UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SIMONE ORTIZ MOURA FIDELES

Avaliação do efeito dose-resposta do xilitol, associado ou não ao fluoreto, na prevenção da desmineralização erosiva e no reendurecimento do esmalte erodido: estudos *in vitro*

BAURU
2021

SIMONE ORTIZ MOURA FIDELES

Avaliação do efeito dose-resposta do xilitol, associado ou não ao fluoreto, na prevenção da desmineralização erosiva e no reendurecimento do esmalte erodido: estudos *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas na área de concentração de Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão Corrigida

BAURU
2021

Fideles, Simone Ortiz Moura

Avaliação do efeito dose-resposta do xilitol, associado ou não ao fluoreto, na prevenção da desmineralização erosiva e no reendurecimento do esmalte erodido: estudos *in vitro*/Simone Ortiz Moura Fideles. -- Bauru, 2021

41 p. : il. ; 31cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP

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 CEUA-FOB-USP

Protocolo nº: 025/2019

Data: 23/10/2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por
SIMONE ORTIZ MOURA FIDELES
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 26 de maio de 2021.

Prof.ª Dr.ª **AGNES DE FATIMA PEREIRA CRUVINEL**
UFFS

Prof.ª Dr.ª **FERNANDA LOURENÇÃO BRIGHENTI**
UNESP

Prof.ª Dr.ª **ANA CAROLINA MAGALHÃES**
FOB-USP

Prof.ª Dr.ª **MARILIA AFONSO RABELO BUZALAF**
Presidente da Banca
FOB - USP

Prof.ª. Dr.ª. **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: posgrad@fob.usp.br – Fone/Fax (0xx14) 3235-8223
http://www.fob.usp.br

AGRADECIMENTOS

Ao magnífico Reitor da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Vahan Agopyan.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, representada pelo Diretor Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, coordenado pelo Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pelos ensinamentos, pelo constante apoio e dedicação.

Aos Professores do Departamento de Ciências Biológicas, área de Bioquímica, Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pelos ensinamentos e pelas contribuições.

A todos os professores, funcionários, técnicos de laboratório e alunos, pelas contribuições e pela convivência.

À Associação Latino Americana para Promoção de Saúde Oral e Pesquisa Odontológica (LAOHA), pelo financiamento deste trabalho de pesquisa.

À Capes, pelo suporte financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

A erosão dentária é definida como a perda irreversível da estrutura dentária pela ação de ácidos de origem não bacteriana. Diversos agentes, como o fluoreto (F) e o xilitol, podem apresentar efeito protetor, minimizando a desmineralização erosiva da estrutura dentária. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do xilitol, associado ou não ao F, no reendurecimento do esmalte erodido e na prevenção da desmineralização erosiva do esmalte *in vitro*. Foram realizados dois experimentos distintos. Para cada experimento, espécimes de esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície (Knoop) e aleatorizados em 8 grupos (n=15), de acordo com as soluções utilizadas para tratamento do esmalte: (1) sem xilitol e sem F (controle); (2) xilitol 5%; (3) xilitol 10%; (4) xilitol 20%; (5) 500 ppm F (NaF); (6) xilitol 5% + 500 ppm F; (7) xilitol 10% + 500 ppm F e (8) xilitol 20% + 500 ppm F. Para a análise do efeito das soluções sobre o reendurecimento do esmalte, os espécimes foram submetidos aos desafios erosivos pela imersão em solução de ácido cítrico a 0,1%, pH 2,5, por 1,5 minuto, 4 vezes, no dia 1. Entre cada desafio, os espécimes foram imersos em saliva artificial por 30 minutos, à temperatura ambiente (TA). Nos dias 2 e 3, os espécimes foram imersos nas soluções de tratamento por 1 minuto e, após, permaneceram em saliva por 30 minutos (TA). Ao final de cada dia, as análises foram realizadas por dureza de superfície. Para a análise do efeito das soluções sobre a prevenção da desmineralização, foi realizada uma ciclagem de pH erosiva por 5 dias. Em cada dia de ciclagem, os espécimes foram tratados com as soluções por 1 minuto, submetidos aos desafios erosivos (4x/dia) e tratados com as soluções novamente. Entre cada desafio, os espécimes foram imersos em saliva por 30 minutos. Ao final do 1º e do 5º dia de ciclagem, as análises foram realizadas por dureza de superfície e por perfilometria de contato, respectivamente. As soluções contendo xilitol 10%, xilitol 10% + 500 ppm F e xilitol 20% + 500 ppm F foram as mais eficazes em promover o reendurecimento do esmalte, diferindo dos demais grupos no 2º dia de tratamento ($p<0,05$). Todas as soluções reduziram significativamente o amolecimento e o desgaste erosivo do esmalte em relação ao grupo controle ($p<0,05$), sem diferenças significativas entre si, com exceção das soluções contendo xilitol 10% + 500 ppm F e 500 ppm F que, dentre as soluções testadas, apresentaram o menor e o maior valor de desgaste erosivo, respectivamente. Os resultados mostraram que a solução de xilitol a 10% apresentou melhor potencial para reendurecer o esmalte, independente da presença do F, e melhor efeito anti-erosivo, quando associado ao F. Os resultados sugerem que o xilitol promove o reendurecimento de lesões erosivas e previne a desmineralização erosiva do esmalte *in vitro*, independente da presença do F.

Palavras-chave: Esmalte dentário. Erosão dentária. Desmineralização dentária. Remineralização dentária. Xilitol.

Abstract

Evaluation of the dose-response effect of xylitol, associated or not with fluoride, on the prevention of erosive demineralization and on the rehardening of the eroded enamel: *in vitro* studies

Dental erosion is defined as the irreversible loss of dental tissue by the action of non-bacterial acids. Several agents, such as fluoride (F) and xylitol, may have a protective effect, minimizing erosive demineralization. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of xylitol, associated or not to F, to reharden eroded enamel and to prevent erosive demineralization of enamel *in vitro*. Two distinct experiments were conducted. For each experiment, bovine enamel specimens were selected by surface hardness (Knoop) and randomized into 8 groups (n=15), according to the solution used for enamel treatment: (1) without xylitol and without F (control); (2) 5% xylitol; (3) 10% xylitol; (4) 20% xylitol; (5) 500 ppm F (NaF); (6) 5% xylitol + 500 ppm F; (7) 10% xylitol + 500 ppm F and (8) 20% xylitol + 500 ppm F. For the analysis of the effect of the solutions on rehardening, the specimens were submitted to erosive challenges by immersion in 0.1% citric acid solution, pH 2.5, for 1.5 minutes, 4 times on day 1. Between each erosive challenge, the specimens were immersed in artificial saliva for 30 minutes at room temperature (RT). On days 2 and 3, the specimens were immersed in the treatment solutions for 1 minute and then immersed in saliva for 30 minutes (RT). At the end of each day, surface hardness analyses were performed. For analysis of the effect of the solutions on the prevention of demineralization, an erosive pH cycling was performed for 5 days. On each day of pH cycling, the specimens were treated with the solutions for 1 minute, subjected to erosive challenges (4x/day) and treated with the solutions again. Between each challenge, the specimens were immersed in saliva for 30 minutes. At the end of the 1st and 5th pH cycling days, the analyses were performed by surface hardness and contact profilometry, respectively. The solutions containing 10% xylitol, 10% xylitol + 500 ppm F and 20% xylitol + 500 ppm F were the most effective in promoting enamel remineralization, differing from the others groups on the 2nd day of treatment ($p<0.05$). All solutions significantly reduced enamel softening and erosive wear in comparison to the control group ($p<0.05$), without significant differences among them, except for the solutions containing 10% xylitol + 500 ppm F and 500 ppm F, which presented the lowest and the highest values of erosive wear, respectively. The results showed that the solution containing 10% xylitol had a better potential to reharden the enamel, regardless of the

presence of F, and a better anti-erosion effect, when associated with F. The results suggest that xylitol promotes rehardening of enamel erosive lesions and prevents enamel erosive demineralization *in vitro*, regardless of the presence of F.

Keywords: Dental enamel. Tooth erosion. Tooth demineralization. Tooth remineralization. Xylitol.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 09

2 **REVISÃO DE LITERATURA**..... 11

2.1 EROSÃO DENTÁRIA..... 11

2.2 EFEITO DO FLUORETO NA EROSÃO DENTÁRIA..... 13

2.3 EFEITO DO XILITOL NA EROSÃO DENTÁRIA..... 15

3 **PROPOSIÇÃO**..... 19

4 **MÉTODOS**..... 21

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 21

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES..... 22

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO..... 22

4.4 ANÁLISE DO REENDURECIMENTO DO ESMALTE..... 23

4.4.1 **Tratamento e Ciclagem de pH**..... 23

4.4.2 **Dureza de Superfície do Esmalte**..... 23

4.5 ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE..... 24

4.5.1 **Tratamento e Ciclagem de pH**..... 24

4.5.2 **Dureza de Superfície do Esmalte**..... 25

4.5.3 **Perfilometria**..... 25

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 26

5 **RESULTADOS**..... 27

5.1 AVALIAÇÃO DO REENDURECIMENTO DO ESMALTE..... 27

5.2 AVALIAÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE..... 28

6 **DISCUSSÃO**..... 31

7 **CONCLUSÃO**..... 35

REFERÊNCIAS..... 37

Introdução

A erosão dentária é definida como a perda irreversível da estrutura dentária pela ação de ácidos de origem não bacteriana. Inicialmente ocorre o amolecimento da superfície do esmalte, seguido da dissolução contínua dos cristais de hidroxiapatita, camada por camada, levando ao desgaste da superfície do esmalte (1). Os ácidos envolvidos com o processo erosivo podem ser provenientes de fontes extrínsecas e, entre elas, a dieta constitui a principal fonte, ou de origem intríseca, relacionada com distúrbios gastroesofágicos (1, 2). O desgaste erosivo progride ao longo do tempo, de forma que a prevalência e a gravidade das lesões podem aumentar com o avanço da idade, se medidas preventivas não forem implementadas precocemente (3).

Algumas estratégias preventivas têm sido empregadas para minimizar o desgaste erosivo, como a estimulação do fluxo salivar e o uso de fluoreto (F) (4, 5). O F apresenta alta reatividade com a estrutura dentária, formando depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) que atuam como uma barreira física impedindo o contato do ácido com a superfície do dente. Além disso, esses depósitos funcionam como reservatórios que disponibilizam os íons Ca^{+2} e F^- durante as quedas de pH, aumentando a saturação do meio em relação ao mineral do dente (6, 7).

Além do F, o xilitol também tem sido investigado como um possível agente protetor contra a erosão dentária. O xilitol é um poliol de 5 carbonos ($C_5H_{12}O_5$) que pode ser encontrado naturalmente em frutas e vegetais ou sintetizado a partir de fontes orgânicas (8). Por ser um açúcar não cariogênico e por apresentar propriedades antimicrobianas (9), o xilitol pode ser utilizado como um substituto da sacarose, sendo considerado um potente agente anticariogênico (10, 11).

O provável mecanismo pelo qual o xilitol atua reduzindo a perda mineral que ocorre em virtude das alterações de pH, está relacionado com a sua capacidade de se complexar com íons Ca^{+2} (12-14). A formação desses complexos facilita o transporte e a incorporação do íon Ca^{+2} no interior da lesão dentária (12-14), além de inibir a perda de mineral do dente (cálcio e fosfato) para o meio (15, 16). Através da formação desses complexos, o xilitol mantém o íon Ca^{+2} disponível no fluido do biofilme e na saliva por um período maior de tempo, estabilizando o sistema cálcio-fosfato. Esse processo altera a saturação do meio em relação à hidroxiapatita, inibindo a perda mineral que ocorre no processo de cárie e minimizando a desmineralização erosiva do esmalte (12, 17).

Apesar das propriedades benéficas do xilitol serem relatadas em diversos estudos, as evidências acerca da eficácia do uso de produtos contendo xilitol para prevenir a erosão dentária são escassas. Estudos que avaliaram o efeito do xilitol e do F, administrados na forma de solução, dentifrícios e vernizes, mostraram que esses agentes, isolados ou em associação, reduziram significativamente a desmineralização erosiva (18-23). No entanto, esses estudos empregaram concentrações diferentes de xilitol, sendo necessários estudos dose-resposta para se definirem as melhores concentrações a serem empregadas futuramente em estudos *in situ* e clínicos. Nesse sentido, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a magnitude do efeito protetor do xilitol sobre a erosão dentária, tendo em vista a complexa interação dos fatores etiológicos relacionados com a incidência, progressão e severidade das lesões erosivas.

Considerando, portanto, o efeito promissor do xilitol na prevenção da erosão dentária, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito dose-resposta de soluções contendo xilitol em diferentes concentrações (5, 10 ou 20%), associado ou não ao F (500 ppm F, NaF), para reendurecer o esmalte erodido e para prevenir a desmineralização erosiva do esmalte *in vitro*.

2 Revisão de Literatura

2.1 Erosão Dentária

A erosão dentária é definida como a perda irreversível da estrutura dentária pela ação de ácidos de origem não bacteriana. Inicialmente ocorre o amolecimento da superfície do esmalte, seguido pela dissolução contínua dos cristais de hidroxiapatita, camada por camada, levando ao desgaste da superfície do esmalte (1). A severidade do desgaste dentário depende da duração e da frequência dos desafios erosivos. Nos estágios iniciais, as alterações provocadas no esmalte são mínimas, o que torna difícil o diagnóstico. Conforme o processo erosivo progride, as alterações tornam-se notórias, sendo comum as restaurações apresentarem-se salientes devido à perda da estrutura dental adjacente. Nos estágios mais avançados, a dentina pode ser atingida e a sintomatologia dolorosa torna-se mais frequente (1). Dependendo da gravidade das lesões, intervenções restauradoras ou reabilitações mais complexas devem ser empregadas para restabelecer a estética e a função dos elementos dentais afetados pelo desgaste erosivo.

A erosão dentária apresenta uma etiologia complexa e multifatorial. Os ácidos envolvidos com o processo erosivo podem ser provenientes de fontes extrínsecas, como a dieta, ou de origem intrínseca, relacionados com distúrbios gástricos, como refluxo gastroesofágico, vômitos constantes, anorexia e bulimia (1). A dieta constitui a principal fonte extrínseca de ácidos e tem um papel crucial na progressão do processo erosivo. Algumas características dos alimentos e bebidas, como pH, capacidade tamponante e as concentrações de cálcio e fosfato determinam o grau de saturação do meio em relação à estrutura mineral do dente e, assim, podem acarretar a dissolução do esmalte e/ou dentina (24). Outras fontes extrínsecas de ácidos podem estar relacionadas com o processo erosivo, como o uso crônico de alguns tipos de medicamentos, o contato frequente com o cloro das piscinas, a prática de esportes com consumo excessivo de bebidas com baixo pH e a prática de certas atividades ocupacionais, como degustação de vinhos e exposição a vapores ácidos industriais. Assim, o estilo de vida e os fatores comportamentais podem influenciar no desenvolvimento da erosão dentária (1). Em muitos casos ainda, a erosão ocorre simultaneamente com outros processos que causam desgaste dentário, como a abrasão e a atrição, o que acelera a perda de tecido dentário e dificulta o correto diagnóstico, já que a superfície erodida torna-se mais susceptível ao desgaste mecânico (25-27).

A erosão dentária afeta tanto a dentição decídua como a permanente. Os dados disponíveis sobre a prevalência da erosão dentária são escassos, tanto em nível nacional como global, uma vez que diferentes sistemas de avaliação dificultam a comparação dos resultados de estudos distintos. Os poucos dados disponíveis revelam um aumento na prevalência da erosão, variando de 1 a 79% na dentição decídua de crianças de 2 a 5 anos, de 14% na dentição permanente de crianças de 5 a 9 anos, de 7 a 100% entre adolescentes (9 a 20 anos) e de 4 a 100% em adultos (18 a 88 anos) (3). Uma revisão sistemática da literatura estimou em 30,4% a prevalência de desgaste erosivo em dentes permanentes de crianças e adolescentes (28). É importante ressaltar que o desgaste erosivo progride ao longo do tempo e, se medidas preventivas não forem implementadas no tempo devido, a prevalência e a gravidade das lesões podem aumentar com o avanço da idade (3). Considerando, portanto, a crescente incidência do desgaste erosivo e suas sequelas indesejáveis, a implementação de medidas preventivas torna-se extremamente necessária.

Nesse contexto, a saliva atua como um importante fator biológico de proteção para o dente contra a desmineralização erosiva (29). A saliva atua na diluição do agente erosivo, na neutralização e no tamponamento de ácidos (24, 29). Por ser supersaturada em relação à hidroxiapatita, a saliva favorece a remineralização dentária, reduzindo a perda mineral durante as alterações de pH que ocorrem no meio bucal (24, 30). Além disso, a saliva é responsável pela formação da película adquirida, que é uma fina camada acelular que recobre a superfície dental e os tecidos orais, composta por diversos tipos de proteínas adsorvidas, como enzimas, glicoproteínas e outras macromoléculas (29, 30). A película adquirida do esmalte funciona como uma barreira de permeabilidade seletiva, que impede o contato direto dos ácidos com o esmalte, proporcionando certa proteção contra a desmineralização dentária (29, 30). Assim, alterações no fluxo salivar, na composição química, no pH e na capacidade tamponante da saliva podem interferir com o potencial remineralizante e com o efeito protetor desse importante fator biológico (24). Apesar da saliva atuar como um fator de proteção para a apatita dentária, sua capacidade remineralizante não é suficiente para reduzir de forma significativa a perda mineral durante as alterações de pH que ocorrem no meio bucal (31). Assim, a presença de agentes remineralizantes, como o F, podem potencializar a capacidade remineralizante da saliva e minimizar a erosão dentária pela formação dos depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) (5).

2.2 Efeito do Fluoreto na Erosão Dentária

O uso de agentes contendo F constitui uma medida eficaz para prevenir a cárie dentária (32). O F atua nos eventos bioquímicos que ocorrem no meio bucal e, além de interferir no processo de cárie, o F também pode atuar reduzindo a desmineralização erosiva (33). Com relação à cárie, o efeito preventivo e terapêutico do F está relacionado com sua capacidade de potencializar a remineralização da apatita dentária. Durante as quedas de pH, o F presente no meio bucal reage com os minerais que estão se dissolvendo da estrutura dentária, ativando a remineralização. Dessa forma, parte dos minerais perdidos são repostos na estrutura dentária e, com isso, o F reduz a desmineralização. Quando o pH do meio se restabelece, o F atua favorecendo a remineralização (34). Assim, o F minimiza a perda mineral que ocorre durante as quedas de pH, já que parte dos minerais perdidos são repostos na apatita dentária. Mas, para que o F atue nos processos de remineralização, ele deve estar constantemente disponível no meio bucal (35).

Os diversos meios de utilização de F promovem a disponibilização desse íon no meio bucal, seja por meio do consumo de água de abastecimento fluoretada e/ou por meio do uso de agentes fluoretados, como dentifrícios e enxaguatórios. A aplicação tópica profissional de produtos fluoretados, como os géis e os vernizes, disponibiliza F em altas concentrações. Principalmente quando disponibilizado em altas concentrações, o F reage com a apatita dentária formando fluorapatita e fluoreto de cálcio (CaF_2) (36, 37). A fluorapatita é um mineral menos solúvel que se incorpora à estrutura dentária. No entanto, o efeito preventivo do F por meio da fluorapatita incorporada ao esmalte é limitado, já que a concentração de F na apatita dentária não é suficiente para reduzir de forma significativa a solubilidade do tecido (38). Os depósitos de CaF_2 revestem a superfície dentária e apresentam alta solubilidade em pH ácido. Assim, quando ocorrem as quedas de pH, esses depósitos se solubilizam, disponibilizando íons cálcio e fluoreto para o meio (39). Esses íons aumentam a saturação do meio em relação ao mineral do dente, reduzindo a desmineralização e favorecendo a remineralização da estrutura dentária. A formação de depósitos de CaF_2 é influenciada pela concentração de F e pelo pH do agente fluoretado, bem como pela característica da superfície dentária (6). Por funcionarem como reservatórios de íons cálcio e fluoreto, que podem ser disponibilizados durante as quedas de pH, os depósitos de CaF_2 têm um papel muito importante nos processos de des-remineralização.

A aplicação de agentes fluoretados constitui, portanto, uma medida eficaz para minimizar a perda mineral que ocorre na estrutura dentária durante as alterações de pH no meio bucal. Na cárie, o F disponível no meio atua remineralizando os cristais de hidroxiapatita parcialmente desmineralizados pela atividade metabólica do biofilme (40). No processo erosivo, não há o envolvimento do biofilme e a dissolução mineral ocorre pela ação de ácidos de baixo pH. O provável mecanismo pelo qual o F atua prevenindo a desmineralização erosiva do esmalte se dá através da formação dos depósitos de CaF_2, que funcionam como uma barreira física e como reservatórios de íons cálcio e fosfato, que são liberados durante as quedas de pH, aumentando a saturação do meio (5). Essa barreira impede o contato direto do ácido com o esmalte, porém, os depósitos de CaF_2 são prontamente dissolvidos pelos desafios ácidos, proporcionando um limitado potencial de proteção contra a dissolução erosiva (38). Além disso, a ação remineralizante do F disponível no meio se dá na camada superficial de tecido dentário amolecido pela dissolução erosiva. Por isso, o efeito do F como agente terapêutico para prevenção da erosão dentária ainda não é muito conclusivo (38). No entanto, diversos estudos que avaliaram o efeito do F na progressão do processo erosivo têm mostrado resultados promissores (41-48). Bartlett e colaboradores (1994) mostraram que o uso de dentifrício contendo F reduziu significativamente a erosão do esmalte *in vitro,* quando comparado com o uso de dentifrício sem F (41). O estudo foi realizado com pré-molares obtidos de indivíduos que consumiam água de abastecimento fluoretada (Birmingham) e não-fluoretada (London). Os autores relataram que a magnitude do desgaste erosivo do esmalte não foi influenciado por diferenças na concentração de F e na microdureza do esmalte entre os espécimes (41). Murakami e colaboradores (2009) investigaram o potencial anti-erosivo do F, aplicado na forma de verniz e de gel, em dentes decíduos e permanentes (46). Os resultados desse estudo *in vitro* mostraram que a aplicação de F, independente da forma de utilização, reduziu significativamente o desgaste erosivo nos dentes permanentes (46). Ganss e colaboradores (2011) relataram que a utilização de dentifrícios contendo F (1.400-1.490 ppm F) minimizaram o desgaste erosivo do esmalte de terceiros molares *in vitro* (43). Porém, os autores relataram que os dentifrícios fluoretados apresentaram eficácia limitada na prevenção do desgaste do esmalte quando os espécimes foram submetidos à erosão e à abrasão por escovação (43).

O efeito do F no processo erosivo também foi reportado em diversos estudos *in situ*. Ganss e colaboradores (2004) mostraram que o uso de dentifrício fluoretado, isolado ou associado com outros agentes fluoretados, como enxaguatório e gel, foi eficaz na prevenção

da perda mineral do esmalte e da dentina, mesmo em condições severamente erosivas (42). O efeito do uso de dentifrício fluoretado (1.098 ppm F) na prevenção do desgaste erosivo do esmalte também foi investigado por Magalhães e colaboradores (2007). Nesse estudo, os espécimes foram submetidos à erosão, seguida de escovação (45). Os resultados mostraram que o uso de dentifrício fluoretado minimizou o desgaste erosivo do esmalte submetido à erosão e à abrasão (45). Em contrapartida, um estudo *in situ* que avaliou o potencial anti-erosivo de soluções contendo NaF, na concentração de 225 ppm F, mostrou que a solução de NaF não apresentou efeito anti-erosivo significativo, exceto quando o F foi associado ao cloreto estanhoso (48). Por outro lado, estudos que investigaram o potencial remineralizante do F, utilizado na forma de dentifrício (NaF), nas concentrações de 1.450 ppm F (44) e 1.150 ppm F (47), mostraram que o F favoreceu a remineralização *in situ* do esmalte bovino erodido, tornando-o mais resistente à erosão (44, 47). Apesar do papel do F na terapia contra a erosão dentária ser ainda questionável, esses estudos *in situ* mostraram que o F pode minimizar a dissolução erosiva do esmalte dentário e atuar com um importante agente remineralizante.

2.3 Efeito do Xilitol na Erosão Dentária

O xilitol é um açúcar natural, que foi descrito e sintetizado, em 1891, pelo químico alemão Emil Fischer. O xilitol é classificado como um açúcar álcool (poliol), composto por 5 átomos de carbono (pentose) e 5 grupos hidroxila ($C_5H_{12}O_5$). Na natureza, o xilitol pode ser encontrado em algumas frutas e vegetais, como ameixa, morango, couve-flor, alface, framboesa, berinjela, cogumelo, abóbora, alface, cebola, cenoura, entre outros (49). O xilitol também está presente no corpo humano, como um produto intermediário do metabolismo da glicose (49). Comercialmente, o xilitol pode ser obtido por processos biotecnológicos, a partir da hidrogenação da xilose (50).

O xilitol é constituído por um pó branco, cristalino, inodoro e de sabor doce. O poder adoçante do xilitol é similar ao da sacarose e superior ao do sorbitol e do manitol (50). Além de apresentar poder adoçante similar ao da sacarose, o xilitol é considerado um açúcar de baixo valor calórico (2,4 kcal/g) (50). O xilitol apresenta diversas propriedades benéficas para o organismo. Estudos mostram que o consumo de xilitol melhora os níveis séricos de colesterol e pouco altera os níveis de glicose e de insulina no organismo (51, 52). Além disso, apenas uma pequena parte do xilitol ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, por isso,

esse açúcar é considerado uma alternativa interessante para uso por indivíduos que apresentam problemas de hiperglicemia e de obesidade (51). O xilitol apresenta ainda propriedades prebióticas, pois a maior parte do xilitol ingerido é fermentado no intestino, o que favorece o desenvolvimento de bactérias benéficas e nativas da microbiota intestinal (9). Além disso, o xilitol é considerado um potente agente anticariogênico, podendo ser utilizado como um substituto da sacarose (53-55).

O uso do xilitol como substituto da sacarose foi considerado seguro, sendo classificado como uma substância atóxica para consumo humano (56). Com base em testes toxicológicos e carcinogênicos negativos, em 1986, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso do xilitol como aditivo alimentar do tipo *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*). O xilitol também foi classificado, pela Comissão Européia, como adoçante não nutritivo. A partir de então, o xilitol tem sido largamente utilizado como adoçante pela indústria alimentícia e farmacêutica, em confeitarias e medicamentos. Na odontologia, o xilitol tem sido adicionado em produtos de higiene oral, por apresentar propriedades antimicrobianas e anticariogênicas, como enxaguatórios e dentifrícios. Diversos estudos relatam que o xilitol reduz a formação de biofilmes, estabiliza as proteínas da saliva, estimula o fluxo salivar, forma complexos com o cálcio e favorece a remineralização dentária (9, 14, 57-60).

No tocante às propriedades anticariogênicas, estudos relatam que o potencial remineralizante do xilitol está relacionado com a sua capacidade de se complexar com íons Ca^{+2} (12-14). Segundo esses estudos, a formação desses complexos facilita o transporte e a incorporação do íon Ca^{+2} no interior da lesão dentária (12, 13), além de inibir a perda de mineral do dente (cálcio e fosfato) para o meio (15, 16). O estudo de Miake e colaboradores (2003) mostrou, por meio de microscopia eletrônica de alta resolução e de microrradiografia, que houve uma maior remineralização em camadas intermediárias e profundas de esmalte desmineralizado após a imersão dos espécimes em solução contendo xilitol a 20%, quando comparadas com o controle. Assim, o aumento do fluxo de íons Ca^{+2} pode favorecer a remineralização, tanto da lesão de cárie subsuperficial (13), como da camada de esmalte amolecida pelo desafio erosivo (12, 15, 16). O potencial do xilitol em favorecer a remineralização da lesão de cárie no esmalte tem sido relatado em diversos estudos. Cardoso e colaboradores (2014) analisaram o efeito da aplicação dos vernizes Duraphat® (5% NaF), Duofluorid® (6% NaF, 2,71% F + 6% CaF_2) e de vernizes contendo xilitol (10% e 20%),

isolado ou associação com F (NaF 5%), na remineralização de lesões do esmalte *in vitro* (61). Os resultados desse estudo mostraram que o verniz Duraphat®, verniz contendo xilitol a 10% + F e verniz contendo xilitol a 20% + F favoreceram significativamente a remineralização da superfície do esmalte, enquanto que os vernizes Duraphat®, Duofluorid® e xilitol a 20%, foram os mais eficazes em promover a remineralização da lesão subsuperficial do esmalte (61). Mais tarde, um estudo *in situ* investigou o potencial remineralizante dos vernizes Duraphat®, Duofluorid®, verniz contendo xilitol a 20% e verniz placebo (62). Esse estudo mostrou que os vernizes Duraphat®, Duofluorid® e verniz contendo xilitol a 20% foram eficazes em favorecer a remineralização da superfície do esmalte. Os resultados desse estudo mostraram ainda que esses vernizes, exceto o Duraphat®, promoveram, de forma significativa, a remineralização da lesão de cárie subsuperficial do esmalte (62). Além desse mecanismo de ação, o xilitol também desempenha um papel na inibição da desmineralização dentária (12). Através da formação de complexos, o xilitol mantém o cálcio disponível no fluido do biofilme e na saliva por um período maior de tempo, estabilizando o sistema cálcio-fosfato. Esse processo altera a saturação do meio em relação à hidroxiapatita, inibindo a perda mineral que ocorre durante as alterações de pH (12).

Além das propriedades antimicrobianas e anticariogênicas, o xilitol também pode apresentar potencial anti-erosivo. Gargouri e colaboradores (2018) relataram que o uso de gomas de mascar contendo xilitol a 1,8% favoreceu a remineralização do esmalte erodido *in vitro* (17). Estudos que investigaram o efeito do xilitol sobre a desmineralização erosiva do esmalte, mostraram que o xilitol pode minimizar a perda mineral. Estudos mostraram que a adição de xilitol isoladamente (25% e 40%) ou em associação com F, ao suco de laranja, foram eficazes em proteger o esmalte, reduzindo a desmineralização erosiva *in vitro* (18, 19). Souza e colaboradores (2010) avaliaram o efeito de vernizes ou de soluções contendo xilitol (10% ou 20%), em comparação com vernizes e soluções contendo 5% de NaF, na prevenção da erosão do esmalte bovino *in vitro* (21). Após 10 dias de ciclagem, tanto os vernizes como as soluções contendo xilitol, reduziram significativamente a erosão do esmalte em comparação com o controle (21). Rochel e colaboradores (2011) mostraram que a aplicação de dentifrício contendo 10% de xilitol associado a 1.000 ppm de F (NaF), ou de dentifrício contendo apenas 1.000 ppm de F, reduziram significativamente a erosão do esmalte, *in vitro,* quando comparados com o grupo placebo (20). Quando a erosão foi associada à abrasão, apenas o dentifrício contendo xilitol associado ao F proporcionou uma proteção significativa contra a erosão dentária (20). Estudos posteriores também reportaram que a aplicação de

verniz contendo xilitol/NaF (Profluorid®) reduziu de forma significativa o desgaste erosivo do esmalte, apresentando desempenho similar ao do verniz Duraphat® (22, 23). Esses autores constataram, por análise de microscopia de varredura, que o esmalte dos grupos tratados com os vernizes contendo xilitol e/ou F apresentou topografia com menor incidência de irregularidades, porosidades e depressões, quando comparado com o grupo controle (22, 23). Assim, o uso do xilitol pode representar uma estratégia promissora para minimizar a desmineralização e para favorecer a remineralização dentária.

3 Proposição

Este estudo teve como propósito avaliar o efeito dose-resposta de soluções contendo diferentes concentrações de xilitol (5, 10 ou 20%), associado ou não ao F (500 ppm F, NaF), para (1) reendurecer o esmalte erodido e (2) para prevenir a desmineralização erosiva do esmalte *in vitro*.

4 Métodos

4.1 Delineamento Experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* de ciclagem de pH com o propósito de avaliar o efeito dose-resposta de soluções contendo xilitol (5, 10 ou 20%), associado ou não ao F (500 ppm F, NaF) para (1) reendurecer o esmalte erodido e (2) para prevenir a desmineralização erosiva do esmalte.

Os experimentos de reendurecimento e de desmineralização foram realizados com espécimes de esmalte bovino, selecionados de acordo com os valores de dureza de superfície (*baseline*), sendo as variáveis de resposta empregadas a dureza de superfície e a perfilometria de contato, respectivamente. Para cada experimento, os espécimes foram aleatoriamente divididos em 8 grupos (n=15), conforme a solução utilizada para tratamento do esmalte: (1) sem xilitol e sem F (controle); (2) xilitol 5%; (3) xilitol 10%; (4) xilitol 20%; (5) 500 ppm F (NaF); (6) xilitol 5% + 500 ppm F; (7) xilitol 10% + 500 ppm F e (8) xilitol 20% + 500 ppm F.

Para a análise do efeito das soluções sobre o reendurecimento do esmalte, os espécimes foram imersos em solução de ácido cítrico a 0,1%, pH 2,5, por 1,5 minuto, 4 vezes no dia, para promover a erosão do esmalte. Entre os desafios erosivos, os espécimes foram imersos em saliva artificial por 30 minutos, à temperatura ambiente. Nos 2 dias seguintes, os espécimes foram imersos nas soluções de tratamento por 1 minuto e, após, permaneceram em saliva por 30 minutos, à temperatura ambiente. A análise foi realizada pela dureza de superfície do esmalte, ao final de cada dia de experimento.

Para a análise do efeito das soluções sobre a prevenção da desmineralização erosiva do esmalte, foi realizada uma ciclagem de pH por 5 dias. Em cada dia de ciclagem, os espécimes foram primeiramente tratados com as soluções por 1 minuto e, após, foram submetidos aos desafios erosivos (imersão em solução de ácido cítrico a 0,1%, pH 2,5, por 1,5 minuto, 4 x dia). Ao final de cada dia, os espécimes foram novamente tratados com as soluções por 1 minuto. Ao final do 1º e do 5º dia de ciclagem, duas horas após o último tratamento com as soluções, as análises foram realizadas por dureza de superfície e por perfilometria de contato do esmalte, respectivamente.

4.2 Preparo dos Espécimes

Para cada experimento (reendurecimento e desmineralização), foram utilizados 120 espécimes de esmalte bovino, totalizando 240 espécimes. Os espécimes foram preparados a partir de incisivos bovinos extraídos e armazenados em solução de timol a 0,1% (pH 7,0). Primeiramente, a coroa foi separada da raiz usando uma máquina de corte (Maruto, Tokyo, Japan) e um disco de diamante (Maruto, Tokyo, Japan). Em seguida, as coroas foram acopladas em moldes de silicone pré-fabricados (Biopdi, São Carlos, Brasil) e embutidas em resina acrílica autopolimerizável, de forma que a face vestibular da coroa permaneceu exposta. Após a polimerização da resina, os espécimes foram polidos utilizando lixas com granulações de 320, 600 e 1200 (silicon carbide, Al_2O_3, Buehler, Lake Bluff, USA).

4.3 Preparo das Soluções de Tratamento

Para os experimentos *in vitro* (reendurecimento e desmineralização), as soluções contendo xilitol (Sigma-Aldrich) e/ou F (NaF) foram preparadas previamente à cada ciclagem. Foi realizada a análise dos valores de pH das soluções, utilizando um eletrodo de pH, acoplado a um peagômetro, previamente calibrado com padrões de pH 4,0 e 7,0. As mensurações do pH das soluções foram realizadas durante 3 dias consecutivos (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de pH das soluções de tratamento (média ± desvio padrão)

Grupos de Tratamento	**pH**
Sem xilitol/Sem F	6,1 ± 0,3
Xilitol 5%	6,8 ± 0,9
Xilitol 10%	7,1 ± 1,0
Xilitol 20%	6,6 ± 0,7
500 ppm F	7,5 ± 0,7
Xilitol 5% + 500 ppm F	6,8 ± 0,4
Xilitol 10% + 500 ppm F	7,1 ± 0,5
Xilitol 20% + 500 ppm F	7,2 ± 0,7

4.4 Análise do Reendurecimento do Esmalte

Após o preparo dos espécimes, os valores de dureza de superfície (DS) foram obtidos usando um microdurômetro *Shimadzu* (HMV-2; Shimadzu Co., Tokyo, Japan), com indentador do tipo *Knoop*. Foram realizadas 5 indentações, com carga de 25 g por 10 s em cada espécime (*baseline*). Em seguida, 2/3 da superfície vestibular de cada espécime foram protegidos com um verniz de unha (Risque, São Paulo, Brazil) para a obtenção de duas áreas controle. Os espécimes foram selecionados de acordo com os valores de dureza obtidos no *baseline* e aleatoriamente divididos em 8 grupos (n=15), conforme a solução utilizada para tratamento do esmalte: (1) sem xilitol e sem F (controle); (2) xilitol 5%; (3) xilitol 10%; (4) xilitol 20%; (5) 500 ppm F (NaF); (6) xilitol 5% + 500 ppm F; (7) xilitol 10% + 500 ppm F e (8) xilitol 20% + 500 ppm F.

4.4.1 Tratamento e Ciclagem de pH

O experimento foi realizado no período de 3 dias. No 1º dia, os espécimes foram imersos em solução de ácido cítrico a 0,1%, pH 2,5, por 1,5 minuto, 4 vezes, para promover a desmineralização erosiva do esmalte. Entre os desafios erosivos, os espécimes foram imersos em saliva artificial (30 mL de saliva por espécime), à temperatura ambiente, por 30 minutos (63). Após o último desafio erosivo, os valores de dureza de superfície foram obtidos conforme descrito para o *baseline* (DS após desafio erosivo). No 2º dia, os espécimes foram imersos nas soluções de tratamento (0,5 mL de solução por espécime) por 1 minuto. Em seguida, os espécimes foram imersos em saliva artificial (30 mL de saliva por espécime), à temperatura ambiente, por 30 minutos, para favorecer o reendurecimento do esmalte (63). Ao final do 1º dia de tratamento com as soluções, foram obtidos os valores de dureza de superfície do esmalte (DS após o 1º tratamento). No 3º dia, foi realizado um 2º tratamento dos espécimes com as soluções, seguindo o mesmo protocolo do dia anterior. Ao final do dia, foram novamente obtidos os valores de dureza de superfície (DS após o 2º tratamento).

4.4.2 Dureza de Superfície do Esmalte

Ao final de cada dia de experimento, os valores de dureza de superfície (DS) foram novamente obtidos utilizando o microdurômetro *Shimadzu* (HMV-2; Shimadzu Co., Tokyo,

Japan), com indentador do tipo *Knoop*. Foram realizadas 5 indentações, a uma distância de 100 µm das indentações inicias, com carga de 25 g por 10 s, em cada espécime.

4.5 Análise da Inibição da Desmineralização do Esmalte

Após o preparo dos espécimes, os valores de dureza de superfície (DS - *baseline*) foram obtidos para alocação dos espécimes em 8 grupos experimentais (n=15), conforme descrito para o experimento de reendurecimento. Foi então realizada a análise perfilométrica do esmalte (*baseline*) utilizando um perfilômetro de contato Mahr (Mahr, Software Mahr Surf XCR20). Foram realizadas 5 leituras de 4 mm, com distância de 0,25 mm entre elas (*baseline*). Em seguida, 2/3 da superfície vestibular de cada espécime foram protegidos com um verniz de unha (Risque, São Paulo, Brazil) para a obtenção de duas áreas controle.

4.5.1 Tratamento e Ciclagem de pH

Foi realizada uma ciclagem de pH por 5 dias consecutivos. Em cada dia de ciclagem, os espécimes foram imersos, primeiramente, nas soluções de tratamento (0,5 mL de solução por espécime) por 1 minuto. Em seguida, os espécimes foram imersos em solução de ácido cítrico a 0,1%, pH 2,5, por 1,5 minuto, 4 vezes ao dia, para promover os desafios erosivos. Entre cada desafio erosivo, os espécimes foram imersos em saliva artificial (30 mL de saliva por espécime), à temperatura ambiente, por 30 minutos (Klimek et al., 1982). Após o último desafio erosivo de cada dia, os espécimes foram novamente imersos nas soluções de tratamento (0,5 mL de solução por espécime) por 1 minuto. Ao final do 1º dia de ciclagem, foram obtidos os valores de dureza de superfície do esmalte, duas horas após o último tratamento com as soluções, para avaliar as alterações no conteúdo mineral do esmalte decorrentes do amolecimento da superfície pelos desafios erosivos. A análise perfilométrica de contato foi realizada ao final do 5º dia de ciclagem, duas horas após o último tratamento com as soluções, a fim de avaliar a perda de superfície do esmalte decorrente dos desafios erosivos realizados ao longo da ciclagem.

4.5.2 Dureza de Superfície do Esmalte

Ao final do 1º dia de ciclagem, a desmineralização do esmalte foi avaliada pela dureza de superfície. Os valores de dureza de superfície (DS) foram novamente obtidos utilizando o microdurômetro *Shimadzu* (HMV-2; Shimadzu Co., Tokyo, Japan), com indentador do tipo *Knoop*. Foram realizadas 5 indentações, a uma distância de 100 µm das indentações inicias, com carga de 25 g por 10 s, em cada espécime. A porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) do esmalte de cada espécime foi obtida pela fórmula:

$$\textbf{\% PDS} = \frac{\text{Dureza inicial - Dureza pós-experimento}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$

4.5.3 Perfilometria

Perfis da superfície do esmalte foram obtidos no *baseline* e ao final do 5º dia de ciclagem, utilizando um perfilômetro de contato (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha). As áreas controle (protegidas com esmalte cosmético de unha) foram marcadas com lâmina de bisturi, para permitir o exato posicionamento do esmalte cosmético de unha, caso este tivesse sido perdido durante o experimento. Adicionalmente, foi realizada uma marcação (pequena cavitação) nas amostras, feita com broca esférica 1/4, para possibilitar o exato posicionamento da ponta do perfilômetro na 1ª varredura de cada leitura. Em cada leitura, cinco varreduras (comprimento de 4 mm) foram realizadas no centro da superfície da amostra a uma distância de 250 µm cada. Para a determinação da alteração do perfil da superfície da amostra, após a ciclagem, o esmalte cosmético de unha foi removido com uma solução de acetona (1:1 – acetona:água) e 5 leituras finais foram realizadas nas mesmas áreas que as leituras iniciais. Para possibilitar o correto reposicionamento das amostras durante as leituras, foi utilizado um dispositivo para padronização da posição das amostras nos eixos x, y e z. Esta técnica de leitura minimizou o erro resultante do posicionamento dos espécimes, pois a cada leitura, a ponta do perfilômetro percorreu o mesmo trajeto naquele determinado espécime, possibilitando uma comparação precisa dos perfis da superfície do esmalte. O desgaste do esmalte foi mensurado pelo software após a sobreposição do contorno final sobre o respectivo contorno inicial de cada varredura. A média dos valores obtidos pelas 5 varreduras em cada espécime foi calculada para análise do desgaste erosivo do esmalte.

4.6 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism (version 6.0 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, Ca USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov Test) e homogeneidade (Bartlett Test). Para o experimento de reendurecimento, os dados de dureza foram analisados por ANOVA a 2 critérios (tratamentos e tempos) de medidas repetidas (tempos) e teste de Tukey para comparações individuais. Para o experimento de desmineralização, ambos os desfechos (dureza de superfície e perfilometria) foram analisados por ANOVA a 2 critérios (xilitol e F), seguida pelo teste de Tukey para comparações individuais. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

5 Resultados

5.1 Avaliação do Reendurecimento do Esmalte

A ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas revelou diferenças significativas entre os tempos (F=10366, p<0,0001), mas não entre os tratamentos no 1º dia de ciclagem (F=0,624, p=0,735), com interação significativa entre estes critérios (F=4,403, p<0,001). Após os desafios erosivos, todos os grupos apresentaram perda significativa de dureza de superfície (Tabela 2). O tratamento com as soluções contendo xilitol e/ou F resultou em aumento nos valores de dureza de superfície, porém, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos no 1º dia de tratamento. No 2º dia de tratamento, as soluções contendo xilitol 10%, xilitol 10% + 500 ppm F e xilitol 20% + 500 ppm F, foram as mais eficazes em promover o reendurecimento do esmalte, diferindo significativamente do grupo controle e dos demais grupos (p<0,05) (Tabela 1). Com relação aos diferentes períodos de avaliação, diferenças significativas nos valores de dureza foram observadas entre todos os tempos (p<0,05), exceto para os valores obtidos no pós-erosão e no 1º dia de tratamento do grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Média da dureza superficial do esmalte no *baseline*, no pós-erosão, no 1º e no 2º dia de tratamento com as soluções contendo diferentes concentrações de xilitol, associadas ou não ao fluoreto (500 ppm F)

Grupos de Tratamento	***Baseline***	**Pós-Erosão**	**1º Dia de Tratamento**	**2º Dia de Tratamento**
Sem xilitol/Sem F	$355,9 \pm 22,6^{Aa}$	$217,3 \pm 9,3^{Ba}$	$222,9 \pm 8,7^{Ba}$	$232,6 \pm 9,3^{Ca}$
Xilitol 5%	$355,9 \pm 21,2^{Aa}$	$218,9 \pm 8,5^{Ba}$	$238,4 \pm 11,8^{Ca}$	$245,7 \pm 11,7^{Da}$
Xilitol 10%	$355,8 \pm 21,7^{Aa}$	$217,5 \pm 10,0^{Ba}$	$234,5 \pm 15,0^{Ca}$	$253,7 \pm 16,0^{Db}$
Xilitol 20%	$355,8 \pm 22,4^{Aa}$	$216,8 \pm 10,1^{Ba}$	$234,4 \pm 7,7^{Ca}$	$244,3 \pm 8,8^{Da}$
500 ppm F	$355,6 \pm 21,7^{Aa}$	$218,0 \pm 15,7^{Ba}$	$233,4 \pm 14,5^{Ca}$	$247,9 \pm 16,7^{Da}$
Xilitol 5% + 500 ppm F	$355,8 \pm 22,2^{Aa}$	$220,1 \pm 17,7^{Ba}$	$239,0 \pm 16,1^{Ca}$	$247,6 \pm 17,4^{Da}$
Xilitol 10% + 500 ppm F	$355,6 \pm 21,6^{Aa}$	$220.7 \pm 15,1^{Ba}$	$236,7 \pm 14,4^{Ca}$	$254,0 \pm 14,5^{Db}$
Xilitol 20% + 500 ppm F	$355,8 \pm 22,2^{Aa}$	$219,3 \pm 14,3^{Ba}$	$235,9 \pm 13,4^{Ca}$	$252,6 \pm 15,4^{Db}$

Para cada tratamento, letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos avaliados. Para cada tempo, letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste de Tukey, p<0,05). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=15).

5.2 Avaliação da Desmineralização do Esmalte

Para a variável dureza de superfície (1° dia de ciclagem), a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre o tratamento com xilitol (F=31,36, p<0,0001) e o tratamento com F (F=32,57, p<0,0001), com interação significativa entre os critérios (F=15,21, p<0,0001). Todos os grupos tratados com as soluções experimentais apresentaram menor perda de dureza de superfície do esmalte no 1º dia de ciclagem, diferindo significativamente do controle (p<0,05). Os grupos tratados com as soluções experimentais, no entanto, não diferiram significativamente entre si (Figura 1).

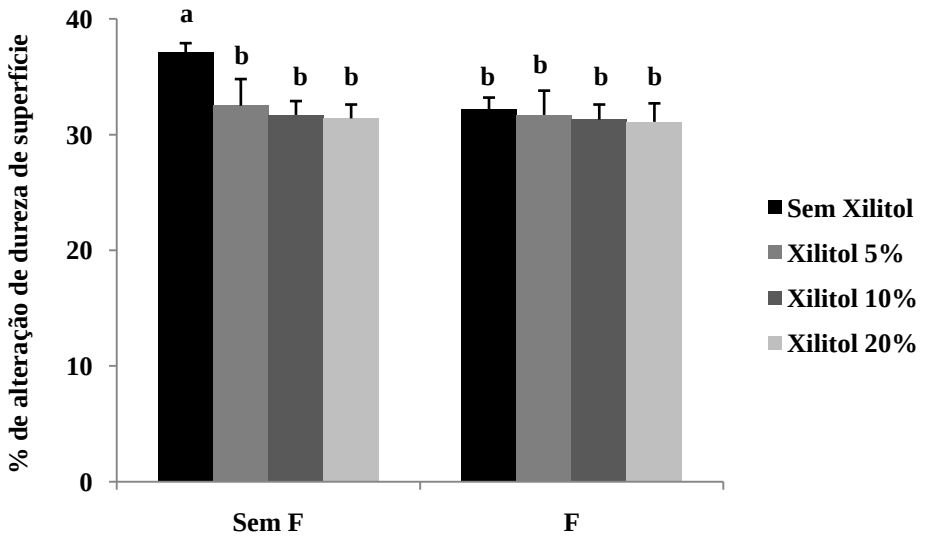

Figura 1. Porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte após desafios erosivos com ácido cítrico 0,1% (pH 2,5), seguido do reendurecimento do esmalte pelo tratamento com diferentes soluções e saliva artifcial no 1º dia de ciclagem. Os dados são apresentados como média (n=15). Barras indicam desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey; p<0,05).

Para o desgaste erosivo do esmalte, avaliado pela perfilometria de contato no 5º dia de ciclagem, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre os tratamentos com xilitol (F=31,46, p<0,0001), entre os tratamentos com F (F=76,64, p<0,0001), bem como para a interação entre ambos os critérios (F=15,21, p<0,0001). Todas as soluções reduziram significativamente o desgaste erosivo do esmalte em relação ao grupo controle (p<0,05), sem diferenças significativas entre si, com exceção das soluções contendo xilitol 10% + 500 ppm

F e 500 ppm F que, dentre as soluções testadas, apresentaram o menor e o maior valor de desgaste erosivo, respectivamente (Figura 2).

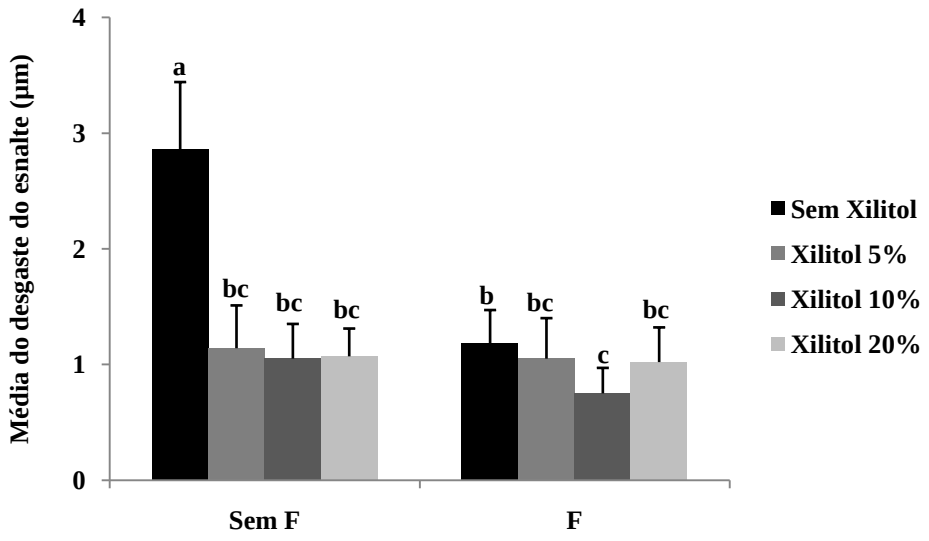

Figura 2. Desgaste erosivo (µm) do esmalte avaliado por perfilometria de contato após os desafios erosivos com ácido cítrico 0,1% (pH 2,5), seguido do reendurecimento do esmalte pelo tratamento com diferentes soluções e saliva artificial no 5º dia de ciclagem de pH. Os dados são apresentados como média (n=15). Barras indicam desvio padrão. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey; $p<0,05$).

6 Discussão

A erosão dentária é um processo que leva à perda irreversível da estrutura dentária. Diversos fatores estão envolvidos com a sua etiologia e progressão, que tende a se agravar ao longo do tempo, podendo comprometer a estética e a função dos elementos dentários. Nesse contexto, estratégias devem ser empregadas para minimizar a severidade da desmineralização erosiva, como o uso do F e de agentes com potencial para reendurecer o esmalte erodido.

Este estudo avaliou o efeito dose-resposta de soluções contendo diversas concentrações de xilitol, associado ou não ao F, na prevenção da desmineralização erosiva do esmalte e no reendurecimento de lesões erosivas *in vitro*. Os resultados deste estudo mostraram que todas as soluções reduziram significativamente a desmineralização erosiva do esmalte e três delas (xilitol 10%, xilitol 10% + 500 ppm F e xilitol 20% + 500 ppm F) favoreceram, de forma expressiva, o reendurecimento de lesões erosivas quando comparadas com o grupo controle. O reendurecimento do esmalte dentário foi avaliado pelas alterações que ocorreram na dureza de superfície do esmalte. Nos estágios iniciais do processo erosivo, a avaliação da dureza de superfície fornece informações importantes sobre as alterações no conteúdo mineral que ocorrem entre os desafios erosivos e a ação reendurecedora da saliva (1). Essas análises mostraram diferenças significativas nos valores de dureza do esmalte entre os 3 tempos avaliados (pós-erosão, 1º e 2º tratamentos), para todos os grupos, exceto para o grupo controle no pós-erosão e no 1º dia de tratamento. O aumento significativo na dureza de superfície do grupo controle, constatado no 2º dia de tratamento, mostra o potencial reendurecedor da saliva, considerando que o grupo controle não foi exposto às soluções experimentais. Por ser supersaturada em relação à hidroxiapatita, a saliva artificial é capaz de repor parte dos minerais perdidos durante as quedas de pH (1, 30), mas isoladamente, esse efeito não é suficiente para reduzir, de forma significativa, a desmineralização dentária. Assim, os dados deste estudo mostraram que todos os grupos tratados com as soluções contendo xilitol e/ou F apresentaram maior reendurecimento do esmalte após os desafios erosivos em relação ao controle. Diferença significativa, no entanto, foi encontrada após o 2º dia de tratamento para os grupos tratados com as soluções contendo xilitol 10%, xilitol 10% + 500 ppm F e xilitol 20% + 500 ppm F, que foram as mais eficazes em promover o reendurecimento do esmalte. Este resultado foi confirmado pelo aumento nos valores de dureza que ocorreu após o tratamento com as soluções, indicando que o xilitol e o F potencializaram a ação reendurecedora da saliva e favoreceram a incorporação de minerais no esmalte erodido (14, 30). De fato, o F inibe a perda mineral pela reação com a apatita dentária

e pela formação de depósitos de CaF_2, que liberam íons Ca^{+2} e F^- durante as quedas de pH (7, 38). No entanto, o F convencional apresenta um limitado potencial de proteção contra a erosão dentária, considerando a dissolução da camada superficial de esmalte que ocorre durante os desafios erosivos (38). O xilitol, por sua vez, apresenta a capacidade de se complexar com íons Ca^{+2} (12, 14) e de facilitar o transporte e a incorporação do íon Ca^{+2} no interior da lesão dentária (12, 13), favorecendo o reendurecimento da camada de esmalte amolecida pelo desafio erosivo (12, 15, 16). Estudos prévios mostraram que o xilitol e o F apresentam potencial para minimizar a erosão do esmalte *in vitro* (17, 22, 23), o que concorda com os resultados do presente estudo. No presente estudo, não foi observado um efeito dose-resposta para os grupos tratados com as soluções contendo xilitol, associado ou não ao F. Na menor concentração testada (5%), o xilitol não apresentou potencial reendurecedor significativo, independente da associação com o F. Por outro lado, as soluções de xilitol a 10%, associado ou não ao F, bem como a solução de xilitol a 20% associada ao F, promoveram, de forma significativa, o reendurecimento do esmalte previamente erodido, em comparação ao grupo controle, após o 2º dia de tratamento. Entretanto, não houve diferença significativa entre estes 3 tratamentos.

O presente estudo ainda mostrou que o xilitol também desempenha um papel na prevenção da desmineralização erosiva do esmalte. As análises de dureza de superfície realizadas no 1º dia de ciclagem mostraram que todas as soluções, independente da concentração de xilitol e da presença do F, reduziram significativamente o amolecimento do esmalte em relação ao controle. O desgaste erosivo, avaliado pela perfilometria de contato no 5º dia de ciclagem, foi significativamente menor para todos os grupos tratados em comparação com o grupo controle. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos tratados (exceto entre o grupo tratado com xilitol 10% + 500 ppm F e o grupo tratado com 500 ppm F), o que demonstra que o efeito do xilitol não foi potencializado pela presença do F. O mesmo achado foi observado por Rochel e colaboradores (2011), que não encontraram diferença significativa entre o uso de dentifrício contendo xilitol a 10%, isolado ou associado ao F, na prevenção da erosão do esmalte *in vitro* (20). Amaechi e colaboradores (1998), no entanto, relataram que o uso de suco de laranja contendo xilitol a 25%, associado ao F, apresentou melhor resultado, do que o seu uso isolado, na prevenção contra a desmineralização erosiva do esmalte *in vitro* (18). Os dados do presente estudo estão ainda de acordo com os resultados obtidos por Souza e colaboradores (2010), que relataram que

soluções contendo xilitol a 10% ou 20% foram eficazes em reduzir a erosão do esmalte *in vitro*, sendo que a concentração de xilitol a 10% apresentou melhores resultados (21).

O efeito preventivo do xilitol contra a desmineralização dentária erosiva pode ser explicado pela formação de complexos com o cálcio. Esses complexos mantêm o cálcio disponível na saliva por um período maior, estabilizando o sistema cálcio-fosfato. Esse processo altera a saturação do meio em relação à hidroxiapatita, inibindo a perda mineral e minimizando a dissolução erosiva do esmalte (12, 15-17). O efeito anti-erosivo do uso isolado ou combinado de agentes reendurecedores, no entanto, pode sofrer influência da interação dos fatores envolvidos com a etiologia da erosão dentária. Rochel e colaboradores (2011) não encontraram diferença significativa entre o uso isolado ou combinado do xilitol e do F contra a desmineralização erosiva do esmalte (20). Porém, esses autores observaram que o F potencializou de forma significativa o efeito do xilitol quando a erosão foi associada à abrasão (20). Desafios abrasivos, entretanto, não foram inclusos no *design* experimental do presente estudo.

É importante destacar que o uso desses agentes reendurecedores, isolados ou em associação, apresenta potencial para minimizar, mas não para prevenir totalmente a erosão dentária (18, 19). Assim, o presente estudo mostrou que o uso de soluções contendo xilitol, associado ou não ao F, pode constituir uma medida eficaz tanto para reduzir a desmineralização erosiva do esmalte, como para potencializar o reendurecimento das lesões erosivas *in vitro*. No entanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a magnitude do efeito protetor do xilitol sobre a erosão dentária, considerando diversos parâmetros clínicos, como o potencial reendurecedor da saliva, a dieta, a frequência dos desafios erosivos e a influência dos fatores etiológicos.

7 Conclusão

Os resultados mostraram que a solução de xilitol a 10% apresentou melhor potencial para reendurecer o esmalte, independente da presença do F, e melhor efeito anti-erosivo, quando associado ao F. Esses estudos mostraram que o uso de soluções contendo xilitol, associado ou não ao F, pode constituir uma medida eficaz tanto para reduzir a desmineralização erosiva do esmalte, como para potencializar o reendurecimento das lesões erosivas *in vitro*.

Referências

1. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries research. 2011;45 Suppl 1:2-12.

2. Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. International dental journal. 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

3. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monographs in oral science. 2014;25:55-73.

4. Lippert F. Fluoride release from fluoride varnishes under acidic conditions. The Journal of clinical pediatric dentistry. 2014;39(1):35-9.

5. 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. European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry. 2019;20(6):517-27.

6. Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. Archives of oral biology. 2007;52(1):9-14.

7. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in dental erosion. Monographs in oral science. 2011;22:158-70.

8. Makinen KK. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2011;20(4):303-20.

9. Salli K, Lehtinen MJ, Tiihonen K, Ouwehand AC. Xylitol's Health Benefits beyond Dental Health: A Comprehensive Review. Nutrients. 2019;11(8).

10. Scheinin A, Mäkinen KK. The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. International dental journal. 1971;21(3):302-21.

11. Scheinin A, Mäkinen KK. Turku sugar studies. An overview. Acta odontologica Scandinavica. 1976;34(6):405-8.

12. Mäkinen KK, Söderling E. Solubility of calcium salts, enamel, and hydroxyapatite in aqueous solutions of simple carbohydrates. Calcified tissue international. 1984;36(1):64-71.

13. Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanagisawa T. Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. Journal of electron microscopy. 2003;52(5):471-6.

14. Mäkinen KK. Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. International journal of dentistry. 2010;2010:981072.

15. Arends J, Christoffersen J, Schuthof J, Smits MT. Influence of xylitol on demineralization of enamel. Caries research. 1984;18(4):296-301.

16. Arends J, Smits M, Ruben JL, Christoffersen J. Combined effect of xylitol and fluoride on enamel demineralization in vitro. Caries research. 1990;24(4):256-7.

17. Gargouri W, Zmantar T, Kammoun R, Kechaou N, Ghoul-Mazgar S. Coupling xylitol with remineralizing agents improves tooth protection against demineralization but reduces antibiofilm effect. Microbial pathogenesis. 2018;123:177-82.

18. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. Archives of oral biology. 1998;43(2):157-61.

19. Chunmuang S, Jitpukdeebodintra S, Chuenarrom C, Benjakul P. Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro. Journal of oral science. 2007;49(4):293-7.

20. Rochel ID, Souza JG, Silva TC, Pereira AF, Rios D, Buzalaf MA, et al. Effect of experimental xylitol and fluoride-containing dentifrices on enamel erosion with or without abrasion in vitro. Journal of oral science. 2011;53(2):163-8.

21. Souza JG, Rochel ID, Pereira AF, Silva TC, Rios D, Machado MA, et al. Effects of experimental xylitol varnishes and solutions on bovine enamel erosion in vitro. Journal of oral science. 2010;52(4):553-9.

22. Alexandria A, Valença AMG, Cabral LM, Maia LC. Comparative Effects of CPP-ACP and Xylitol F-Varnishes on the Reduction of Tooth Erosion and Its Progression. Brazilian dental journal. 2020;31(6):664-72.

23. Alexandria AK, Vieira TI, Pithon MM, da Silva Fidalgo TK, Fonseca-Gonçalves A, Valença AM, et al. In vitro enamel erosion and abrasion-inhibiting effect of different fluoride varnishes. Archives of oral biology. 2017;77:39-43.

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

25. Bartlett D, Phillips K, Smith B. A difference in perspective--the North American and European interpretations of tooth wear. The International journal of prosthodontics. 1999;12(5):401-8.

26. Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monographs in oral science. 2014;25:1-15.

27. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. Brazilian oral research. 2006;20(2):148-54.

28. Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. Journal of dentistry. 2015;43(1):42-50.

29. Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monographs in oral science. 2014;25:197-205.

30. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. Journal of applied oral science : revista FOB. 2012;20(5):493-502.

31. Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. Archives of oral biology. 2001;46(8):697-703.

32. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. The Cochrane database of systematic reviews. 2003(1):Cd002278.

33. Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. Monographs in oral science. 2014;25:230-43.

34. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. Monographs in oral science. 2011;22:97-114.

35. Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. Monographs in oral science. 2011;22:146-57.

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

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

38. Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. Caries research. 2015;49 Suppl 1:18-29.

39. Øgaard B. The cariostatic mechanism of fluoride. Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ : 1995). 1999;20(1 Suppl):10-7; quiz 34.

40. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. Journal of the American Dental Association (1939). 2000;131(7):887-99.

41. Bartlett DW, Smith BG, Wilson RF. Comparison of the effect of fluoride and non-fluoride toothpaste on tooth wear in vitro and the influence of enamel fluoride concentration and hardness of enamel. British dental journal. 1994;176(9):346-8.

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

43. Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. Caries research. 2011;45(6):581-9.

44. Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, et al. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. Caries research. 2009;43(1):57-63.

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

46. Murakami C, Bönecker M, Corrêa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. Archives of oral biology. 2009;54(11):997-1001.

47. Nehme M, Parkinson CR, Zero DT, Hara AT. Randomised study of the effects of fluoride and time on in situ remineralisation of acid-softened enamel. Clinical Oral Investigations. 2019;23(12):4455-63.

48. 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. Journal of dentistry. 2017;63:30-5.

49. Ur-Rehman S, Mushtaq Z, Zahoor T, Jamil A, Murtaza MA. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. Critical reviews in food science and nutrition. 2015;55(11):1514-28.

50. Mussatto SI, Roberto IC. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2002;38(4):401-11.

51. Livesey G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. Nutrition research reviews. 2003;16(2):163-91.

52. Huttunen JK, Mäkinen KK, Scheinin A. Turku sugar studies XI. Effects of sucrose, fructose and xylitol diets on glucose, lipid and urate metabolism. Acta odontologica Scandinavica. 1976;34(6):345-51.

53. Mäkinen KK. Dental aspects of the consumption of xylitol and fructose diets. International dental journal. 1976;26(1):14-28.

54. Mäkinen KK, Scheinin A. The effect of the consumption of various sugars on the activity of plaque and salivary enzymes. International dental journal. 1971;21(3):331-9.

55. Söderling E, Rekola M, Mäkinen KK, Scheinin A. Turku sugar studies XXI. Xylitol, sorbitol-, fructose- and sucrose-induced physico-chemical changes in saliva. Acta odontologica Scandinavica. 1976;34(6):397-403.

56. Mäkinen KK. Effect of long-term, peroral administration of sugar alcohols on man. Swedish dental journal. 1984;8(3):113-24.

57. Mäkinen KK. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2011;20(4):303-20.

58. Trahan L, Söderling E, Dréan MF, Chevrier MC, Isokangas P. Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. Journal of dental research. 1992;71(11):1785-91.

59. Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkkinen L. Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers. European journal of oral sciences. 1997;105(2):170-7.

60. Söderling E, Pienihäkkinen K. Effects of xylitol and erythritol consumption on mutans streptococci and the oral microbiota: a systematic review. Acta odontologica Scandinavica. 2020;78(8):599-608.

61. Cardoso CA, de Castilho AR, Salomão PM, Costa EN, Magalhães AC, Buzalaf MA. Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. Journal of dentistry. 2014;42(11):1495-501.

62. Cardoso CA, Cassiano LP, Costa EN, Souza ESCM, Magalhães AC, Grizzo LT, et al. Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. Journal of dentistry. 2016;50:74-8.

63. Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. Caries research. 1982;16(2):156-61.