normal e a homogeneidade dos dados (testes de Kolmogorov–Smirnov e Bartlett, respectivamente). A perda de esmalte (μm) foi submetida ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste pos-hoc Dunn e a perda de dentina (μm) foi comparada utilizando-se ANOVA seguida pelo teste pos-hoc Tukey. O nível de significância foi fixado em 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESMALTE

5.1.1 PERFILOMETRIA

A solução Elmex[®] e as soluções TiF₄/NaF modificadas com quitosana foram capazes de reduzir significativamente a perda de esmalte após 7 dias de experimento (p<0,0001). As soluções que continham apenas TiF₄/NaF ou apenas quitosana foram semelhantes ao controle negativo. A solução Elmex[®] teve o melhor efeito protetor comparado a todas as outras soluções, exceto a experimental contendo TiF₄/NaF + CH 2000 mPas. Os resultados de perda de superfície do esmalte são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores medianos (intervalo interquartil, II) de perda de esmalte (µm) de acordo com cada tratamento.

Tratamentos	Mediana (II)
Elmex [®] (SnCl ₂ /NaF/AmF)	0,72 (0,18) ^a
TiF ₄ /NaF	1,52 (0,24) ^{bc}
TiF ₄ /NaF + CH 500 mPas	1,24 (0,49) ^b
TiF ₄ /NaF + CH 2000 mPas	1,28 (0,25) ^{ab}
Água (controle negativo)	1,70 (0,27) ^c
CH 500 mPas	1,41 (0,28) ^{bc}
CH 2000 mPas	1,40 (0,30) ^{bc}

Diferentes letras minúsculas apontam diferenças significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis/Dunn, p<0,0001).

5.1.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

As imagens representativas mostram depósito de precipitados na superfície das amostras de esmalte tratadas tanto com Elmex[®] (SnCl₂/AmF/NaF) (Figura 6A) como com TiF₄/NaF (Figura 6B), sendo mais homogênea a camada produzida pela solução comercial. Um menor número de precipitados foi visto sobre as amostras tratadas com TiF₄/NaF + CH 500 mPas (Figura 6C) e TiF₄/NaF + CH 2000 mPas (Figura 6D). A Figura 6E corresponde ao controle negativo apresentando superfície lisa. Resultado similar à combinação de F e CH foi visto pra a CH 2000

mPas (Figura 6G) que também apresentou precipitados na superfície do esmalte em quantidade muito maior do que a amostra tratada com CH 500 mPas (Figura 6F).

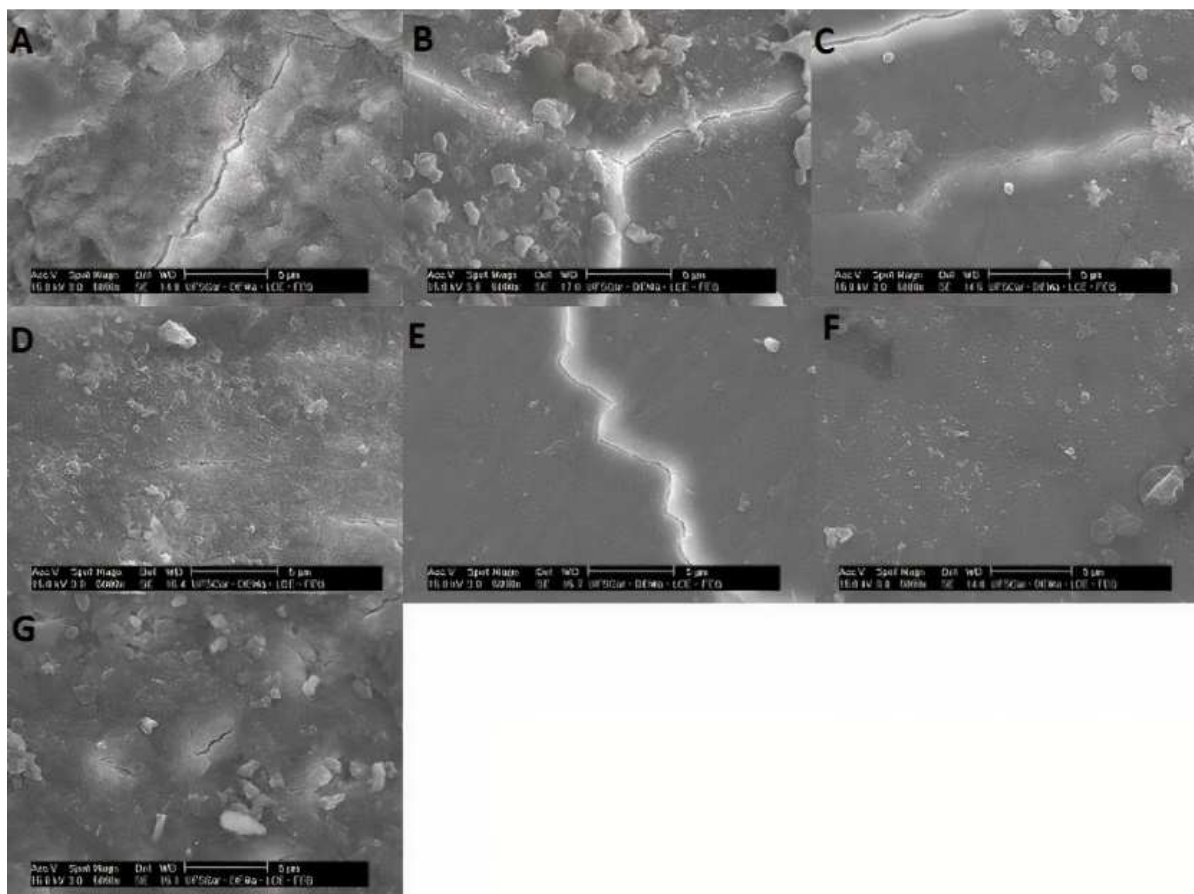


Figura 6. Imagens do MEV de esmalte representativas de cada grupo: A) Elmex[®] (SnCl₂/NaF/AmF); B) TiF₄/NaF; C) TiF₄/NaF + CH 500 mPas; D) TiF₄/NaF + CH 2000 mPas; E) Água (controle negativo); F) CH 500 mPas; G) CH 2000 mPas.

Em relação à análise por EDX, não houve diferenças relevantes entre os grupos em relação à proporção Ca/P assim como para alguns elementos que aparecem em menor quantidade sobre o esmalte. Em relação ao estanho, só foi possível detectar quantidades significantes (acima de 1%) para o grupo Elmex[®], pois foi a única solução contendo este elemento químico na forma de cloreto de estanho. Não foi possível detectar titânio sobre a superfície do esmalte, mesmo nas amostras tratadas com solução contendo este elemento. A deposição de fluoreto também foi modesta para todos os grupos de tratamento, sendo um pouco mais elevada no caso da solução TiF₄/NaF (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão da porcentagem (%) de elementos químicos presentes no esmalte tratado com as diferentes soluções.

	Ca	P	Ca/P	O	Mg	C	Na	F	Ti	Sn
Elmex® (SnCl₂/NaF/ AmF)	39,5 ± 0,8	16,8 ± 0,8	2,3 ± 0,0	32,7 ± 1,5	0,6 ± 0,4	7,1 ± 2,3	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,8 ± 0,6
TiF₄/NaF	38,7 ± 8,1	14,1 ± 2,6	2,8 ± 0,9	35,0 ± 6,1	0,3 ± 0,0	10,9 ± 4,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
TiF₄/NaF+ CH 500	43,1 ± 3,3	16,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	32,1 ± 2,1	0,3 ± 0,0	7,7 ± 2,3	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
TiF₄/NaF + CH 2000	35,5 ± 2,4	13,3 ± 1,0	2,6 ± 0,0	40,0 ± 2,4	0,3 ± 0,0	9,4 ± 0,7	0,7 ± 0,5	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Água (controle negativo)	45,8 ± 4,0	16,2 ± 0,9	2,8 ± 0,0	29,3 ± 4,3	0,3 ± 0,0	7,3 ± 0,7	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
CH 500	40,0 ± 2,1	16,3 ± 1,3	2,4 ± 0,0	34,6 ± 3,0	0,3 ± 0,0	7,9 ± 0,7	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
CH 2000	39,0 ± 3,1	16,0 ± 0,6	2,4 ± 0,2	34,6 ± 0,5	0,6 ± 0,3	8,5 ± 2,5	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

5.2 DENTINA

5.2.1 PERFILOMETRIA

A solução à base de quitosana (500 mPas) e a solução Elmex[®] foram capazes de reduzir significativamente a perda de dentina em comparação ao controle negativo. Todas as outras soluções experimentais foram semelhantes ao controle negativo e não diferem umas das outras (Tabela 4). A solução Elmex[®] teve melhor efeito protetor comparada a todas as soluções experimentais, só não diferindo estatisticamente da solução contendo CH 500 mPas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de média e desvio padrão do desgaste da dentina (μm) de acordo com cada tratamento.

Tratamento	Desgaste (μm)
Elmex [®] (SnCl ₂ /NaF/AmF)	0,53 \pm 0,23 ^a
TiF ₄ /NaF	1,06 \pm 0,33 ^b
TiF ₄ /NaF + CH 500 mPas	1,14 \pm 0,43 ^b
TiF ₄ /NaF + CH 2000 mPas	1,23 \pm 0,37 ^b
Água (controle negativo)	1,20 \pm 0,33 ^b
CH 500 mPas	0,60 \pm 0,24 ^a
CH 2000 mPas	1,25 \pm 0,48 ^b

Letras minúsculas distintas mostram diferenças significativas entre grupos (ANOVA/Tukey, $p < 0,0001$).

5.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

As imagens representativas mostram a presença de túbulos dentinários em todas as amostras de dentina, com alguma obliteração tubular para dentina tratada com TiF₄/NaF (Figura 7B), mas sem deposição em dentina intertubular. Por outro lado, foi possível ver um grande depósito sobre a dentina intertubular da amostra tratada com Elmex[®] (SnCl₂/AmF/NaF) (Figura 7A), e também, com menor evidência, nas amostras tratadas com TiF₄/NaF + CH500 mPas (Figura 7C) ou CH500 mPas (Figura 7F). Além disso, CH 500 mPas mostrou oclusão dos túbulos dentinários (Figura 7F). Por outro lado, amostras tratadas com soluções contendo CH 2000 mPas, com ou sem TiF₄/NaF, não apresentaram obliteração de túbulos, nem depósitos em dentina intertubular (Figuras 7D e 7G). Figura 7E corresponde ao controle negativo, mostrando os túbulos e dentina intertubular lisa.

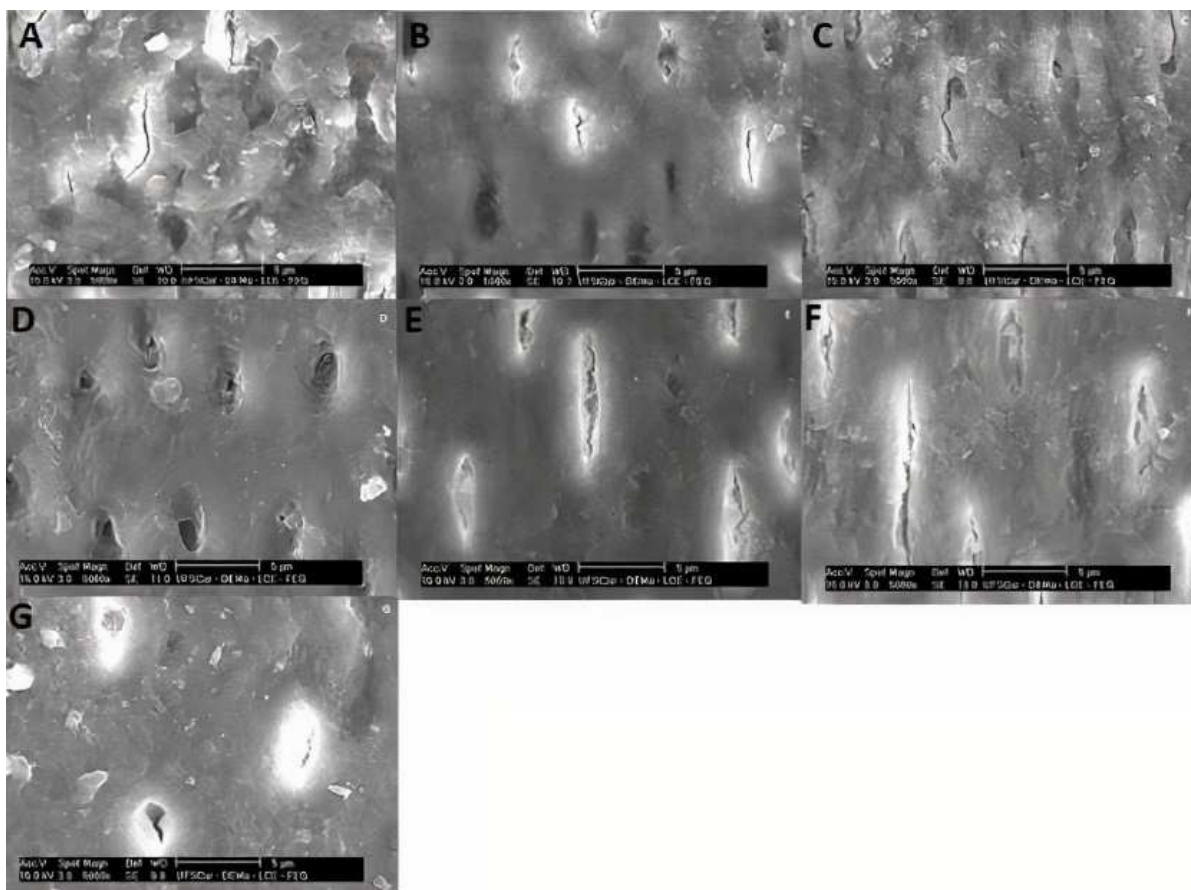


Figura 7. Imagens do MEV de dentina representativas de cada grupo: A) Elmex[®] (SnCl₂/NaF/AmF); B) TiF₄/NaF; C) TiF₄/NaF + CH 500 mPas; D) TiF₄/NaF + CH 2000 mPas; E) Água (controle negativo); F) CH 500 mPas; G) CH 2000 mPas.

Em relação à análise por EDX, só foi possível detectar quantidades significativas (acima de 1%) de estanho (Sn) para o grupo Elmex[®], o que já era esperado, pois é a única solução contendo este elemento químico na forma de cloreto de estanho. As amostras de dentina tratadas com as soluções experimentais contendo TiF₄/NaF, com ou sem quitosana, apresentaram titânio, mas a deposição foi pequena comparada à do Sn (<1%). Todas as soluções que tinham algum tipo de sal fluoretado induziram deposição de fluoreto na superfície da dentina. Os maiores valores de F foram encontrados nas dentinas pertencentes aos grupos das soluções contendo TiF₄/NaF associado à quitosana, seguidas pelas soluções fluoretadas apenas (Tabela 5). Resultado diferente foi visto no grupo da CH 2000 mPas que apresentou um conteúdo mais baixo de Ca e P alterando a proporção Ca/P, o que pode ser devido à deposição deste carboidrato (especialmente do elemento C) sobre a superfície da dentina.

Tabela 5. Valores de média e desvio padrão da porcentagem (%) de elementos químicos presentes na dentina tratada com as diferentes soluções.

	Ca	P	Ca/P	O	Mg	C	Na	F	Ti	Sn
Elmex® (SnCl₂/NaF/ AmF)	27,9 ± 6,3	13,3 ± 4,6	2,1 ± 0,3	29,4 ± 3,6	0,8 ± 0,1	25,4 ± 7,9	0,4 ± 0,0	0,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1
TiF₄/NaF	24,5 ± 5,7	12,1 ± 6,1	2,2 ± 0,6	29,2 ± 9,1	0,7 ± 0,1	30,5 ± 1,3	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,4	0,0 ± 0,0
TiF₄/NaF + CH 500	29,0 ± 7,7	13,0 ± 3,9	2,2 ± 0,1	32,0 ± 2,8	0,6 ± 0,1	23,7 ± 6,4	0,5 ± 0,0	1,2 ± 1,6	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0
TiF₄/NaF+ CH 2000	27,1 ± 7,1	12,9 ± 3,0	2,1 ± 0,1	31,5 ± 3,0	0,7 ± 0,0	25,6 ± 0,6	0,5 ± 0,4	1,9 ± 1,2	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,0
Água (controle negativo)	25,6 ± 7,7	11,6 ± 3,6	2,2 ± 0,0	30,9 ± 7,3	0,6 ± 0,0	31,3 ± 2,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1
CH 500	25,1 ± 7,2	11,0 ± 3,0	2,3 ± 0,0	33,5 ± 4,5	0,7 ± 0,0	27,9 ± 4,8	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
CH 2000	18,5 ± 0,0	6,2 ± 1,2	2,6 ± 0,0	36,9 ± 2,0	0,6 ± 0,0	44,5 ± 11,4	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A hipótese nula foi rejeitada uma vez que as formulações contendo quitosana e fluoreto assim como a da quitosana sozinha foram capazes de reduzir significativamente a perda de esmalte e dentina de forma semelhante à solução comercial $\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$ (considerada a solução padrão-ouro F para esta proposta, ou seja, o controle positivo), respectivamente. No estudo de Castilho et al.⁴ (2015), a solução controle positivo (Elmex[®]) teve efeito protetor sobre a dentina de 52%, relativamente semelhante ao nosso valor (55% do efeito protetor), porém no caso deste estudo o tratamento foi aplicado 2x60 s por dia, já no presente trabalho foi de 1x30 s por dia, ou seja, a frequência e duração de aplicações não interferiram para o efeito desejável na dentina.

Referente ao esmalte, o estudo de Souza et al.³ (2014) mostrou 77,5% de proteção para a solução Elmex[®] (2x 60 s/dia), enquanto nosso estudo demonstrou 57,7% de proteção (1x 30 s/dia), ou seja, no caso do esmalte, a frequência e/ou tempo de aplicação parece(m) ter influência no resultado, mas que ainda é significativo mesmo quando aplicado em menor frequência e tempo.

Sendo assim, a solução de fluoreto contendo íons de estanho (Elmex[®]) parece ser suficiente para proteger contra a erosão dentária independente da frequência e duração da aplicação, em concordância com publicações anteriores.^{14,15,17} Seu efeito protetor deve-se à formação de precipitados na superfície dentária, como $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$, SnOHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, que são mais resistentes a ácidos do que as partículas CaF_2 induzidas pela aplicação de NaF ¹⁹, assim como da incorporação de estanho à superfície desmineralizada. Em contrapartida, o efeito da solução de TiF_4/NaF parece ser dependente da frequência e do tempo de exposição, pois em nosso estudo não foi eficaz quando aplicada a 1x30 s por dia, em comparação com os melhores resultados da aplicação de 2x60 s por dia sobre o esmalte e dentina especialmente.^{3,4} Desse modo, para se ter uma efetiva deposição de óxido de titânio, fosfato de titânio hidratado e fluoreto de cálcio parecem ser necessários maior frequência e tempo de aplicação da solução de TiF_4/NaF , como pode ser visto na análise de EDX que mostrou pouca deposição de fluoreto e titânio (em geral <1%) sobre o esmalte e dentina tratados com esta solução.

Com relação ao mecanismo de ação do TiF_4 , um estudo recente elucidou a reação do verniz de TiF_4 com o esmalte. O titânio é capaz de reduzir a desmineralização, uma vez que se liga ao fosfato da apatita, formando uma camada tipo “*glaze*” rica em óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado que é mais resistente ao ácido que a camada de CaF_2 .²⁰ Apesar dos bons resultados da aplicação da solução TiF_4 pura (500 ppm F-, pH 2.5) terem sido previamente demonstrados^{3,4}, não incluímos essa solução no presente estudo, pois possui um pH muito baixo (inferior a 3), o que o torna inviável para a comercialização, devido aos possíveis efeitos colaterais citotóxicos. Especula-se que o efeito poderia ter sido diferente ou até melhor se TiF_4 puro tivesse sido combinado com CH ao invés de TiF_4/NaF .

Trabalhos anteriores mostraram que o aumento da viscosidade de soluções fluoretadas reduziu a erosão do esmalte em experimento de 5 dias (4x5 min/dia, 0,3% de ácido cítrico)²¹ e de 10 dias (6 × 2 min/dia, 0,5% de ácido cítrico)²². Entretanto, há poucos estudos correlacionando o aumento de viscosidade de soluções com a prevenção da erosão em dentina. Beltrame et al.³¹ (2018) observaram que amostras tratadas (6 vezes ao dia por 2 min) com soluções de quitosana fosforilada 0,5%, alcalina ou neutra apresentaram redução da perda de dentina em 33%, enquanto a quitosana tradicional 0,5% (75-85% de desacetilação) apresentou uma taxa de prevenção de 18%, em um experimento de 5 dias (6 x 2 min, 0,5% de ácido cítrico), sendo todas soluções superiores ao controle negativo (solução salina tamponada com fosfato); no entanto, a solução $\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$ ainda apresentou a melhor taxa de redução da erosão (67%).

Neste sentido, o uso da quitosana em associação com fluoreto e estanho tem sido cada vez mais investigado, com efeito promissor no controle do desgaste erosivo para o esmalte^{34,35}, no entanto, menos significativo para dentina.³⁶ A hipótese é que a quitosana aumentaria a retenção dos sais de estanho e do fluoreto sobre a estrutura dentária desmineralizada.²²

A quitosana é um polímero natural derivado da desacetilação da quitina. A unidade única possui um grupo amino que fornece ao polímero um forte potencial zeta positivo e, portanto, a quitosana pode facilmente se adsorver no esmalte, que tem um forte potencial zeta negativo.^{82,83} A dentina, por sua vez, tem um potencial zeta negativo menor que o esmalte e a interação com a quitosana pode ser reduzida por consequência. A quitosana na forma fosforilada, se torna mais eletronegativa, diminuindo o potencial zeta positivo, o que permite uma maior interação com as fibras de colágeno (cargas positivas), favorecendo a remineralização.⁸⁵ Beltrame et al.³¹ (2018) mostraram que as amostras de dentina tratadas com

quitosana fosforilada apresentaram uma integridade da rede de fibrilas de colágeno, principalmente em pH alcalino ou neutro, criando a hipótese de que a camada de quitosana criada sobre a superfície da dentina poderia inibir a ativação das metaloproteinases (MMPs) diminuindo assim a degradação do colágeno. Sabe-se que a manutenção da integridade das fibrilas de colágeno pode fornecer uma maior resistência à desmineralização e favorecer a remineralização.⁹⁰

As soluções contendo fluoreto apresentaram viscosidade semelhante à da água; no entanto, quando a quitosana (CH 500 e 2000 mPas) foi adicionada, a viscosidade das soluções de TiF_4/NaF aumentou 27 e 125 x, respectivamente, em comparação com a solução de TiF_4/NaF sem quitosana. A inclusão da quitosana com o consequente aumento da viscosidade parece aumentar o efeito protetor das soluções de TiF_4/NaF para o esmalte (24 a 27% de proteção), no entanto, o mesmo não foi visto para a dentina (5% de proteção).

Como demonstrado nas imagens do MEV, as soluções de tratamento induziram precipitados sobre a superfície do esmalte, porém a camada mais homogênea foi vista com a aplicação da solução comercial, o que está condizente com os resultados do perfil do esmalte mostrando um menor valor de desgaste para este grupo. Já na dentina, a solução comercial induziu precipitação na dentina intertubular, enquanto a CH500 obliterou túbulos, sendo que ambos mecanismos podem ter sido responsáveis pela redução da perda de dentina. Já os outros grupos apresentaram imagens intermediárias. Obviamente, a análise por MEV é subjetiva e demonstra apenas a morfologia de poucas amostras. Para complementar, realizamos a análise por EDX que tornou evidente pelos resultados o importante papel do Sn^{2+} sobre a superfície dentária em relação ao efeito protetor da solução comercial. No entanto, ambos métodos falharam em explicar com detalhes os diferentes resultados obtidos e mecanismos de ação, sendo necessários estudos adicionais para comprovação dos resultados.

Apenas para o esmalte, a associação de TiF_4/NaF e quitosana foi interessante, o que pode ser devido muito mais à ação da quitosana que à do fluoreto, uma vez que foram detectados baixos níveis de Ti e F sobre o esmalte, reforçando o uso de métodos adicionais para visualizar e quantificar a quitosana presente na estrutura dentária. As soluções experimentais $TiF_4/NaF + CH$ reduziram a perda de esmalte em cerca de 26% em comparação com o controle negativo. Apesar de estatisticamente significativo, esse efeito pode não ser reconhecido clinicamente, reforçando a necessidade de estudos adicionais. Por outro lado, apesar de maiores quantidades de F e Ti terem sido vistas na dentina, o melhor efeito foi encontrado para CH 500 pura,

reforçando mais uma vez o potencial protetor deste carboidrato, que deve ser explorado no futuro. Fato é que o aumento da viscosidade não melhorou o efeito da CH, pelo contrário, o que provavelmente se deve à uma exagerada viscosidade que poderia ter reduzido a superfície de contato com a estrutura dentária, o que deve ser melhor investigado.

Nossos resultados não podem ser comparados diretamente à literatura, pela escassez de estudos com solução, sendo mais prevalente estudos com dentifrícios. Pini et al.²² (2016) mostraram que a solução de flúor (800 ppm Sn^{2+} e 500 ppm F^-) contendo CH 2000 mPas (80% de desacetilação) teve um efeito significativo na redução da perda de esmalte em relação ao controle positivo (Elmex[®]), enquanto as soluções contendo CH 50, 500 e 1000 mPas não diferiram do controle positivo. Nosso estudo mostrou benefício da associação do TiF_4/NaF e quitosana no esmalte, porém em desacordo com Pini et al.²² (2016), não foi possível verificar diferenças entre 500 e 2000 mPas, o que pode ser devido ao grau de desacetilação da quitosana testada. Apesar da diferença de desacetilação entre ambos os estudos ter sido de apenas 5%, o alto grau de desacetilação está relacionado ao grande potencial zeta positivo⁷⁸, o que poderia favorecer a interação da quitosana com o esmalte, que tem um potencial zeta negativo.⁸³ No entanto, não apenas o grau de desacetilação é importante neste contexto, mas também a distribuição dos grupos de acetila na molécula⁸⁰ e o valor do pH.⁷⁸ Outra razão para essa diferença pode estar relacionada à metodologia, em que Pini et al.²² (2016) realizaram desafios erosivos mais agressivos e maior frequência e duração dos tratamentos com os fluoretos/quitosana. Espera-se que as soluções fluoretadas contendo íons metálicos polivalentes, como Ti^{4+} e Sn^{2+} , tenham um efeito protetor cumulativo em comparação com as soluções convencionais de F, isto é, após várias aplicações e desafios erosivos, o efeito protetor tende a ser reforçado. Essa proteção provavelmente é melhorada pela ação da quitosana, que também pode formar múltiplas camadas após várias aplicações.

Quando se avalia a ação da quitosana em dentifrícios, observam-se seus efeitos contra o desgaste erosivo tanto para esmalte⁹¹ quanto para dentina⁹², sugerindo que a quitosana por si só já apresenta efeito protetor quando a erosão dentária é associada à abrasão. Aykut-Yetkiner et al.⁹² (2014) mostraram que o dentifrício comercial Chitodent[®], cuja a formulação contém 0,5% de quitosana e ausência de sais fluoretados, apresentou uma taxa de prevenção contra o desgaste dentinário por erosão e abrasão de 60% quando comparado ao grupo sem tratamento após 6 dias de experimento. O dentifrício Elmex[®] Erosion ($\text{NaF}/\text{AmF}/\text{SnCl}_2$ + quitosana) teve uma

taxa de prevenção de 66%, mas não diferiu do Chitodent[®] neste estudo. Apesar do bom efeito do dentifrício contendo apenas quitosana, todos os dentifrícios testados foram eficazes em reduzir a erosão dentinária, mas nenhum foi superior ao dentifrício convencional contendo AmF. Apesar de não se poder comparar resultados obtidos com solução e dentifrício, uma vez que o último tem uma fórmula complexa e é aplicado durante a escovação, acreditamos ser interessante fazer a associação de AmF/NaF/SnCl₂ e quitosana em solução como já foi realizado com dentifrício em futuros estudos.

Por fim, esses resultados devem ser confirmados em modelos *in situ*, nos quais a saliva pode desempenhar um papel importante no efeito das soluções testadas, já que a camada produzida pelo quitosana é mais forte na presença de proteínas salivares, como a mucina.⁹³ Fatores como os tipos de fluoreto e graus de viscosidade devem ser mais estudados. Quanto à dentina, sugerimos que mais experimentos devam ser feitos para comprovação destes resultados e, se for o caso, investir em análises químicas da porção orgânica da camada superficial da dentina (proteoma da dentina, análise da atividade de enzimas dentinárias, por exemplo), para averiguação de um eventual mecanismo de ação da quitosana sozinha sobre este tecido.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Como conclusão do presente estudo, a adição de quitosana à solução contendo TiF_4/NaF melhorou seu efeito protetor contra o desgaste erosivo em comparação com o controle negativo somente para o esmalte. A solução $\text{TiF}_4/\text{NaF} + \text{CH}$ (2000 mPas) teve efeito compatível ao controle positivo (Elmex[®]) sobre a proteção contra perda de esmalte neste modelo experimental. Quanto à dentina, apenas a solução contendo CH 500 mPas teve efeito protetor contra o desgaste de forma compatível ao controle comercial positivo (Elmex[®]) neste modelo de estudo. Portanto, as soluções testadas tiveram comportamento diferente sobre os tecidos dentários.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 - Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR. The effect of an experimental 4% TiF₄ varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF₄ solution on dental erosion in vitro. *Caries Res.* 2008; 42:269-274.
 - 2 - Levy FM, Rios D, Buzalaf MA, Magalhães AC. Efficacy of TiF₄ and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive-abrasive wear. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(4):1097-1102.
 - 3 - Souza BM, Lima LL, Comar LP, Buzalaf MA, Magalhães AC. Effect of experimental mouthrinses containing the combination of NaF and TiF₄ on enamel erosive wear in vitro. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(6):621-624.
 - 4 - Castilho ARF, Salomão PMA, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Protective effect of experimental mouthrinses containing NaF and TiF₄ on dentin erosive loss in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(5):486-490.
 - 5 - Comar LP, Cardoso C de A, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MA, Magalhães AC. TiF₄ and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(1):14-18.
 - 6 - Magalhães AC, Dos Santos MG, Comar LP, Buzalaf MA, Ganss C, Schlueter N. Effect of a Single Application of TiF₄ Varnish versus Daily Use of a Low- Concentrated TiF₄/NaF Solution on Tooth Erosion Prevention in vitro. *Caries Res.* 2016; 50(5):462-470.
 - 7 - Comar LP, Souza BM, Martins J, Santos MG, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Response of carious enamel to TiF₄ varnish treatment under diverse cariogenic activities in situ. *J Dent.* 2017; 63:81-84.
 - 8 - de Souza BM, Santi LRP, de Souza Silva M, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of an experimental mouth rinse containing NaF and TiF₄ on tooth erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2018; 73:45-49.
 - 9 - Martines de Souza B, Vertuan M, Buzalaf MAR, Magalhães AC. The Impact of the Demineralized Organic Matrix on the Effect of TiF₄ Varnish on the Progression of Dentin Erosive Loss. *Caries Res.* 2017; 51(3):264-270.
-
-

- 10 - Salomão PMA, Oliveira FA, Rodrigues PD, Al-Ahj LP, Gasque KCDS, Jeggle P, et al. The cytotoxic effect of TiF₄ and NaF on fibroblasts is influenced by the experimental model, fluoride concentration and exposure time. *PLoS One*. 2017; 12(6):e0179471.
- 11 - Sen BH, Kazemi RB, Spangberg LSW. Morphologic effects on L929 fibroblasts of titanium tetrafluoride application. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 86(3):341–346.
- 12 - Aranda Salomão PM, de Oliveira FA, Dos Santos DMS, Domezi JP, Dionísio TJ, de Oliveira RC, et al. TiF₄ and NaF varnishes induce low levels of apoptosis in murine and human fibroblasts through mitochondrial Bcl-2 family and death receptor signalling. *Arch Oral Biol*. 2019 Jan; 97:245-252.
- 13 - Mosquim V, Santi LRP, de Souza BM, Magalhães AC. Can TiF₄ varnish or TiF₄/NaF solution stain eroded and sound enamel? *J Dent*. 2019; 85:11-17.
- 14 - Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2010; 68(3):180-184.
- 15 - 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*. 2010; 89(11):1214-1218.
- 16 - 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; 15(3):361-367.
- 17 - João-Souza SH, Bezerra SJC, de Freitas PM, de Lima NB, Aranha ACC, Hara AT, et al. In situ evaluation of fluoride-, stannous- and polyphosphate-containing solutions against enamel erosion. *J Dent*. 2017; 63:30-35.
- 18 - Lussi A, Buzalaf MAR, Duangthip D, Anttonen V, Ganss C, João-Souza SH, et al. The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2019; 6:517-527.
- 19 - 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*. 2010; 118(4):376-384.
- 20 - Comar LP, Souza BM, Al-Ahj LP, Martins J, Grizzo LT, Piasentim I, et al. Mechanism of action of TiF₄ on dental enamel surface: SEM/EDX, KOH-soluble F and X-ray diffraction analysis. *Caries Res*. 2017; 51(6):554-567.
-
-

- 21 - Sakae LO, Bezerra SJC, João-Souza SH, Borges AB, Aoki IV, Aranha ACC, et al. An in vitro study on the influence of viscosity and frequency of application of fluoride/tin solutions on the progression of erosion of bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 2018; 89:26-30.
- 22 - Pini NI, Lima DA, Lovadino JR, Ganss C, Schlueter N. In vitro Efficacy of Experimental Chitosan-Containing Solutions as Anti-Erosive Agents in Enamel. *Caries Res.* 2016; 50(3):337-345.
- 23 - Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46:1–27.
- 24 - Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2003; 44:9–16.
- 25 - Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Invest.* 2006; 10:102–107.
- 26 - Akincibay H, Senel S, Ay ZY. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res Part B.* 2007; 80B:290–296.
- 27 - Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, et al. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:290–294.
- 28 - Boynueğri D, Özcan G, Şenel S, Uç D, Uraz A, Ögüş E, et al. Clinical and radiographic evaluations of chitosan gel in periodontal intraosseous defects: a pilot study. *J Biomed Mater Res Part B.* 2009; 90B:461–466.
- 29 - Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent* 2011; 39:218–224.
- 30 - Carvalho FG, França RCS, Tibau RA, Carlo HL, Santos RL. In vitro effect of chitosan nanoparticles on tooth enamel bio-corrosion. *Dental Mat.* 2017; 33:e17.
- 31 - Beltrame APCA, Suchyta D, Abd Alraheem I, Mohammed A, Schoenfisch M, Walter R, et al. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An in vitro Study. *Caries Res.* 2018; 52(5):378-386.
-
-

32 - Ururahy MS, Curylofo-Zotti FA, Galo R, Nogueira LF, Ramos AP, Corona SA. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. *Arch Oral Biol.* 2017 Mar; 75:68-73.

33 - Keegan GM, Smart JD, Ingram MJ, Barnes LM, Burnett GR, Rees GD. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. *J Dent.* 2012; 40:229–240.

34 - Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res.* 2011; 45:581–589.

35 - Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent.* 2012; 40(12):1036-1043.

36 - Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res.* 2014; 48(2):163-169.

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

38 - 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 Invest.* 2015; 19:1557–1561.

39 - Bartlett DD, S Mills, I Pitts, N Rattan, R Rochford, D Wilson, et al. Monitoring erosive tooth wear: BEWE, a simple tool to protect patients and the profession. *Br Dent J.* 2019; 226:930-932.

40 - Warreth AB, Abuhijleh EY, Almaghribi MA, Mahwal G, Ashawish AL. Tooth surface loss: A review of literature. *Saudi Dent J.* 2020; 32(2):53-60.

41 - Johansson AK, Lingström P, Birkhed D. Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. *Eur J Oral Sci.* 2002 Jun; 110(3):204-211.

42 - Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond).* 2007; 57(3):169-176.

43 - Kanzow P, Wegehaupt FJ, Attin T, Wiegand A. Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence Int.* 2016; 47(4):275-278.

44 - Carvalho TS, Lussi A. Chapter 9: Acidic Beverages and Foods Associated with Dental Erosion and Erosive Tooth Wear. *Monogr Oral Sci.* 2020; 28:91-98.

45 - Machado A, João-Souza SH, Carvalho TS. Using fluoride mouthrinses before or after toothbrushing: effect on erosive tooth wear. *Arch Oral Biol.* 2019; 108:104-520.

46 - Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013; 29(1):116-135.

47 - Salas, MC, Vargas-Ferreira L, Demarco FF. Dental erosion in permanent dentition: epidemiology and diagnosis. *RFO.* 2015; 20(1):126-134.

48 - Stangvaltaite-Mouhat L, Pūrienė A, Stankevičienė I, Aleksejūnienė J. Erosive Tooth Wear among Adults in Lithuania: A Cross-Sectional National Oral Health Study. *Caries Res.* 2020; 54(3):283-291.

49 - Salas MSS, Vargas-Ferreira F, Ardenghi TM, Peres KG, Huysmans MD, Demarco FF. Prevalence and Associated Factors of Tooth Erosion in 8-12-Year-Old Brazilian Schoolchildren. *J Clin Pediatr Dent.* 2017; 41(5):343-350.

50 - Okunseri C, Okunseri E, Gonzalez C, Visotcky A, Szabo A. Erosive tooth wear and consumption of beverages among children in the United States. *Caries Res.* 2011; 45(2):130-135.

51 - Imfeld C, Imfeld T. Essstörungen (II): Zahnmedizinische Aspekte [Eating disorders (II)--dental aspects]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2005; 115(12):1163-1171.

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

53 - Khan M, Fida M. Assessment of psychosocial impact of dental aesthetics. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008; 18(9):559-564.

54 - Campos LA, Costa MA, Bonafé FSS, Marôco J, Campos JADB. Psychosocial impact of dental aesthetics on dental patients. *Int Dent J.* 2020; 70:321-327.

55 - Smith BG, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. *Br Dent J.* 1984; 23;156(12):435-438.

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

57 - Lussi A, Schaffner M, Jaeggi T. Dental erosion - diagnosis and prevention in children and adults. *Int Dent J.* 2007; 57:385-398.

58 - Burnett G, Nehme M, Parkinson C, Karwal R, Badrock T, Thomas GV, et al. A randomised oral fluoride retention study comparing intra-oral kinetics of fluoride-containing dentifrices before and after dietary acid exposure. *Arch Oral Biol.* 2020; 119:104-891.

59 - O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, et al. Fluoride and Oral Health. *Community Dent Health.* 2016; 33(2):69-99.

60 - Rølla G, Ogaard B, Cruz AR. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol.* 1993; 20(2):105-108.

61 - Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001; 35(5):325-330.

62 - Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11):931-935.

63 - Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and preventive measures. *Monogr Oral Sci.* 2006; 20:190-199.

64 - Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MC. Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. *Caries Res.* 2007; 41(1):61-7

65 - 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; 52(1):9-14.

66 - Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:158-170.

67 - Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2004; 38(6):561-566.

68 - Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25:230-243.

- 69 - Austin RS, Rodriguez JM, Dunne S, Moazzez R, Bartlett DW. The effect of increasing sodium fluoride concentrations on erosion and attrition of enamel and dentine in vitro. *J Dent.* 2010; 38(10):782-787.
- 70 - Murakami C, Bönecker M, Corrêa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(11):997-1001.
- 71 - West NX, He T, Macdonald EL, Seong J, Hellin N, Barker ML, et al. Erosion protection benefits of stabilized SnF₂ dentifrice versus an arginine-sodium monofluorophosphate dentifrice: results from in vitro and in situ clinical studies. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(2):533-540.
- 72 - Park JS, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(5):443-453.
- 73 - Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, Wilson SL. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66(6):1177-1183.
- 74 - Abousamra NM. Efficacy of chitosan and absorbable gelatin sponge on hemostasis and wound healing following tooth extraction “a comparative study”. *Egypt Dent J.* 2012; 58(244):2443-2447.
- 75 - Wieckiewicz M, Boening KW, Grychowska N, Paradowska-Stolarz A. Clinical Application of Chitosan in Dental Specialities. *Mini Rev Med Chem.* 2017; 17(5):401-409.
- 76 - Kmiec M, Pighinelli L, Tedesco MF, Silva MM, Reis V. Chitosan-properties and applications in dentistry. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access.* 2017; 2(4):205–211.
- 77 - Peter MG. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. *J Macromol Sci Phys.* 1995; 32:4, 629-640.
- 78 - Chang SH, Lin HT, Wu GJ, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr Polym.* 2015; 134:74-81.
- 79 - Qin C, Li H, Xiao Q, Liu Y, Zhu J, Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym.* 2006; 63(3):367-374.
-
-

80 - Han Z, Zeng Y, Lu H, Zhang L. Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products. *Carbohydr Res*. 2015; 413:75-84.

81 - Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D, et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci*. 2012; 385(1):235-243.

82 - Claesson P, Ninham B. pH- dependent interactions between adsorbed chitosan layers. *Langmuir*. 1992; 8:1406-1412.

83 - Young A, Smistad G, Karlsen J, Rolla G, Rykke M. Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the coulter DELSA 440. *Adv Dent Res*. 1997; 11(4):560-565.

84 - 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; 42(4):450-459.

85 - Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;98(1):150-159.

86 - Arnaud TM, de Barros Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel remineralization: an in vitro evaluation. *J Dent*. 2010; 38(11):848-852.

87 - Bijle MNA, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. The combined enamel remineralization potential of arginine and fluoride toothpaste. *J Dent*. 2018; 76:75-82.

88 - 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- 581.

89 - Pini NIP, Lima DANL, Luka B, Ganss C, Schlueter N. Viscosity of chitosan impacts the efficacy of F/Sn containing toothpastes against erosive/abrasive wear in enamel. *J Dent*. 2020; 92:103247.

90 - Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res*. 2012; 24(2):72-6

91 - Ganss C, Marten J, Hara AT, Schlueter N. Toothpastes and enamel erosion/abrasion- Impact of active ingredients and the particulate fraction. *J Dent*. 2016; 54:62-67.

92 - Aykut-Yetkiner A, Attin T, Wiegand A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. *J Dent.* 2014; 42(7):856-861.

93 - Van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Dijkstra RJ, Busscher HJ. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(4):303–307.

APÊNDICES

APÊNDICES



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Uso de Animais

**PROTOCOLO DE RECEBIMENTO DO FORMULÁRIO
PARA REGISTRO DE PROTOCOLOS EFETUADOS COM
CADÁVERES, OU PARTE DELES, EM ENSINO E/OU
PESQUISA**

Uso exclusivo da CEUA/FOB/USP

Reg. Nº **015/2019**

Recebido em: 16/05/2019
Maristela

Maristela Petenuci Ferrari
Secretária da CEUA – SRTE 53052

Finalidade:	Pesquisa
Período:	Maio/2019 a Abr/2020
Título da pesquisa:	Efeito protetor das soluções de TiF ₄ /NaF e quitosana sobre o desenvolvimento de erosão precoce do esmalte e no desgaste erosivo do esmalte in vitro
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães
Pesquisador Executor:	Larissa Rodrigues Pereira Santi
Colaboradores:	Beatriz Martines de Souza
Nota Fiscal/Termo de Doação	Termo de Doação – Frigol (12/04/2019) Total adquirido: 120
Nº Lote / Data do Abate	01 e 02 / 12/04/2019
Nº utilizados / Nº de grupos:	120 / 7 grupos (n=15/grupo e n=15 de reserva)



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Uso de Animais

PROTOCOLO DE RECEBIMENTO DO FORMULÁRIO
PARA REGISTRO DE DE PROTOCOLOS EFETUADOS COM
CADÁVERES, OU PARTE DELES, EM ENSINO E/OU
PESQUISA

Uso exclusivo da CEUA/FOB/USP

Reg. Nº **018/2019**

Recebido em: 26/08/2019

Maristela

Maristela Petenuci Ferrari

Secretária da CEUA – SRTE 53052

Finalidade: Pesquisa
Período: Ago/2019 a Jul/2020
Título da pesquisa: Efeito das soluções contendo TiF4/NaF e quitosana sobre o desgaste erosivo da dentina in vitro
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães
Pesquisador Executor: Paula Fontana Machado
Colaboradores: Beatriz Martines de Souza, Luiz Ricardo Pero Vecchia
Nota Fiscal/Termo de Doação doação (NF.000.024.679 - CEUA Reg. nº 014/2019) **Total adquirido:**
500 (para essa pesquisa=150 raízes)
Nº Lote / Data do Abate 01, 02, 03 e 04 / 20/09/2018
Nº utilizados / Nº de grupos: 7 grupos/n=15