



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA



SHELYN AKARI YAMAKAMI

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA INTERCEPTAÇÃO DA
EROSÃO DENTINÁRIA**

Ribeirão Preto

2019

SHELYN AKARI YAMAKAMI

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA INTERCEPTAÇÃO DA EROSÃO
DENTINÁRIA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-
USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências
da Saúde junto ao Programa de Odontologia
Restauradora.

Área de Concentração: Odontologia Restauradora

Opção: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de
Biblioteca
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Yamakami, Shelyn Akari

Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária.
Ribeirão Preto, 2019.
110p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa), apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora - Opção: Dentística
Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Dentina. 2. Erosão. 3. Abrasão. 4. Desgaste. 5. Quitosana. 6. Flúor. 7. Microscopia Confocal. 8. Análise Espectral Raman. 9. Tomografia Óptica.

Folha de Aprovação

Yamakami, SY. Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Odontologia Restauradora. Área de Concentração: Odontologia Restauradora. Opção: Dentística. Ribeirão Preto, 2019.

Data da Aprovação: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, por quem são todas as coisas e por quem existo.

Poucas palavras traduzem o coração da pessoa a quem tudo dedico, pois Ele é a personificação do Amor. Na escrita de Thomas à Kempis e Clive Staples Lewis encontra-se a expressão de um profundo ensinamento:

“Filho meu, é preciso aprender muito mais, coisas que você ainda não aprendeu bem. Quais são estas coisas, Senhor?”

Que você coloque o seu anelo, totalmente, de conformidade com o que me apraz e que não seja admirador de si mesmo, mas seguidor sincero de minha vontade. Várias aspirações poderão, muitas vezes, dominá-lo e impeli-lo à frente com veemência, mas considere se você está sendo movido pela minha honra ou mais pela sua própria vantagem, se sou eu a causa, você ficará satisfeito com o que quer que seja. Mas se você fica à espreita em busca de vantagem pessoal é exatamente isso que o atrapalha e lhe pesa.

Cuidado para não tender demais ao desejo preconcebido, sem pedir meu conselho, para depois talvez se arrepender e ficar infeliz com aquilo que a princípio o fazia feliz, e pelo qual você cuidou com zelo sincero, pensando que fosse o melhor.

Porque nem todo o gosto que parece ser bom é para ser seguido imediatamente, nem toda a coisa que lhe desagrade à primeira vista é para ser evitada.

Por vezes, é expediente parar, mesmo no caso de bons empreendimentos e aquisições, para que você não crie distrações na mente, pois o perigo é que, por falta de autodomínio você crie um escândalo para os outros, ou então, sendo frustrado por outras pessoas, você de repente fique confundido e caia.

Dê-me tudo. Entregue-me todo o seu ego natural, todos os seus desejos que você julga inocentes, bem como os que você julga maus. Todo o seu ser. Eu lhe darei em troca um novo eu. Na verdade, eu lhe darei o meu próprio eu e a minha vontade se tornará a sua vontade.

O mundo está farto de indiferença. Deus quer pessoas reais, pessoas que creiam em Alguém por quem estejam dispostos a viver e morrer.”

T. à Kempis e C. S. Lewis

Agradecimento. Especial

Agradecimento Especial

Agradeço por ser minha inspiração, por trazer vida a quem nada merecia. Agradeço por ser a Graça que sustenta, por trazer alento a quem nada tinha. Tens minha eterna gratidão, constante estima, pois tudo o que sou, tudo o que tenho e tudo o que espero ser entrego-Te irrevogavelmente. Ao meu Deus, a minha inteira devoção.

A tua suficiência me basta.

Minha família, minha afeição. Meus sinceros agradecimentos e sempiterno apreço.

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb, suas palavras motivadoras me impulsionaram a crescer. Seus ensinamentos são o reflexo de seu excelente conhecimento.

À Dra. Juliana Jendiroba Faraoni, valioso amparo e terna amizade. Sua presença acolhedora marcou para sempre minhas lembranças.

Aos meus amigos. Eternas memórias. Amizade para toda a vida.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representado pela Digníssima Diretora Professora Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e pelo Vice-diretor Prof. Dr. Arthur de Belém Noves Junior.

À coordenação geral de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pessoa do Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho.

Ao chefe de Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Paulo Tambasco de Oliveira.

Ao comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo.

Ao Biobanco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona.

Aos professores membros da minha banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann, Professor do Departamento de Física. Agradeço a colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

À Débora Fernandes Costa Guedes, técnica do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao querido Carlos Feitosa dos Santos, secretário do curso de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por toda a ajuda.

À Universidade de British Columbia, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho, por ter cedido espaço para a realização de parte dos meus experimentos.

À Universidade de Harvard, na pessoa da Prof. Dra. Hiroe Ohyama, por ter me acolhido durante o doutorado sanduíche e permitido que eu realizasse parte dos meus experimentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro do meu trabalho (Processo: 16/23193-7)

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro para meu trabalho e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE outorgada.

Resumo

RESUMO

Yamakami SY. **Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária**. 2019. p.111. Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O processo erosivo leva a perda mineral da estrutura dentária, e uma vez que este tecido é comprometido, o dano ao dente pode tornar-se irreversível. **Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes tratamentos para interceptar o processo de erosão dentinária. **Materiais e métodos:** Foram obtidos 400 fragmentos de dentina radicular (4x3x2mm) a partir de incisivos bovinos hígidos. Metade de cada fragmento foi exposta aos tratamentos/desafios erosivos (ácido clorídrico na forma líquida e gasosa). Esta etapa do estudo foi fatorial (4x2), tendo como fatores de estudo o *tratamento superficial* em 4 níveis: ausência de tratamento (G1); quitosana (G2); hidrogel experimental (G3) e verniz fluoretado (G4) e a *abrasão* em 2 níveis: com e sem abrasão (escovas Oral-B, 10s/200gf). O fator erosão foi realizado com ácido clorídrico na forma líquido (pH1,2, 6x/dia/20s) e gasosa (pH1,2, 6x/dia/20) durante 6 dias. As análises utilizadas foram: degrau (μm), perfil de desgaste (Rv), perda de volume (μm^3), rugosidade (Sa) e contagem de túbulos por meio da microscopia confocal a laser 3D, intensidade e profundidade da mineralização dentinária por meio da tomografia de coerência óptica e alterações químicas por meio da microscopia micro Raman. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey's test ($p < 0,05$). **Resultados:** Observou-se que para o fator tratamento, o grupo controle foi semelhante ao grupo quitosana e estatisticamente diferente do grupo experimental ($p < 0,05$). Para o fator abrasão, observou-se que os subgrupos apresentaram maior desgaste quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p < 0,05$). A rugosidade da superfície não foi afetada pelos diferentes tratamentos ($p > 0,005$). Os túbulos dentinários foram eficazmente obliterados pelo grupo experimental que também apresentou maior mineralização superficial da dentina radicular. **Conclusão:** O processo erosivo com ácido clorídrico (HCl) líquido teve um efeito mais intenso do que o processo com HCl gasoso. A abrasão promoveu alterações estruturais mais evidentes no substrato dentinário. O

grupo experimental e o verniz de TiF₄ foram capazes de interceptar o processo erosivo, contudo, não conseguiu paralisá-lo.

Palavras-chave: 1. Dentina. 2. Erosão. 3. Abrasão. 4. Desgaste. 5. Quitosana. 6. Flúor. 7. Microscopia Confocal. 8. Análise Espectral Raman. 9. Tomografia Óptica.

Abstract

Yamakami SY. **Effect of different treatments on the dental erosion interception** 2019. p.111. PhD Thesis – Ribeirão Preto Dental School, São Paulo University.

The erosive process leads to mineral loss of tooth structure, and once this tissue is compromised, the damage to the tooth may become irreversible. **Objective:** To analyze the effect of different treatments to intercept the dental erosion process. **Materials and methods:** 400 root dentin fragments (4x3x2mm) were used from sound bovine incisors. Half of each fragment was exposed to erosive controls/challenges (hydrochloric acid in liquid and gaseous form). This phase of the study was factorial (4x2), having as study factors the *superficial treatment* in 4 levels: absence of treatment (G1); chitosan (G2); experimental hydrogel (G3) and fluoride varnish (G4) and 2-level abrasion: with and without abrasion (Oral-B brushes, 10s / 200gf). The erosion factor was performed with hydrochloric acid in liquid (pH 1.2, 6x/day/20s) and gaseous form (pH 1.2, 6x/day/20) for 6 days. The statistical analysis were step (μm), wear profile (Rv), volume loss (μm^3), roughness (Sa) and tubule count by 3D laser confocal microscopy, intensity and depth of dental mineralization by optical coherence tomography and chemical changes by micro Raman microscopy. Data were submitted to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). **Results:** For the *treatment factor*, the control group was similar to the chitosan group and was statistically different from the experimental group ($p < 0.05$). For the *abrasion factor*, it was observed that the subgroups presented greater wear when associated with abrasion than without abrasion ($p < 0.05$). ($p < 0.05$). Surface roughness was not affected by different treatments ($p > 0.005$). The dentinal tubules were effectively obliterated by the experimental group that also presented higher superficial mineralization of the root dentin. **Conclusion:** The erosive process with liquid hydrochloric acid (HCl) had a more intense effect than the process with gaseous HCl. Abrasion promotes more evident changes in the dentin substrate. The experimental group and TiF_4 varnish were able to intercept the erosive process, however, they could not paralyze it.

Keywords: 1. Dentin. 2. Erosion. 3. Abrasion. 4. Wear. 5. Chitosan. 6. Fluorine. 7. Confocal Microscopy. 8. Raman Spectral Analysis. 9. Optical tomography.

Sumário

Sumário

1. Introdução	31
2. Proposição	40
3. Material e Método	44
3.1. Delineamento experimental	44
3.2. Erosão inicial e Seleção dos fragmentos	47
3.3. Grupos experimentais	48
3.4. Desafios erosivos	49
3.5. Análises realizadas	52
4. Resultados	64
4.1. Erosão ácido clorídrico líquido	64
4.2. Erosão ácido clorídrico gasoso	75
5. Discussão	87
6. Conclusões	97
7. Referências Bibliográficas	100
8. Anexo	111

Introdução

1. Introdução

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é definida como sendo uma condição patológica proveniente do fluxo retrógrado do conteúdo gástrico para o esôfago, orofaringe e/ou trato respiratório que produz um conjunto de sintomas e/ou complicações prejudiciais a qualidade de vida do indivíduo (Savarino et al., 2018). É uma patologia relativamente comum, cuja prevalência na América do Sul é em torno de 23% (El-Serag et al., 2014) e no Brasil cerca de 11% da população apresenta-se com sintomas compatíveis com o refluxo gastroesofágico (Moraes-Filho et al., 2005).

Diferentemente da DRGE, o refluxo gastroesofágico (RGE) é uma condição fisiológica que ocorre normalmente em pacientes saudáveis no período pós-prandial (após as refeições), durante uma hora por dia (Fenoglio-Preiser et al., 1999; Gonzalez et al., 2019). Esta ocorrência pode ser diagnosticada quando o pH esofágico liberado é menor do que 4,0 e perdura ao menos 30 segundos (Orr, 2005). Regularmente, este conteúdo ácido é removido por meio dos movimentos peristálticos associados à saliva, neutralizando-o entre 1-2 minutos (Orr, 2003). A saliva além de auxiliar no efeito neutralizador do ácido, também atua na lubrificação do esôfago protegendo-o contra os danos mecânicos relacionados a passagem do bolo alimentar (Fenoglio-Preiser et al., 1999; Gyawali et al., 2018).

Além deste mecanismo de proteção, o próprio organismo possui uma barreira antirrefluxo que se localiza na junção gastroesofágica. Essa junção funcional possui características anatômicas (forma oblíqua ligada à curva do diafragma) que auxiliam no papel protetor contra o refluxo do ácido. Outro aspecto importante está associado ao alto gradiente de pressão (10-30 mm Hg) mantido pela contração tônica dos músculos circulares do esfíncter esofágico inferior que sob contração, isola o estômago do esôfago. A depuração intraluminal do esôfago acaba sendo auxiliada pela força da gravidade, pelo peristaltismo fisiológico do conteúdo esofágico para o estômago e também pelos bicarbonatos presentes na saliva (Fox et al., 2004; Herbella et al., 2010).

Quando a RGE começa a produzir disfunção gástrica ou a provocar danos à mucosa, esta condição passa a progredir para uma desordem clínica também conhecida como DRGE. As manifestações sintomatológicas desta síndrome, podem

ser classificadas como esofágicas ou extra esofágicas. Os sintomas esofágicos são a pirose, que está associada a estimulação e ativação dos quimiorreceptores presentes na mucosa do esôfago distal (Yates et al., 2015) e/ou regurgitação que refletem a ocorrência de um transtorno na barreira antirrefluxo da junção gastroesofágica. Já os sintomas extra esofágicos podem ser tosse seca crônica, laringite, asma e erosão dentária (Vakil et al., 2006; Patcharatrakul et al., 2014; Tatarian et al., 2016).

O processo de erosão dentária é definido como sendo a perda do tecido dentário causado por meio do contato com substâncias químicas ou processos eletrolíticos de origem não bacteriológica (Schlueter et al., 2019). O ácido que atua no processo erosivo dentário de pacientes portadores de DRGE é de origem intrínseca oriundo de ácidos endógenos, como por exemplo, o ácido clorídrico. Este ácido é um dos principais componentes do suco gástrico e pode apresentar-se na forma líquida e/ou gasosa (Wang et al., 2010, Faraoni et al., 2018). O ácido clorídrico na sua forma líquida dificilmente chega a cavidade bucal dos pacientes, pois na maioria dos casos este material refluído acaba ficando retido na região do esôfago (Woodland et al., 2010). Em contrapartida, o ácido clorídrico na sua forma gasosa tem sido o material mais frequentemente encontrado durante os episódios de refluxo e provavelmente seja o principal responsável pela erosão dentária (Sifrim et al., 1999; Higo et al., 2009; Faraoni et al., 2018). Quando os ácidos erosivos atingem a superfície do esmalte, seu conteúdo mineral começa a se dissolver, causando a perda de estrutura dentária. À medida que o processo erosivo progride, o esmalte é completamente removido e a dentina descoberta é exposta na cavidade bucal (da Silva et al., 2019).

A dentina apresenta em sua constituição, componentes minerais (inorgânicos) formados por cristais substituíveis de hidroxiapatita. Estes cristais são pobres em cálcio, fosfato e sódio e ricos em magnésio e carbonato. Além de serem encontrados sobre e entre as fibrilas colágenas, os cristais de hidroxiapatita presentes na dentina apresentam-se em menores tamanhos, proporcionando desta forma, uma maior área de superfície. Por isso os cristais da dentina são mais suscetíveis ao ataque ácido (Hicks et al., 1985). Desta forma, qualquer substância

ácida com um pH abaixo do valor crítico para dentina (6,0-6,5) pode ser capaz de dissolver os cristais de hidroxiapatita (Wefel, 1994; Grippo et al., 2004).

Apesar do mecanismo exato do processo de erosão sobre a superfície da dentina radicular ainda não ser completamente elucidado (Hannas et al., 2016), sabe-se que a exposição da dentina ao ácido leva primeiramente a um processo de desmineralização na região entre a dentina peritubular e intertubular. Em defluência, o ácido continua permeando a dentina peritubular e dissolvendo-a até levar ao alargamento dos túbulos dentinários. A camada superficial que se forma após o desgaste erosivo da estrutura dentinária tem como constituição uma matriz de colágeno desmineralizada que apresenta grande resistência mecânica (Ganss et al., 2009), além de limitar a difusão iônica de substâncias para dentro e fora da superfície desmineralizada (Klont et al., 1991; Kato et al., 2014). É por isso que a preservação desta camada tem sido considerada importante para a redução da progressão da erosão dentinária (Buzalaf et al., 2015).

No entanto, uma vez que se inicia o processo de desmineralização a matriz orgânica começa a apresentar degradação química por meio da ação das metaloproteinases da matriz (MMPs) que estão presentes na própria dentina ou na saliva (Tjäderhane et al., 1998). Estas enzimas proteolíticas zinco dependentes degradam quase todas as proteínas da matriz extracelular, isto significa que os diferentes tipos de colágeno em sua forma ativa ou desnaturada estão incluídos no mecanismo de degradação química (Buzalaf et al., 2012). Este processo só pode ser desencadeado quando as MMPs, secretadas inicialmente como precursores inativos (pró-forma), são ativas pelo baixo pH oral (aproximadamente 4,5). Contudo, sob condições normais as MMPs salivares (-2, -8, -9) ativadas não conseguem degradar a matriz orgânica da dentina por causa do efeito tampão que a saliva exerce sobre o pH ácido, ou seja, a saliva acaba neutralizando logo em seguida o ambiente bucal e por isso não ocorre a degradação enzimática (Buzalaf et al., 2012). Contudo o processo erosivo é dinâmico, e cada vez que as fibrilas de colágeno são expostas, as MMPs ativadas degradam a matriz orgânica desmineralizada, e mesmo que o pH retorne a sua neutralidade, parte da estrutura dentinária foi perdida neste processo (Buzalaf et al., 2012).

É um processo contínuo e pode tornar-se irreversível, desta forma pesquisas têm sido realizadas sobre os agentes inibidores das MMPs para diminuir a perda de colágeno e conseqüentemente, da erosão dentária. Dentre os tipos de inibidores, tem-se a clorexidina, polifenóis do chá verde especialmente o galato de epigallocatequina (EGCG), soluções ou géis de FeSO_4 (Kato et al., 2010). O EGCG é um polifenol extraído do chá verde que possui forte atividade inibitória contra as MMP-2 (gelatinase-A), MMP-8 (colagenase-2) e MMP-9 (gelatinase-B) (Demeule et al., 2000; Bae et al., 2008). O mecanismo proposto para descrever o processo inibitório das MMPs está relacionado à capacidade do EGCG de se ligar às colagenases por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Esta ligação enzimática pode provocar certa alteração conformacional ou até mesmo ocultar o sítio catalítico (Madhan et al., 2007) inibindo desta forma a sua ativação.

Por ser um produto natural e sem efeitos colaterais, o EGCG tem sido testado sobre a erosão dentária em diferentes estados físicos e agregações moleculares para compreender seu mecanismo frente ao papel inibidor das MMPs. Na forma líquida de extrato de chá verde, estudos envolvendo o EGCG como bochechos (Magalhães et al., 2009b; Kato et al., 2009; Barbosa et al., 2011, Mirkarimi et al., 2012; De Moraes et al., 2016; Wang et al., 2018; Fialho et al., 2019) concluíram que este polifenol reduziu significativamente a desmineralização dentária causada por erosão química. Estes resultados promissores levaram as novas pesquisas a testarem o EGCG na forma de gel (Kato et al., 2010; Kato et al., 2012; Pini et al., 2019) visando aumentar o tempo de contato deste polifenol com a dentina, melhorar sua substantividade e principalmente, facilitar o tratamento clínico dos pacientes, pois não haveria necessidade de aplicar o produto várias vezes ao dia, como no caso das soluções com extrato de chá verde. Os resultados com EGCG em gel, também se apresentaram eficazes na redução da erosão dentária. Um estudo (Hannas et al., 2016) propôs utilizar este polifenol e testá-lo na forma de dentifrício para analisar seu efeito na redução da desmineralização dentária. Este estudo mostrou resultados semelhantes no que diz respeito ao efeito protetor do EGCG na erosão dentária.

Alguns biopolímeros, como a quitosana, também tem sido investigado não só pela vasta aplicabilidade dentro da Odontologia, mas também por estarem

associados a redução da erosão. A quitosana é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina que é obtida essencialmente de exoesqueletos de artrópodes. Por ser uma macromolécula não tóxica, sua estrutura química única apresenta-se em forma de um polícatión linear com alta densidade de carga e de grupos reativos, além de inúmeras ligações de hidrogênio que lhe conferem excelente propriedade de biocompatibilidade (Kumar, 2000). Dentre as suas propriedades biológicas, algumas se destacam mais por apresentarem maior relevância clínica dentro da prática odontológica, tais como: a capacidade antioxidante (Sun et al., 2007), antimicrobiana (Elsaka et al., 2012; Matica et al., 2017; Garcia-Godoy et al., 2018), inibição da formação de biofilmes (Choi et al., 2019; dos Santos et al., 2019; Khan et al., 2019; Junge et al., 2020), cicatrizante (Minagawa et al., 2007; Choi et al., 2019; Fang et al., 2019) e anti-inflamatória (Kim et al., 2006; Martin et al., 2019).

Além destas inúmeras propriedades, este biopolímero pode ser carregado positivamente em baixo pH (Claesson et al., 1992) e esta característica lhe confere a capacidade de formar uma camada aderida à dentina que pode protegê-la contra os ataques ácidos (Ganss et al., 2011). Esta camada é formada porque a quitosana possui um forte potencial zeta positivo que facilmente adsorve as superfícies com um forte potencial zeta negativo como a estrutura dentária (Weerkamp et al., 1988). Seu efeito protetor pode ser ainda mais consistente in vivo porque a quitosana pode se aderir a película adquirida (van der Mei et al., 2007; Sieber et al., 2019) e ainda formar múltiplas camadas na presença de mucina (Svensson et al., 2006; Sieber et al., 2019). Por causa destas características, a quitosana tem sido adicionada a vários agentes anti-erosivos com o intuito de aprimorar os materiais odontológicos para que se tornem mais eficazes no tratamento da erosão dentária. Um dos veículos utilizados é o dentifrício com ou sem o flúor (agente ativo) (Ganss et al., 2011) e/ou com ou sem estanho (Ganss et al., 2012; Schlueter et al., 2014; Lussi et al., 2015; Pini et al., 2019). A adição de quitosana nestes veículos demonstrou ser tão eficaz ou até melhor do que qualquer outro dentifrício fluoretado (controle) na redução da perda erosiva.

Outra opção promissora para a prevenção da desmineralização é a utilização fosfoproteínas derivadas do leite, como a caseína, que apresenta função

semelhante às proteínas responsáveis pela biomineralização dentária (Kucuk et al., 2016; Bajaj et al., 2016). Sob condições ácidas do ambiente bucal, o fosfopeptídeo de caseína expressa uma sequência específica que aumenta consideravelmente a solubilidade do fosfato de cálcio, responsável por liberar íons cálcio e fosfato (Cochrane, 2010; Chandak et al., 2016; Ebrahimi et al., 2017). O grande reservatório de cálcio dentro da placa atrasa a difusão de íons livres de cálcio e fornece uma fonte de cálcio para remineralização, além de restringir a perda de minerais durante um episódio acidogênicos (Chandak et al., 2016; Ebrahimi et al., 2017; Zhao et al., 2017). A incorporação de peptídeos de caseína na placa e saliva aumenta o conteúdo de cálcio e fosfato no esmalte, diminuindo sua desmineralização e melhorando o processo dinâmico de remineralização quando submetido a desafios erosivos na superfície dentária (Philip, 2019).

Apesar de ter obtido resultados promissores utilizando estes compostos, sabe-se que os produtos fluoretados ainda são os mais utilizados e frequentemente recomendados dentro da prática clínica. Por isso, existem diversas pesquisas desenvolvendo compostos fluoretados modificados para que possam apresentar propriedades superiores na prática clínica (Buyukyilmaz et al., 1997). Um exemplo deste composto é o verniz de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) que vem despertado grande interesse entre os pesquisadores, não só por apresentar na sua composição o flúor que atua no processo de remineralização dentária (Exterkate et al., 2007), mas também por possuir baixa solubilidade frente a um pH bucal ácido (Hals et al., 1981). Além disso, apresenta um pH neutro e é um composto fisiologicamente inerte de grande estabilidade (Nobrega et al., 2008).

Uma vez que o TiF_4 é aplicado na estrutura dentária, a reação deste composto com o oxigênio, presente no meio, provoca a liberação de alguns produtos secundários como o dióxido de titânio. Conseqüentemente, o dióxido de titânio acaba se precipitando na forma de uma película branca ácido resistente que se mantém adsorvida à superfície do elemento dentário (Buyukyilmaz et al., 1997). Mesmo em valores muito baixos de pH (1-2), o TiF_4 tem sua reatividade aumentada o que favorece a formação de ligações químicas do titânio e oxigênio com o grupo fosfato da estrutura dentária na formação da película de dióxido de titânio (Yu et al., 2012). Este verniz foi testado em alguns estudos (Magalhães et al., 2010; Levy et

al., 2014; Comar et al., 2015) e resultados positivos foram encontrados em relação a perda de mineral, ou seja, o TiF_4 possui grande capacidade de inibição da desmineralização dentária, podendo ser utilizado em pacientes com erosão dentária.

Desta forma, observa-se que atualmente existem diversos protocolos para o tratamento à erosão dentinária, tais como o uso de fluoretos, produtos a base de fosfato de cálcio, clorexidina entre outros, contudo ainda não há nenhum material capaz de paralisar e/ou prevenir o processo erosivo. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos para interceptar o processo de erosão dentinária.

Proposição —

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito de diferentes tratamentos sobre a dentina erodida para interceptação das consequências do processo erosivo promovido por ácido clorídrico na forma líquida e gasosa, associado ou não a abrasão. A análise foi realizada por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D, Tomografia de Coerência Óptica e Espectroscopia Micro Raman.

Material e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Este estudo foi fatorial 4 X 2, tendo como fatores analisados o *Tratamento Superficial* em quatro níveis: ausência de tratamento (G1); tratamento com gel de quitosana (G2); tratamento com hidrogel experimental (G3) e tratamento com verniz de TiF₄ (G4) e *Abrasão* em dois níveis: com e sem abrasão. O fator erosão realizado com ácido HCl na forma líquida e gasosa foi analisado individualmente em cada grupo.

As unidades experimentais utilizadas foram 400 fragmentos de dentina radicular obtidas de incisivos bovinos, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=60) de acordo com o tipo de tratamento, e subdivididos em 2 subgrupos (n=30) de acordo com o tipo de abrasão (com ou sem abrasão). Em cada grupo, metade dos espécimes foram submetidos ao processo erosivo com HCl líquido (n=15) e a outra metade ao processo erosivo com HCl gasoso (n=15).

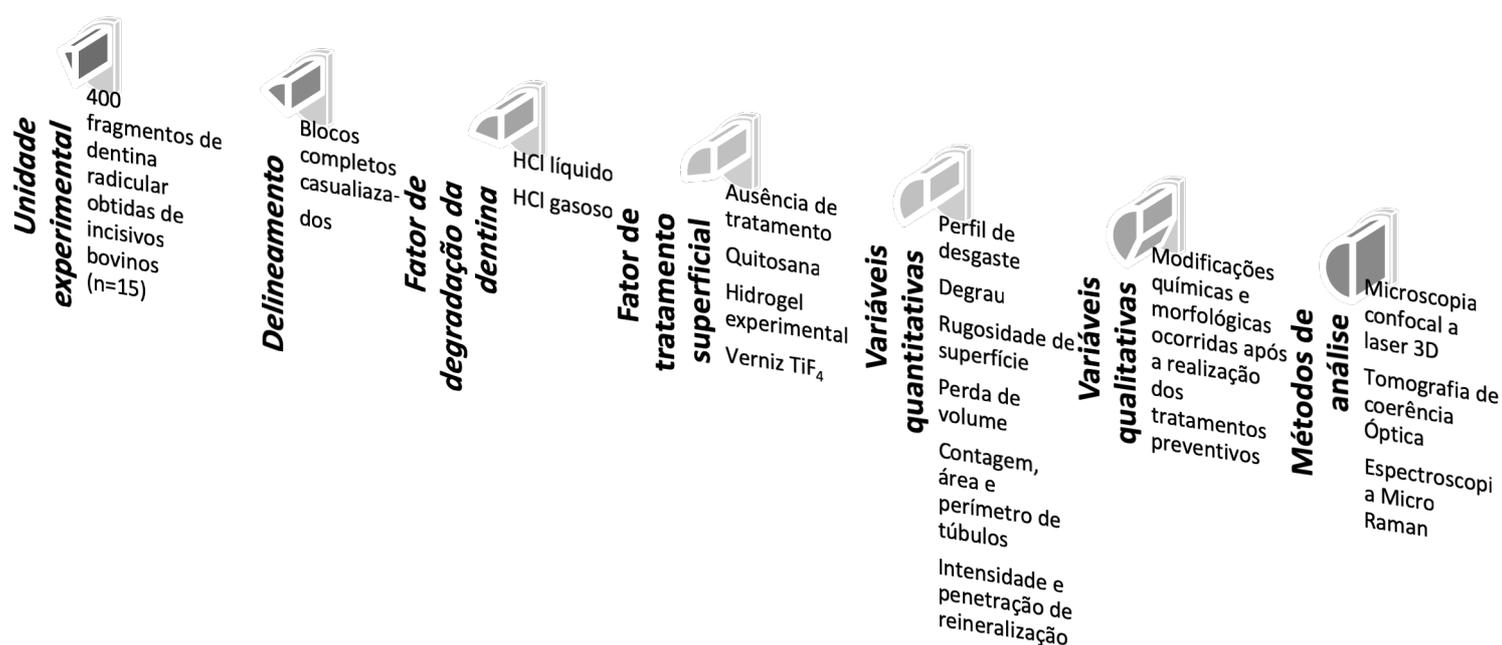
O estudo foi realizado de acordo com o delineamento em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta quantitativa foram o perfil de desgaste, degrau, perda de volume, rugosidade de superfície, contagem do número/área/perímetro dos túbulos dentinários por meio da microscopia confocal a laser 3D e a intensidade do brilho adimensional e profundidade da remineralização pela tomografia de coerência óptica (n=5). As alterações químicas da superfície da dentina foram avaliadas qualitativamente por espectroscopia Micro Raman (n=5) (Figura 1).

Seleção da Amostra

Para obtenção dos espécimes (Figura 2), foram selecionados incisivos bovinos íntegros armazenados, previamente, em solução de formol a 2% com pH 7,0. Os dentes com presença de trincas, manchas hipoplásicas ou acentuado desgaste foram descartados. Após a limpeza adequada dos espécimes, os incisivos bovinos foram fixados com cera escultura (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil) em uma placa de acrílico para serem

levados posteriormente a uma máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, USA) para separar a coroa da raiz com um disco diamantado (Buehler®, Diamond Wafering Blade, Serie 15HC Diamond, Arbon Size ½ - 12,7cm, 10cm x 0,3mm) refrigerado por água. A secção foi realizada na junção amelocementária para obter fragmentos de dentina radicular com dimensões de 3 x 3 x 2 mm da região cervical da raiz dos incisivos bovinos.

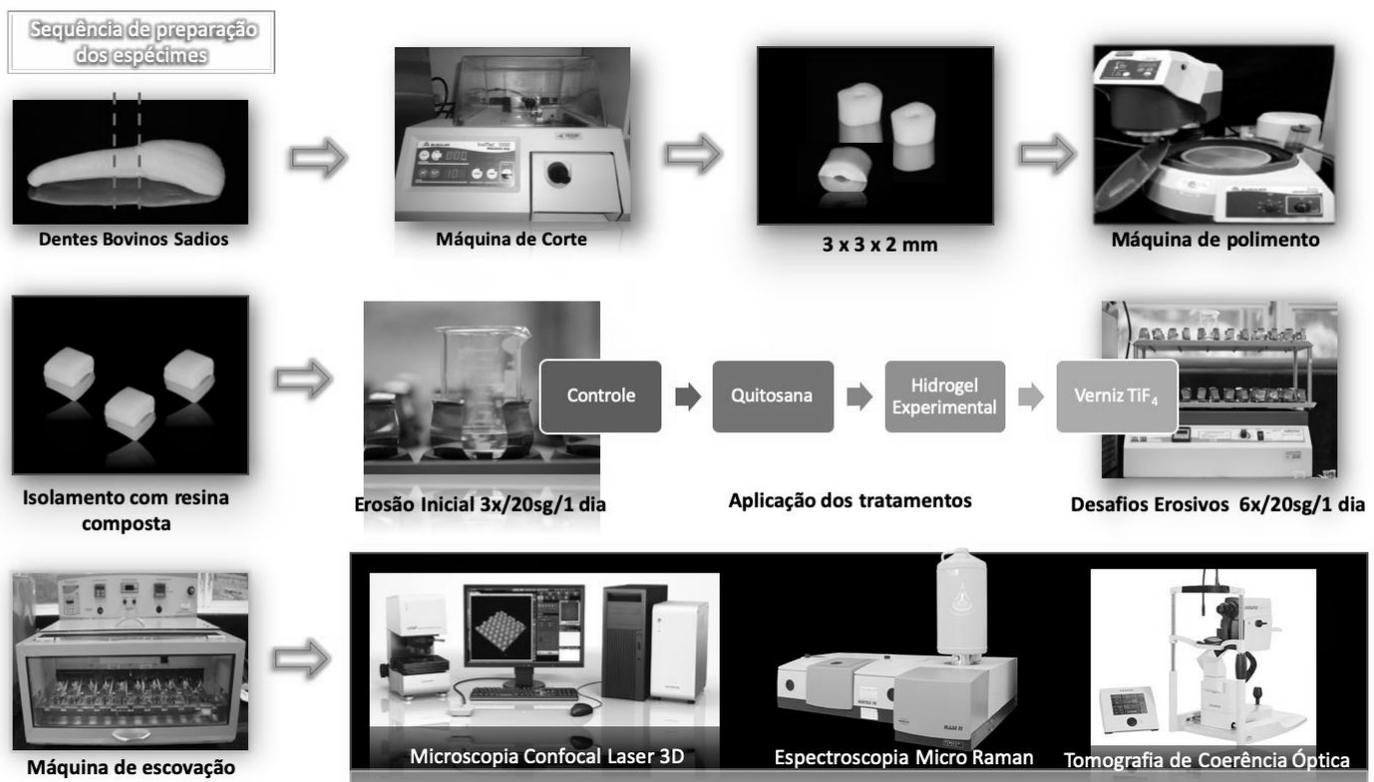
Figura 1. Delineamento representativo deste estudo.



Fonte: Delineamento fornecido pelo autor deste trabalho.

Em seguida, os fragmentos de dentina foram fixados em cilindros de resina acrílica para a realização da planificação e remoção do cemento radicular com lixa de óxido de alumínio de granulação #600 e #1200 (Norton Abrasivos Ltda, São Paulo, Brasil) com o auxílio da politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Ao final da planificação e remoção do cemento, os espécimes foram imersos em água deionizada, sob ação do ultrassom (Ultrasonic Cleaner T-1449-D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 5 minutos para lavagem e remoção de resíduos.

Figura 2. Esquema da sequência preparatória dos espécimes neste estudo.



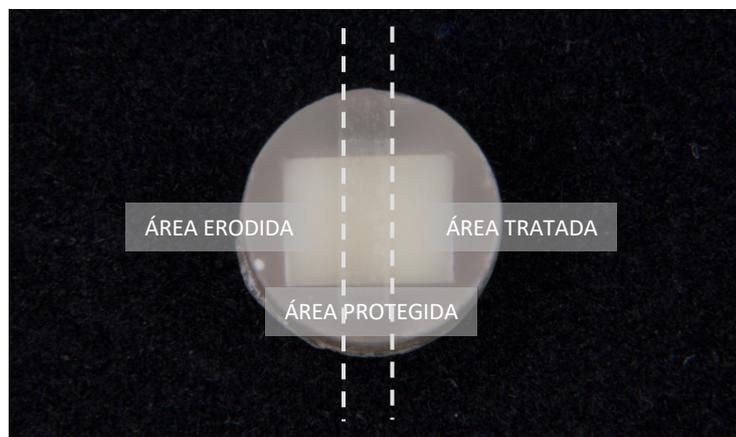
Fonte: Esquema fornecido pelo autor deste trabalho.

Impermeabilização dos Espécimes

Para o processo de impermeabilização dos fragmentos de dentina radicular utilizou-se a resina composta (Filtek™ Z350, cor A1, 3M ESPE, USA) sem a aplicação de sistema adesivo (Figura 3). Neste procedimento foi utilizada uma matriz confeccionada para padronizar o formato da resina que envolve o fragmento de dentina em todas as amostras. A polimerização da resina composta foi efetuada por meio do fotopolimerizador Poly Wireless (Kavo, Joinville, Santa Catarina, Brasil) com 1100 mW/cm² por 20 segundos (Faraoni *et al.*, 2018).

A impermeabilização foi efetuada com o intuito de proteger todas as faces do fragmento com resina composta durante o desafio erosivo, exceto uma parte da face externa (3 mm) que permaneceu sem resina. A parte central desta face foi coberta com resina composta para ser utilizada posteriormente como referência de dentina hígida (1 mm).

Figura 3. Esquema de preparação da amostra.



Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

Erosão inicial e Seleção dos Fragmentos

Inicialmente os espécimes foram armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) por 2 horas a 37 °C, em seguida estes espécimes foram submersos individualmente em 5 ml de ácido clorídrico (HCl) líquido (pH 1,2; 0,1 Molar) em uma concentração de 0,3 % a 37 °C pelo tempo de 20 segundos, sob agitação de 40 rpm em mesa agitadora (Orbital CT-155, Cientec Equipamentos, São Paulo, Brasil). Foram realizadas 3 exposições em ácido clorídrico líquido, e entre cada exposição, os espécimes foram armazenados em saliva artificial a 37 °C pelo período de 1 hora (Faraoni *et al.*, 2018). A quantidade de saliva artificial utilizada foi de 5 ml para cada espécime.

Análise Inicial

Após o ciclo de erosão inicial, os espécimes foram armazenados em saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) a 37 °C por 12 horas para posteriormente serem realizadas análises morfológicas da superfície em microscópio confocal a laser 3D (LEXT OLS4000, Olympus, Tóquio, Japão). Para cada espécime foram capturadas duas imagens em uma área central

padronizada que compõe o *baseline*. Os espécimes que apresentarem trincas, malformações na superfície ou túbulos dentinários obliterados foram substituídos.

Após a seleção dos espécimes, estes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (n=60) de acordo com o tratamento a ser realizado. Para a tomografia de coerência óptica (n=5) e Micro Raman (n=5) foram realizadas leituras após a aplicação do tratamento.

Após a seleção de 240 espécimes, os mesmos foram aleatoriamente divididos entre os diferentes grupos experimentais, conforme descrito abaixo:

Grupos Experimentais

- **G1:** grupo controle;
- **G2:** hidrogel de quitosana;
- **G3:** hidrogel experimental;
- **G4:** verniz à base de 4% TiF₄.

Subgrupos Experimentais

- **A:** com abrasão;
- **SA:** sem abrasão.

Tratamentos Superficiais

Os espécimes foram tratados de acordo com os seus subgrupos da seguinte maneira:

- **Grupo 1:** Grupo controle (sem aplicação de tratamento)

Ausência de tratamento.

- **Grupo 2:** Aplicação do hidrogel de quitosana

A quitosana 1,5% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em hidrogel foi aplicada nos espécimes experimentais com o auxílio de um *microbrush* ativamente por 10

segundos e mantido sobre o espécime em uma fina camada de gel até completar o período de 4 minutos. Em seguida o gel foi cuidadosamente removido com cotonete.

- **Grupo 3:** Aplicação do hidrogel experimental (sigilo Patente submetida)

O hidrogel experimental foi aplicado nos espécimes experimentais com o auxílio de um *microbrush* ativamente por 10 segundos e mantido sobre o espécime em uma fina camada de gel até completar o período de 4 minutos. Em seguida o gel foi cuidadosamente removido com cotonete.

- **Grupo 4:** Aplicação de verniz de TiF₄

Verniz de TiF₄ (FGM/Dentscare, Brasil): Os espécimes experimentais receberam a aplicação de uma camada de aproximadamente 2 mm de verniz com o auxílio de um *microbrush*. Após o tempo de secagem de 1 minuto, os espécimes foram imersos em saliva artificial por 6 horas. O verniz foi cuidadosamente removido antes da sua mensuração pela microscopia confocal a laser 3D.

No final destes tratamentos, todas as amostras foram mantidas em saliva artificial a 37 °C. A seguir, as amostras de todos os grupos foram divididas em dois subgrupos de acordo com a presença de abrasão (com ou sem) e subdivididos de acordo com o tipo de desafio erosivo.

Desafios Erosivos

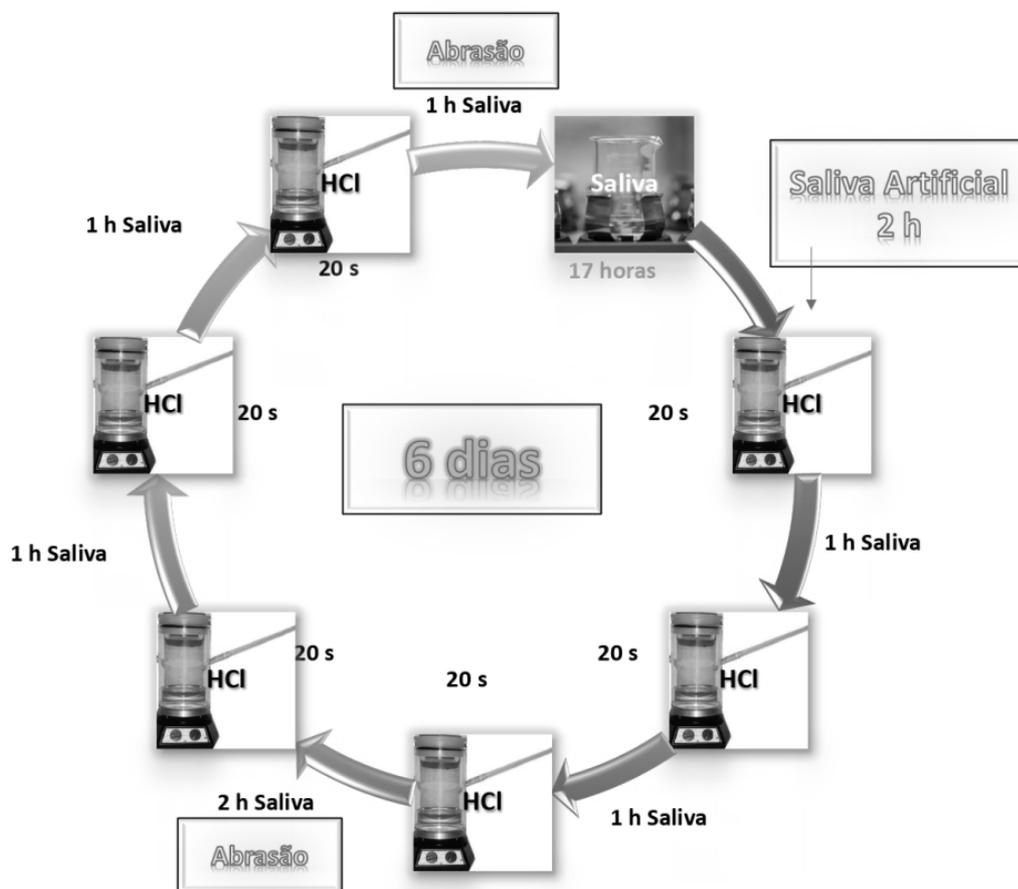
Os espécimes foram individualmente armazenados em 5 ml de saliva artificial a 37 °C por 2 horas e depois cada grupo foi exposto aos desafios erosivos (HCl na forma líquida ou gasosa) associado ou não ao fator abrasão (com ou sem abrasão) (Faraoni *et al.*, 2018).

Ciclo Erosivo

- **HCl na forma líquida:** Para a erosão da dentina com ácido clorídrico (HCl) na forma líquida, os espécimes foram individualmente expostos a

HCl (pH 1,2) a 37 °C no período de 20 segundos em 1 ATM de pressão atmosférica. A exposição dos espécimes ao gás de HCl foi realizada por meio de um dispositivo que controla a temperatura do gás de HCl. Para produzir o gás, foi aquecido 500 ml de solução de HCl com concentração de 15,84 % (Derceli, 2014). A solução foi aquecida e o pH foi controlado com auxílio de uma fita de papel indicador pH Acilit® (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemanha). A exposição foi realizada 6 vezes ao dia, durante 6 dias, e a solução de HCl foi trocada diariamente para garantir as condições ideais do gás. Após a exposição ao ácido, os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial a 37 °C pelo intervalo de 1 hora, entre cada exposição, e de um dia a outro ao final de cada ciclo de degradação (Faraoni *et al.*, 2018), sendo a saliva trocada diariamente para mimetizar o ambiente bucal (Figura 4).

Figura 5. Esquema dos desafios erosivos em HCl gasoso.



Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

Erosão associada à abrasão

Metade dos espécimes foram submetidos ao processo de abrasão, que foi realizada com escovas dentárias (Oral-B, São Paulo, Brasil) de cabeça pequena e cerdas macias, as quais simularam a técnica rotacional de escovação. As escovas foram colocadas em um dispositivo para padronizar a posição e altura da escova em relação ao fragmento. Após posicionar os espécimes perpendicularmente às cerdas da escova dental, 0,5 ml de gel dental (Cocoricó, Bitufo, São Paulo, Brasil) (sem flúor e com sílica abrasiva) foi colocado entre cada fragmento e a escova dental (previamente umedecida com água deionizada). Durante a escovação foi aplicada uma força de 200 gf com peso colocado sobre a cabeça da escova. Foram realizadas 2 escovações por dia, durante 20 segundos, sendo os espécimes escovados a cada 3 exposições ao ácido HCl. Após a escovação, os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) a 37°C pelo intervalo de 1 hora, após a primeira escovação, e de um dia a outro após a segunda escovação (Faraoni *et al.*, 2018), sendo a saliva trocada diariamente.

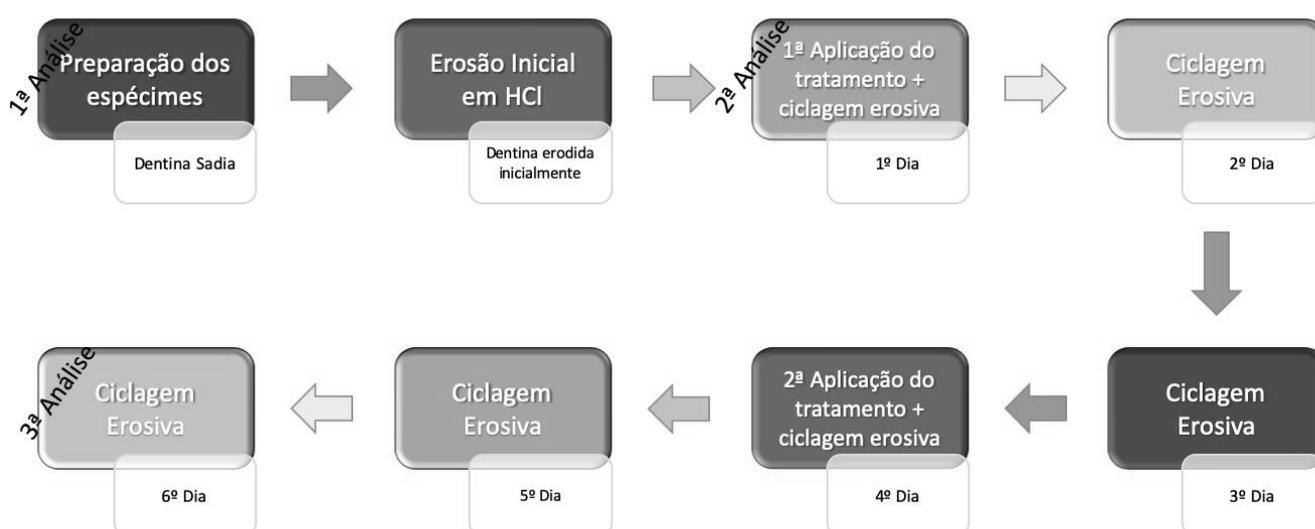
A escovação foi realizada entre a 3^o e a 4^o exposição ao HCl, com intervalo de 1 hora entre os desafios e após a 6^o exposição ao HCl e 1 hora na saliva. Para os grupos sem escovação, o intervalo foi de 2 horas entre a 3^o e a 4^o exposição ao HCl para manter o mesmo tempo de intervalo (Faraoni *et al.*, 2018). Para realizar as análises, a resina composta colocada sobre a dentina hígida (referência) foi removida delicadamente. Em seguida, foi realizada a limpeza dos espécimes com ultrassom (Ultrasonic Cleaner T – 1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 5 minutos, e então os espécimes foram lavados com água deionizada. Os tratamentos foram repetidos 2 vezes durante todo o processo erosivo, sendo 1 antes da ciclagem erosiva e outra no início do 4^o dia de ciclagem (Figura 5).

Análises Realizadas

Microscopia Confocal a Laser 3D

Após os desafios erosivos/abrasivos em HCl líquido/gasoso e tratamentos preventivos, a resina composta isolante foi removida delicadamente com auxílio de um alicate expondo a área referêcia. O fragmento foi posicionado sobre a mesa do microscópio confocal a laser 3D (LEXT OLS4000®, Olympus, Tokyo, Japão) no qual foram capturadas as imagens através de um laser semiconductor ($\lambda = 405 \text{ nm}$) presente no microscópio. As imagens foram analisadas por meio de software OLS 4000. As áreas mais re-

Figura 6. Sequência de análises realizadas.



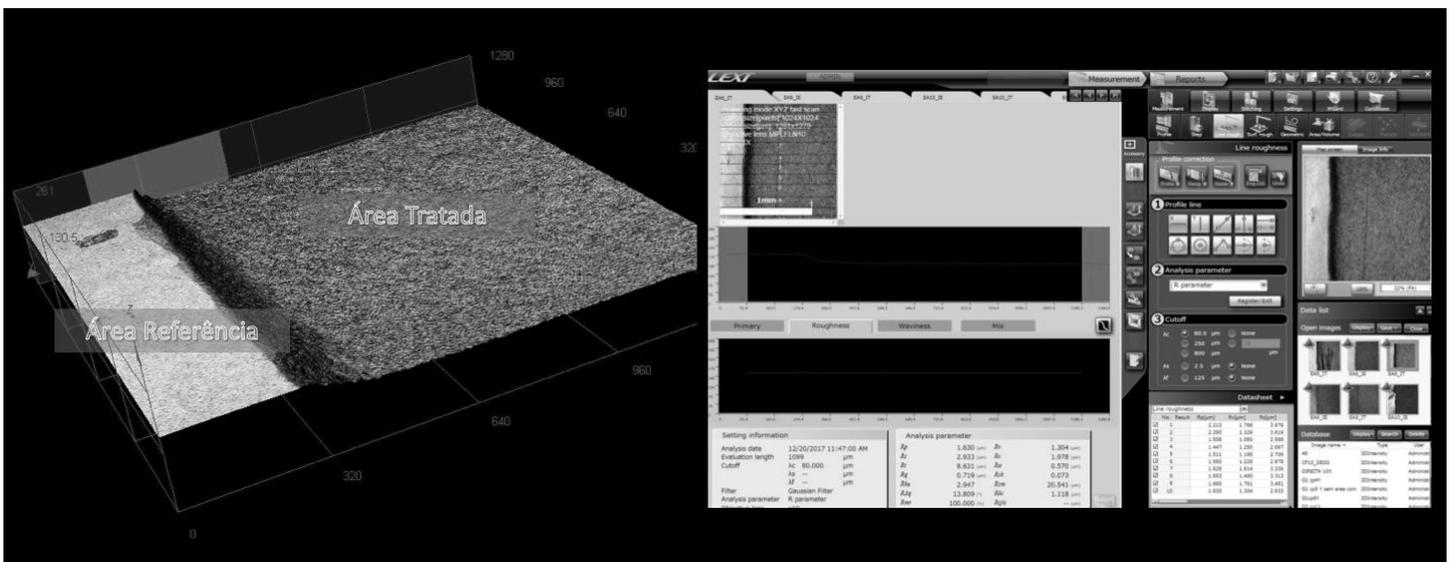
Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

presentativas foram gravadas por meio de zoom óptico. Após a aquisição das imagens, estas foram analisadas quanto ao perfil de desgaste, degrau, perda de volume, rugosidade de superfície e contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários.

- Para a análise do perfil de desgaste foram realizadas leituras englobando a área hígida (referência) e a área erodida. O perfil de desgaste foi determinado pela distância em micrômetros entre a linha média do gráfico e a linha de desgaste (área erodida).

○ Para a análise da perda de volume foi traçado um plano baseado na área hígida (referência) e toda a estrutura perdida abaixo desse plano foi calculada em μm^3 . Esta análise determina a quantidade de tecido mineralizado perdido durante os processos erosivos ou erosivos/abrasivos. Para manter a mesma proporção para todos os espécimes empregou-se a razão do volume de estrutura perdida (μm^3) pela área (μm^2) de dentina degradada.

Figura 7. Figura representativa da análise do perfil de desgaste (μm) realizada.

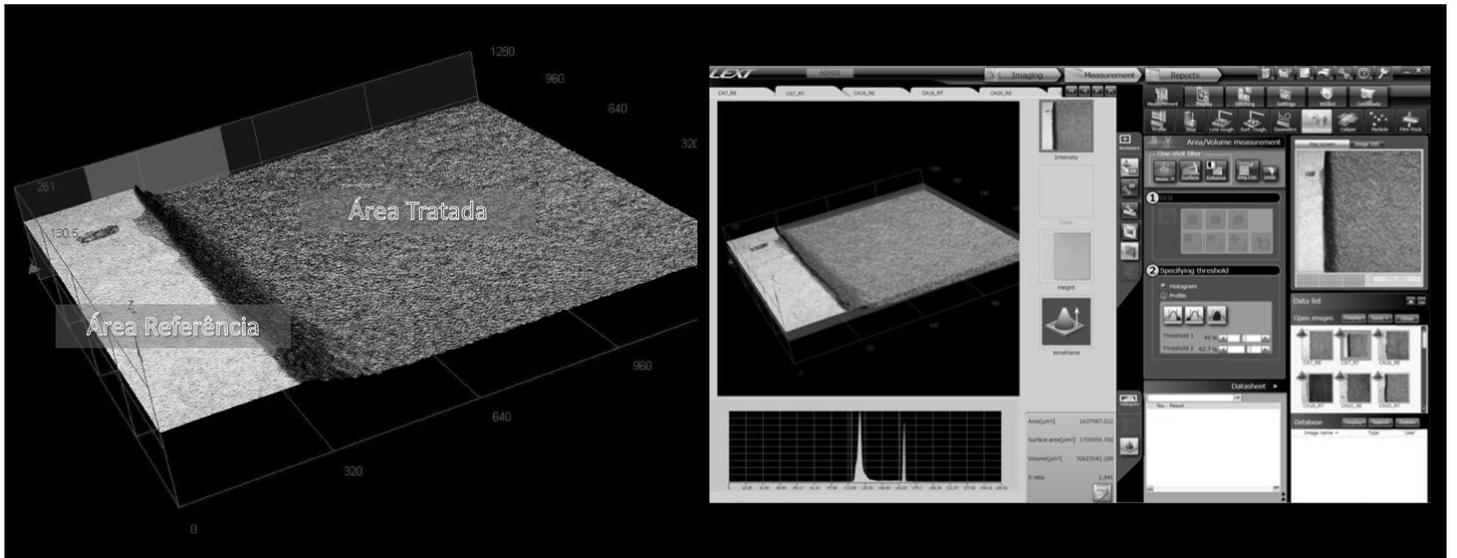


Área Referência: corresponde a dentina sadia protegida por resina composta. **Área Tratada:** corresponde a região da dentina submetida aos ciclos erosivos e aplicações dos tratamentos (107x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

○ Para a análise do degrau, foram realizadas leituras desde a borda da área hígida (referência) até o ponto mais baixo da área erodida (altura μm). Essa mensuração determina o degrau formado pelo substrato dentinário bem como o volume perdido.

○ Para a análise de rugosidade, foram realizadas leituras na área hígida (referência) e leituras na área erodida (μm). Esta análise determina se os tratamentos promoveram distintos padrões de texturas na superfície.

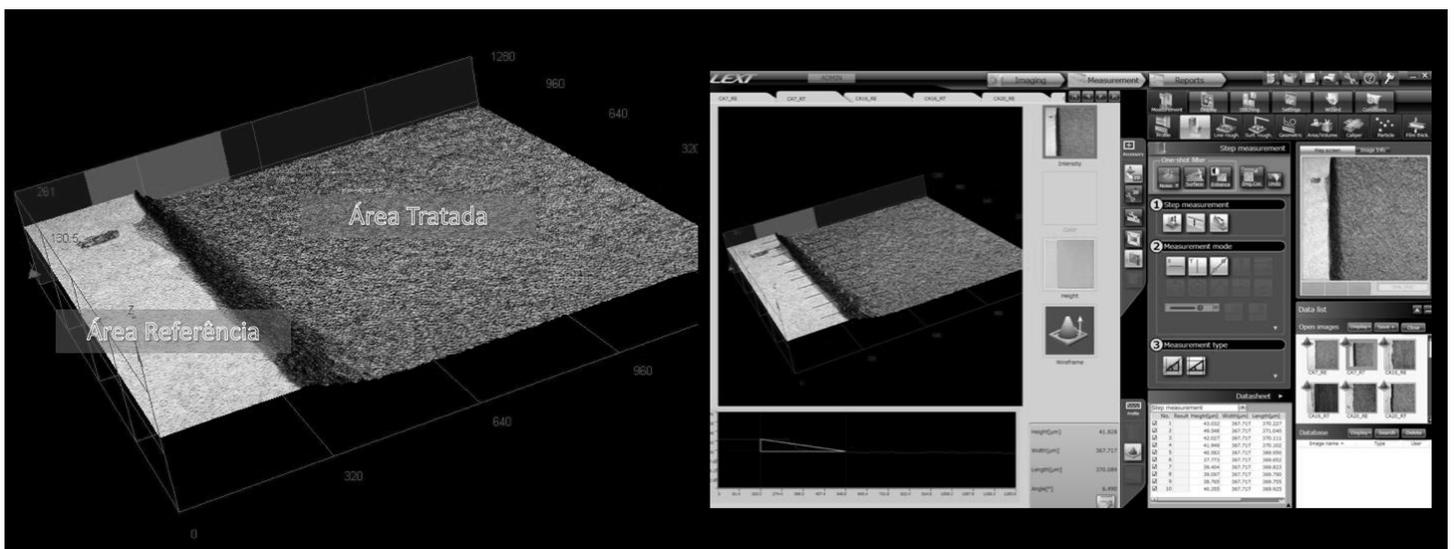
Figura 8. Figura representativa da análise de perda de volume (μm^3) realizada.



dos tratamentos (107x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

○ Para as análises de contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários, realizou-se a captação das imagens com objetiva de 100x em uma região padronizada na dentina inicialmente erodida e após a aplicação do tratamento. Estas análises determinaram a morfologia da superfície dentinária, se os tratamentos promoveram o fechamento de túbulos ou diminuição do perímetro e volume dos túbulos dentinários.

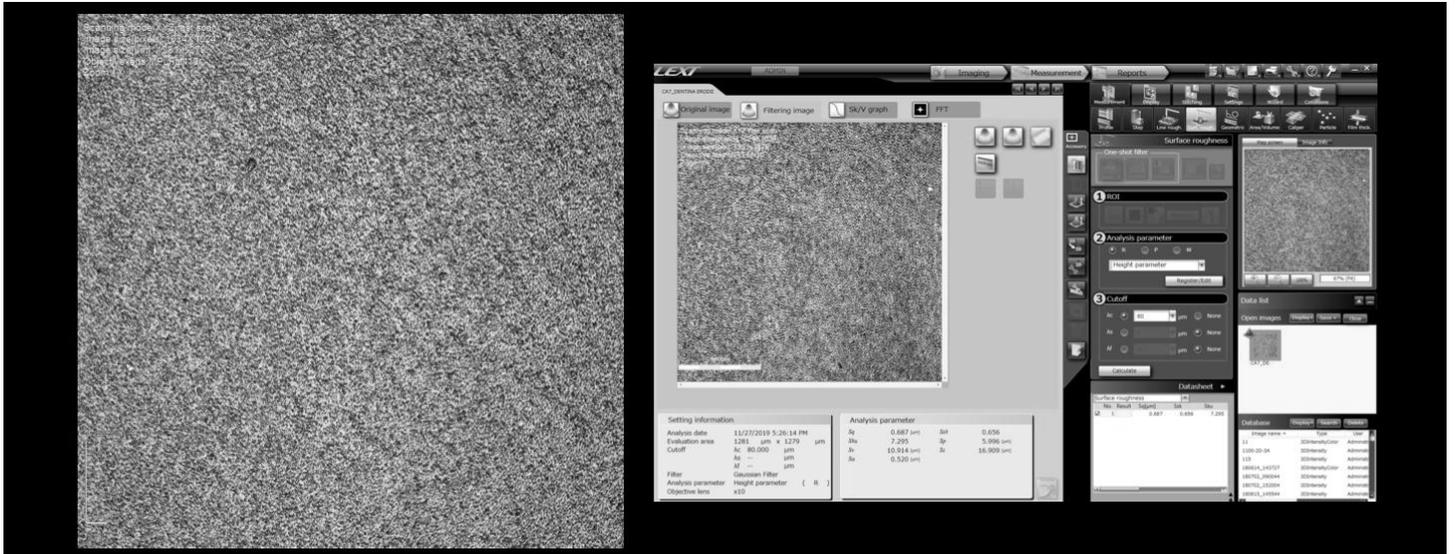
Figura 9. Figura representativa da análise de degrau (μm) realizada.



Área Referência: corresponde a dentina sadia protegida por resina composta.

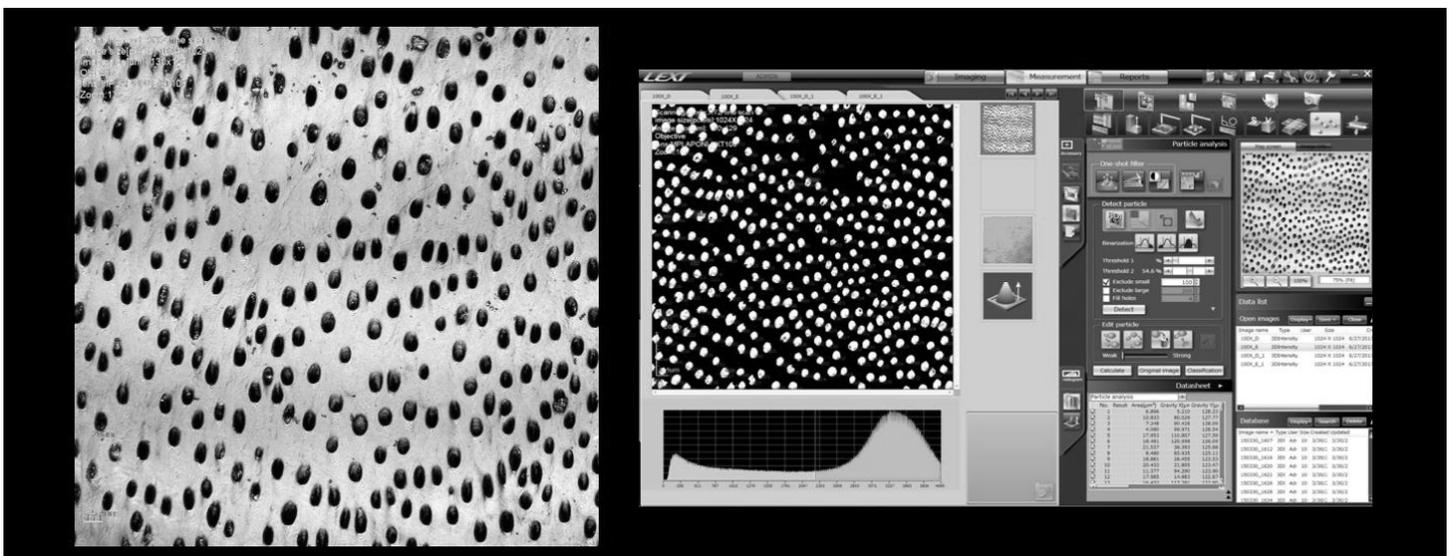
Área Tratada: corresponde a região da dentina submetida aos ciclos erosivos e aplicações dos tratamentos (107x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

Figura 10. Figura representativa da análise de rugosidade (Sa) realizada.



Área Tratada: Análise de rugosidade da superfície da dentina submetida aos ciclos erosivos e aplicações de tratamentos. Fonte: foto fornecida pelo autor.

Figura 11. Figura representativa da análise de rugosidade (Sa) realizada.



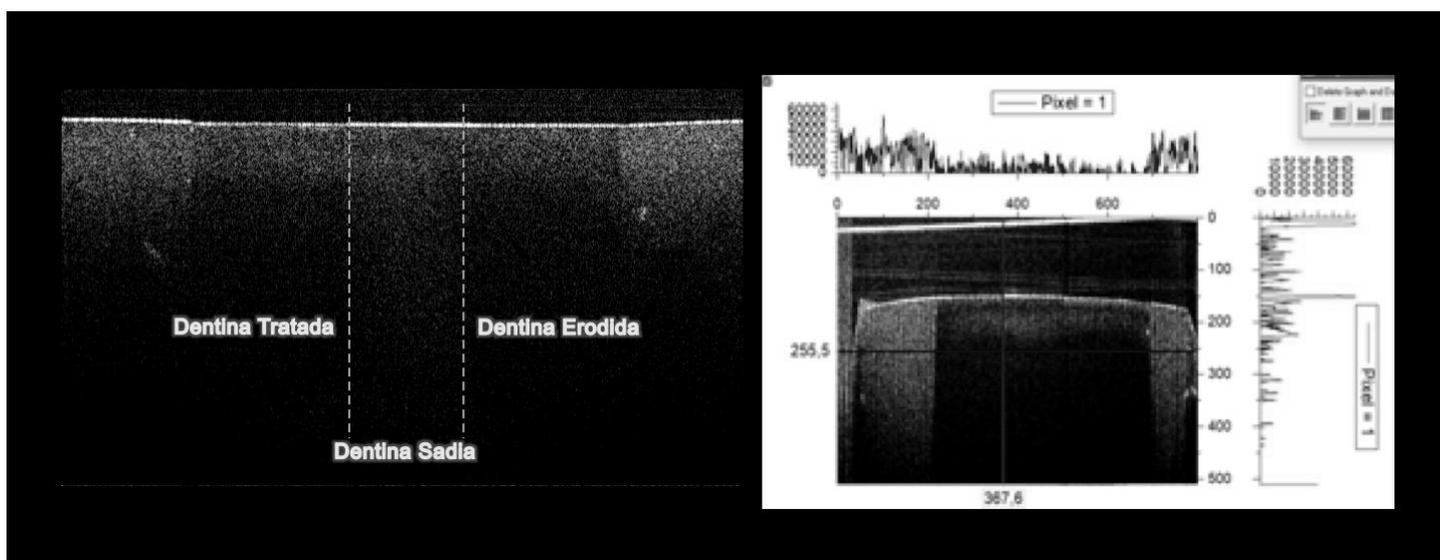
Área Tratada: Mensuração do número, perímetro e volume dos túbulos dentinários adquiridos pelo Software Olympus LEXT OLS4000® para análise superficial em Microscopia Confocal a Laser 3D (2132x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

Tomografia de coerência óptica (OCT)

Foram realizadas análises em 5 espécimes de cada grupo (n=5). A medição da profundidade e área de remineralização após o processo erosivo/abrasivo, bem como o coeficiente de atenuação óptica, foi realizado utilizando um sistema de tomografia de coerência óptica (OCT - OCP930SR, Thorlabs Inc., Newton, NJ, EUA), com 2 mW de potência óptica, comprimento de onda central de 930 nm, largura de banda espectral de 100 nm, resolução axial de 4,0 μm e lateral de 6,0 μm .

O posicionamento de cada linha de varredura foi padronizado e mantido durante todos os experimentos. As imagens tomográficas obtidas (B-scan) foram analisadas pelo software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA), que permite definir uma região de interesse, bem como a área e a profundidade das lesões. A média do coeficiente de atenuação óptica de cada B-scan foi analisada usando um algoritmo desenvolvido em LabView 8 (National Instruments, Austin, TX, EUA), no qual foi utilizada uma equação semelhante à lei de Beer-Lambert para calcular o coeficiente de atenuação óptica. a intensidade da luz retrodifundida em função da profundidade da amostra (Cara *et al.*, 2014).

Figura 12. Figura representativa na análise de intensidade e profundidade de remineralização dentária.



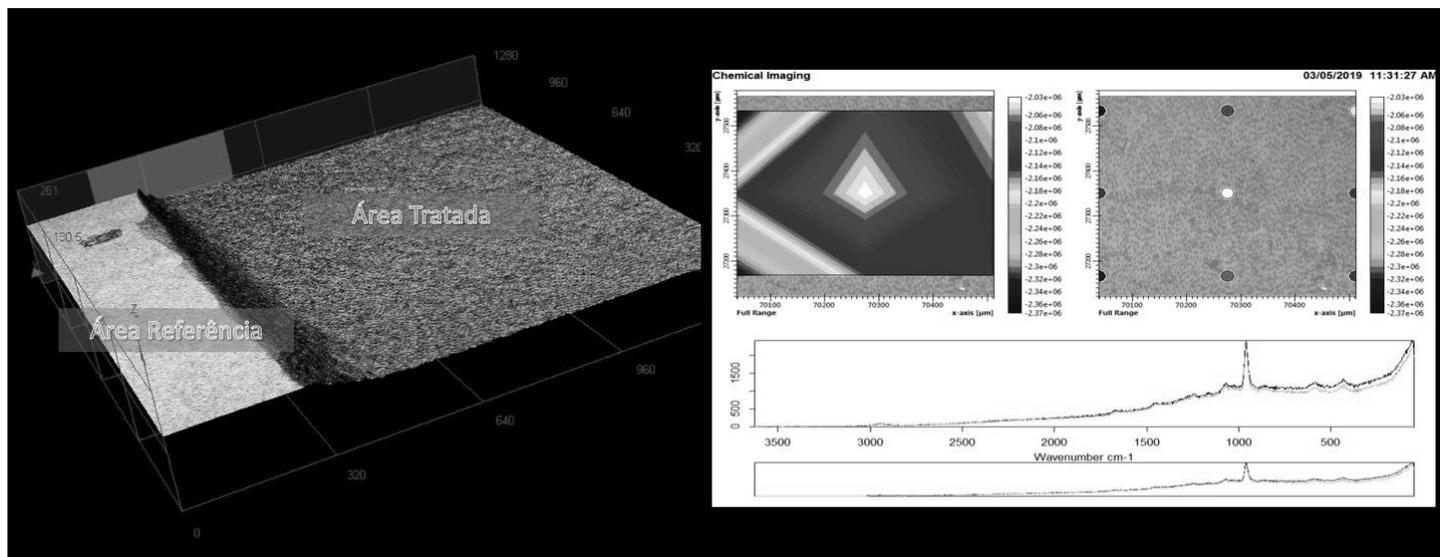
Espécime dividido em: dentina tratada, dentina sadia e dentina inicialmente erodida.

Fonte: foto fornecida pelo autor.

Análises na Espectroscopia Micro Raman

As medições foram realizadas em temperatura ambiente por meio de um microscópio Raman dispersivo SENTERRA II (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha). O espectro Raman foi medido com um sistema micro Raman com uma fonte de laser 785 nm e foi registrado de 400 a 2000 cm^{-1} , com 25 mW e objetiva de 10x com o aumento final de 100x. Os espectros foram adquiridos em posições correspondentes a intervalos de 0,5 μm na interface entre a área de controle e a área tratada, usando o estágio x-y-z controlado por computador com uma largura de passo mínima de 50 nm. Os espectros Raman foram coletados ao longo de três varreduras de linha para cada amostra de 20 μm de comprimento, com espaço de 10 μm entre as linhas.

Figura 13. Figura representativa da análise das ligações químicas dos espécimes.



Mensuração das ligações químicas por meio da espectroscopia Micro Raman. Fonte: foto fornecida pelo autor.

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise em MEV, transformamos o hidrogel experimental em membrana e testamos sobre os espécimes (n=15) seguindo o mesmo modelo de

ciclo erosivo deste estudo. Após o ciclo erosivo, a dentina foi imersa em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de sódio por 12 horas a 0,1M com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) em temperatura de 4°C. Seguida de lavagem com água deionizada, por 1 hora. A desidratação dos espécimes ocorreu por meio da embebição dos mesmos em diferentes concentrações de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil) por um período pré-determinado (25% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 75% por 20 minutos, 90% por 30 minutos e 100% por 1 hora). Imersão em solução de HMDS (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos, seguida de secagem com papel absorvente.

A fixação dos espécimes em stubs foi realizada por meio de fita adesiva de carbono dupla-face (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA) e cobertura com carbono em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, FL9496, Balzers, Liechtenstein). As morfologias e localizações dos precipitados foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM; Sirion 200, FEI Co, EUA), as margens (diferentes aumentos) foram realizadas para análise visual da superfície da dentina.

Análise de dados

Para a análise quantitativa (degrau, perda de volume, perfil de desgaste, rugosidade, contagem, área e perímetro dos túbulos dentinários, intensidade e profundidade de remineralização) foi realizada a distribuição dos dados que apresentaram-se normais e homogêneos, em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois critérios e teste de Tukey para diferenciação das médias com nível de significância de $\alpha=5\%$. Para a análise qualitativa (ligações químicas e morfológicas) foi realizada a análise descritiva dos dados. O software SPSS Statistics 17 foi empregado para a avaliação dos espécimes.

Resultados

4. RESULTADOS

Foi realizada a análise comparativa do processo erosivo com ácido HCl líquido e gasoso e observou-se que para o perfil de desgaste, perda de volume e degrau houve diferença significativa entre os desafios erosivos do HCl na forma líquida e gasosa. Desta forma, optou-se por realizar a análise individual em cada grupo.

Ácido clorídrico gasoso

Perfil de Desgaste

Para a análise de perfil de desgaste, no *fator tratamento* o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p=0,97$) e verniz TiF_4 ($p=0,99$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p<0,001$). O grupo experimental apresentou menor perfil de desgaste e foi estatisticamente diferente dos outros grupos ($p<0,001$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p<0,001$). Na Tabela 1, observou-se que todos os subgrupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p<0,05$), com exceção do grupo experimental que foi semelhante nas duas situações ($p>0,05$). Para os espécimes sem abrasão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$). Contudo, para a abrasão, o grupo experimental foi estatisticamente diferente do verniz ($p<0,05$) e semelhante aos outros grupos ($p>0,05$).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores de perfil de desgaste (μm) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
	Controle	0,57±0,33 ABa	0,19±0,06 Ab

HCl Líquido	Quitosana	0,56±0,34 ABa	0,13±0,14 Ab
	Experimental	0,25±0,17 Ba	0,03±0,19 Ab
	Verniz TiF₄	0,62±0,58 Aa	0,10±0,16 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Perda de volume

Para a análise de perda de volume, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p>0,05$) ($p=0,13$), porém apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao grupo experimental e o verniz ($p<0,001$). O grupo experimental foi semelhante ao verniz ($p>0,05$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p<0,001$). Na Tabela 2, observou-se que todos os subgrupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p<0,05$). Para os subgrupos sem abrasão não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Contudo, para os espécimes com abrasão, o grupo experimental foi estatisticamente diferente do controle e quitosana ($p>0,05$), e semelhante ao verniz ($p>0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de perda de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	3,08E7±7,78E6 Aa	9,70E6±3,69E6 Ab
	Quitosana	2,73E7±7,13E6 ABa	5,88E6±4,25E6 Ab
	Experimental	1,693E7±8,70E6 Ca	2,80E6±6,32E6 Ab
	Verniz TiF₄	2,079E7±8,36E6 BCa	3,71E6±2,81E6 Ab

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

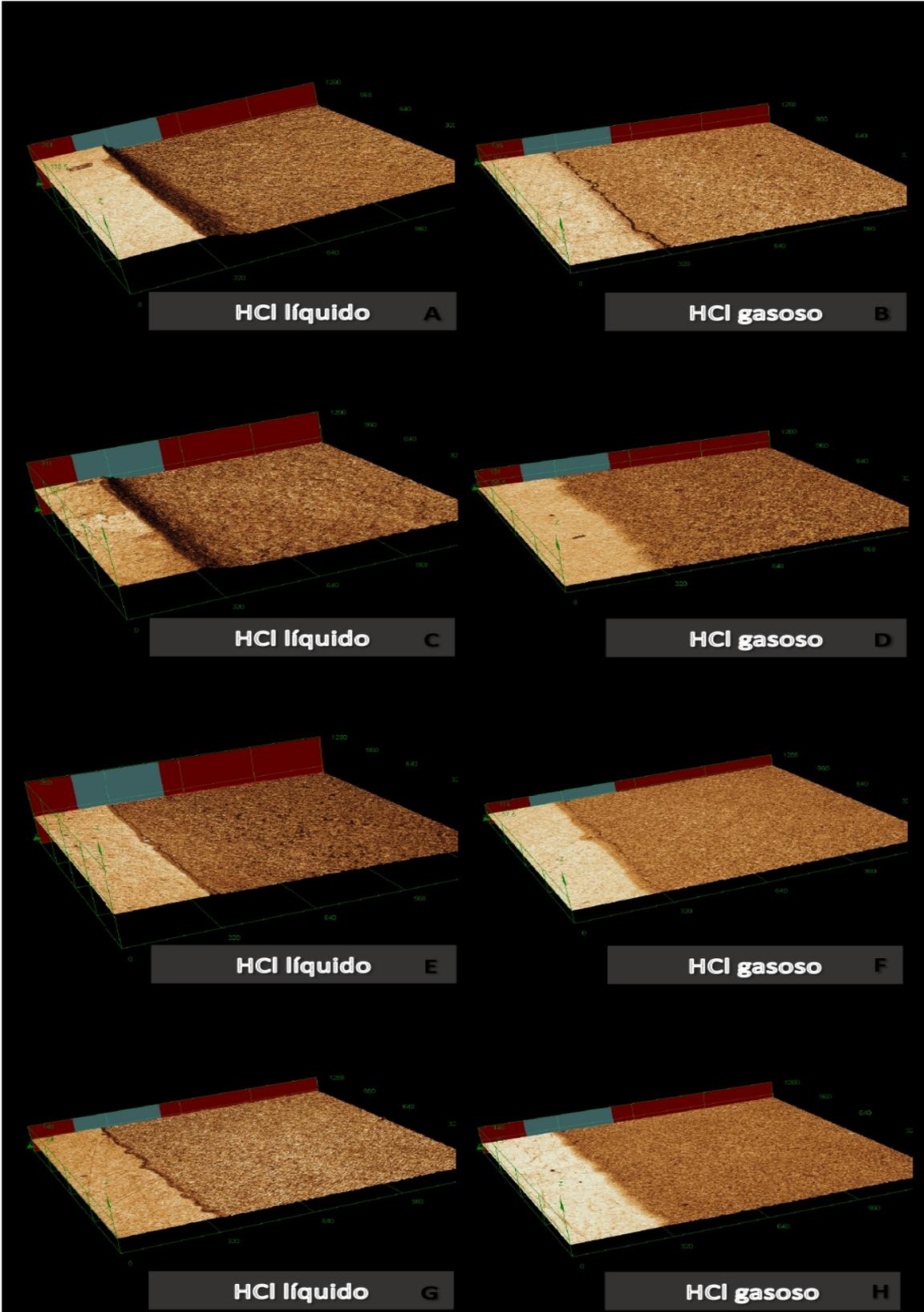


Figura 14. Análise do perfil de desgaste, perda de volume, degrau por Microscopia Confocal a Laser 3D. A) Grupo controle (sem tratamento) tratado com HCl líquido e gasoso; B) Grupo hidrogel de quitosana tratado com HCl líquido e gasoso; C) Grupo hidrogel experimental tratado com HCl líquido e gasoso; D) Grupo verniz de TiF_4 tratado com HCl líquido e gasoso.

Na Figura 14, observa-se que o processo erosivo com HCl líquido promoveu a perda de estrutura dentinária mais intensamente do que para o processo erosivo com HCl gasoso.

Degrau

Para a análise de degrau, observou-se que no *fator tratamento* o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos experimental ($p < 0,001$) e verniz ($p = 0,001$). A quitosana apresentou um comportamento semelhante ao grupo controle ($p = 0,77$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão apresentou menor degrau e foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p < 0,001$). Na Tabela 3, observou-se que todos os subgrupos apresentaram o degrau maior quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p < 0,05$). O grupo controle foi semelhante a quitosana ($p > 0,05$) e diferente dos grupos experimental e verniz ($p < 0,05$) que foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de degrau (μm) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	38,87±6,78 Aa	23,86±5,82 Ab
	Quitosana	36,13±5,36 Aa	23,07±3,89 Ab
	Experimental	22,55±5,00 Ba	7,54±5,39 Bb
	Verniz TiF_4	25,53±14,96 Ba	10,39±1,88 Bb

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0.05$).

Rugosidade

Para a análise de rugosidade, o *fator tratamento* não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,005$) entre os grupos, sendo observado o mesmo comportamento para o *fator abrasão*, no qual não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,005$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores de rugosidade da superfície ($Sa-\mu\text{m}$) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	0,67±0,22 Aa	0,57±0,10 Aa
	Quitosana	0,67±0,24 Aa	0,70±0,16 Aa
	Experimental	0,64±0,09 Aa	0,65±0,10 Aa
	Verniz TiF₄	0,64±0,14 Aa	0,62±0,13 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0.05$).

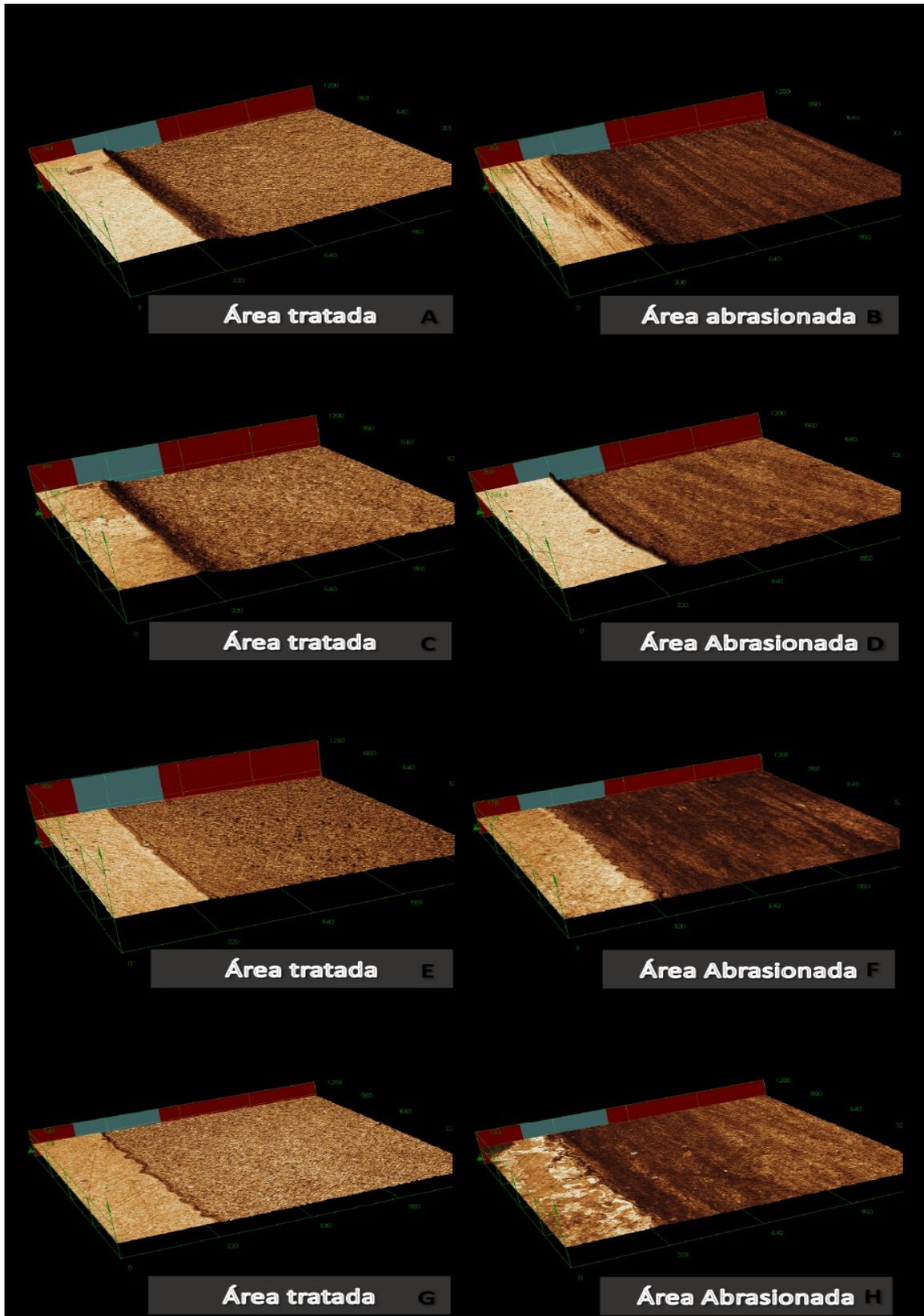


Figura 15. Análise do perfil de desgaste, perda de volume e degrau formado por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D. Interface entre a área referência e dentina após ciclo erosivo e interface entre a área referência e dentina com abrasão. A/B) Grupo

controle; C/D) Grupo hidrogel de quitosana. E/F) Grupo hidrogel experimental. G/H) Grupo verniz de TiF_4 .

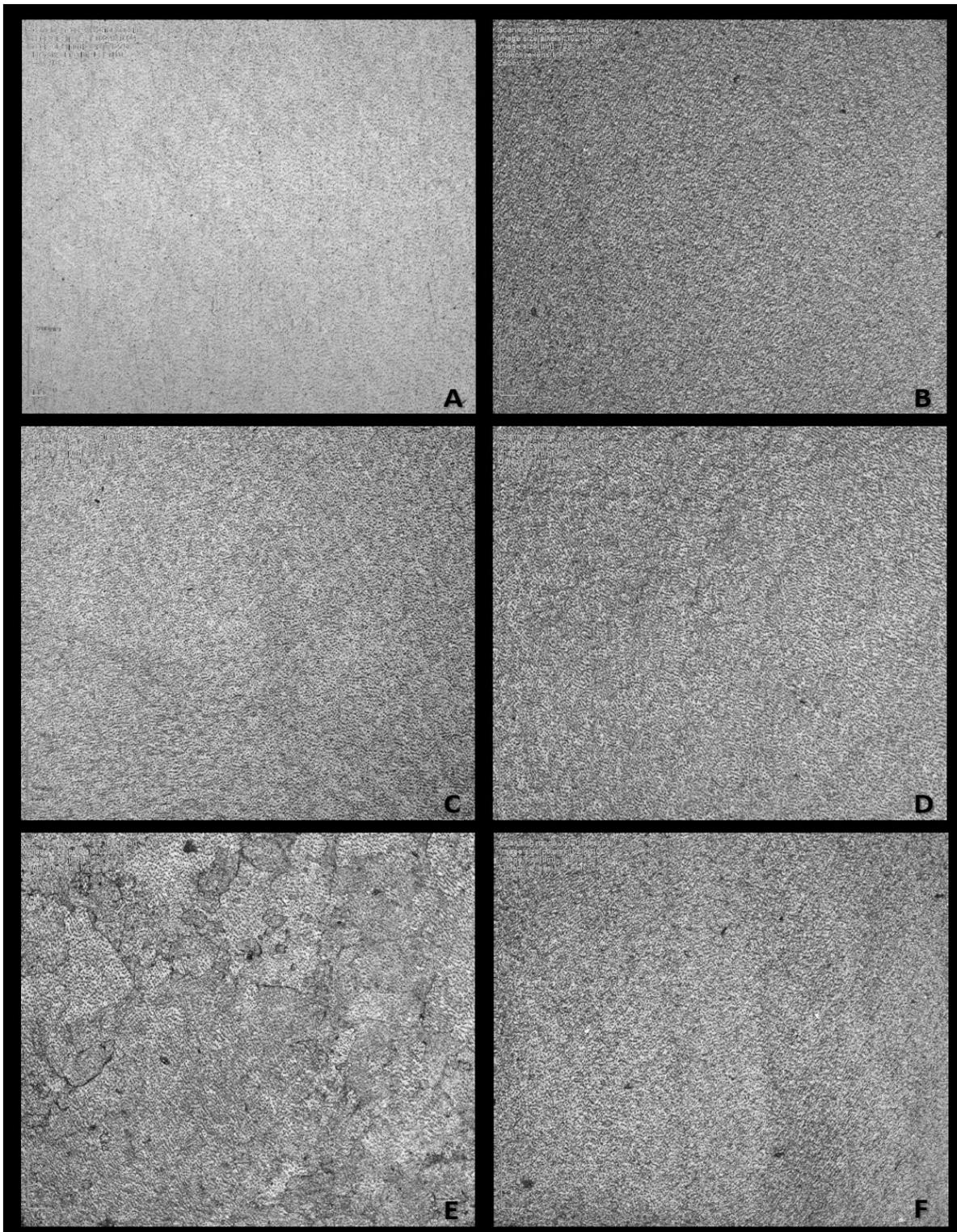


Figura 16. Análise rugosidade por Microscopia Confocal a Laser 3D. A) Dentina sadia; B) Dentina erodida; C) Grupo controle após ciclo erosivo (sem tratamento); D) Grupo

quitosana após ciclo erosivo e tratamento com hidrogel de quitosana; E) Grupo experimental após ciclo erosivo e tratamento com hidrogel experimental; F) Grupo verniz de TiF_4 após ciclo erosivo e tratamento com verniz de TiF_4 .

Contagem dos túbulos dentinários

Em relação as análises mensuradas dos túbulos dentinários expostos, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante a quitosana ($p=0,34$) e ao verniz ($p=0,70$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p<0,001$) que apresentou o maior número de túbulos dentinários ocluídos.

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente semelhante ao subgrupo com abrasão ($p>0,05$). Na Tabela 5, observou-se que o grupo experimental foi estatisticamente diferente de todos os subgrupos ($p<0,05$) nas duas situações (com e sem abrasão).

Tabela 5. Média e desvio padrão do número dos túbulos dentinários expostos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos com e sem abrasão.

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	-64,33±125,36 Aa	32,47±90,62 Ab
	Quitosana	-55,47±87,80 Aa	-45,87±75,40 Aa
	Experimental	-205,13±57,39 Ba	-203,47±26,14 Ba
	Verniz TiF_4	4,53±59,75 Aa	8,53±83,28 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Área dos túbulos dentinários

Para a análise da área dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, o grupo controle foi semelhante ao verniz ($p=0,24$) e estatisticamente diferente do grupo experimental ($p<0,001$). Em relação a abrasão observou-se uma diferença

significativa ($p=0,005$) entre o subgrupo com e sem abrasão. Na tabela 6 observou-se que todos os grupos apresentaram-se semelhantes estatisticamente ($p>0,005$) nos subgrupos com e sem abrasão e apenas nos espécimes não abradidos que o grupo experimental apresentou diferença estatística em relação aos grupos controle e verniz ($p<0,05$).

Tabela 6. Média e desvio padrão da área (μm) dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos para os diferentes grupos com e sem abrasão.

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	-1,12±4,50 Aa	1,04±2,69 Aa
	Quitosana	-3,69±2,73 Ab	-1,34±1,86 AB
	Experimental	-2,35±2,67 Aa	-2,68±3,99 Ba
	Verniz TiF₄	-2,91±3,90 Ab	-0,32±2,86 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Perímetro dos túbulos dentinários

Em relação ao perímetro dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, apenas o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0,02$). A quitosana e o verniz apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle ($p=0,93$). Para o *fator abrasão* não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão ($p<0,05$). Na tabela 7, observou-se que apenas o grupo experimental promoveu uma diminuição do perímetro dos túbulos dentinários.

Tabela 7. Média e desvio padrão do perímetro (μm) dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
	Controle	1,07±4,02 Aa	0,87±2,26 ABa

HCl Líquido	Quitosana	-0,18±3,32 Aa	0,38±1,70 ABa
	Experimental	-1,02±3,76 Aa	-2,51±4,79 Ba
	Verniz TiF₄	-0,42±5,00 Aa	1,75±3,28 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0.05$).

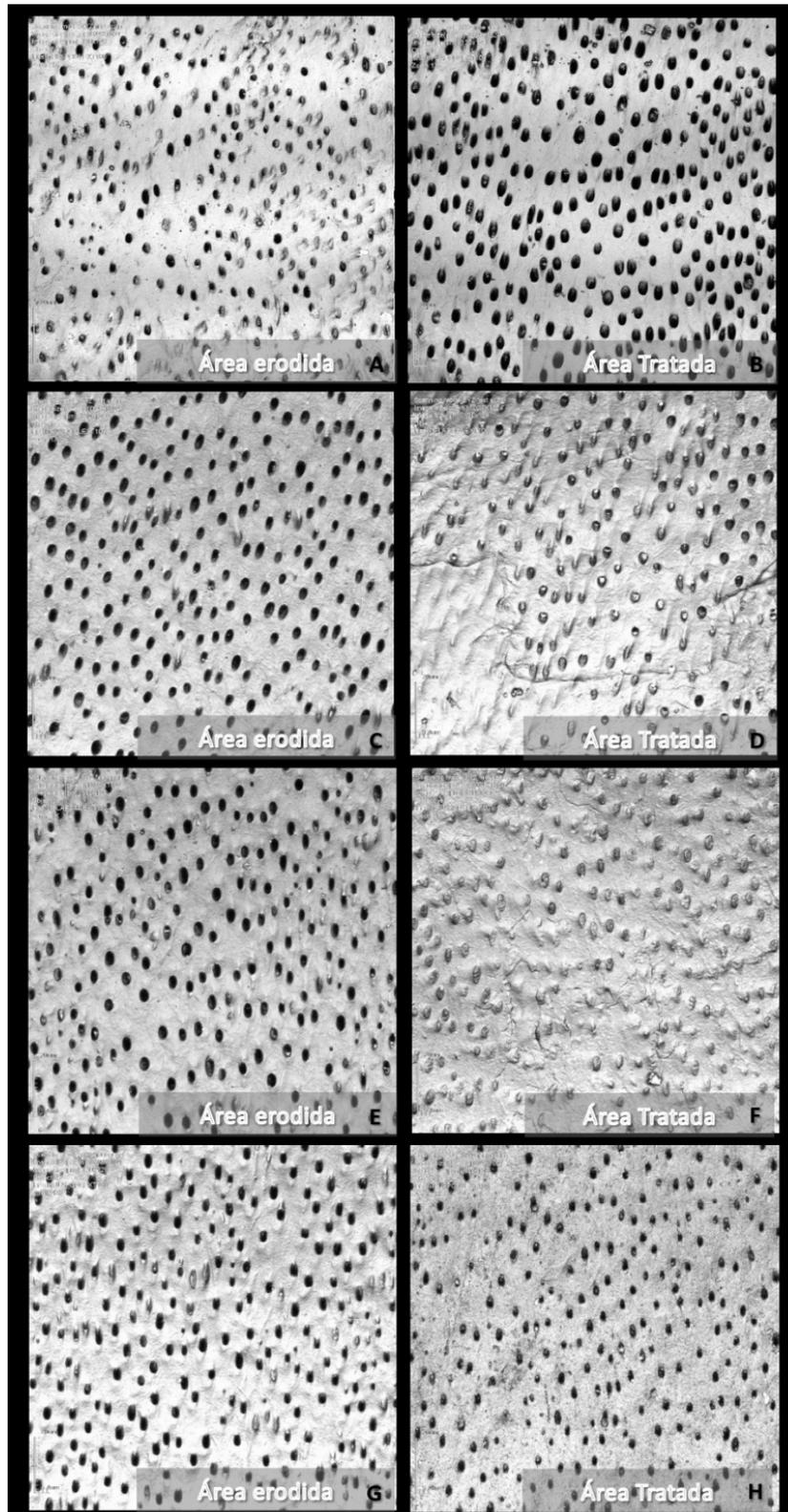


Figura 17. Análise da contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D. Interface entre a área referência e dentina erodida e interface entre a área referência e dentina após ciclo erosivo (controle - sem

tratamento); A/B) Grupo controle; C/D) Grupo hidrogel de quitosana. E/F) Grupo hidrogel experimental. G/H) Grupo verniz de TiF_4 .

Tomografia de coerência óptica

Para a análise de espessura superficial da mineralização, no *fator tratamento*, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Para o fator abrasão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 8).

Tabela 8. Média e desvio padrão da espessura superficial de mineralização nos diferentes grupos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	0,025±0,006 Aa	0,277±0,017 Aa
	Quitosana	0,029±0,012 Aa	0,032±0,014 Aa
	Experimental	0,045±0,016 Aa	0,04±0,022 Aa
	Verniz TiF_4	0,037±0,017 Aa	0,031±0,012 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Espectroscopia Micro Raman

Os dados mostraram no Figura 18 (erosão líquida) que o grupo hidrogel experimental apresentou picos referentes ao estiramento do grupo fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}) com maior intensidade sendo semelhante ao grupo dentina sadia. O grupo verniz apresentou os picos referentes ao fosfato (ν_1 960 cm^{-1} ν_4 582 cm^{-1}) com menor intensidade e formato alargado e os grupos controle e quitosana apresentaram picos menos intensos e semelhantes entre si no formato. O pico referente a amida I (1450 cm^{-1}) foi semelhante entre os grupos.

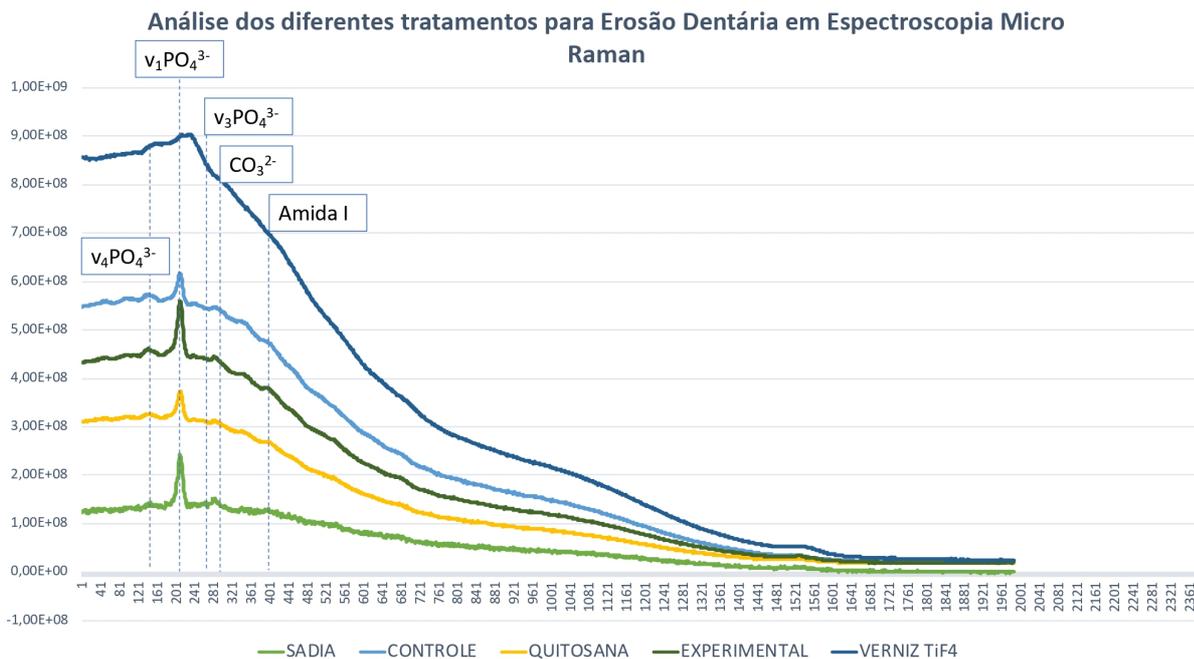


Figura 18. Gráfico dos diferentes tratamentos submetidos a erosão líquida pela Espectroscopia Micro Raman.

Ácido clorídrico gasoso

Perfil de Desgaste

Para a análise de perfil de desgaste, no *fator tratamento*, observou-se que o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p=0,68$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O verniz apresentou menor perfil de desgaste e foi estatisticamente diferente dos grupos controle e quitosana ($p<0,05$), porém foi semelhante ao grupo experimental ($p>0,05$).

Em relação ao *fator abrasão*, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre os subgrupos com e sem abrasão. Entretanto, na tabela 9, observou-se que, com exceção do grupo experimental que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão, todos os demais grupos apresentaram um comportamento semelhante nas duas situações. Ao analisar apenas a abrasão, observou-se uma diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o controle e a quitosana com o verniz, que por sua vez, sem o processo de abrasão, foi semelhante ao grupo experimental.

Tabela 9. Média e desvio padrão dos valores de perfil de desgaste (μm) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
Erosivos			
HCl Gasoso	Controle	0,21±0,07 Aa	0,07±0,06 Aa
	Quitosana	0,14±0,09 Aa	0,02±0,17 Aa
	Experimental	0,01±0,31 ABa	-0,28±0,17 Bb
	Verniz TiF₄	-0,14±0,28 Ba	-0,28±0,24 Ba

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Perda de volume

Para a análise de perda de volume, no *fator tratamento* o grupo controle foi estatisticamente semelhante a quitosana ($p = 0,26$) e ao verniz ($p = 0,12$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p < 0,001$). O verniz e o grupo experimental foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que os subgrupos com abrasão foram estatisticamente diferentes dos subgrupos sem abrasão ($p < 0,001$). Na Tabela 10, observou-se que todos os grupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p > 0,05$), com exceção do grupo experimental que em ambas as situações foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Para os subgrupos sem abrasão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 10. Média e desvio padrão dos valores de perda de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	1,25E7±3,33E6 Aa	3,22E6±2,31E6 Ab
	Quitosana	1,05E7±5,31E6 Aa	1,65E6±1,10E6 Ab
	Experimental	5,03E6±6,07E6 Ba	1,27E6±3,50E6 Aa
	Verniz TiF₄	8,75E6±2,985E6 ABa	1,99E6±3,74E6 Ab

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Degrau

Na análise de degraú, observou-se que para o *fator tratamento*, o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo quitosana ($p < 0,001$) e foi semelhante aos grupos experimental ($p = 0,16$) e verniz TiF₄ ($p = 0,95$). O grupo quitosana apresentou maior degraú e foi estatisticamente diferente de todos os grupos ($p < 0,05$).

Em relação ao *fator abrasão*, observou-se que a abrasão promoveu maior degraú e foi estatisticamente diferente do subgrupo sem abrasão ($p < 0,001$). Na tabela 11, observou-se que todos os subgrupos apresentaram o degraú maior quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p < 0,05$). A quitosana apresentou os maiores valores nas duas situações (com e sem abrasão) e foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 11. Média e desvio padrão dos valores do degraú (μm) formado na dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	3,87±2,44 Aa	0,81±0,59 Bb
	Quitosana	6,58±2,52 Ba	1,98±1,77 Ab
	Experimental	2,57±1,42 Aa	0,17±0,74 Bb
	Verniz TiF₄	4,87±2,31 Ba	0,31±1,28 Bb

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Rugosidade

Para o *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p = 0,89$) e ao grupo experimental ($p = 0,99$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo verniz TiF_4 ($p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, quitosana e experimental ($p > 0,05$).

Para o *fator abrasão*, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão. Este comportamento se manteve entre os subgrupos, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 12). Além disso, pode-se observar que o verniz apresentou menor rugosidade nas duas situações (com e sem abrasão) ($p < 0,05$).

Tabela 12. Média e desvio padrão dos valores de rugosidade da superfície ($Sa-\mu m$) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,74±0,24 ABa	0,67±0,14 Aa
	Quitosana	0,77±0,27 Aa	0,71±0,13 Aa
	Experimental	0,68±0,12 ABa	0,75±0,10 Aa
	Verniz TiF_4	0,56±0,23 Ba	0,47±0,13 Ba

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Contagem dos túbulos dentinários

Para a contagem dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao verniz ($p=0,99$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a quitosana ($p=0,004$) e grupos experimental ($p<0,0001$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o processo abrasivo promoveu maior obliteração dos túbulos em comparação ao sem abrasão que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,00008$). Para a Tabela 13 pode-se observar que o número de túbulos dentinários expostos foi semelhante nas duas situações (com e sem abrasão) ($p>0,05$), com exceção da quitosana e experimental que apresentaram grande número de túbulos obliterados quando abrasionados ($p>0,05$). O grupo experimental, independente de ter sido abrasionado ou não, apresentou um maior número de túbulos dentinários obliterados e foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) dos demais grupos estudados.

Tabela 13. Média e desvio padrão do número dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	-30,33±61,90 Aa	28,13±79,51 Aa
	Quitosana	-116,07±119,50 Ba	-19,80±61,32 Ab
	Experimental	-203,47±40,51 Ca	-214,07±57,33 Ba
	Verniz TiF₄	-21,87±83,58 Aa	22,93±76,07 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Área dos túbulos dentinários

Em relação a área dos túbulos dentinários, observou-se que no *fator tratamento*, somente o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0,008$). A quitosana e o verniz apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle ($p=0,99$). No *fator abrasão*,

observou-se uma diferença significativa em relação a abrasão e sem abrasão ($p=0,04$). Na tabela 14, observou-se que somente o grupo experimental apresentou menor área e foi estatisticamente diferente do controle ($p<0,05$).

Tabela 14. Média e desvio padrão da área- μm dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	-1,08 \pm 4,45 Aa	-0,10 \pm 2,88 Aa
	Quitosana	-2,11 \pm 2,90 ABa	-1,71 \pm 2,76 ABa
	Experimental	-4,98 \pm 3,90 Ba	-1,33 \pm 2,14 Bb
	Verniz TiF₄	-1,85 \pm 1,65 ABa	-2,19 \pm 2,96 ABa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Perímetro dos túbulos dentinários

Para o perímetro dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, somente o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0,002$) e verniz ($p=0,03$). A quitosana ($p=0,55$) e verniz ($p=0,83$) apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle. Para o *fator abrasão* não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão ($p<0,05$). Na tabela 15, o grupo experimental abrasionado apresentou perímetro menor em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Tabela 15. Média e desvio padrão do perímetro- μm dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
	Controle	0,83 \pm 4,41 Aa	-0,83 \pm 4,30 Aa
	Quitosana	-0,97 \pm 3,46 ABa	-1,59 \pm 1,97 Aa

HCl Gasoso	Experimental	-4,66±5,68 Ba	-2,42±2,70 Aa
	Verniz TiF₄	-0,65±3,12 ABa	-1,00±2,93 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Tomografia de coerência óptica

Para a análise de espessura superficial da mineralização, no fator tratamento, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Para o fator abrasão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 16).

Tabela 16. Média e desvio padrão da espessura superficial de mineralização nos diferentes grupos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,024±0,004 Aa	0,033±0,024 Aa
	Quitosana	0,036±0,012 Aa	0,025±0,003 Aa
	Experimental	0,051±0,019 Aa	0,053±0,025 Aa
	Verniz TiF₄	0,036±0,017 Aa	0,032±0,009 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Espectroscopia Micro Raman

No Figura 19 (erosão gasosa), os grupos dentina sadia, controle e verniz apresentaram formatos semelhantes em relação aos picos de fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}) e amida I (1450 cm^{-1}) porém com intensidades diferentes. O espectro do grupo experimental foi semelhante ao do grupo

quitosana, apresentando menor intensidade e formato alargado do pico fosfato (ν_1 960 cm^{-1}). O pico referente a amida I (1450 cm^{-1}) foi semelhante entre os grupos.

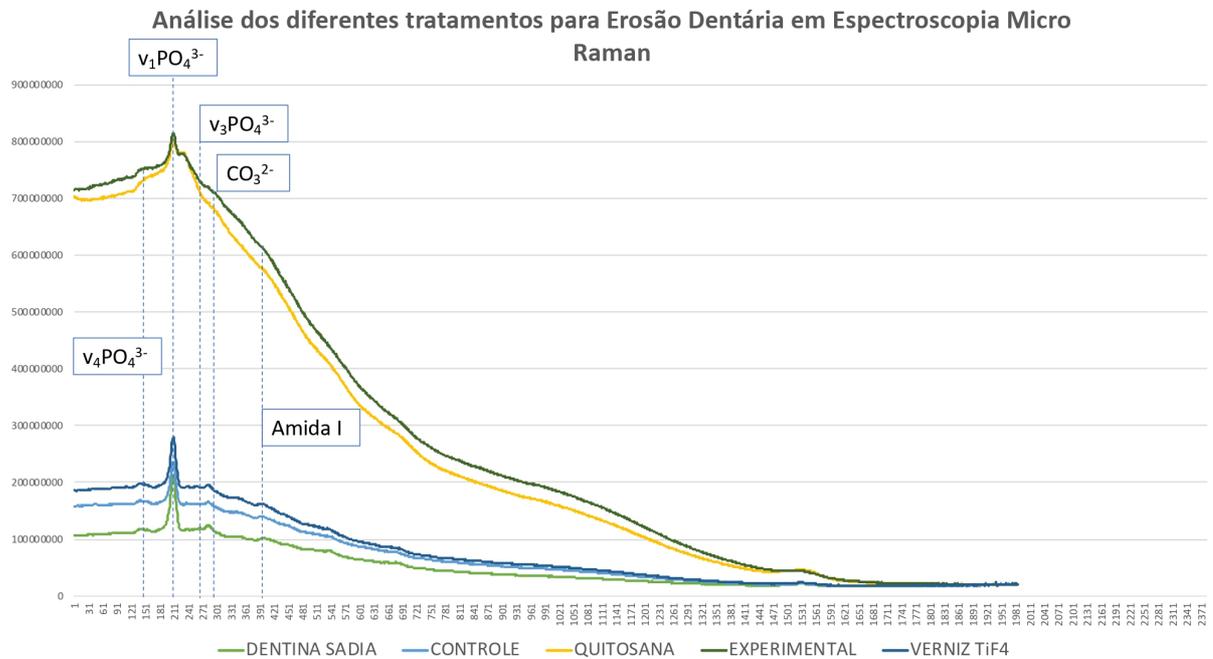


Figura 19. Gráfico dos diferentes tratamentos

Análise morfológica dos túbulos dentinários

Observou-se que os túbulos dentinários no grupo controle apresentaram-se mais alargados e abertos após o ciclo erosivo. Não observa-se a presença de dentina peritubular. No grupo quitosana, os túbulos dentinários não tiveram alterações em sua forma e dimensão e não houve a perda da dentina peritubular, houve somente a obliteração parcial dos túbulos dentinários. Observa-se uma fina camada depositada sobre a dentina tratada com quitosana.

Em relação ao grupo experimental, observa-se que os túbulos não tiveram sua dimensão alterada e a dentina peritubular encontra-se preservada. Houve a obliteração de grande parte dos túbulos dentinários, e em algumas regiões, observa-se uma fina camada depositada sobre a superfície dentinária. O grupo verniz TiF_4

preservou a dimensão dos túbulos dentinários e teve uma obliteração parcial dos túbulos dentinários. Não se observa nenhuma camada depositada sobre os espécimes tratados com o verniz.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou a ação dos tratamentos sobre os túbulos dentinários. Na Figura 20A observa-se a dentina sadia com os túbulos abertos como padrão referência.

Após a erosão com HCl líquido, na Figura 20B observa-se o aumento da abertura dos túbulos dentinários causados pelo processo erosivo do ácido sobre a superfície da dentina radicular. O hidrogel experimental em forma de membrana (Figura 20C) promoveu a obliteração parcial dos túbulos dentinários.

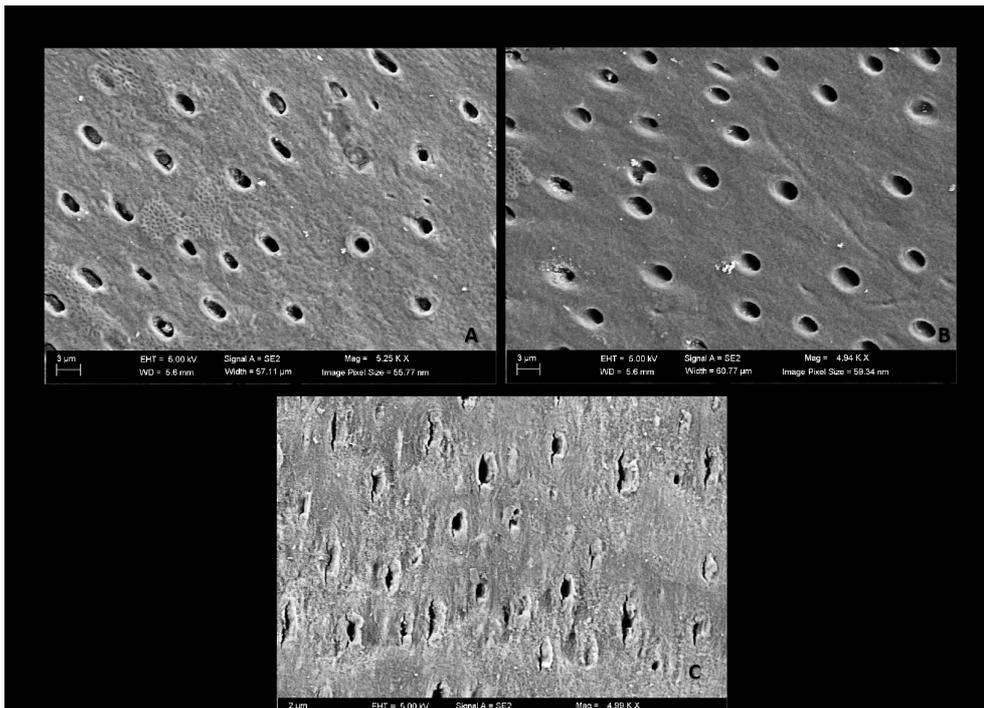


Figura 20. Espécime tratado com hidrogel experimental em forma de membrana em microscopia eletrônica de varredura. A) Dentina sadia. B) Dentina erodida. C) Dentina tratada com hidrogel experimental em forma de membrana.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo propôs a comparação do hidrogel experimental de quitosana com os diferentes tratamentos sobre a dentina erodida, com o objetivo de analisar o efeito dos tratamentos no controle/redução do processo erosivo e no fechamento dos túbulos dentinários. Para isso, utilizou-se a microscopia confocal a laser na avaliação do degrau, perda de volume, perfil de desgaste, rugosidade e número, área e perímetro dos túbulos dentinários antes e após o ciclo erosivo (com/sem abrasão). A tomografia de coerência óptica foi empregada para analisar a intensidade e profundidade da remineralização da dentina, pois tem a capacidade de prever evidências indiretas de perda ou ganho mineral. Por fim, a espectroscopia Micro Raman foi utilizada para avaliar as alterações químicas do tratamento experimental sobre a estrutura dentinária e compará-lo com os outros tratamentos.

Para este estudo optou-se por utilizar o HCl líquido e gasoso para simular as condições encontradas na cavidade bucal de pacientes portadores da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), pois com frequência estes pacientes são expostos a ocorrência e periodicidade do refluxo misto (refluxo líquido e gasoso) (Sifrim et al., 2001). No entanto, o ácido gástrico líquido (refluxo líquido) é mais frequentemente relacionado à erosão dentária severa em comparação ao ácido gástrico gasoso (refluxo gasoso) (Faraoni et al., 2018). Esta situação clínica quando associada à abrasão produz um resultado acelerado capaz de deteriorar significativamente a integridade da estrutura dentária. A ação da escova de dente sobre uma estrutura fragilizada exerce um efeito abrasivo que intensifica a perda dentária durante a erosão (Shellis & Addy, 2014; Dehghan et al., 2017; Mantilla et al., 2017), especialmente se o paciente escova os dentes após episódios de refluxo gastroesofágico (Grippe, Simring & Coleman, 2012).

Além deste efeito nocivo, a dentina ainda é um substrato mais suscetível ao desgaste por abrasão se comparado ao esmalte (Ranjitkar et al., 2012) por isso, como constatado neste estudo, ao associar a erosão à abrasão, produziu-se maior perda da estrutura dentinária do que nos subgrupos sem abrasão. Os subgrupos com abrasão foram estatisticamente diferentes dos subgrupos sem abrasão nas análises de degrau, perfil de desgaste, perda de volume e rugosidade, demonstrando a perda significativa da estrutura dentária quando associada à

erosão. A maior perda de dentina causada pela ação do HCl líquido pode estar associada aos agentes químicos e ações mecânicas causadas pela movimentação do líquido sobre a superfície da dentina (Faraoni et al., 2018). Diferentemente do HCl líquido, o HCl gasoso é composto por partículas esparsas na sua forma física, conseqüentemente a ocorrência do contato destas partículas ácidas sobre a estrutura dentária é menor já que estas partículas não estão em contato próximo como na forma líquida (Faraoni et al., 2018).

Em relação aos resultados associados ao tipo de tratamento, observou-se que o hidrogel experimental obteve maior eficácia na intercepção do processo erosivo evidenciado nos valores de degrau, perfil de desgaste e perda de volume que foram estatisticamente diferentes em relação aos grupos controle e quitosana. O desempenho do hidrogel experimental foi semelhante, e em alguns casos, até mesmo melhor do que o verniz de TiF_4 contra a desmineralização dentinária. De acordo com a literatura, vários tratamentos podem ser utilizados na tentativa de recuperar o processo erosivo. Em geral, esses tratamentos são à base de flúor (fluoreto de fosfato acidulado, fluoreto de sódio, fluoreto de amina, tetrafluoreto de titânio) (Lussi & Hellwig, 2014; Philip et al., 2019).

Este estudo optou por testar as propriedades do verniz de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) no qual tem mostrado um maior efeito protetor na remineralização dentária quando comparado ao fluoreto de sódio (NaF) (Magalhães et al., 2010; Comar et al., 2012; Comar et al., 2017; de Souza et al., 2018; Mosquim et al., 2019). O possível mecanismo de ação do TiF_4 baseia-se na formação de uma camada resistente a ácidos composta por complexos organometálicos, nos quais o íon titânio é fortemente atraído pelo oxigênio presente no grupo fosfato da estrutura da dentina para formar precipitados do tipo óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado durante o processo de hidrólise (Sen & Büyükyılmaz, 1998). Esses compostos são fortemente ligados e não são facilmente removidos por prótons, mesmo sob condições altamente ácidas (pH 1), como consequência, são considerados mais resistentes a desafios erosivos (Basting et al., 2015). A camada resistente a ácidos também pode atuar como uma barreira física e absorver maior quantidade de fluoreto, o que leva a um bom desempenho do verniz de TiF_4 quando comparado aos grupos tratados com quitosana e controle presentes neste estudo (Wiegand et al., 2010; Comar et al., 2018).

Estes resultados corroboram com os achados literários que testaram o verniz TiF_4 em esmalte/dentina submetido a erosão e abrasão em estudos *in vitro* e *in situ* (Levy et al., 2014; Comar et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Martines de Souza et al., 2017; Pini et al., 2019). A maioria destes estudos apresentou resultados positivos quanto ao controle e diminuição da progressão das lesões erosivas. Além disso, o precipitado formado pelo complexo de fosfato de titânio é mais resistente ao ácido que o precipitado de CaF_2 formado pela aplicação de NaF, o que significa que o verniz de TiF_4 tem a capacidade de proteger a dentina de desafios erosivos (Martines de Souza et al., 2017). Esse aspecto é importante, pois normalmente a dentina apresenta menores valores de desgaste quando comparada ao esmalte (Martines de Souza et al., 2018), e isso pode ocorrer devido à presença de uma matriz orgânica desmineralizada rica em fibrilas de colágeno, que pode prevenir o contato do ácido com o tecido mineralizado subjacente, reduzindo assim, a progressão da erosão dentinária através de uma camada superficial estável a agressão do ácido (Schlueter et al., 2010). Por ser crucial garantir a estabilidade da matriz orgânica no processo erosivo, a quitosana foi empregada neste estudo para ser a base do hidrogel experimental, levando-se em conta às suas propriedades benéficas de adesão e sustentação das fibras de colágeno.

A quitosana (2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosose) é um biopolímero que apresenta em sua cadeia polimérica, um grande número de grupos amina e hidroxila livres; estes agrupamentos podem se ligar a diferentes moléculas, e conseqüentemente, formar ligações cruzadas com o colágeno (Madhavan et al., 2010; Resende et al., 2019). A interação química da quitosana com a matriz orgânica pode promover forte adesão deste material à estrutura dentária, além de auxiliar na diminuição da degradação da dentina (Fawzy et al., 2013; Pini et al., 2019). O mecanismo de adesão da quitosana pode produzir uma superfície dentinária menos lisa (partículas de quitosana continuam aderidas na superfície da dentina), e conseqüentemente, resultar em valores mais altos de rugosidade superficial, como o encontrado neste estudo. Os grupos quitosana e hidrogel experimental apresentaram valores de rugosidade semelhantes ao grupo controle e foram estatisticamente diferentes do grupo verniz de TiF_4 (erosão gasosa). Entretanto, além de interagir e aderir firmemente a matriz orgânica, a quitosana

também pode facilitar a deposição de uma camada de fosfato de cálcio nos túbulos dentinários da dentina erodida (Xu et al., 2011; Ururahy et al., 2017).

Este biopolímero é amplamente utilizado por sua capacidade de auxiliar o processo de biomineralização através da deposição de íons cálcio e fosfato e neutralizar a atividade das metaloproteinasas da matriz (MMPs) presentes na dentina e na saliva (Xu et al., 2011; de Souza et al., 2017). As MMPs são ativadas em pH ácido durante um ataque erosivo e, conseqüentemente, degradam as fibrilas de colágeno presentes na matriz orgânica da dentina (Buzalaf et al., 2012; de Souza et al., 2017). A quitosana auxilia na integridade das fibrilas de colágeno, proporcionando maior resistência à erosão dentária (Buzalaf et al., 2012). Além disso, esse polímero pode favorecer a reticulação entre as fibras de colágeno, construir arranjos microfibrilares com propriedades mecânicas superiores para tornar a estrutura da dentina mais resistente a enzimas que degradam o colágeno (Dash et al., 2011; Fawzy et al., 2013; Martines et al., 2017).

O processo de degradação da dentina está relacionado a dissolução ou desnaturação de proteínas bem como de moléculas proteoglicanas responsáveis por aderir os minerais de hidroxiapatita na matriz orgânica do colágeno (Yassen et al., 2013). Desta forma, qualquer tratamento capaz de sustentar a ultraestrutura do colágeno e paralisar a atividade da colagenase, prolongará a integridade superficial da dentina contra a dissolução ou desnaturação protéica (Kishen, 2016). Neste sentido, espera-se que o processo de reticulação forme ligações cruzadas intra e intermoleculares no colágeno e melhore a estabilidade mecânica e orgânica da dentina (Bedran-Russo et al., 2007; Kishen et al., 2016). Isto contradiz, em certa medida, o nosso estudo que mostrou uma menor resistência nas amostras tratadas com quitosana evidenciadas pelo maior degrau, perfil de desgaste e perda de volume, além de serem estatisticamente semelhantes ao grupo controle (sem tratamento). No entanto, estas asserções concordam parcialmente com os resultados do presente estudo que demonstraram a eficácia do hidrogel experimental na interceptação do processo erosivo, diminuindo a perda de estrutura dentinária principalmente para as análises de degrau, perfil de desgaste e perda de volume.

Com base nestas propriedades, pode-se considerar que a quitosana é um meio promissor para estabilizar a estrutura de colágeno presente na matriz orgânica

da dentina, porém a quitosana isolada não é eficaz para promover a remineralização do tecido afetado, conseqüentemente, a inserção de íons minerais em sua composição torna-se necessária para induzir o processo reparativo, remineralizar a matriz de colágeno, formar cristais de hidroxiapatita intrafibrilar, e por fim, estimular a precipitação de minerais para a oclusão dos túbulos dentinários (Han et al., 2017; El Gezawi et al., 2019). Com esta finalidade, o hidrogel experimental, criado à base de quitosana, foi formulado para comportar íons minerais em sua composição e aprimorar o desempenho deste material frente ao processo de desmineralização dentária.

A literatura tem mostrado que novos agentes para interceptar a erosão e a hipersensibilidade dentinária têm seguido nesta mesma direção, a de formular um produto capaz de remineralizar a superfície desmineralizada (sem a presença de flúor) por meio da transferência de fosfato de cálcio, hidroxiapatita, fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo entre outros (Kyaw et al., 2019; Mushtaq et al., 2019; Machado et al., 2019). Estudos mostraram que estes novos tratamentos têm tido resultados tão eficazes quanto aos produtos comumente utilizados no mercado para a obliteração dos túbulos dentinários e alívio da hipersensibilidade (Kanehira et al., 2019; Kyaw et al., 2019; Mushtaq et al., 2019; Machado et al., 2019). Estes resultados promissores têm demonstrado que a utilização de materiais, baseados na interação química com a estrutura do dente, podem obliterar os túbulos dentinários abertos e bloquear a estimulação térmica, mecânica e química do dente por meio de componentes naturais (Kanehira et al., 2019; Machado et al., 2019).

Desta forma, o hidrogel experimental e a quitosana demonstraram ser eficazes na obliteração dos túbulos dentinários, principalmente o grupo experimental, que apresentou diferença estatística, nas análises de contagem do número, área e perímetro dos túbulos dentinários quando comparada com os demais grupos. Outros estudos também corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo (Kurita et al., 1998; Silva et al., 2012) e demonstraram que a propriedade quelante da quitosana empobrece os componentes inorgânicos da camada de esfregaço, levando a uma maior concentração de partículas nos túbulos dentinários e não na superfície. No entanto, um estudo recente mostrou que a quitosana apresenta uma grande cadeia polimérica com ligações de hidrogênio e grupos hidroxila em sua estrutura, e quando os prótons são perdidos pela ação de

quelação, ligações covalentes são formadas com a estrutura dentária, levando ao acúmulo de partículas na dentina peritubular, sendo responsável pela obliteração dos túbulos dentinários (Ururahy et al., 2017) expostos. Alternativamente, outro estudo apresentou resultados contrários aos nossos, demonstrando a eficácia do verniz TiF_4 na diminuição do diâmetro e da área dos túbulos dentinários, uma vez que os íons de titânio têm afinidade com o oxigênio das moléculas de fosfato, levando à deposição de partículas no áreas com maior mineralização, por exemplo na porção peritubular da dentina (Mantilla et al., 2017). Este resultado promissor do verniz TiF_4 na obliteração dos túbulos dentinários não foi encontrado no presente estudo.

Com relação à análise da tomografia de coerência óptica, este método é baseado no princípio da interferometria de luz, no qual a magnitude e o atraso de tempo de eco da luz retroespalhada são analisados para fornecer informações sobre a intensidade de dispersão da luz em diferentes camadas de tecido. Tanto o esmalte quanto a dentina apresentam propriedades de espalhamento diferentes nas quais o tecido saudável difere do tecido desmineralizado, proporcionando uma compreensão da espessura, morfologia e porosidade mineral das lesões erosivas (Attin et al., 2014). Neste estudo, observou-se uma diminuição significativa nos valores do coeficiente de atenuação óptica após o ciclo erosivo/abrasivo. Esse achado corrobora com alguns estudos prévios (Mujat et al., 2003; Cara et al., 2014; Pereira et al., 2018) que demonstraram o processo de desmineralização promovido por ácido, como o ácido clorídrico usado neste estudo, o qual criou vazios na estrutura da dentina que aumentou a dispersão da luz e diminuiu os valores dos coeficientes de atenuação óptica. Nossos resultados também mostraram que a quitosana apresentou coeficientes de atenuação óptica mais baixos e não foi capaz de remineralizar eficientemente a estrutura da dentina, o que contradiz o único estudo (Arnaud et al., 2010), no entanto a quitosana foi testada na superfície do esmalte e encontrou resultados encorajadores.

Até onde temos conhecimento, não foi encontrado nenhum estudo sobre a eficácia do verniz TiF_4 na dentina desmineralizada pela OCT, portanto, é difícil fazer qualquer comparação com este estudo. No entanto, observou-se que o verniz TiF_4 produziu coeficientes de atenuação óptica mais altos relacionados ao processo de remineralização na estrutura dental, o que corrobora os resultados deste estudo pela

microscopia confocal a laser que mostrou desempenho superior do verniz TiF_4 na análise de perda de volume, e perfil de desgaste. Embora não tenhamos estudos testando o verniz TiF_4 na análise OCT, outras pesquisas com verniz fluoretado (de Moraes et al., 2017) podem atestar o melhor desempenho do flúor em relação a outros tratamentos na remineralização dentária pela técnica OCT. Em relação à profundidade da remineralização, o hidrogel de quitosana apresentou valores ligeiramente mais altos, o que demonstrou a sua penetração nas porções mais profundas da estrutura dentinária, diferentemente do verniz TiF_4 que apresentou valores menores em relação a profundidade de remineralização. Essa diferença mostra que a quitosana pode interagir em profundidade com a estrutura dentária e o verniz fluoretado interage com maior eficácia na superfície das amostras, conforme suportado na literatura (Magalhães et al., 2008; Comar et al., 2012; Comar et al., 2017).

A análise espectroscópica das ligações químicas também mostrou que o hidrogel experimental apresentou maior intensidade dos picos relacionados ao grupo fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}). O formato destes picos foi semelhante ao grupo dentina sadia (picos estreitos com alta intensidade) que estão relacionados a cristalinidade e a concentração relativa de minerais do material (Toledano et al., 2015). Diferentemente dos picos relacionados ao verniz que apresentaram-se mais abaulados. Estes dados permitem interpretar que o hidrogel experimental possui potencial para remineralizar a estrutura dentinária. Os picos fosfato e carbonato apresentaram-se com intensidade e formato semelhantes nos grupos controle e quitosana, ambos tiveram picos menos intensos representativos da menor quantidade de minerais presentes no espécime.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que apesar da erosão dentária ser mais severa com o líquido se comparado ao gasoso, os tratamentos interceptores foram mais efetivos na erosão com HCl líquido do que na erosão com HCl gasoso. O verniz fluoretado e o hidrogel experimental apresentam-se como uma alternativa ao tratamento da erosão causada por líquidos. Entretanto, se o processo erosivo está associado a presença de gás, então provavelmente os tratamentos poderão ter a sua eficácia reduzida já que o seu comportamento frente a esta agressão não demonstrou ser capaz de controlá-lo.

Dentro das limitações deste estudo, o grupo hidrogel experimental apresentou resultados promissores na interceptação do processo erosivo, sendo particularmente eficaz no fechamento dos túbulos dentinários. Por outro lado, o verniz TiF_4 foi capaz de remineralizar a superfície da dentina e o hidrogel experimental de penetrar mais profundamente na estrutura dentinária já que o colágeno cumpre o seu papel de trazer os minerais da superfície para dentro de sua estrutura, facilitando desta maneira, a remineralização nas porções mais profundas da dentina. No entanto, em especial para o hidrogel experimental, estudos adicionais são necessários para elucidar ainda mais a interação e a durabilidade desse tratamento com a estrutura dentária. Ainda não foram realizados ensaios clínicos para testar o hidrogel experimental na cavidade bucal, portanto, extrapolar para as condições clínicas é fundamental para entender a durabilidade do efeito protetor e a validade deste material promissor.

— Conclusão —

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados da metodologia proposta, pode-se concluir que:

De modo geral, o processo erosivo líquido teve um efeito mais lesivo sobre o substrato dentinário do que o processo erosivo gasoso. A abrasão promoveu alterações estruturais mais evidentes no substrato dentinário. O grupo experimental e o verniz de TiF_4 foram capazes de interceptar o processo erosivo, contudo, não conseguiu paralisá-lo.

Em relação ao desgaste observado por meio das análises de degrau, perda de volume e perfil de desgaste, o grupo experimental promoveu um efeito protetor mais intenso sobre a dentina radicular erodida com HCl líquido. A rugosidade da superfície não foi afetada pelos diferentes tratamentos. Os túbulos dentinários foram eficazmente obliterados pelo grupo experimental que promoveu a redução da área e perímetro do lúmen dos túbulos dentinários. Em relação a mineralização da superfície, o grupo experimental apresentou maior mineralização superficial da dentina radicular.

Os tratamentos foram mais eficazes no processo erosivo líquido, diferentemente do processo erosivo gasoso que não permitiu a redução ou paralisação da erosão mesmo com a aplicação dos diferentes tratamentos para mineralização dentária.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Techniques for production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil*; 1999 26:97-102.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. In *Erosive Tooth Wear*. Vol. 25. Karger Publishers; p. 123-142.

Bae JY, Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Kang SW, Han SJ, Kang YH. (-) Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem. Toxicol*; 2008 46(4):1298-1307.

Bajaj M, Poornima P, Praveen S, Nagaveni NB, Roopa KB, Neena IE, Bharath KP. Comparison of CPP-ACP, tri-calcium phosphate and hydroxyapatite on remineralization of artificial caries like lesions on primary enamel-An in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*; 2016 40(5):404-409.

Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MAR. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J*; 2011 56(3):317-321.

Basting RT, Leme AA, Bridi EC, Amaral FLB, França FMG, Turssi CP et al. Nanomechanical properties, SEM and EDS microanalysis of dentin treated with 2.5% titanium tetrafluoride, before and after an erosive challenge. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 2015 103(4):783-789.

Bedran-Russo AKB, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B*, 2007 80(1):268-272.

Botelho JN, Del Bel Cury AA, Silva WJD, Tenuta LMA, Cury JA. The effect of fluoride toothpaste on root dentine demineralization progression: a pilot study. *Braz Oral Res*; 2014 28(spe): 1-5.

Buzalaf MAR, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012 24:72-6.

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

Buzalaf MA, Charone S, Tjäderhane L. Role of host derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res*; 2015 49:30-37.

Buyukyilmaz T, Øgaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetrafluoride treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*; 1997 105(5):473-477.

Cara AC, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of

enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med*; 2014 46(9):666-671.

Chandak S, Bhondey A, Bhardwaj A, Pimpale J & Chandwani M. Comparative evaluation of the efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide–Amorphous calcium phosphate in reducing *Streptococcus mutans* counts in dental plaque of children: An in vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent*; 2016 6(5):423-429.

Choi M, Hasan N, Cao J, Lee J, Hlaing SP, Yoo JW. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and in vivo healing activities in MRSA biofilm-infected wounds. *Int. J. Biol. Macromol*, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.009

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

Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*; 2010 89(10): 1187-1197.

Collado-González MAR, González Espinosa Y, Goycoolea Francisco M. Interaction between chitosan and mucin: fundamentals and applications. *Biomimetics*, 2019 4(2):32.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomao PA, Grizzo LT, Magalhaes AC. Effect of NaF, SnF₂, and TiF₄ toothpastes on bovine enamel and dentin erosion-abrasion in vitro. *Int J Dent*, 2012: 134350.

Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MA, Buchalla W et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci*. 2012 Aug; 120(4):342–348.

Comar LP, Cardoso CDAB, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhaes 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.

Comar LP, Souza BM, Martins J, Santos MG, Buzalaf MA, Magalhães AC. Response of carious enamel to TiF₄ varnish treatment under diverse cariogenic activities in situ. *J Dent*. 2017 63:81–84.

Comar LP, Souza BM, Al-Ahij LP, Martins J, Grizzo LT, Piasentim IS 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.

da Silva VRM, Viana ÍEL, Lopes RM, Zezell DM, Scaramucci T, Aranha ACC. Effect of Er, Cr: YSGG laser associated with fluoride on the control of enamel erosion progression. *Arch. Oral Biol*, 2019 99:156-160.

Dash MF, Chiellini RM, Ottenbriteb E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*; 2011 36:981-1014

Dehghan M, Ozorio JEV, Chanin S, Tantbirojn D, Versluis A, Garcia-Godoy F. Protocol for measurement of enamel loss from brushing with an anti-erosive toothpaste after an acidic episode. *Gen Dent*, 2017 65(4):63-68.

Delgado AJ, Dias AR, Quesada A, Rodríguez LE, Hernández R, Wynkoop B, Dilbone DA. Potential erosive effect of mouthrinses on enamel and dentin. *Gen Dent*, 2018 66(3):75-79.

de Moraes MDR, Carneiro JRM, Passos VF, Santiago SL. Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. *Braz Oral Res* 2016 30(1):e13.

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.

de Souza BM, Vertuan M, Buzalaf MAR, Magalhaes 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.

dos Santos DMS, Pires JG, Silva AB, Salomão PMA, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Protective Effect of 4% Titanium Tetrafluoride Varnish on Dentin Demineralization Using a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res*, 53(4) :495-502.

Ebrahimi M, Mehrabkhani M, Ahrari F, Parisay I, Jahantigh M. The effects of three remineralizing agents on regression of white spot lesions in children: A two-week, single-blind, randomized clinical trial. *J Clin Exp Dent*; 2017 9(5):e641-e648.

El Gezawi M, Wölfle UC, Haridy R, Fliefel R, Kaisarly D. Remineralization, Regeneration, and Repair of Natural Tooth Structure: Influences on the Future of Restorative Dentistry Practice. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019 5(10): 4899-4919.

Elsaka SE, Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSealer sealer to radicular dentin. *J Biomed Res*; 2012 26:193-199.

El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 63:871-880.

Fang QQ, Wang XF, Zhao WY, Shi BH, Lou D, Chen CY, Zhang MX, Wang X et al. Development of a Chitosan-Vaseline Gauze Dressing with Wound-Healing Properties in Murine Models. *Am J Trop Med Hyg*. 2019. doi: 10.4269/ajtmh.19-0387.

Faraoni JJ, Toro CVT, de Matos LLM, Palma-Dibb RG. Efficacy of different strategies to treat root dentin eroded by liquid or gaseous hydrochloric acid associated with brushing abrasion. *Arch. Oral Biol*; 2018 89:65-69.

Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo JT. Chitosan/riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J Mech Behav Biomed Mater*; 2013 17: 278-289

Fialho MPN, Hass V, Nogueira RP, França FMG, Turssi CP, Basting RT, Amaral FLB. Effect of epigallocatechin-3-gallate solutions on bond durability at the adhesive interface in caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019 91:398-405.

Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of tooth brushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci*; 2009 117:255-260.

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

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 40:1036-1043.

Garcia-Godoy F, HONG L. A novel antimicrobial and remineralizing toothpaste containing CaCl/chitosan microspheres. *Am J Dent*, 2018 31(3):149-154.

Gonzalez Ayerbe JI, Hauser B, Salvatore S, Vandenplas Y. Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease in Infants and Children: from Guidelines to Clinical Practice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2019 22(2):107-121.

Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*; 2004 135:1109-1118.

Grippo JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncarious cervical lesions: a 20-year perspective. *J Esthet Restor Dent*, 2012 24(1):10-23.

Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, Zerbib F, Mion F, Smout AJ et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut*, 2018 67(7): 1351-1362.

Hals E, Tveit AB, Tötdal B, Isrenn R. Effect of NaF, TiF₄ and APF solutions on root surfaces in vitro, with special reference to uptake of F. *Caries Res*; 1981 15(6):468-476.

Han M, Li QL, Cao Y, Fang H, Xia R, Zhang ZH. In vivo remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system. *Sci Rep*, 2017 7:41955.

Hannas AR, Kato MT, Cardoso CDAB, Magalhães AC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Preventive effect of toothpastes with MMP inhibitors on human dentine erosion and abrasion in vitro. *J Appl Oral Sci*; 2016 24:61-66.

Herbella FA, Patti MG. Gastroesophageal reflux disease: from pathophysiology to treatment. *World J Gastroenterol*; 2010 16:3745–3749.

Higo T, Mukaisho K, Ling ZQ, Oue K, Chen KH, Araki Y et al. An animal model of intrinsic dental erosion caused by gastro-oesophageal reflux disease. *Oral diseases. Oral Dis*; 2009 15(5):360-365.

Jung J, Bae Y, Cho YK, Ren X, Sun Y. Structural insights into conformation of amphiphilic quaternary ammonium chitosans to control fungicidal and anti-biofilm functions. *Carbohydr*, 2020 228:115391.

Kanehira M, Ishihata H, Araki Y, Takahashi H, Sasaki K, Finger WJ. Effect of artificial saliva on permeability of dentin treated with phosphate containing desensitizer measured by digital flow meter. *Dent Mater J*, 2019 38(6):963-969.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MAR. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*; 2009 17: 560-564.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MAR. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*; 2010a 89:468-472.

Kato MT, Leite ADL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MAR. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res*; 2012 91(12):1119-1123.

Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*; 2014 93:74-77.

Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110627

Kim M, Kim S. Chito-oligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *FEBS Letters*; 2006 580:2661-2666.

Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater*, 2016 32(8):968-977.

Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*; 2016 150(3):483-490.

Kumar RMNV. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym*;46:1-27.

Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and stability*, 1998 59(1-3): 117-120.

Kyaw KY, Otsuki M, Segarra MS, Hiraishi N, Tagami J. Effect of Calcium-phosphate Desensitizers on Staining Susceptibility of Acid-eroded Enamel. *Oper Dent*, 2019 44(3):281-288.

Lee LH, Park SY, Park JE, Jung BO, Park JE, Park JK, Hwang YJ. Anti-Oxidant Activity and Dust-Proof Effect of Chitosan with Different Molecular Weights. *Int. J. Mol*, 2019 20(12): 3085.

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.

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

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*, 2019 20(6):517-527.

Machado AC, Rabelo FEM, Maximiano V, Lopes RM, Aranha ACC, Scaramucci T. Effect of in-office desensitizers containing calcium and phosphate on dentin permeability and tubule occlusion. *J Dent* 2019 86:53-59.

Madhavan K, Belchenko D, Motta A, Tan W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomater*, 2010 6(4):1413-1422.

Magalhães AC, Comar LP, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *J Dent*. 2008 36(2):158-62.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent*; 2010 38(2):153-157.

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.

Mantilla TF, Turssi CP, Ramos-Oliveira TM, Silva CVD, Suzuki LC, Freitas PMD. The in situ effect of titanium tetrafluoride gel on erosion/abrasion progression in human dentin. *Braz Dent J*, 2017 28(3):337-345.

Mantilla TF, Silva CVD, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PMD. TiF₄ gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. *Microsc Res Tech*, 2017 80(11):1182-1188.

Martin V, Ribeiro IA, Alves MM, Gonçalves L, Almeida AJ, Grenho L et al. Understanding intracellular trafficking and anti-inflammatory effects of minocycline chitosan-nanoparticles in human gingival fibroblasts for periodontal disease treatment. *Int. J. Pharm*, 2019 572:118821.

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.

Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, Sletta H, Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int. J. Mol*, 2017 20(23): 5889.

Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr. Polym*; 2007 67:640-644.

Mirkarimi M, Toomarian L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an in vitro study. *J Dent*; 2012 9(4): 224-228.

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.

Moraes-Filho JPP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol*; 2005 42(2):122-127.

Mujat C, Van Der Veen MH, Ruben JL, Ten Bosch JJ, Dogariu A. Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light induced fluorescence and lesions characteristics. *Appl. Opt.* 2003 42:2079–2086.

Mushtaq S, Gupta R, Dahiya P, Kumar M, Bansal V, Melwani SR. Evaluation of different desensitizing agents on dentinal tubule occlusion: A scanning electron microscope study. *Indian Journal of Dental Sciences*, 2019 11(3):121-124.

Nobrega CBC, Fujiwara FY, Cury JA, Rosalen PL. TiF4 varnish-A (19) F-NMR stability study and enamel reactivity evaluation. *Chem Pharm Bull*; 2008 56(1):139-141.

Oliveira-Reis B, Maluly-Proni AT, Fagundes TC, Vasconcelos G, Bresciani E, Prakki A, Dos Santos PH. Influence of protease inhibitors on the degradation of sound, sclerotic and caries-affected demineralized dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019 97:1-6.

Orr WC. Sleep issues in gastroesophageal reflux disease: beyond simple heartburn control. *Rev Gastroenterol Disord*; 2003 3:522–529.

Patcharatrakul T, Gonlachanvit S. Gastroesophageal reflux symptoms in typical and atypical GERD: roles of gastroesophageal acid refluxes and esophageal motility. *J Gastroenterol Hepatol*; 2014 29:284-290.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion, *Oral Diseases*, 2002 8(3):117–129.

Philip N. State of the art enamel remineralization systems: the next frontier in caries management. *Caries Res*; 2019 53(3): 284-295.

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*, 2019:103247.

Rala S, Çakir M, Kose T, Bor S, Aydogdu S. Prevalence of Gastroesophageal Reflux Disease and Reflux-Related Symptoms in Infants; Development and Validation of a Novel Gastroesophageal Reflux Disease Questionnaire to Use for Turkish Infants (SM Reflux Questionnaire). *J Pediatr Res*; 2014 1(4):189-198.

Ranjitkar S, Kaidonis JA, Smales RJ. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion. *Int J Dent*, 2012:479850. doi: 10.1155/2012/479850.

Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW. The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent*, 2009 37(4):250-254.

Resende AHM, Farias JM, Silva DD, Rufino RD, Luna JM, Stamford TCM, Sarubbo LA. Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids and surfaces B*, 2019 181:77-84.

Savarino E, Bredenoord AJ, Fox M, Pandolfino JE, Roman S, Gyawali CP. Advances in the physiological assessment and diagnosis of GERD. *Nat. Rev. Gastroenterol*, 2018 15(5):323.

Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine, *Arch. Oral. Biol* 2010 55(4):294-299.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn⁺² - containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomized in situ trial. *Clin Oral Investig*; 2014 18:107–115.

Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res*; 2019:1-5.

Sen BH, Büyükyılmaz T. The effect of 4% titanium tetrafluoride solution on root canal walls-a preliminary investigation. *J Endod*, 1998 24:239–243.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 32-45). Karger Publishers. 2014.

Sieber KR, Schmidt C, Baumann T, Lussi A, Carvalho TS. Acquired Enamel Pellicle Modification with Casein and Mucin in Different Concentrations and its Impact on Initial Dental Erosion. *Caries Res*, 2019 53(4): 458-467.

Sifrim D, Holloway R, Silny J, Xin Z, Tack J, Lerut A et al. Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings. *Gastroenterology*; 2001 120:1588-1598.

Silva PV, Guedes DFC, Nakadi FV, Pécora JD, Cruz-Filho AMD. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*, 2013 46(4): 332-338.

Sun T, Zhou D, Xie J, Mao F. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*; 2007 225:451-456.

Svensson O, Lindh L, Cárdenas M, Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan – influence of surface properties, concentration and type of mucin. *J Colloid Interface Sci*; 2006 299:608–616.

Tatarian T, Pucci MJ, Palazzo F. A Modern Approach to the Surgical Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *J Laparoendosc Adv Surg Tech*; 2016 26:174-179.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*; 1998 77(8):1622-1629.

Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015 50:131-149.

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

van der Mei HC, Engels E, De Vries J, Dijkstra RJ, Busscher HJ. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci*; 2007 115:303–307.

Wang GR, Zhang H, Wang ZG, Jiang GS, Guo CH. Relationship between dental erosion and respiratory symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *J Dent*; 2010 38(11):892-898.

Wang YL, Chang HH, Chiang YC, Lu YC, Lin CP. Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. *J Formos Med Assoc*, 2018 117(4):276-282.

Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ. Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res*; 1988 67(12):1483-1487.

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

Woodland P, Sifrim D. The refluxate: the impact of its magnitude, composition and distribution. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 2010 24(6):861-87.

Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo ECM, Chu CH. Prevention of secondary caries using silver diamine fluoride treatment and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate modified glass-ionomer cement. *J Dent*; 2017 57:38-44.

Yassen GH, Platt JA. The effect of nonsetting calcium hydroxide on root fracture and mechanical properties of radicular dentine: a systematic review. *Inter Endod J*, 2013 46(2):112-118.

Yates RB, Oelschlager BK. Surgical treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surg Clin North Am*; 2015 95:527-553.

Yu H, Buchalla W, Cheng H, Wiegand A, Attin T. Topical fluoride application is able to reduce acid susceptibility of restorative materials. *Dent Mater J*, 2012 31(3), 433-442.

Xu Z, Neoh KJ, 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*, 2011 98:150-159.

Anexo

CRE-2019-10-18 Manuscript submission confirmation

De: Caries Research (cre@manuscriptmanager.net)

Para: jujfaraoni@yahoo.com.br

Data: sexta-feira, 25 de outubro de 2019 11:16 BRT

Submission: CRE-2019-10-18 - Effectiveness of in vitro preventive treatments on dentin erosion by intrinsic acid.

Submitting author: Dr. Juliana Faraoni

Attention: Dr. Faraoni

Thank you very much for submitting the above manuscript. Please use the manuscript number as listed above on all correspondence about the manuscript.

The manuscript will now be forwarded to our reviewers and we shall inform you as soon as a decision has been made by the editorial board.

The progress of your manuscript can be followed from the progress report accessed from your account overview.

Kind regards, *

Editorial Office

Would you like to publish your paper without extra cost?

Follow this link <https://de.surveymonkey.com/r/X8CLT9M> to take part in a short author survey and win a voucher towards your publication costs.

YOUR SIGN IN INFORMATION

Website: <https://www.manuscriptmanager.net/cre>

Email: jujfaraoni@yahoo.com.br

Forgot password or not signed in before?

Click the URL below to create/reset your password.

https://www.manuscriptmanager.net/sLib/v4/retrieve_pw.php?paramScreen=HHYP+4rCZteFRdFvD9hkBIQht2WiMJB9XowpbE57+zA=



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA



SHELYN AKARI YAMAKAMI

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA INTERCEPTAÇÃO DA
EROSÃO DENTINÁRIA**

Ribeirão Preto

2019

SHELYN AKARI YAMAKAMI

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA INTERCEPTAÇÃO DA EROSÃO
DENTINÁRIA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde junto ao Programa de Odontologia Restauradora.

Área de Concentração: Odontologia Restauradora

Opção: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de
Biblioteca
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Yamakami, Shelyn Akari

Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária.
Ribeirão Preto, 2019.
110p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa), apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora - Opção: Dentística
Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Dentina. 2. Erosão. 3. Abrasão. 4. Desgaste. 5. Quitosana. 6. Flúor. 7. Microscopia Confocal. 8. Análise Espectral Raman. 9. Tomografia Óptica.

Folha de Aprovação

Yamakami, SY. Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Odontologia Restauradora. Área de Concentração: Odontologia Restauradora. Opção: Dentística. Ribeirão Preto, 2019.

Data da Aprovação: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, por quem são todas as coisas e por quem existo.

Poucas palavras traduzem o coração da pessoa a quem tudo dedico, pois Ele é a personificação do Amor. Na escrita de Thomas à Kempis e Clive Staples Lewis encontra-se a expressão de um profundo ensinamento:

“Filho meu, é preciso aprender muito mais, coisas que você ainda não aprendeu bem. Quais são estas coisas, Senhor?”

Que você coloque o seu anelo, totalmente, de conformidade com o que me apraz e que não seja admirador de si mesmo, mas seguidor sincero de minha vontade. Várias aspirações poderão, muitas vezes, dominá-lo e impeli-lo à frente com veemência, mas considere se você está sendo movido pela minha honra ou mais pela sua própria vantagem, se sou eu a causa, você ficará satisfeito com o que quer que seja. Mas se você fica à espreita em busca de vantagem pessoal é exatamente isso que o atrapalha e lhe pesa.

Cuidado para não tender demais ao desejo preconcebido, sem pedir meu conselho, para depois talvez se arrepender e ficar infeliz com aquilo que a princípio o fazia feliz, e pelo qual você cuidou com zelo sincero, pensando que fosse o melhor.

Porque nem todo o gosto que parece ser bom é para ser seguido imediatamente, nem toda a coisa que lhe desagrada à primeira vista é para ser evitada.

Por vezes, é expediente parar, mesmo no caso de bons empreendimentos e aquisições, para que você não crie distrações na mente, pois o perigo é que, por falta de autodomínio você crie um escândalo para os outros, ou então, sendo frustrado por outras pessoas, você de repente fique confundido e caia.

Dê-me tudo. Entregue-me todo o seu ego natural, todos os seus desejos que você julga inocentes, bem como os que você julga maus. Todo o seu ser. Eu lhe darei em troca um novo eu. Na verdade, eu lhe darei o meu próprio eu e a minha vontade se tornará a sua vontade.

O mundo está farto de indiferença. Deus quer pessoas reais, pessoas que creiam em Alguém por quem estejam dispostos a viver e morrer.”

T. à Kempis e C. S. Lewis

Agradecimento. Especial

Agradecimento Especial

Agradeço por ser minha inspiração, por trazer vida a quem nada merecia. Agradeço por ser a Graça que sustenta, por trazer alento a quem nada tinha. Tens minha eterna gratidão, constante estima, pois tudo o que sou, tudo o que tenho e tudo o que espero ser entrego-Te irrevogavelmente. Ao meu Deus, a minha inteira devoção.

A tua suficiência me basta.

Minha família, minha afeição. Meus sinceros agradecimentos e sempiterno apreço.

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb, suas palavras motivadoras me impulsionaram a crescer. Seus ensinamentos são o reflexo de seu excelente conhecimento.

À Dra. Juliana Jendiroba Faraoni, valioso amparo e terna amizade. Sua presença acolhedora marcou para sempre minhas lembranças.

Aos meus amigos. Eternas memórias. Amizade para toda a vida.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representado pela Digníssima Diretora Professora Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e pelo Vice-diretor Prof. Dr. Arthur de Belém Noves Junior.

À coordenação geral de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pessoa do Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho.

Ao chefe de Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Paulo Tambasco de Oliveira.

Ao comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo.

Ao Biobanco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona.

Aos professores membros da minha banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann, Professor do Departamento de Física. Agradeço a colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

À Débora Fernandes Costa Guedes, técnica do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao querido Carlos Feitosa dos Santos, secretário do curso de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por toda a ajuda.

À Universidade de British Columbia, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho, por ter cedido espaço para a realização de parte dos meus experimentos.

À Universidade de Harvard, na pessoa da Prof. Dra. Hiroe Ohyama, por ter me acolhido durante o doutorado sanduíche e permitido que eu realizasse parte dos meus experimentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro do meu trabalho (Processo: 16/23193-7)

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro para meu trabalho e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE outorgada.

Resumo

RESUMO

Yamakami SY. **Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária.** 2019. p.111. Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O processo erosivo leva a perda mineral da estrutura dentária, e uma vez que este tecido é comprometido, o dano ao dente pode tornar-se irreversível. **Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes tratamentos para interceptar o processo de erosão dentinária. **Materiais e métodos:** Foram obtidos 400 fragmentos de dentina radicular (4x3x2mm) a partir de incisivos bovinos hígidos. Metade de cada fragmento foi exposta aos tratamentos/desafios erosivos (ácido clorídrico na forma líquida e gasosa). Esta etapa do estudo foi fatorial (4x2), tendo como fatores de estudo o *tratamento superficial* em 4 níveis: ausência de tratamento (G1); quitosana (G2); hidrogel experimental (G3) e verniz fluoretado (G4) e a *abrasão* em 2 níveis: com e sem abrasão (escovas Oral-B, 10s/200gf). O fator erosão foi realizado com ácido clorídrico na forma líquido (pH1,2, 6x/dia/20s) e gasosa (pH1,2, 6x/dia/20) durante 6 dias. As análises utilizadas foram: degrau (μm), perfil de desgaste (Rv), perda de volume (μm^3), rugosidade (Sa) e contagem de túbulos por meio da microscopia confocal a laser 3D, intensidade e profundidade da mineralização dentinária por meio da tomografia de coerência óptica e alterações químicas por meio da microscopia micro Raman. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey's test ($p < 0,05$). **Resultados:** Observou-se que para o fator tratamento, o grupo controle foi semelhante ao grupo quitosana e estatisticamente diferente do grupo experimental ($p < 0,05$). Para o fator abrasão, observou-se que os subgrupos apresentaram maior desgaste quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p < 0,05$). A rugosidade da superfície não foi afetada pelos diferentes tratamentos ($p > 0,005$). Os túbulos dentinários foram eficazmente obliterados pelo grupo experimental que também apresentou maior mineralização superficial da dentina radicular. **Conclusão:** O processo erosivo com ácido clorídrico (HCl) líquido teve um efeito mais intenso do que o processo com HCl gasoso. A abrasão promoveu alterações estruturais mais evidentes no substrato dentinário. O

grupo experimental e o verniz de TiF₄ foram capazes de interceptar o processo erosivo, contudo, não conseguiu paralisá-lo.

Palavras-chave: 1. Dentina. 2. Erosão. 3. Abrasão. 4. Desgaste. 5. Quitosana. 6. Flúor. 7. Microscopia Confocal. 8. Análise Espectral Raman. 9. Tomografia Óptica.

Abstract

Yamakami SY. **Effect of different treatments on the dental erosion interception** 2019. p.111. PhD Thesis – Ribeirão Preto Dental School, São Paulo University.

The erosive process leads to mineral loss of tooth structure, and once this tissue is compromised, the damage to the tooth may become irreversible. **Objective:** To analyze the effect of different treatments to intercept the dental erosion process. **Materials and methods:** 400 root dentin fragments (4x3x2mm) were used from sound bovine incisors. Half of each fragment was exposed to erosive controls/challenges (hydrochloric acid in liquid and gaseous form). This phase of the study was factorial (4x2), having as study factors the *superficial treatment* in 4 levels: absence of treatment (G1); chitosan (G2); experimental hydrogel (G3) and fluoride varnish (G4) and 2-level abrasion: with and without abrasion (Oral-B brushes, 10s / 200gf). The erosion factor was performed with hydrochloric acid in liquid (pH 1.2, 6x/day/20s) and gaseous form (pH 1.2, 6x/day/20) for 6 days. The statistical analysis were step (μm), wear profile (Rv), volume loss (μm^3), roughness (Sa) and tubule count by 3D laser confocal microscopy, intensity and depth of dental mineralization by optical coherence tomography and chemical changes by micro Raman microscopy. Data were submitted to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). **Results:** For the *treatment factor*, the control group was similar to the chitosan group and was statistically different from the experimental group ($p < 0.05$). For the *abrasion factor*, it was observed that the subgroups presented greater wear when associated with abrasion than without abrasion ($p < 0.05$). ($p < 0.05$). Surface roughness was not affected by different treatments ($p > 0.005$). The dentinal tubules were effectively obliterated by the experimental group that also presented higher superficial mineralization of the root dentin. **Conclusion:** The erosive process with liquid hydrochloric acid (HCl) had a more intense effect than the process with gaseous HCl. Abrasion promotes more evident changes in the dentin substrate. The experimental group and TiF_4 varnish were able to intercept the erosive process, however, they could not paralyze it.

Keywords: 1. Dentin. 2. Erosion. 3. Abrasion. 4. Wear. 5. Chitosan. 6. Fluorine. 7. Confocal Microscopy. 8. Raman Spectral Analysis. 9. Optical tomography.

Sumário

Sumário

1. Introdução	31
2. Proposição	40
3. Material e Método	44
3.1. Delineamento experimental	44
3.2. Erosão inicial e Seleção dos fragmentos	47
3.3. Grupos experimentais	48
3.4. Desafios erosivos	49
3.5. Análises realizadas	52
4. Resultados	64
4.1. Erosão ácido clorídrico líquido	64
4.2. Erosão ácido clorídrico gasoso	75
5. Discussão	87
6. Conclusões	97
7. Referências Bibliográficas	100
8. Anexo	111

Introdução

1. Introdução

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) é definida como sendo uma condição patológica proveniente do fluxo retrógrado do conteúdo gástrico para o esôfago, orofaringe e/ou trato respiratório que produz um conjunto de sintomas e/ou complicações prejudiciais a qualidade de vida do indivíduo (Savarino et al., 2018). É uma patologia relativamente comum, cuja prevalência na América do Sul é em torno de 23% (El-Serag et al., 2014) e no Brasil cerca de 11% da população apresenta-se com sintomas compatíveis com o refluxo gastroesofágico (Moraes-Filho et al., 2005).

Diferentemente da DRGE, o refluxo gastroesofágico (RGE) é uma condição fisiológica que ocorre normalmente em pacientes saudáveis no período pós-prandial (após as refeições), durante uma hora por dia (Fenoglio-Preiser et al., 1999; Gonzalez et al., 2019). Esta ocorrência pode ser diagnosticada quando o pH esofágico liberado é menor do que 4,0 e perdura ao menos 30 segundos (Orr, 2005). Regularmente, este conteúdo ácido é removido por meio dos movimentos peristálticos associados à saliva, neutralizando-o entre 1-2 minutos (Orr, 2003). A saliva além de auxiliar no efeito neutralizador do ácido, também atua na lubrificação do esôfago protegendo-o contra os danos mecânicos relacionados a passagem do bolo alimentar (Fenoglio-Preiser et al., 1999; Gyawali et al., 2018).

Além deste mecanismo de proteção, o próprio organismo possui uma barreira antirrefluxo que se localiza na junção gastroesofágica. Essa junção funcional possui características anatômicas (forma oblíqua ligada à curva do diafragma) que auxiliam no papel protetor contra o refluxo do ácido. Outro aspecto importante está associado ao alto gradiente de pressão (10-30 mm Hg) mantido pela contração tônica dos músculos circulares do esfíncter esofágico inferior que sob contração, isola o estômago do esôfago. A depuração intraluminal do esôfago acaba sendo auxiliada pela força da gravidade, pelo peristaltismo fisiológico do conteúdo esofágico para o estômago e também pelos bicarbonatos presentes na saliva (Fox et al., 2004; Herbella et al., 2010).

Quando a RGE começa a produzir disfunção gástrica ou a provocar danos à mucosa, esta condição passa a progredir para uma desordem clínica também conhecida como DRGE. As manifestações sintomatológicas desta síndrome, podem

ser classificadas como esofágicas ou extra esofágicas. Os sintomas esofágicos são a pirose, que está associada a estimulação e ativação dos quimiorreceptores presentes na mucosa do esôfago distal (Yates et al., 2015) e/ou regurgitação que refletem a ocorrência de um transtorno na barreira antirrefluxo da junção gastroesofágica. Já os sintomas extra esofágicos podem ser tosse seca crônica, laringite, asma e erosão dentária (Vakil et al., 2006; Patcharatrakul et al., 2014; Tatarian et al., 2016).

O processo de erosão dentária é definido como sendo a perda do tecido dentário causado por meio do contato com substâncias químicas ou processos eletrolíticos de origem não bacteriológica (Schlueter et al., 2019). O ácido que atua no processo erosivo dentário de pacientes portadores de DRGE é de origem intrínseca oriundo de ácidos endógenos, como por exemplo, o ácido clorídrico. Este ácido é um dos principais componentes do suco gástrico e pode apresentar-se na forma líquida e/ou gasosa (Wang et al., 2010, Faraoni et al., 2018). O ácido clorídrico na sua forma líquida dificilmente chega a cavidade bucal dos pacientes, pois na maioria dos casos este material refluído acaba ficando retido na região do esôfago (Woodland et al., 2010). Em contrapartida, o ácido clorídrico na sua forma gasosa tem sido o material mais frequentemente encontrado durante os episódios de refluxo e provavelmente seja o principal responsável pela erosão dentária (Sifrim et al., 1999; Higo et al., 2009; Faraoni et al., 2018). Quando os ácidos erosivos atingem a superfície do esmalte, seu conteúdo mineral começa a se dissolver, causando a perda de estrutura dentária. À medida que o processo erosivo progride, o esmalte é completamente removido e a dentina descoberta é exposta na cavidade bucal (da Silva et al., 2019).

A dentina apresenta em sua constituição, componentes minerais (inorgânicos) formados por cristais substituíveis de hidroxiapatita. Estes cristais são pobres em cálcio, fosfato e sódio e ricos em magnésio e carbonato. Além de serem encontrados sobre e entre as fibrilas colágenas, os cristais de hidroxiapatita presentes na dentina apresentam-se em menores tamanhos, proporcionando desta forma, uma maior área de superfície. Por isso os cristais da dentina são mais suscetíveis ao ataque ácido (Hicks et al., 1985). Desta forma, qualquer substância

ácida com um pH abaixo do valor crítico para dentina (6,0-6,5) pode ser capaz de dissolver os cristais de hidroxiapatita (Wefel, 1994; Grippo et al., 2004).

Apesar do mecanismo exato do processo de erosão sobre a superfície da dentina radicular ainda não ser completamente elucidado (Hannas et al., 2016), sabe-se que a exposição da dentina ao ácido leva primeiramente a um processo de desmineralização na região entre a dentina peritubular e intertubular. Em defluência, o ácido continua permeando a dentina peritubular e dissolvendo-a até levar ao alargamento dos túbulos dentinários. A camada superficial que se forma após o desgaste erosivo da estrutura dentinária tem como constituição uma matriz de colágeno desmineralizada que apresenta grande resistência mecânica (Ganss et al., 2009), além de limitar a difusão iônica de substâncias para dentro e fora da superfície desmineralizada (Klont et al., 1991; Kato et al., 2014). É por isso que a preservação desta camada tem sido considerada importante para a redução da progressão da erosão dentinária (Buzalaf et al., 2015).

No entanto, uma vez que se inicia o processo de desmineralização a matriz orgânica começa a apresentar degradação química por meio da ação das metaloproteinases da matriz (MMPs) que estão presentes na própria dentina ou na saliva (Tjäderhane et al., 1998). Estas enzimas proteolíticas zinco dependentes degradam quase todas as proteínas da matriz extracelular, isto significa que os diferentes tipos de colágeno em sua forma ativa ou desnaturada estão incluídos no mecanismo de degradação química (Buzalaf et al., 2012). Este processo só pode ser desencadeado quando as MMPs, secretadas inicialmente como precursores inativos (pró-forma), são ativas pelo baixo pH oral (aproximadamente 4,5). Contudo, sob condições normais as MMPs salivares (-2, -8, -9) ativadas não conseguem degradar a matriz orgânica da dentina por causa do efeito tampão que a saliva exerce sobre o pH ácido, ou seja, a saliva acaba neutralizando logo em seguida o ambiente bucal e por isso não ocorre a degradação enzimática (Buzalaf et al., 2012). Contudo o processo erosivo é dinâmico, e cada vez que as fibrilas de colágeno são expostas, as MMPs ativadas degradam a matriz orgânica desmineralizada, e mesmo que o pH retorne a sua neutralidade, parte da estrutura dentinária foi perdida neste processo (Buzalaf et al., 2012).

É um processo contínuo e pode tornar-se irreversível, desta forma pesquisas têm sido realizadas sobre os agentes inibidores das MMPs para diminuir a perda de colágeno e conseqüentemente, da erosão dentária. Dentre os tipos de inibidores, tem-se a clorexidina, polifenóis do chá verde especialmente o galato de epigallocatequina (EGCG), soluções ou géis de FeSO_4 (Kato et al., 2010). O EGCG é um polifenol extraído do chá verde que possui forte atividade inibitória contra as MMP-2 (gelatinase-A), MMP-8 (colagenase-2) e MMP-9 (gelatinase-B) (Demeule et al., 2000; Bae et al., 2008). O mecanismo proposto para descrever o processo inibitório das MMPs está relacionado à capacidade do EGCG de se ligar às colagenases por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Esta ligação enzimática pode provocar certa alteração conformacional ou até mesmo ocultar o sítio catalítico (Madhan et al., 2007) inibindo desta forma a sua ativação.

Por ser um produto natural e sem efeitos colaterais, o EGCG tem sido testado sobre a erosão dentária em diferentes estados físicos e agregações moleculares para compreender seu mecanismo frente ao papel inibidor das MMPs. Na forma líquida de extrato de chá verde, estudos envolvendo o EGCG como bochechos (Magalhães et al., 2009b; Kato et al., 2009; Barbosa et al., 2011, Mirkarimi et al., 2012; De Moraes et al., 2016; Wang et al., 2018; Fialho et al., 2019) concluíram que este polifenol reduziu significativamente a desmineralização dentária causada por erosão química. Estes resultados promissores levaram as novas pesquisas a testarem o EGCG na forma de gel (Kato et al., 2010; Kato et al., 2012; Pini et al., 2019) visando aumentar o tempo de contato deste polifenol com a dentina, melhorar sua substantividade e principalmente, facilitar o tratamento clínico dos pacientes, pois não haveria necessidade de aplicar o produto várias vezes ao dia, como no caso das soluções com extrato de chá verde. Os resultados com EGCG em gel, também se apresentaram eficazes na redução da erosão dentária. Um estudo (Hannas et al., 2016) propôs utilizar este polifenol e testá-lo na forma de dentifrício para analisar seu efeito na redução da desmineralização dentária. Este estudo mostrou resultados semelhantes no que diz respeito ao efeito protetor do EGCG na erosão dentária.

Alguns biopolímeros, como a quitosana, também tem sido investigado não só pela vasta aplicabilidade dentro da Odontologia, mas também por estarem

associados a redução da erosão. A quitosana é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina que é obtida essencialmente de exoesqueletos de artrópodes. Por ser uma macromolécula não tóxica, sua estrutura química única apresenta-se em forma de um polícatión linear com alta densidade de carga e de grupos reativos, além de inúmeras ligações de hidrogênio que lhe conferem excelente propriedade de biocompatibilidade (Kumar, 2000). Dentre as suas propriedades biológicas, algumas se destacam mais por apresentarem maior relevância clínica dentro da prática odontológica, tais como: a capacidade antioxidante (Sun et al., 2007), antimicrobiana (Elsaka et al., 2012; Matica et al., 2017; Garcia-Godoy et al., 2018), inibição da formação de biofilmes (Choi et al., 2019; dos Santos et al., 2019; Khan et al., 2019; Junge et al., 2020), cicatrizante (Minagawa et al., 2007; Choi et al., 2019; Fang et al., 2019) e anti-inflamatória (Kim et al., 2006; Martin et al., 2019).

Além destas inúmeras propriedades, este biopolímero pode ser carregado positivamente em baixo pH (Claesson et al., 1992) e esta característica lhe confere a capacidade de formar uma camada aderida à dentina que pode protegê-la contra os ataques ácidos (Ganss et al., 2011). Esta camada é formada porque a quitosana possui um forte potencial zeta positivo que facilmente adsorve as superfícies com um forte potencial zeta negativo como a estrutura dentária (Weerkamp et al., 1988). Seu efeito protetor pode ser ainda mais consistente in vivo porque a quitosana pode se aderir a película adquirida (van der Mei et al., 2007; Sieber et al., 2019) e ainda formar múltiplas camadas na presença de mucina (Svensson et al., 2006; Sieber et al., 2019). Por causa destas características, a quitosana tem sido adicionada a vários agentes anti-erosivos com o intuito de aprimorar os materiais odontológicos para que se tornem mais eficazes no tratamento da erosão dentária. Um dos veículos utilizados é o dentifrício com ou sem o flúor (agente ativo) (Ganss et al., 2011) e/ou com ou sem estanho (Ganss et al., 2012; Schlueter et al., 2014; Lussi et al., 2015; Pini et al., 2019). A adição de quitosana nestes veículos demonstrou ser tão eficaz ou até melhor do que qualquer outro dentifrício fluoretado (controle) na redução da perda erosiva.

Outra opção promissora para a prevenção da desmineralização é a utilização fosfoproteínas derivadas do leite, como a caseína, que apresenta função

semelhante às proteínas responsáveis pela biomineralização dentária (Kucuk et al., 2016; Bajaj et al., 2016). Sob condições ácidas do ambiente bucal, o fosfopeptídeo de caseína expressa uma sequência específica que aumenta consideravelmente a solubilidade do fosfato de cálcio, responsável por liberar íons cálcio e fosfato (Cochrane, 2010; Chandak et al., 2016; Ebrahimi et al., 2017). O grande reservatório de cálcio dentro da placa atrasa a difusão de íons livres de cálcio e fornece uma fonte de cálcio para remineralização, além de restringir a perda de minerais durante um episódio acidogênicos (Chandak et al., 2016; Ebrahimi et al., 2017; Zhao et al., 2017). A incorporação de peptídeos de caseína na placa e saliva aumenta o conteúdo de cálcio e fosfato no esmalte, diminuindo sua desmineralização e melhorando o processo dinâmico de remineralização quando submetido a desafios erosivos na superfície dentária (Philip, 2019).

Apesar de ter obtido resultados promissores utilizando estes compostos, sabe-se que os produtos fluoretados ainda são os mais utilizados e frequentemente recomendados dentro da prática clínica. Por isso, existem diversas pesquisas desenvolvendo compostos fluoretados modificados para que possam apresentar propriedades superiores na prática clínica (Buyukyilmaz et al., 1997). Um exemplo deste composto é o verniz de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) que vem despertado grande interesse entre os pesquisadores, não só por apresentar na sua composição o flúor que atua no processo de remineralização dentária (Exterkate et al., 2007), mas também por possuir baixa solubilidade frente a um pH bucal ácido (Hals et al., 1981). Além disso, apresenta um pH neutro e é um composto fisiologicamente inerte de grande estabilidade (Nobrega et al., 2008).

Uma vez que o TiF_4 é aplicado na estrutura dentária, a reação deste composto com o oxigênio, presente no meio, provoca a liberação de alguns produtos secundários como o dióxido de titânio. Conseqüentemente, o dióxido de titânio acaba se precipitando na forma de uma película branca ácido resistente que se mantém adsorvida à superfície do elemento dentário (Buyukyilmaz et al., 1997). Mesmo em valores muito baixos de pH (1-2), o TiF_4 tem sua reatividade aumentada o que favorece a formação de ligações químicas do titânio e oxigênio com o grupo fosfato da estrutura dentária na formação da película de dióxido de titânio (Yu et al., 2012). Este verniz foi testado em alguns estudos (Magalhães et al., 2010; Levy et

al., 2014; Comar et al., 2015) e resultados positivos foram encontrados em relação a perda de mineral, ou seja, o TiF_4 possui grande capacidade de inibição da desmineralização dentária, podendo ser utilizado em pacientes com erosão dentária.

Desta forma, observa-se que atualmente existem diversos protocolos para o tratamento à erosão dentinária, tais como o uso de fluoretos, produtos a base de fosfato de cálcio, clorexidina entre outros, contudo ainda não há nenhum material capaz de paralisar e/ou prevenir o processo erosivo. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos para interceptar o processo de erosão dentinária.

Proposição —

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito de diferentes tratamentos sobre a dentina erodida para interceptação das consequências do processo erosivo promovido por ácido clorídrico na forma líquida e gasosa, associado ou não a abrasão. A análise foi realizada por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D, Tomografia de Coerência Óptica e Espectroscopia Micro Raman.

Material e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Este estudo foi fatorial 4 X 2, tendo como fatores analisados o *Tratamento Superficial* em quatro níveis: ausência de tratamento (G1); tratamento com gel de quitosana (G2); tratamento com hidrogel experimental (G3) e tratamento com verniz de TiF₄ (G4) e *Abrasão* em dois níveis: com e sem abrasão. O fator erosão realizado com ácido HCl na forma líquida e gasosa foi analisado individualmente em cada grupo.

As unidades experimentais utilizadas foram 400 fragmentos de dentina radicular obtidas de incisivos bovinos, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=60) de acordo com o tipo de tratamento, e subdivididos em 2 subgrupos (n=30) de acordo com o tipo de abrasão (com ou sem abrasão). Em cada grupo, metade dos espécimes foram submetidos ao processo erosivo com HCl líquido (n=15) e a outra metade ao processo erosivo com HCl gasoso (n=15).

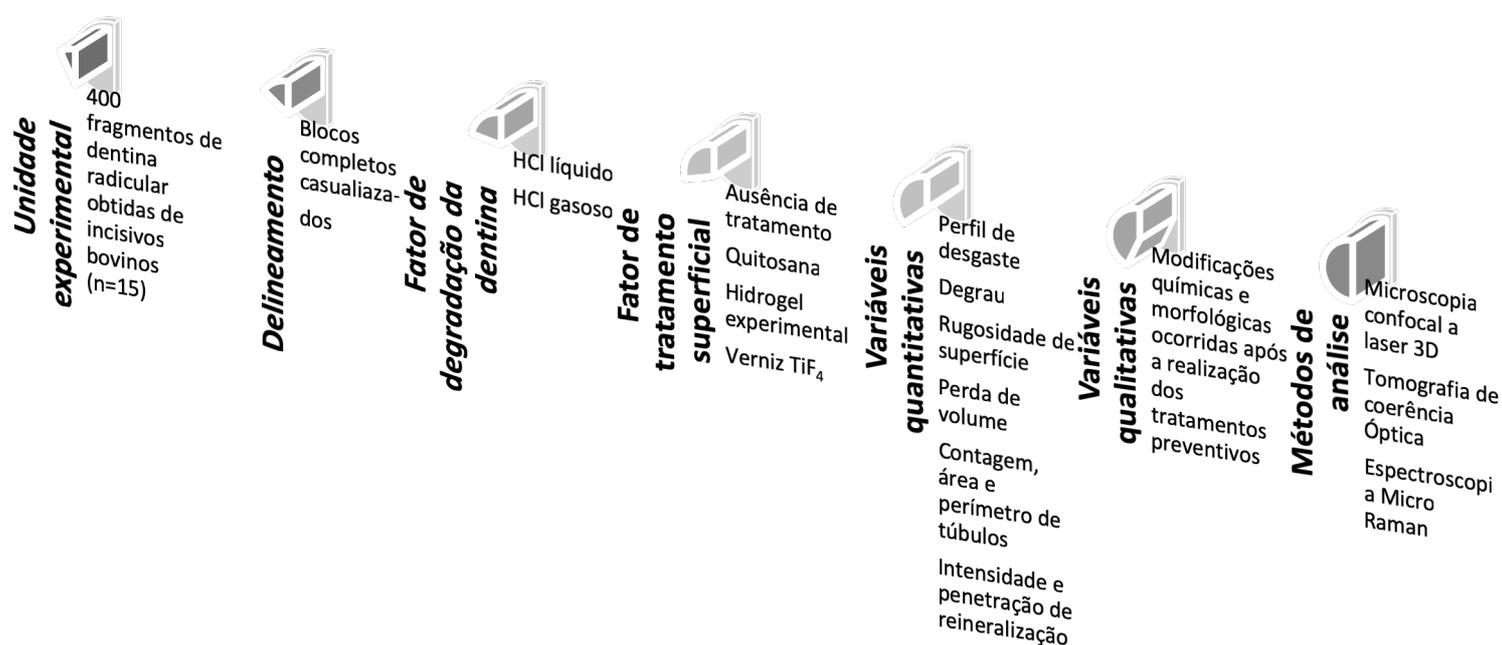
O estudo foi realizado de acordo com o delineamento em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta quantitativa foram o perfil de desgaste, degrau, perda de volume, rugosidade de superfície, contagem do número/área/perímetro dos túbulos dentinários por meio da microscopia confocal a laser 3D e a intensidade do brilho adimensional e profundidade da remineralização pela tomografia de coerência óptica (n=5). As alterações químicas da superfície da dentina foram avaliadas qualitativamente por espectroscopia Micro Raman (n=5) (Figura 1).

Seleção da Amostra

Para obtenção dos espécimes (Figura 2), foram selecionados incisivos bovinos íntegros armazenados, previamente, em solução de formol a 2% com pH 7,0. Os dentes com presença de trincas, manchas hipoplásicas ou acentuado desgaste foram descartados. Após a limpeza adequada dos espécimes, os incisivos bovinos foram fixados com cera escultura (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil) em uma placa de acrílico para serem

levados posteriormente a uma máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, USA) para separar a coroa da raiz com um disco diamantado (Buehler®, Diamond Wafering Blade, Serie 15HC Diamond, Arbon Size ½ - 12,7cm, 10cm x 0,3mm) refrigerado por água. A secção foi realizada na junção amelocementária para obter fragmentos de dentina radicular com dimensões de 3 x 3 x 2 mm da região cervical da raiz dos incisivos bovinos.

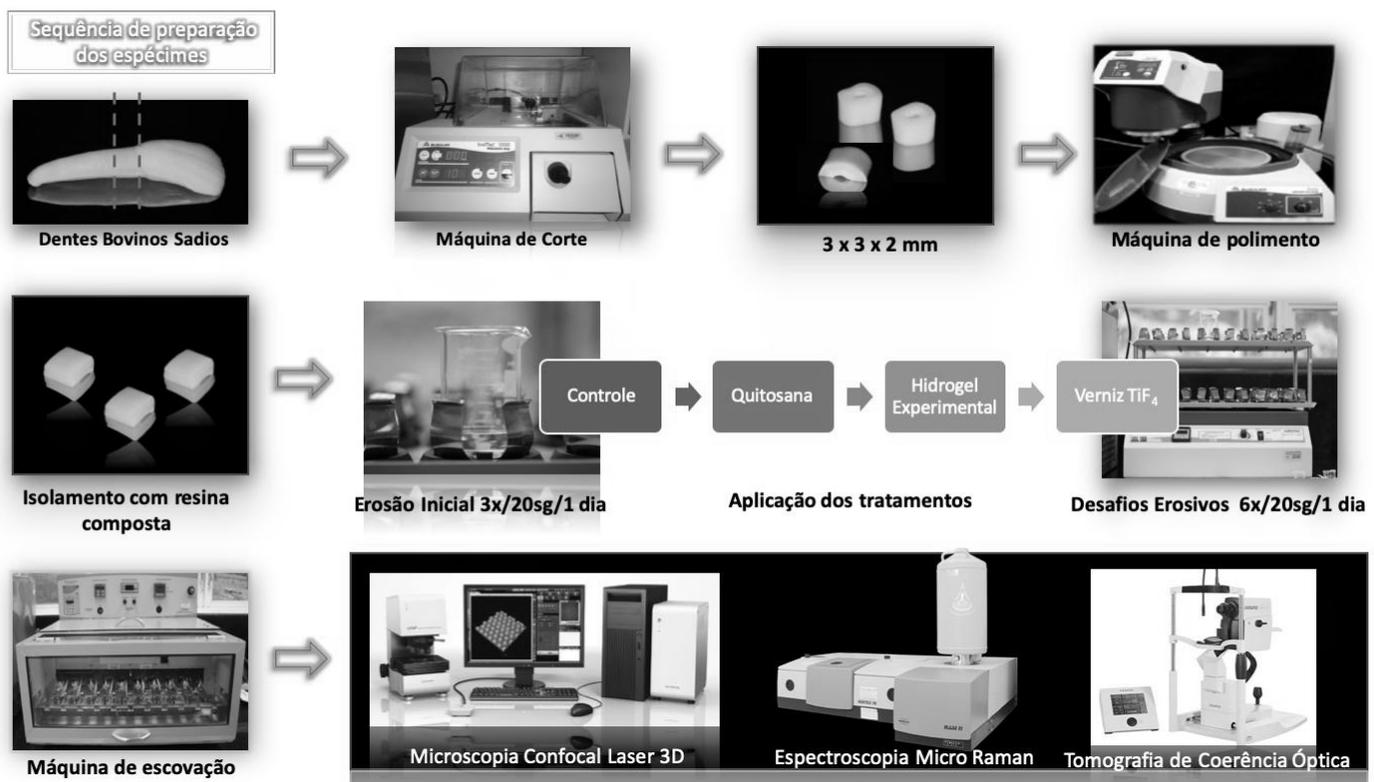
Figura 1. Delineamento representativo deste estudo.



Fonte: Delineamento fornecido pelo autor deste trabalho.

Em seguida, os fragmentos de dentina foram fixados em cilindros de resina acrílica para a realização da planificação e remoção do cemento radicular com lixa de óxido de alumínio de granulação #600 e #1200 (Norton Abrasivos Ltda, São Paulo, Brasil) com o auxílio da politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Ao final da planificação e remoção do cemento, os espécimes foram imersos em água deionizada, sob ação do ultrassom (Ultrasonic Cleaner T-1449-D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 5 minutos para lavagem e remoção de resíduos.

Figura 2. Esquema da sequência preparatória dos espécimes neste estudo.



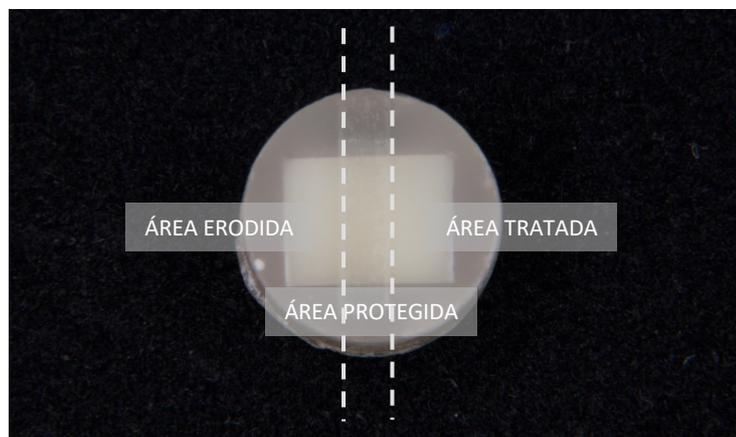
Fonte: Esquema fornecido pelo autor deste trabalho.

Impermeabilização dos Espécimes

Para o processo de impermeabilização dos fragmentos de dentina radicular utilizou-se a resina composta (Filtek™ Z350, cor A1, 3M ESPE, USA) sem a aplicação de sistema adesivo (Figura 3). Neste procedimento foi utilizada uma matriz confeccionada para padronizar o formato da resina que envolve o fragmento de dentina em todas as amostras. A polimerização da resina composta foi efetuada por meio do fotopolimerizador Poly Wireless (Kavo, Joinville, Santa Catarina, Brasil) com 1100 mW/cm² por 20 segundos (Faraoni *et al.*, 2018).

A impermeabilização foi efetuada com o intuito de proteger todas as faces do fragmento com resina composta durante o desafio erosivo, exceto uma parte da face externa (3 mm) que permaneceu sem resina. A parte central desta face foi coberta com resina composta para ser utilizada posteriormente como referência de dentina hígida (1 mm).

Figura 3. Esquema de preparação da amostra.



Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

Erosão inicial e Seleção dos Fragmentos

Inicialmente os espécimes foram armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) por 2 horas a 37 °C, em seguida estes espécimes foram submersos individualmente em 5 ml de ácido clorídrico (HCl) líquido (pH 1,2; 0,1 Molar) em uma concentração de 0,3 % a 37 °C pelo tempo de 20 segundos, sob agitação de 40 rpm em mesa agitadora (Orbital CT-155, Cientec Equipamentos, São Paulo, Brasil). Foram realizadas 3 exposições em ácido clorídrico líquido, e entre cada exposição, os espécimes foram armazenados em saliva artificial a 37 °C pelo período de 1 hora (Faraoni *et al.*, 2018). A quantidade de saliva artificial utilizada foi de 5 ml para cada espécime.

Análise Inicial

Após o ciclo de erosão inicial, os espécimes foram armazenados em saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) a 37 °C por 12 horas para posteriormente serem realizadas análises morfológicas da superfície em microscópio confocal a laser 3D (LEXT OLS4000, Olympus, Tóquio, Japão). Para cada espécime foram capturadas duas imagens em uma área central

padronizada que compõe o *baseline*. Os espécimes que apresentarem trincas, malformações na superfície ou túbulos dentinários obliterados foram substituídos.

Após a seleção dos espécimes, estes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (n=60) de acordo com o tratamento a ser realizado. Para a tomografia de coerência óptica (n=5) e Micro Raman (n=5) foram realizadas leituras após a aplicação do tratamento.

Após a seleção de 240 espécimes, os mesmos foram aleatoriamente divididos entre os diferentes grupos experimentais, conforme descrito abaixo:

Grupos Experimentais

- **G1:** grupo controle;
- **G2:** hidrogel de quitosana;
- **G3:** hidrogel experimental;
- **G4:** verniz à base de 4% TiF₄.

Subgrupos Experimentais

- **A:** com abrasão;
- **SA:** sem abrasão.

Tratamentos Superficiais

Os espécimes foram tratados de acordo com os seus subgrupos da seguinte maneira:

- **Grupo 1:** Grupo controle (sem aplicação de tratamento)

Ausência de tratamento.

- **Grupo 2:** Aplicação do hidrogel de quitosana

A quitosana 1,5% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em hidrogel foi aplicada nos espécimes experimentais com o auxílio de um *microbrush* ativamente por 10

segundos e mantido sobre o espécime em uma fina camada de gel até completar o período de 4 minutos. Em seguida o gel foi cuidadosamente removido com cotonete.

- **Grupo 3:** Aplicação do hidrogel experimental (sigilo Patente submetida)

O hidrogel experimental foi aplicado nos espécimes experimentais com o auxílio de um *microbrush* ativamente por 10 segundos e mantido sobre o espécime em uma fina camada de gel até completar o período de 4 minutos. Em seguida o gel foi cuidadosamente removido com cotonete.

- **Grupo 4:** Aplicação de verniz de TiF₄

Verniz de TiF₄ (FGM/Dentscare, Brasil): Os espécimes experimentais receberam a aplicação de uma camada de aproximadamente 2 mm de verniz com o auxílio de um *microbrush*. Após o tempo de secagem de 1 minuto, os espécimes foram imersos em saliva artificial por 6 horas. O verniz foi cuidadosamente removido antes da sua mensuração pela microscopia confocal a laser 3D.

No final destes tratamentos, todas as amostras foram mantidas em saliva artificial a 37 °C. A seguir, as amostras de todos os grupos foram divididas em dois subgrupos de acordo com a presença de abrasão (com ou sem) e subdivididos de acordo com o tipo de desafio erosivo.

Desafios Erosivos

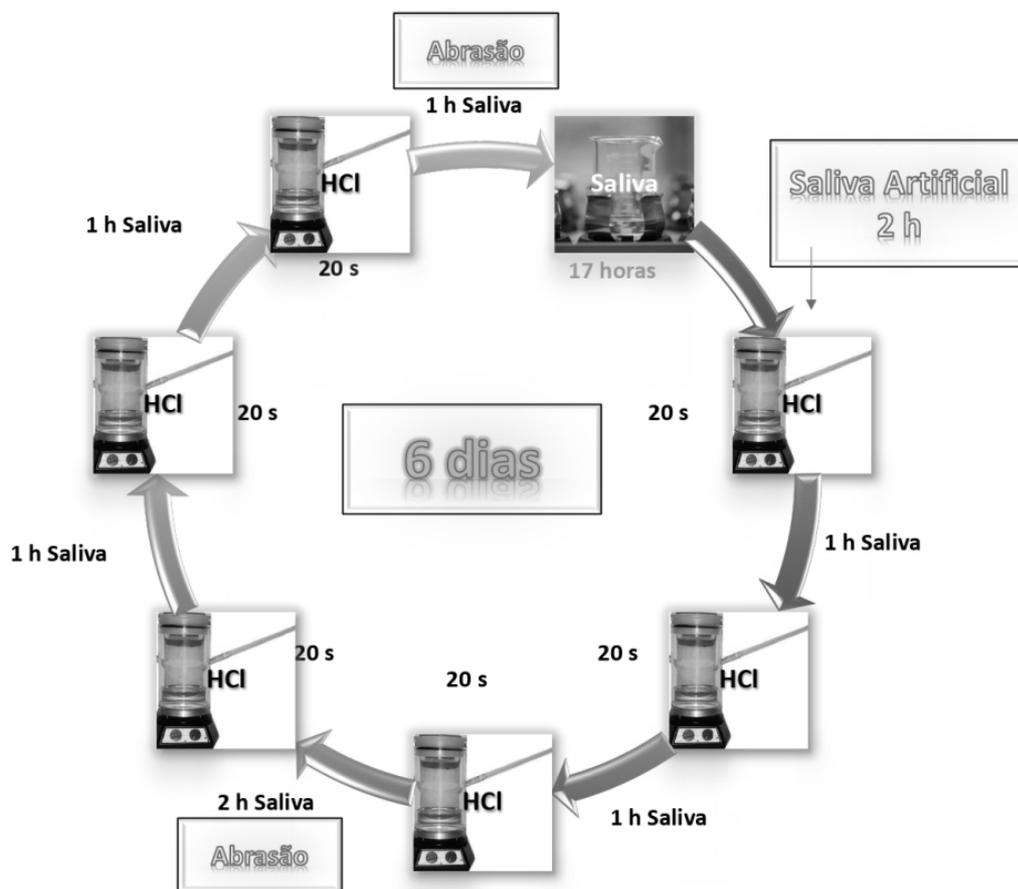
Os espécimes foram individualmente armazenados em 5 ml de saliva artificial a 37 °C por 2 horas e depois cada grupo foi exposto aos desafios erosivos (HCl na forma líquida ou gasosa) associado ou não ao fator abrasão (com ou sem abrasão) (Faraoni *et al.*, 2018).

Ciclo Erosivo

- **HCl na forma líquida:** Para a erosão da dentina com ácido clorídrico (HCl) na forma líquida, os espécimes foram individualmente expostos a

HCl (pH 1,2) a 37 °C no período de 20 segundos em 1 ATM de pressão atmosférica. A exposição dos espécimes ao gás de HCl foi realizada por meio de um dispositivo que controla a temperatura do gás de HCl. Para produzir o gás, foi aquecido 500 ml de solução de HCl com concentração de 15,84 % (Derceli, 2014). A solução foi aquecida e o pH foi controlado com auxílio de uma fita de papel indicador pH Acilit® (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemanha). A exposição foi realizada 6 vezes ao dia, durante 6 dias, e a solução de HCl foi trocada diariamente para garantir as condições ideais do gás. Após a exposição ao ácido, os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial a 37 °C pelo intervalo de 1 hora, entre cada exposição, e de um dia a outro ao final de cada ciclo de degradação (Faraoni *et al.*, 2018), sendo a saliva trocada diariamente para mimetizar o ambiente bucal (Figura 4).

Figura 5. Esquema dos desafios erosivos em HCl gasoso.



Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

Erosão associada à abrasão

Metade dos espécimes foram submetidos ao processo de abrasão, que foi realizada com escovas dentárias (Oral-B, São Paulo, Brasil) de cabeça pequena e cerdas macias, as quais simularam a técnica rotacional de escovação. As escovas foram colocadas em um dispositivo para padronizar a posição e altura da escova em relação ao fragmento. Após posicionar os espécimes perpendicularmente às cerdas da escova dental, 0,5 ml de gel dental (Cocoricó, Bitufo, São Paulo, Brasil) (sem flúor e com sílica abrasiva) foi colocado entre cada fragmento e a escova dental (previamente umedecida com água deionizada). Durante a escovação foi aplicada uma força de 200 gf com peso colocado sobre a cabeça da escova. Foram realizadas 2 escovações por dia, durante 20 segundos, sendo os espécimes escovados a cada 3 exposições ao ácido HCl. Após a escovação, os espécimes foram lavados com água deionizada e armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial (Amaechi *et al.*, 1999) a 37°C pelo intervalo de 1 hora, após a primeira escovação, e de um dia a outro após a segunda escovação (Faraoni *et al.*, 2018), sendo a saliva trocada diariamente.

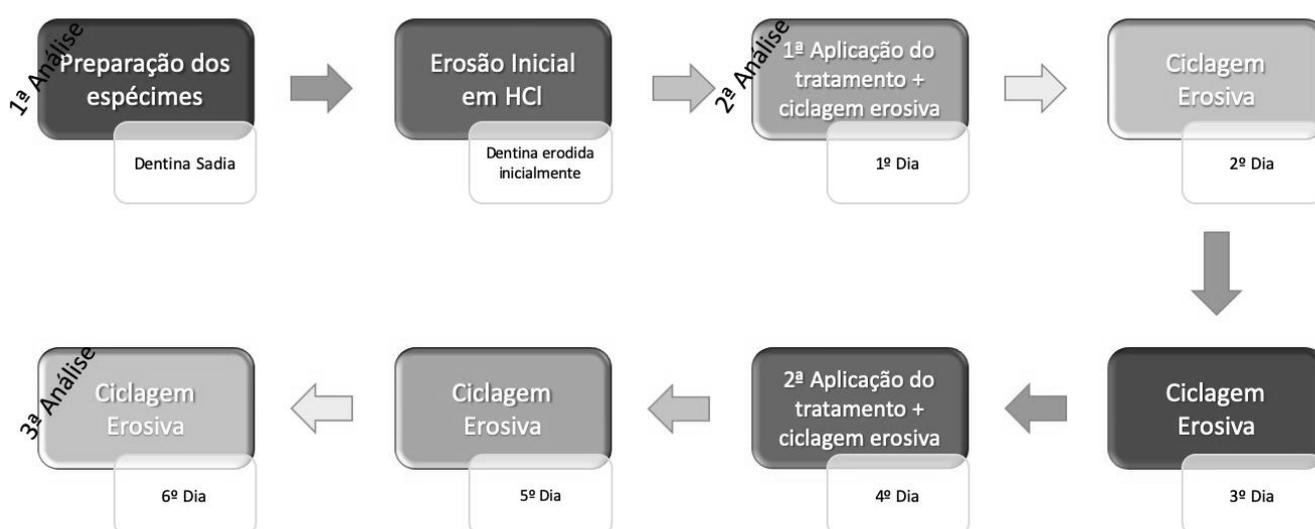
A escovação foi realizada entre a 3^o e a 4^o exposição ao HCl, com intervalo de 1 hora entre os desafios e após a 6^o exposição ao HCl e 1 hora na saliva. Para os grupos sem escovação, o intervalo foi de 2 horas entre a 3^o e a 4^o exposição ao HCl para manter o mesmo tempo de intervalo (Faraoni *et al.*, 2018). Para realizar as análises, a resina composta colocada sobre a dentina hígida (referência) foi removida delicadamente. Em seguida, foi realizada a limpeza dos espécimes com ultrassom (Ultrasonic Cleaner T – 1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 5 minutos, e então os espécimes foram lavados com água deionizada. Os tratamentos foram repetidos 2 vezes durante todo o processo erosivo, sendo 1 antes da ciclagem erosiva e outra no início do 4^o dia de ciclagem (Figura 5).

Análises Realizadas

Microscopia Confocal a Laser 3D

Após os desafios erosivos/abrasivos em HCl líquido/gasoso e tratamentos preventivos, a resina composta isolante foi removida delicadamente com auxílio de um alicate expondo a área referêcia. O fragmento foi posicionado sobre a mesa do microscópio confocal a laser 3D (LEXT OLS4000®, Olympus, Tokyo, Japão) no qual foram capturadas as imagens através de um laser semiconductor ($\lambda = 405 \text{ nm}$) presente no microscópio. As imagens foram analisadas por meio de software OLS 4000. As áreas mais re-

Figura 6. Sequência de análises realizadas.



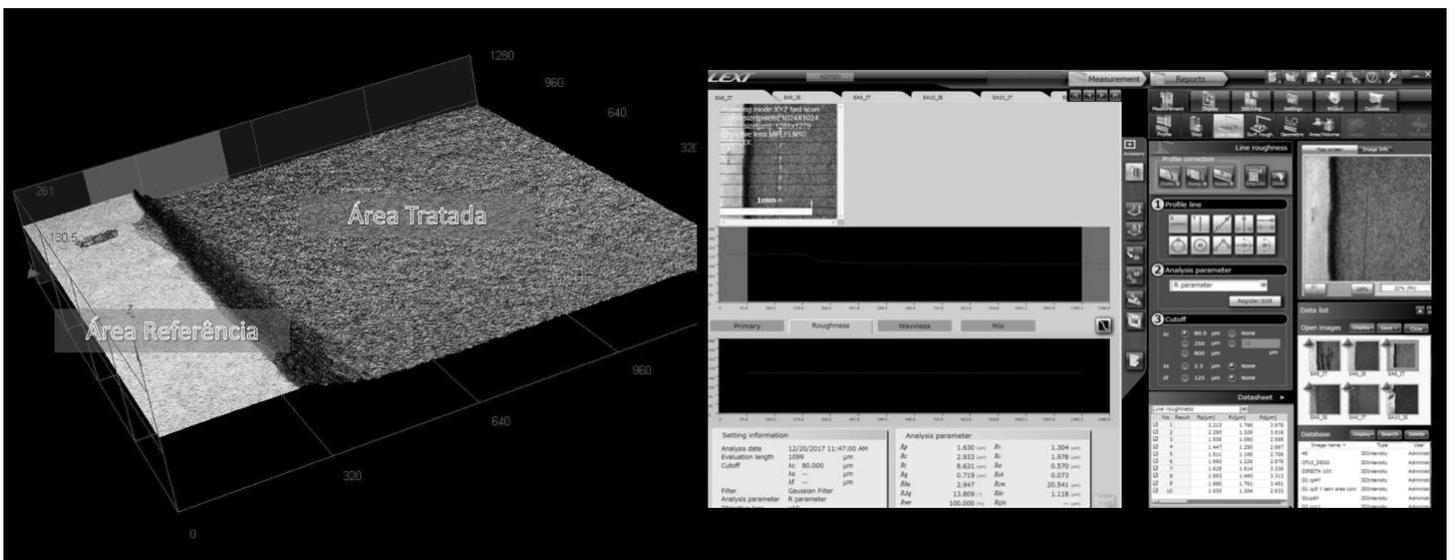
Fonte: Foto fornecida pelo autor deste trabalho.

presentativas foram gravadas por meio de zoom óptico. Após a aquisição das imagens, estas foram analisadas quanto ao perfil de desgaste, degrau, perda de volume, rugosidade de superfície e contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários.

- Para a análise do perfil de desgaste foram realizadas leituras englobando a área hígida (referência) e a área erodida. O perfil de desgaste foi determinado pela distância em micrômetros entre a linha média do gráfico e a linha de desgaste (área erodida).

○ Para a análise da perda de volume foi traçado um plano baseado na área hígida (referência) e toda a estrutura perdida abaixo desse plano foi calculada em μm^3 . Esta análise determina a quantidade de tecido mineralizado perdido durante os processos erosivos ou erosivos/abrasivos. Para manter a mesma proporção para todos os espécimes empregou-se a razão do volume de estrutura perdida (μm^3) pela área (μm^2) de dentina degradada.

Figura 7. Figura representativa da análise do perfil de desgaste (μm) realizada.

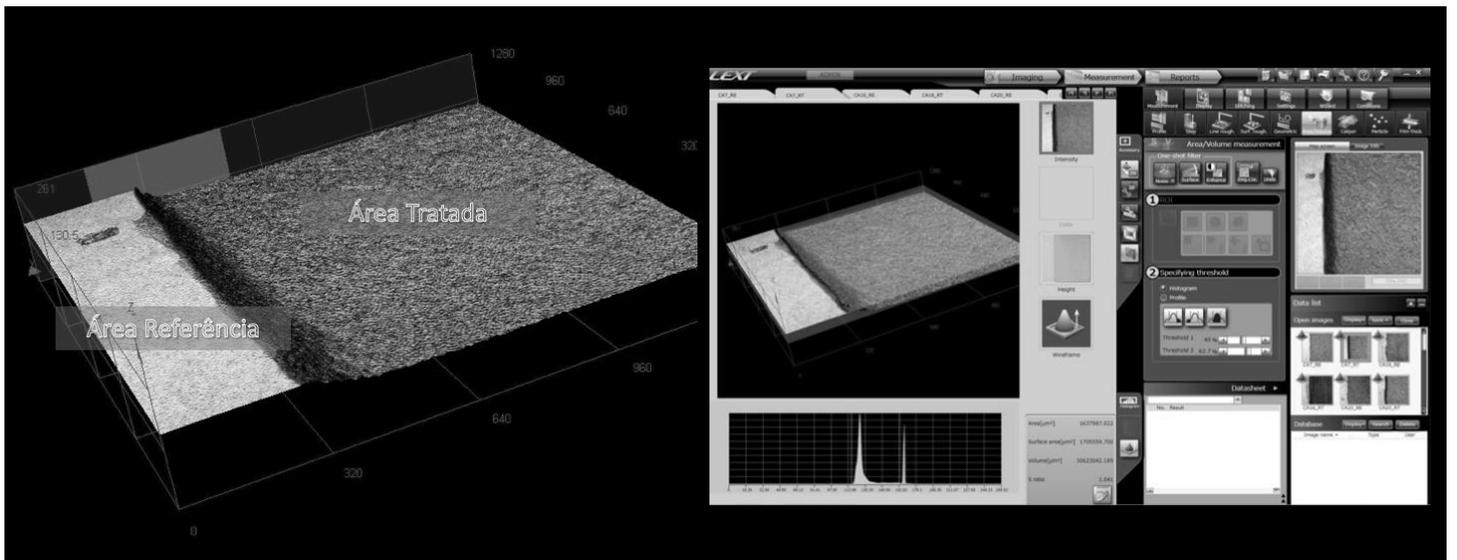


Área Referência: corresponde a dentina sadia protegida por resina composta. **Área Tratada:** corresponde a região da dentina submetida aos ciclos erosivos e aplicações dos tratamentos (107x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

○ Para a análise do degrau, foram realizadas leituras desde a borda da área hígida (referência) até o ponto mais baixo da área erodida (altura μm). Essa mensuração determina o degrau formado pelo substrato dentinário bem como o volume perdido.

○ Para a análise de rugosidade, foram realizadas leituras na área hígida (referência) e leituras na área erodida (μm). Esta análise determina se os tratamentos promoveram distintos padrões de texturas na superfície.

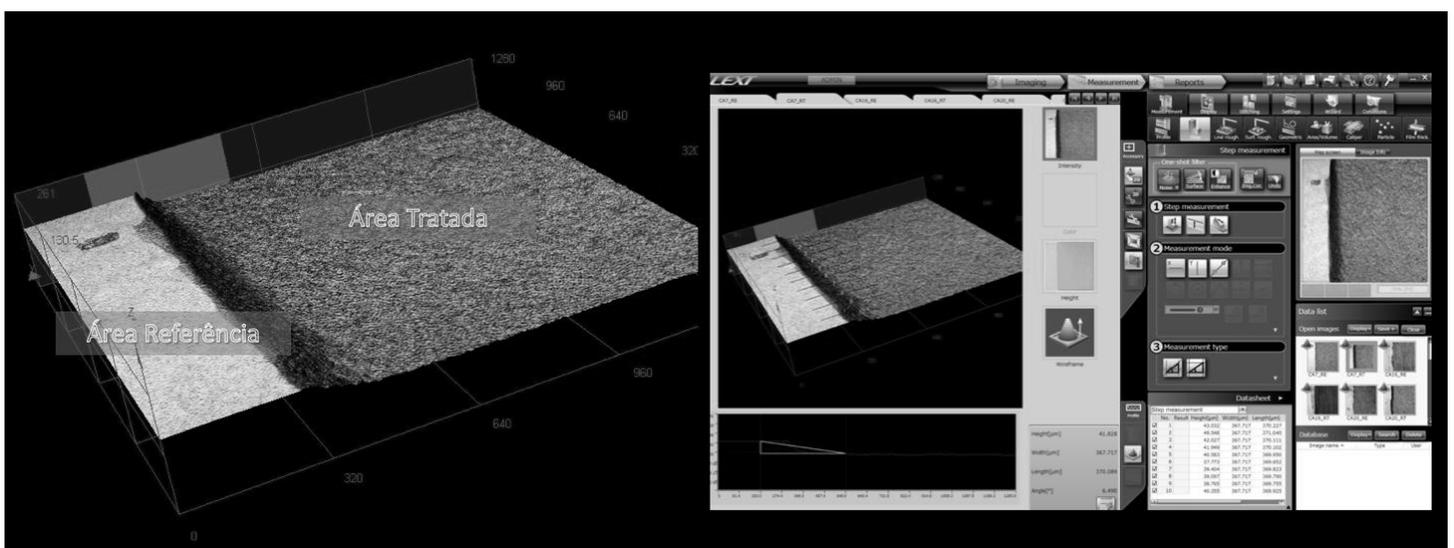
Figura 8. Figura representativa da análise de perda de volume (μm^3) realizada.



dos tratamentos (107x de aumento). Fonte: foto fornecida pelo autor.

- Para as análises de contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários, realizou-se a captação das imagens com objetiva de 100x em uma região padronizada na dentina inicialmente erodida e após a aplicação do tratamento. Estas análises determinaram a morfologia da superfície dentinária, se os tratamentos promoveram o fechamento de túbulos ou diminuição do perímetro e volume dos túbulos dentinários.

Figura 9. Figura representativa da análise de degrau (μm) realizada.



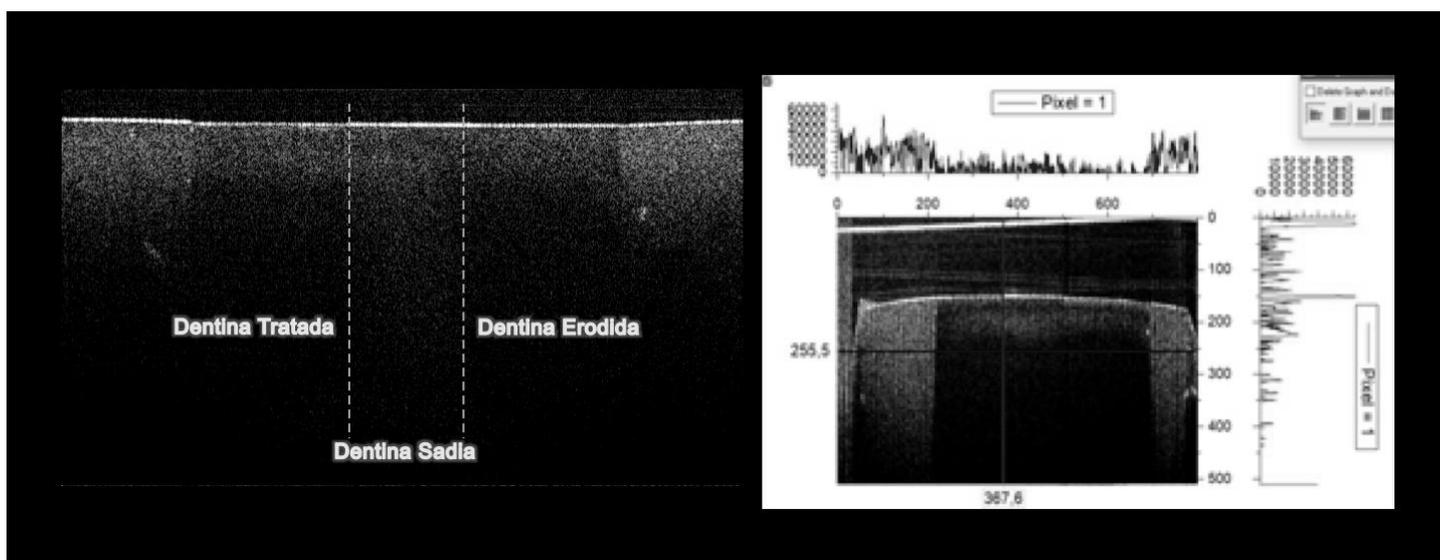
Área Referência: corresponde a dentina sadia protegida por resina composta.

Tomografia de coerência óptica (OCT)

Foram realizadas análises em 5 espécimes de cada grupo (n=5). A medição da profundidade e área de remineralização após o processo erosivo/abrasivo, bem como o coeficiente de atenuação óptica, foi realizado utilizando um sistema de tomografia de coerência óptica (OCT - OCP930SR, Thorlabs Inc., Newton, NJ, EUA), com 2 mW de potência óptica, comprimento de onda central de 930 nm, largura de banda espectral de 100 nm, resolução axial de 4,0 μm e lateral de 6,0 μm .

O posicionamento de cada linha de varredura foi padronizado e mantido durante todos os experimentos. As imagens tomográficas obtidas (B-scan) foram analisadas pelo software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA), que permite definir uma região de interesse, bem como a área e a profundidade das lesões. A média do coeficiente de atenuação óptica de cada B-scan foi analisada usando um algoritmo desenvolvido em LabView 8 (National Instruments, Austin, TX, EUA), no qual foi utilizada uma equação semelhante à lei de Beer-Lambert para calcular o coeficiente de atenuação óptica. a intensidade da luz retrodifundida em função da profundidade da amostra (Cara *et al.*, 2014).

Figura 12. Figura representativa na análise de intensidade e profundidade de remineralização dentária.



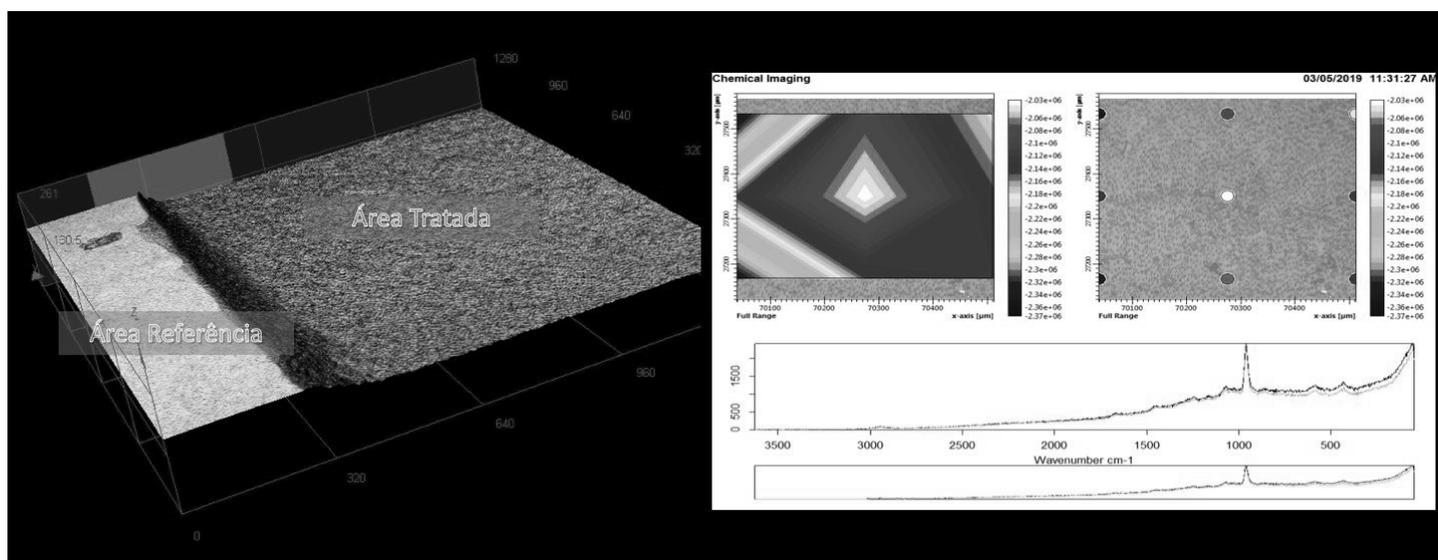
Espécime dividido em: dentina tratada, dentina sadia e dentina inicialmente erodida.

Fonte: foto fornecida pelo autor.

Análises na Espectroscopia Micro Raman

As medições foram realizadas em temperatura ambiente por meio de um microscópio Raman dispersivo SENTERRA II (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha). O espectro Raman foi medido com um sistema micro Raman com uma fonte de laser 785 nm e foi registrado de 400 a 2000 cm^{-1} , com 25 mW e objetiva de 10x com o aumento final de 100x. Os espectros foram adquiridos em posições correspondentes a intervalos de 0,5 μm na interface entre a área de controle e a área tratada, usando o estágio x-y-z controlado por computador com uma largura de passo mínima de 50 nm. Os espectros Raman foram coletados ao longo de três varreduras de linha para cada amostra de 20 μm de comprimento, com espaço de 10 μm entre as linhas.

Figura 13. Figura representativa da análise das ligações químicas dos espécimes.



Mensuração das ligações químicas por meio da espectroscopia Micro Raman. Fonte: foto fornecida pelo autor.

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise em MEV, transformamos o hidrogel experimental em membrana e testamos sobre os espécimes (n=15) seguindo o mesmo modelo de

ciclo erosivo deste estudo. Após o ciclo erosivo, a dentina foi imersa em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de sódio por 12 horas a 0,1M com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) em temperatura de 4°C. Seguida de lavagem com água deionizada, por 1 hora. A desidratação dos espécimes ocorreu por meio da embebição dos mesmos em diferentes concentrações de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil) por um período pré-determinado (25% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 75% por 20 minutos, 90% por 30 minutos e 100% por 1 hora). Imersão em solução de HMDS (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos, seguida de secagem com papel absorvente.

A fixação dos espécimes em stubs foi realizada por meio de fita adesiva de carbono dupla-face (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA) e cobertura com carbono em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, FL9496, Balzers, Liechtenstein). As morfologias e localizações dos precipitados foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM; Sirion 200, FEI Co, EUA), as margens (diferentes aumentos) foram realizadas para análise visual da superfície da dentina.

Análise de dados

Para a análise quantitativa (degrau, perda de volume, perfil de desgaste, rugosidade, contagem, área e perímetro dos túbulos dentinários, intensidade e profundidade de remineralização) foi realizada a distribuição dos dados que apresentaram-se normais e homogêneos, em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois critérios e teste de Tukey para diferenciação das médias com nível de significância de $\alpha=5\%$. Para a análise qualitativa (ligações químicas e morfológicas) foi realizada a análise descritiva dos dados. O software SPSS Statistics 17 foi empregado para a avaliação dos espécimes.

Resultados

4. RESULTADOS

Foi realizada a análise comparativa do processo erosivo com ácido HCl líquido e gasoso e observou-se que para o perfil de desgaste, perda de volume e degrau houve diferença significativa entre os desafios erosivos do HCl na forma líquida e gasosa. Desta forma, optou-se por realizar a análise individual em cada grupo.

Ácido clorídrico gasoso

Perfil de Desgaste

Para a análise de perfil de desgaste, no *fator tratamento* o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p=0,97$) e verniz TiF_4 ($p=0,99$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p<0,001$). O grupo experimental apresentou menor perfil de desgaste e foi estatisticamente diferente dos outros grupos ($p<0,001$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p<0,001$). Na Tabela 1, observou-se que todos os subgrupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p<0,05$), com exceção do grupo experimental que foi semelhante nas duas situações ($p>0,05$). Para os espécimes sem abrasão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$). Contudo, para a abrasão, o grupo experimental foi estatisticamente diferente do verniz ($p<0,05$) e semelhante aos outros grupos ($p>0,05$).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores de perfil de desgaste (μm) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	0,57±0,33 ABa	0,19±0,06 Ab
	Quitosana	0,56±0,34 ABa	0,13±0,14 Ab
	Experimental	0,25±0,17 Ba	0,03±0,19 Ab

	Verniz TiF₄	0,62±0,58 Aa	0,10±0,16 Aa
--	-------------------------------	--------------	--------------

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Perda de volume

Para a análise de perda de volume, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p>0,05$) ($p=0,13$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental e o verniz ($p<0,001$). O grupo experimental foi semelhante ao verniz ($p>0,05$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p<0,001$). Na Tabela 2, observou-se que todos os subgrupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p<0,05$). Para os subgrupos sem abrasão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$). Contudo, para os espécimes com abrasão, o grupo experimental foi estatisticamente diferente do controle e quitosana ($p>0,05$), e semelhante ao verniz ($p>0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de perda de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
Erosivos	Controle	3,08E7±7,78E6 Aa	9,70E6±3,69E6 Ab
	Quitosana	2,73E7±7,13E6 ABa	5,88E6±4,25E6 Ab
	Experimental	1,693E7±8,70E6 Ca	2,80E6±6,32E6 Ab
	Verniz TiF₄	2,079E7±8,36E6 BCa	3,71E6±2,81E6 Ab

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

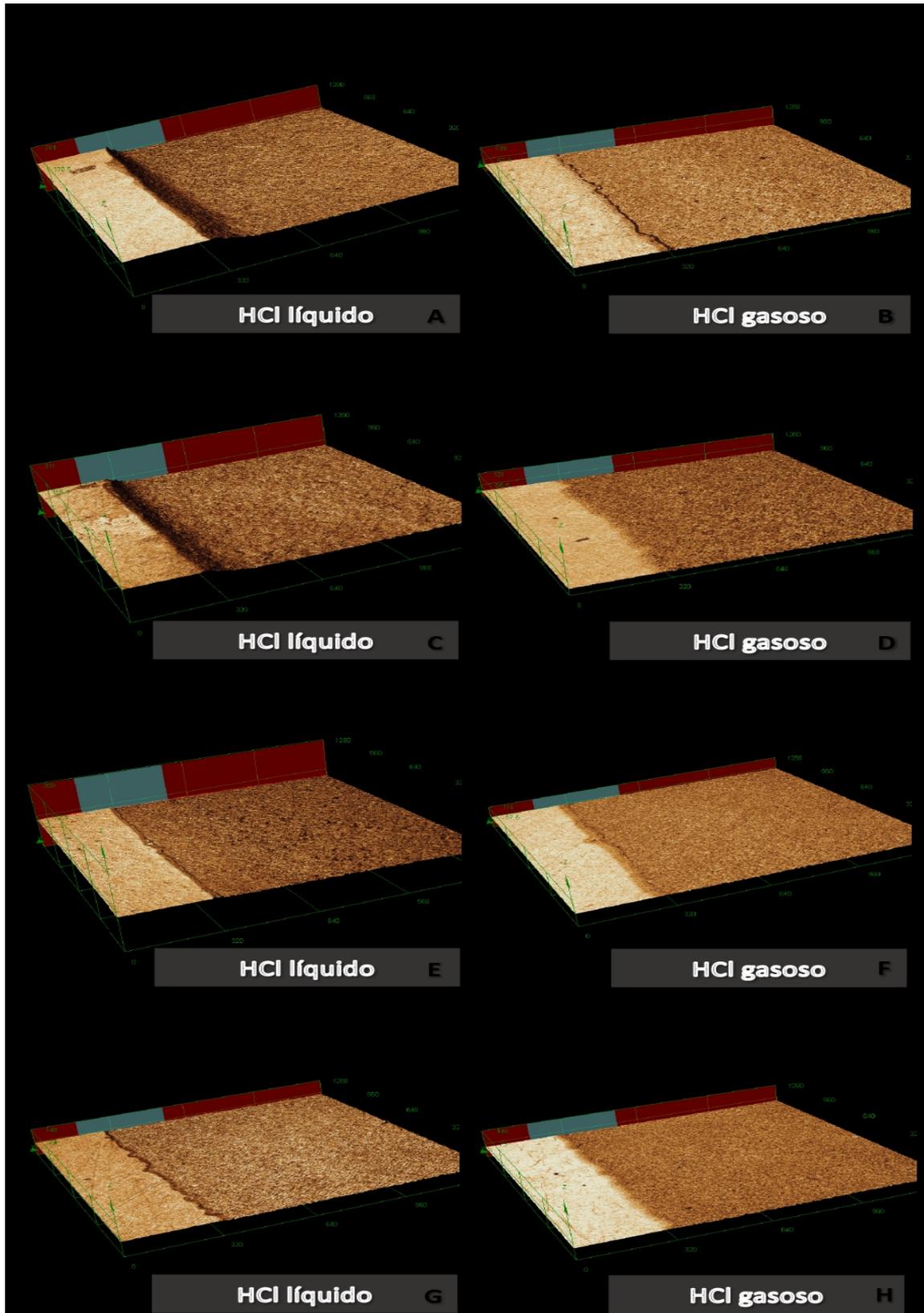


Figura 14. Análise do perfil de desgaste, perda de volume, degrau por Microscopia Confocal a Laser 3D. A) Grupo controle (sem tratamento) tratado com HCl líquido e gasoso; B) Grupo hidrogel de quitosana tratado com HCl líquido e gasoso; C) Grupo

hidrogel experimental tratado com HCl líquido e gasoso; D) Grupo verniz de TiF_4 tratado com HCl líquido e gasoso.

Na Figura 14, observa-se que o processo erosivo com HCl líquido promoveu a perda de estrutura dentinária mais intensamente do que para o processo erosivo com HCl gasoso.

Degrau

Para a análise de degrau, observou-se que no *fator tratamento* o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos experimental ($p < 0,001$) e verniz ($p = 0,001$). A quitosana apresentou um comportamento semelhante ao grupo controle ($p = 0,77$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão apresentou menor degrau e foi estatisticamente diferente do subgrupo com abrasão ($p < 0,001$). Na Tabela 3, observou-se que todos os subgrupos apresentaram o degrau maior quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p < 0,05$). O grupo controle foi semelhante a quitosana ($p > 0,05$) e diferente dos grupos experimental e verniz ($p < 0,05$) que foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores de degrau (μm) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	38,87±6,78 Aa	23,86±5,82 Ab
	Quitosana	36,13±5,36 Aa	23,07±3,89 Ab
	Experimental	22,55±5,00 Ba	7,54±5,39 Bb
	Verniz TiF_4	25,53±14,96 Ba	10,39±1,88 Bb

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Rugosidade

Para a análise de rugosidade, o *fator tratamento* não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,005$) entre os grupos, sendo observado o mesmo comportamento para o *fator abrasão*, no qual não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,005$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores de rugosidade da superfície (S_a - μm) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	0,67 \pm 0,22 Aa	0,57 \pm 0,10 Aa
	Quitosana	0,67 \pm 0,24 Aa	0,70 \pm 0,16 Aa
	Experimental	0,64 \pm 0,09 Aa	0,65 \pm 0,10 Aa
	Verniz TiF₄	0,64 \pm 0,14 Aa	0,62 \pm 0,13 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

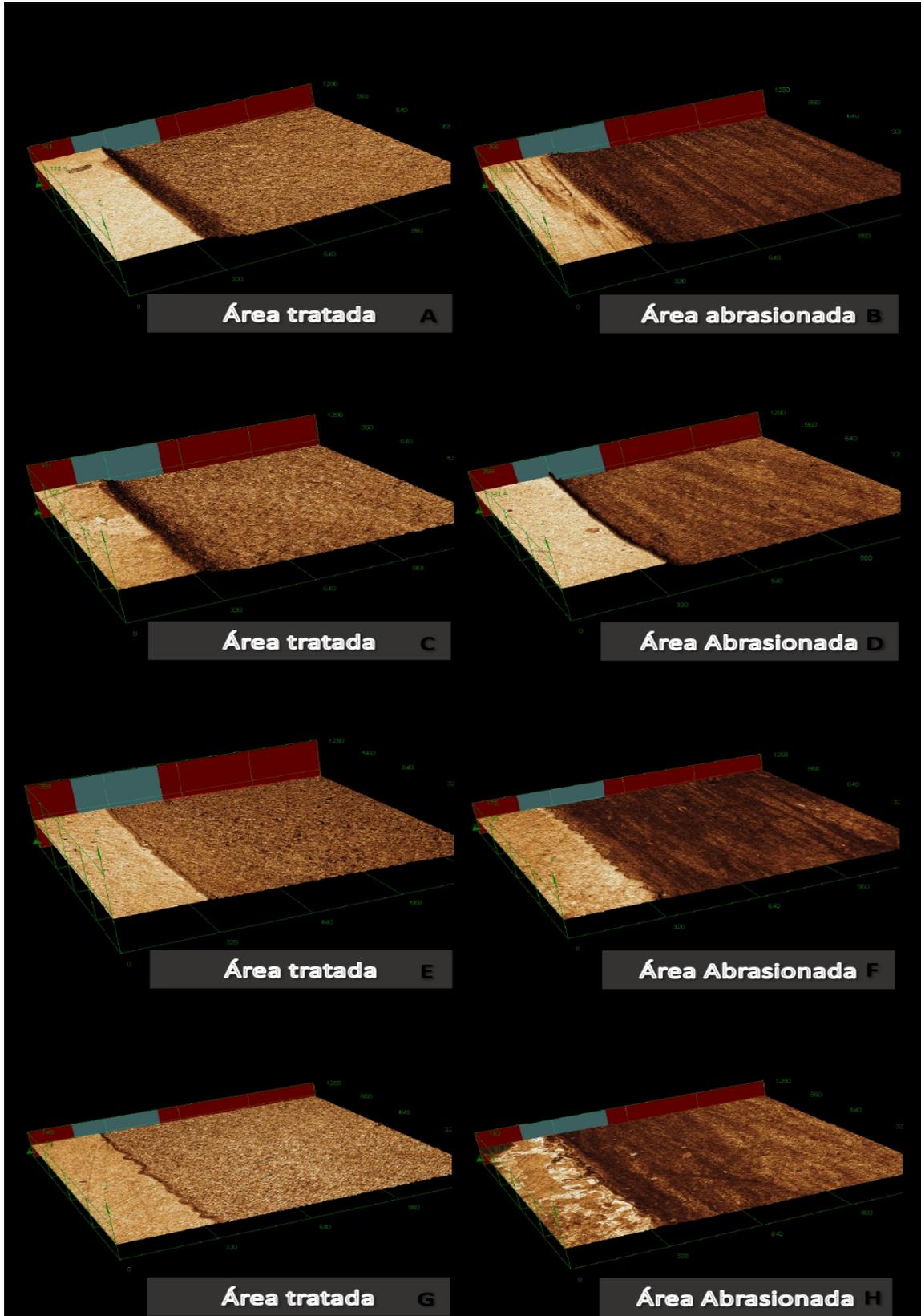


Figura 15. Análise do perfil de desgaste, perda de volume e degrau formado por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D. Interface entre a área referência e dentina após ciclo erosivo e interface entre a área referência e dentina com abrasão. A/B) Grupo

controle; C/D) Grupo hidrogel de quitosana. E/F) Grupo hidrogel experimental. G/H) Grupo verniz de TiF_4 .

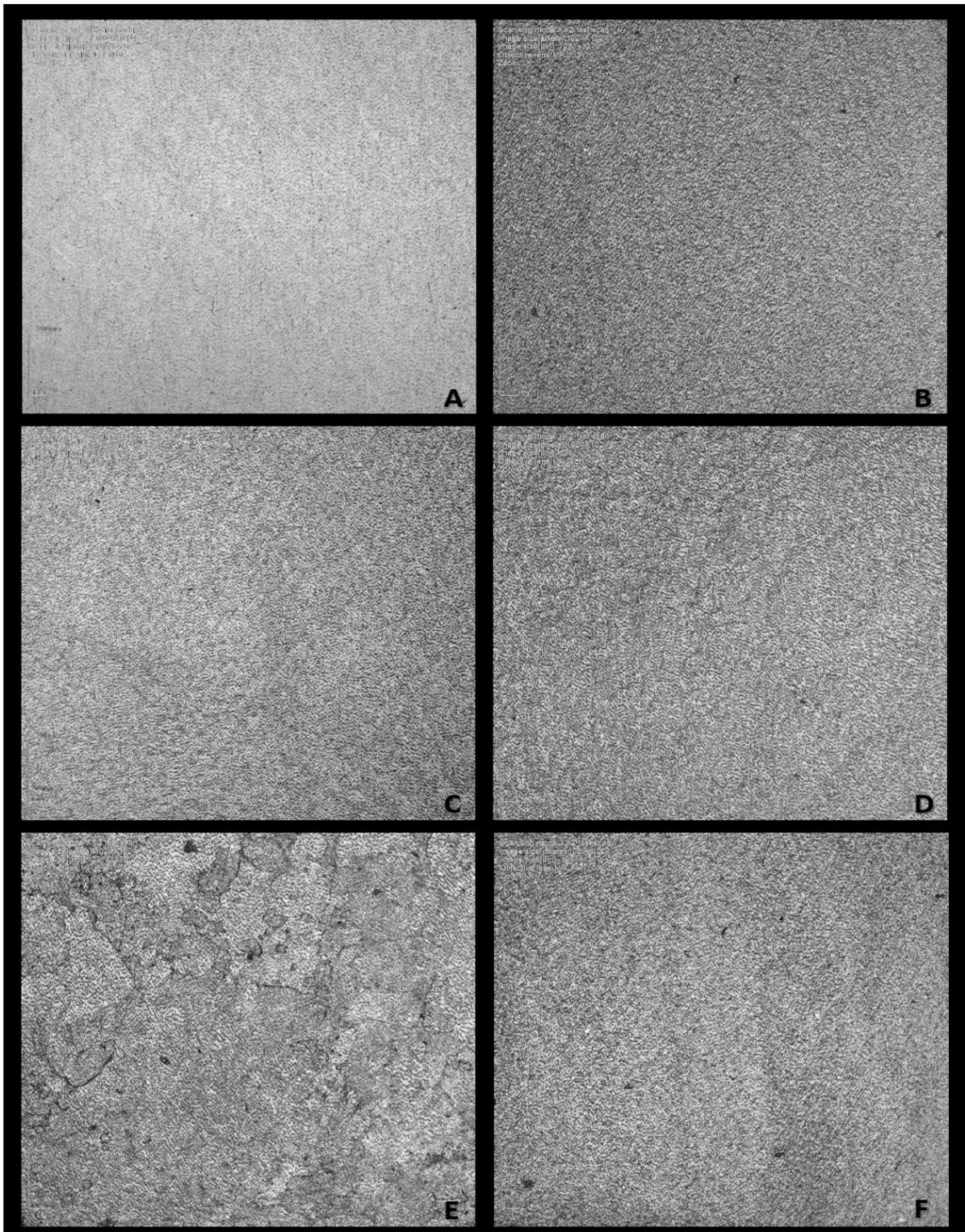


Figura 16. Análise rugosidade por Microscopia Confocal a Laser 3D. A) Dentina sadia; B) Dentina erodida; C) Grupo controle após ciclo erosivo (sem tratamento); D) Grupo quitosana após ciclo erosivo e tratamento com hidrogel de quitosana; E) Grupo

experimental após ciclo erosivo e tratamento com hidrogel experimental; F) Grupo verniz de TiF_4 após ciclo erosivo e tratamento com verniz de TiF_4 .

Contagem dos túbulos dentinários

Em relação as análises mensuradas dos túbulos dentinários expostos, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante a quitosana ($p=0,34$) e ao verniz ($p=0,70$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p<0,001$) que apresentou o maior número de túbulos dentinários ocluídos.

Para o *fator abrasão*, observou-se que o subgrupo sem abrasão foi estatisticamente semelhante ao subgrupo com abrasão ($p>0,05$). Na Tabela 5, observou-se que o grupo experimental foi estatisticamente diferente de todos os subgrupos ($p<0,05$) nas duas situações (com e sem abrasão).

Tabela 5. Média e desvio padrão do número dos túbulos dentinários expostos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos com e sem abrasão.

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	-64,33±125,36 Aa	32,47±90,62 Ab
	Quitosana	-55,47±87,80 Aa	-45,87±75,40 Aa
	Experimental	-205,13±57,39 Ba	-203,47±26,14 Ba
	Verniz TiF_4	4,53±59,75 Aa	8,53±83,28 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Área dos túbulos dentinários

Para a análise da área dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, o grupo controle foi semelhante ao verniz ($p=0,24$) e estatisticamente diferente do grupo experimental ($p<0,001$). Em relação a abrasão observou-se uma diferença significativa ($p=0,005$) entre o subgrupo com e sem abrasão. Na tabela 6 observou-se que todos os grupos apresentaram-se semelhantes estatisticamente ($p>0,005$) nos subgrupos com e sem abrasão e apenas nos espécimes não abradados que o

grupo experimental apresentou diferença estatística em relação aos grupos controle e verniz ($p < 0,05$).

Tabela 6. Média e desvio padrão da área (μm) dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos para os diferentes grupos com e sem abrasão.

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	-1,12 \pm 4,50 Aa	1,04 \pm 2,69 Aa
	Quitosana	-3,69 \pm 2,73 Ab	-1,34 \pm 1,86 AB
	Experimental	-2,35 \pm 2,67 Aa	-2,68 \pm 3,99 Ba
	Verniz TiF₄	-2,91 \pm 3,90 Ab	-0,32 \pm 2,86 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

Perímetro dos túbulos dentinários

Em relação ao perímetro dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, apenas o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p = 0,02$). A quitosana e o verniz apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle ($p = 0,93$). Para o *fator abrasão* não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão ($p < 0,05$). Na tabela 7, observou-se que apenas o grupo experimental promoveu uma diminuição do perímetro dos túbulos dentinários.

Tabela 7. Média e desvio padrão do perímetro (μm) dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	1,07 \pm 4,02 Aa	0,87 \pm 2,26 ABa
	Quitosana	-0,18 \pm 3,32 Aa	0,38 \pm 1,70 ABa
	Experimental	-1,02 \pm 3,76 Aa	-2,51 \pm 4,79 Ba
	Verniz TiF₄	-0,42 \pm 5,00 Aa	1,75 \pm 3,28 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0,05$).

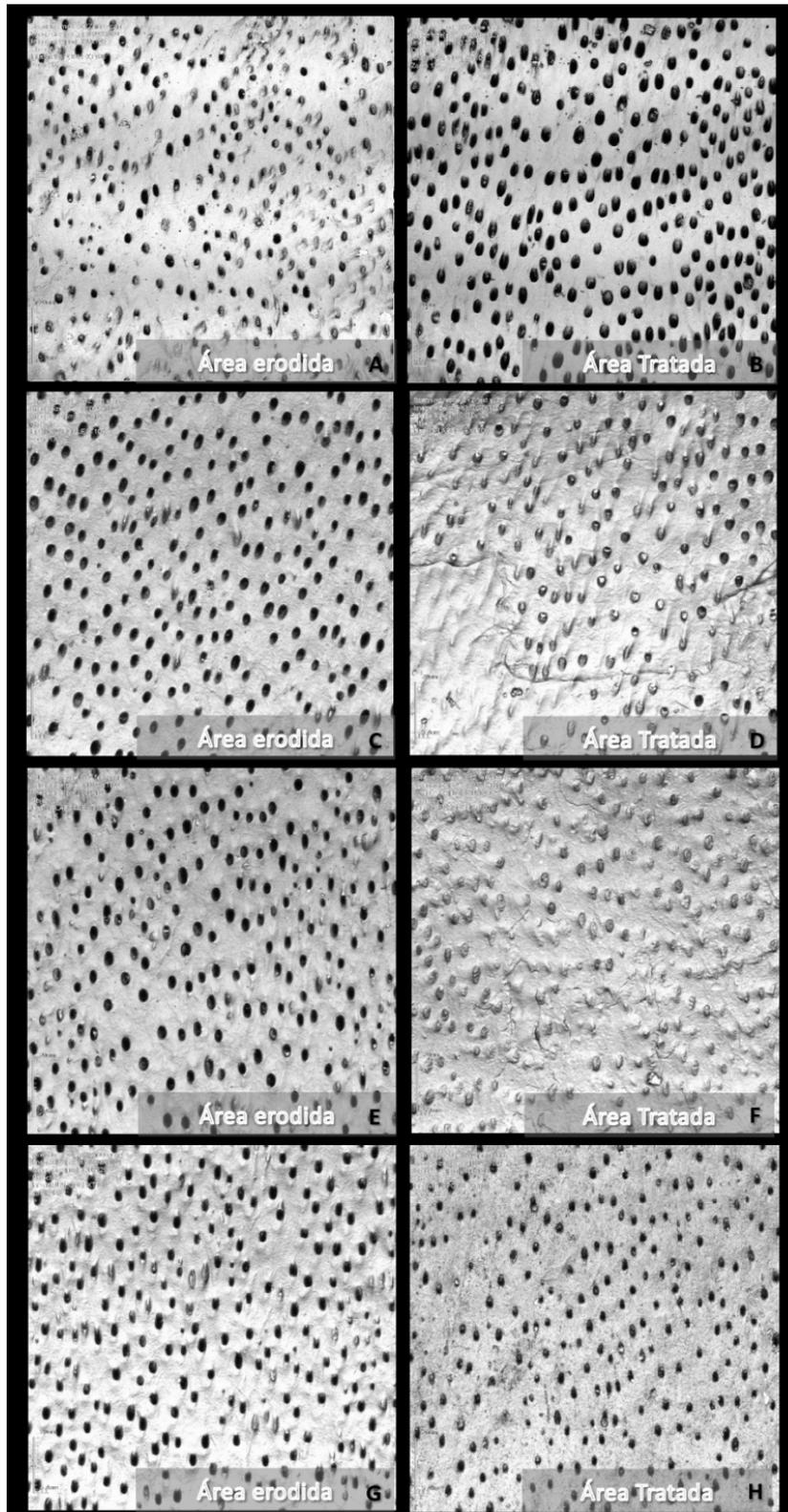


Figura 17. Análise da contagem, perímetro e volume dos túbulos dentinários por meio da Microscopia Confocal a Laser 3D. Interface entre a área referência e dentina erodida e interface entre a área referência e dentina após ciclo erosivo (controle - sem

tratamento); A/B) Grupo controle; C/D) Grupo hidrogel de quitosana. E/F) Grupo hidrogel experimental. G/H) Grupo verniz de TiF_4 .

Tomografia de coerência óptica

Para a análise de espessura superficial da mineralização, no *fator tratamento*, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Para o fator abrasão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 8).

Tabela 8. Média e desvio padrão da espessura superficial de mineralização nos diferentes grupos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Líquido	Controle	0,025±0,006 Aa	0,277±0,017 Aa
	Quitosana	0,029±0,012 Aa	0,032±0,014 Aa
	Experimental	0,045±0,016 Aa	0,04±0,022 Aa
	Verniz TiF_4	0,037±0,017 Aa	0,031±0,012 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Espectroscopia Micro Raman

Os dados mostraram na Figura 18 (erosão líquida) que o grupo hidrogel experimental apresentou picos referentes ao estiramento do grupo fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}) com maior intensidade sendo semelhante ao grupo dentina sadia. O grupo verniz apresentou os picos referentes ao fosfato (ν_1 960 cm^{-1} ν_4 582 cm^{-1}) com menor intensidade e formato alargado e os grupos controle e quitosana apresentaram picos menos intensos e semelhantes entre si no formato. O pico referente a amida I (1450 cm^{-1}) foi semelhante entre os grupos.

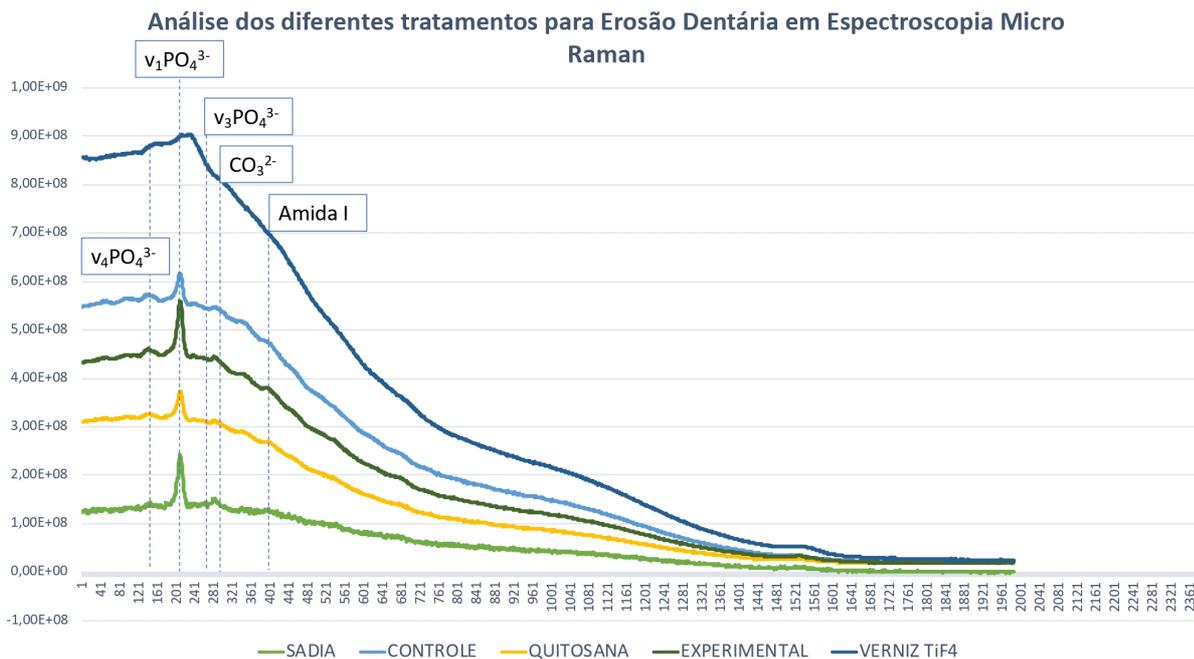


Figura 18. Gráfico dos diferentes tratamentos submetidos a erosão líquida pela Espectroscopia Micro Raman.

Ácido clorídrico gasoso

Perfil de Desgaste

Para a análise de perfil de desgaste, no *fator tratamento*, observou-se que o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p=0,68$) e diferente dos demais grupos ($p<0,05$). O verniz apresentou menor perfil de desgaste e foi estatisticamente diferente dos grupos controle e quitosana ($p<0,05$), porém foi semelhante ao grupo experimental ($p>0,05$).

Em relação ao *fator abrasão*, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre os subgrupos com e sem abrasão. Entretanto, na tabela 9, observou-se que, com exceção do grupo experimental que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão, todos os demais grupos apresentaram um comportamento semelhante nas duas situações. Ao analisar apenas a abrasão, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre o controle e a quitosana com o verniz, que por sua vez, sem o processo de abrasão, foi semelhante ao grupo experimental.

Tabela 9. Média e desvio padrão dos valores de perfil de desgaste (μm) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,21±0,07 Aa	0,07±0,06 Aa
	Quitosana	0,14±0,09 Aa	0,02±0,17 Aa
	Experimental	0,01±0,31 ABa	-0,28±0,17 Bb
	Verniz TiF₄	-0,14±0,28 Ba	-0,28±0,24 Ba

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Perda de volume

Para a análise de perda de volume, no *fator tratamento* o grupo controle foi estatisticamente semelhante a quitosana ($p=0,26$) e ao verniz ($p=0,12$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo experimental ($p<0,001$). O verniz e o grupo experimental foram semelhantes entre si ($p>0,05$).

Para o *fator abrasão*, observou-se que os subgrupos com abrasão foram estatisticamente diferentes dos subgrupos sem abrasão ($p<0,001$). Na Tabela 10, observou-se que todos os grupos apresentaram uma maior perda de volume quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p>0,05$), com exceção do grupo experimental que em ambas as situações foram semelhantes entre si ($p>0,05$). Para os subgrupos sem abrasão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

Tabela 10. Média e desvio padrão dos valores de perda de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) para dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
	Controle	1,25E7±3,33E6 Aa	3,22E6±2,31E6 Ab
	Quitosana	1,05E7±5,31E6 Aa	1,65E6±1,10E6 Ab

HCl Gasoso	Experimental	5,03E6±6,07E6 Ba	1,27E6±3,50E6 Aa
	Verniz TiF₄	8,75E6±2,985E6 ABa	1,99E6±3,74E6 Ab

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Degrau

Na análise de degraú, observou-se que para o *fator tratamento*, o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo quitosana ($p<0,001$) e foi semelhante aos grupos experimental ($p=0,16$) e verniz TiF₄ ($p=0,95$). O grupo quitosana apresentou maior degraú e foi estatisticamente diferente de todos os grupos ($p<0,05$).

Em relação ao *fator abrasão*, observou-se que a abrasão promoveu maior degraú e foi estatisticamente diferente do subgrupo sem abrasão ($p<0,001$). Na tabela 11, observou-se que todos os subgrupos apresentaram o degraú maior quando associado a abrasão do que sem a abrasão ($p<0,05$). A quitosana apresentou os maiores valores nas duas situações (com e sem abrasão) e foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p<0,05$).

Tabela 11. Média e desvio padrão dos valores do degraú (μm) formado na dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	3,87±2,44 Aa	0,81±0,59 Bb
	Quitosana	6,58±2,52 Ba	1,98±1,77 Ab
	Experimental	2,57±1,42 Aa	0,17±0,74 Bb
	Verniz TiF₄	4,87±2,31 Ba	0,31±1,28 Bb

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Rugosidade

Para o *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao grupo quitosana ($p=0,89$) e ao grupo experimental ($p=0,99$), porém apresentou

diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo verniz TiF₄ (p<0,001). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, quitosana e experimental (p>0,05).

Para o *fator abrasão*, não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05) entre os subgrupos com e sem abrasão. Este comportamento se manteve entre os subgrupos, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 12). Além disso, pode-se observar que o verniz apresentou menor rugosidade nas duas situações (com e sem abrasão) (p<0,05).

Tabela 12. Média e desvio padrão dos valores de rugosidade da superfície (Sa- μ m) para a dentina radicular após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,74 \pm 0,24 ABa	0,67 \pm 0,14 Aa
	Quitosana	0,77 \pm 0,27 Aa	0,71 \pm 0,13 Aa
	Experimental	0,68 \pm 0,12 ABa	0,75 \pm 0,10 Aa
	Verniz TiF₄	0,56 \pm 0,23 Ba	0,47 \pm 0,13 Ba

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística (p>0,05).

Contagem dos túbulos dentinários

Para a contagem dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, o grupo controle foi estatisticamente semelhante ao verniz (p=0,99), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a quitosana (p=0,004) e grupos experimental (p<0,0001).

Para o *fator abrasão*, observou-se que o processo abrasivo promoveu maior obliteração dos túbulos em comparação ao sem abrasão que apresentou diferença estatisticamente significativa (p=0,00008). Para a Tabela 13 pode-se observar que o número de túbulos dentinários expostos foi semelhante nas duas situações (com e

sem abrasão) ($p>0,05$), com exceção da quitosana e experimental que apresentaram grande número de túbulos obliterados quando abrasionados ($p>0,05$). O grupo experimental, independente de ter sido abrasionado ou não, apresentou um maior número de túbulos dentinários obliterados e foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) dos demais grupos estudados.

Tabela 13. Média e desvio padrão do número dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	-30,33±61,90 Aa	28,13±79,51 Aa
	Quitosana	-116,07±119,50 Ba	-19,80±61,32 Ab
	Experimental	-203,47±40,51 Ca	-214,07±57,33 Ba
	Verniz TiF₄	-21,87±83,58 Aa	22,93±76,07 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0,05$).

Área dos túbulos dentinários

Em relação a área dos túbulos dentinários, observou-se que no *fator tratamento*, somente o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0,008$). A quitosana e o verniz apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle ($p=0,99$). No *fator abrasão*, observou-se uma diferença significativa em relação a abrasão e sem abrasão ($p=0,04$). Na tabela 14, observou-se que somente o grupo experimental apresentou menor área e foi estatisticamente diferente do controle ($p<0,05$).

Tabela 14. Média e desvio padrão da área- μm dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
	Controle	-1,08±4,45 Aa	-0,10±2,88 Aa

HCl Gasoso	Quitosana	-2,11±2,90 ABa	-1,71±2,76 ABa
	Experimental	-4,98±3,90 Ba	-1,33±2,14 Bb
	Verniz TiF₄	-1,85±1,65 ABa	-2,19±2,96 ABa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0.05$).

Perímetro dos túbulos dentinários

Para o perímetro dos túbulos dentinários, no *fator tratamento*, somente o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0,002$) e verniz ($p=0,03$). A quitosana ($p=0,55$) e verniz ($p=0,83$) apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle. Para o *fator abrasão* não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos com e sem abrasão ($p<0,05$). Na tabela 15, o grupo experimental abrasionado apresentou perímetro menor em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Tabela 15. Média e desvio padrão do perímetro- μm dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,83±4,41 Aa	-0,83±4,30 Aa
	Quitosana	-0,97±3,46 ABa	-1,59±1,97 Aa
	Experimental	-4,66±5,68 Ba	-2,42±2,70 Aa
	Verniz TiF₄	-0,65±3,12 ABa	-1,00±2,93 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p>0.05$).

Tomografia de coerência óptica

Para a análise de espessura superficial da mineralização, no *fator tratamento*, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Para o *fator abrasão*, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os subgrupos com e sem abrasão (Tabela 16).

Tabela 16. Média e desvio padrão da espessura superficial de mineralização nos diferentes grupos após o ciclo erosivo e aplicação dos tratamentos (com e sem abrasão).

Desafios Erosivos	Tratamentos	c/ Abrasão	s/ Abrasão
HCl Gasoso	Controle	0,024±0,004 Aa	0,033±0,024 Aa
	Quitosana	0,036±0,012 Aa	0,025±0,003 Aa
	Experimental	0,051±0,019 Aa	0,053±0,025 Aa
	Verniz TiF₄	0,036±0,017 Aa	0,032±0,009 Aa

Letra maiúscula representa comparação entre as colunas. Letra minúscula representa a comparação entre as linhas. Mesma letra indica similaridade estatística ($p > 0.05$).

Espectroscopia Micro Raman

Na Figura 19 (erosão gasosa), os grupos dentina sadia, controle e verniz apresentaram formatos semelhantes em relação aos picos de fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}) e amida I (1450 cm^{-1}) porém com intensidades diferentes. O espectro do grupo experimental foi semelhante ao do grupo quitosana, apresentando menor intensidade e formato alargado do pico fosfato (ν_1 960 cm^{-1}). O pico referente a amida I (1450 cm^{-1}) foi semelhante entre os grupos.

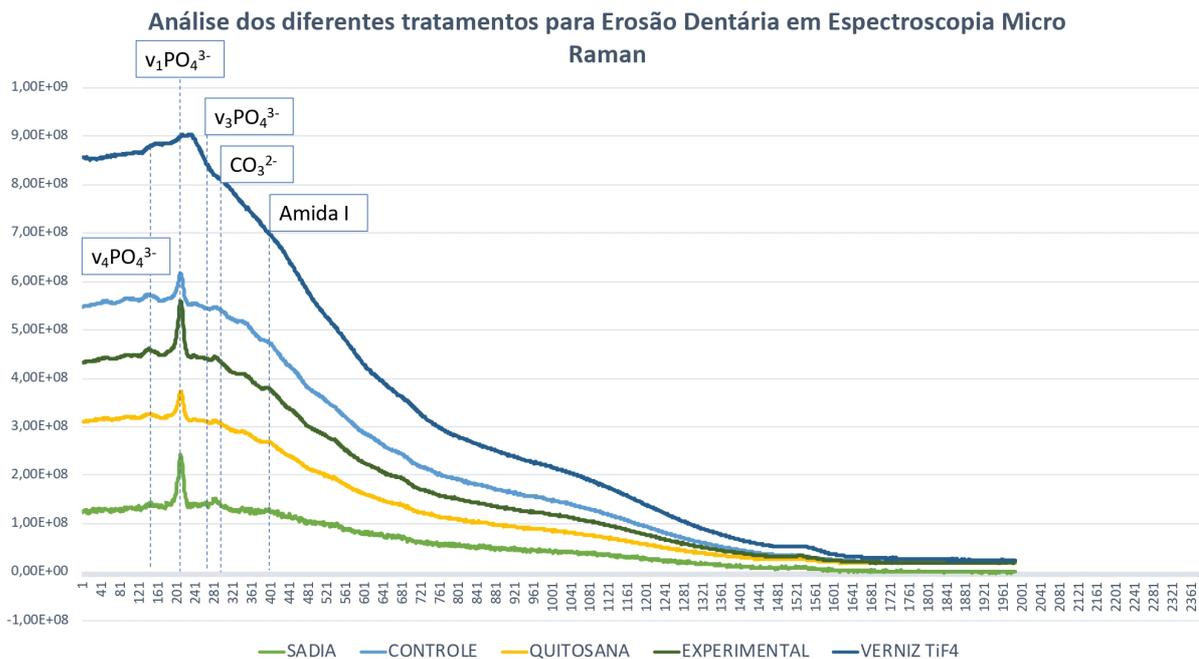


Figura 19. Gráfico dos diferentes tratamentos

Análise morfológica dos túbulos dentinários

Observou-se que os túbulos dentinários no grupo controle apresentaram-se mais alargados e abertos após o ciclo erosivo. Não observa-se a presença de dentina peritubular. No grupo quitosana, os túbulos dentinários não tiveram alterações em sua forma e dimensão e não houve a perda da dentina peritubular, houve somente a obliteração parcial dos túbulos dentinários. Observa-se uma fina camada depositada sobre a dentina tratada com quitosana.

Em relação ao grupo experimental, observa-se que os túbulos não tiveram sua dimensão alterada e a dentina peritubular encontra-se preservada. Houve a obliteração de grande parte dos túbulos dentinários, e em algumas regiões, observa-se uma fina camada depositada sobre a superfície dentinária. O grupo verniz TiF₄ preservou a dimensão dos túbulos dentinários e teve uma obliteração parcial dos túbulos dentinários. Não se observa nenhuma camada depositada sobre os espécimes tratados com o verniz.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou a ação dos tratamentos sobre os túbulos dentinários. Na Figura 20A observa-se a dentina sadia com os túbulos abertos como padrão referência.

Após a erosão com HCl líquido, na Figura 20B observa-se o aumento da abertura dos túbulos dentinários causados pelo processo erosivo do ácido sobre a superfície da dentina radicular. O hidrogel experimental em forma de membrana (Figura 20C) promoveu a obliteração parcial dos túbulos dentinários.

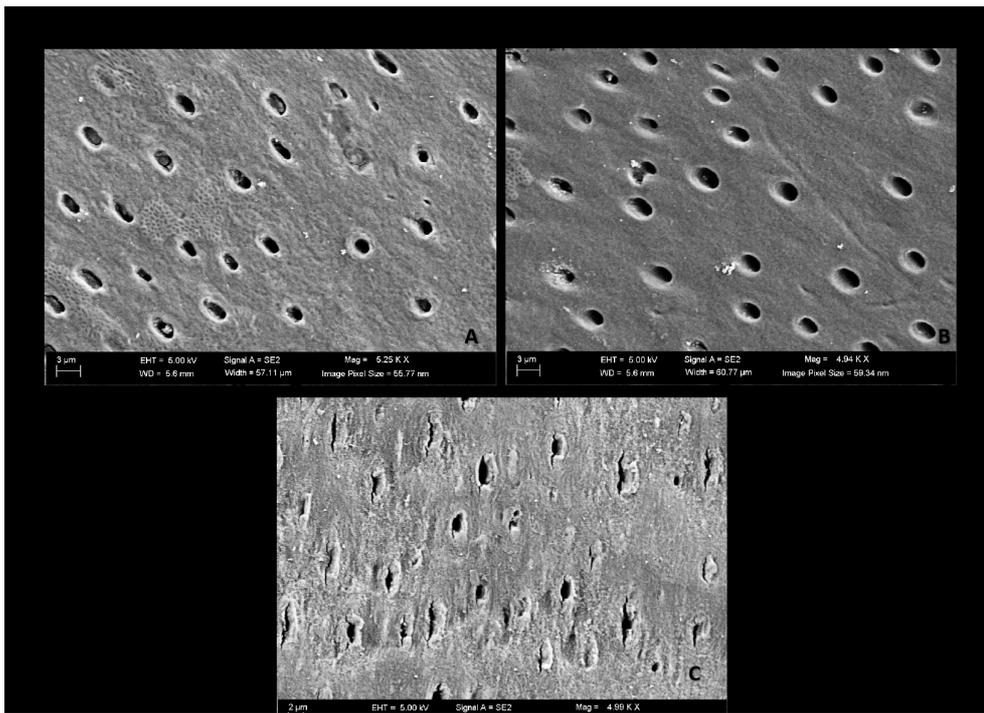


Figura 20. Espécime tratado com hidrogel experimental em forma de membrana em microscopia eletrônica de varredura. A) Dentina sadia. B) Dentina erodida. C) Dentina tratada com hidrogel experimental em forma de membrana.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo propôs a comparação do hidrogel experimental de quitosana com os diferentes tratamentos sobre a dentina erodida, com o objetivo de analisar o efeito dos tratamentos no controle/redução do processo erosivo e no fechamento dos túbulos dentinários. Para isso, utilizou-se a microscopia confocal a laser na avaliação do degrau, perda de volume, perfil de desgaste, rugosidade e número, área e perímetro dos túbulos dentinários antes e após o ciclo erosivo (com/sem abrasão). A tomografia de coerência óptica foi empregada para analisar a intensidade e profundidade da remineralização da dentina, pois tem a capacidade de prever evidências indiretas de perda ou ganho mineral. Por fim, a espectroscopia Micro Raman foi utilizada para avaliar as alterações químicas do tratamento experimental sobre a estrutura dentinária e compará-lo com os outros tratamentos.

Para este estudo optou-se por utilizar o HCl líquido e gasoso para simular as condições encontradas na cavidade bucal de pacientes portadores da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), pois com frequência estes pacientes são expostos a ocorrência e periodicidade do refluxo misto (refluxo líquido e gasoso) (Sifrim et al., 2001). No entanto, o ácido gástrico líquido (refluxo líquido) é mais frequentemente relacionado à erosão dentária severa em comparação ao ácido gástrico gasoso (refluxo gasoso) (Faraoni et al., 2018). Esta situação clínica quando associada à abrasão produz um resultado acelerado capaz de deteriorar significativamente a integridade da estrutura dentária. A ação da escova de dente sobre uma estrutura fragilizada exerce um efeito abrasivo que intensifica a perda dentária durante a erosão (Shellis & Addy, 2014; Dehghan et al., 2017; Mantilla et al., 2017), especialmente se o paciente escova os dentes após episódios de refluxo gastroesofágico (Grippe, Simring & Coleman, 2012).

Além deste efeito nocivo, a dentina ainda é um substrato mais suscetível ao desgaste por abrasão se comparado ao esmalte (Ranjitkar et al., 2012) por isso, como constatado neste estudo, ao associar a erosão à abrasão, produziu-se maior perda da estrutura dentinária do que nos subgrupos sem abrasão. Os subgrupos com abrasão foram estatisticamente diferentes dos subgrupos sem abrasão nas análises de degrau, perfil de desgaste, perda de volume e rugosidade, demonstrando a perda significativa da estrutura dentária quando associada à

erosão. A maior perda de dentina causada pela ação do HCl líquido pode estar associada aos agentes químicos e ações mecânicas causadas pela movimentação do líquido sobre a superfície da dentina (Faraoni et al., 2018). Diferentemente do HCl líquido, o HCl gasoso é composto por partículas esparsas na sua forma física, conseqüentemente a ocorrência do contato destas partículas ácidas sobre a estrutura dentária é menor já que estas partículas não estão em contato próximo como na forma líquida (Faraoni et al., 2018).

Em relação aos resultados associados ao tipo de tratamento, observou-se que o hidrogel experimental obteve maior eficácia na intercepção do processo erosivo evidenciado nos valores de degrau, perfil de desgaste e perda de volume que foram estatisticamente diferentes em relação aos grupos controle e quitosana. O desempenho do hidrogel experimental foi semelhante, e em alguns casos, até mesmo melhor do que o verniz de TiF_4 contra a desmineralização dentinária. De acordo com a literatura, vários tratamentos podem ser utilizados na tentativa de recuperar o processo erosivo. Em geral, esses tratamentos são à base de flúor (fluoreto de fosfato acidulado, fluoreto de sódio, fluoreto de amina, tetrafluoreto de titânio) (Lussi & Hellwig, 2014; Philip et al., 2019).

Este estudo optou por testar as propriedades do verniz de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) no qual tem mostrado um maior efeito protetor na remineralização dentária quando comparado ao fluoreto de sódio (NaF) (Magalhães et al., 2010; Comar et al., 2012; Comar et al., 2017; de Souza et al., 2018; Mosquim et al., 2019). O possível mecanismo de ação do TiF_4 baseia-se na formação de uma camada resistente a ácidos composta por complexos organometálicos, nos quais o íon titânio é fortemente atraído pelo oxigênio presente no grupo fosfato da estrutura da dentina para formar precipitados do tipo óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado durante o processo de hidrólise (Sen & Büyükyılmaz, 1998). Esses compostos são fortemente ligados e não são facilmente removidos por prótons, mesmo sob condições altamente ácidas (pH 1), como consequência, são considerados mais resistentes a desafios erosivos (Basting et al., 2015). A camada resistente a ácidos também pode atuar como uma barreira física e absorver maior quantidade de fluoreto, o que leva a um bom desempenho do verniz de TiF_4 quando comparado aos grupos tratados com quitosana e controle presentes neste estudo (Wiegand et al., 2010; Comar et al., 2018) .

Estes resultados corroboram com os achados literários que testaram o verniz TiF_4 em esmalte/dentina submetido a erosão e abrasão em estudos *in vitro* e *in situ* (Levy et al., 2014; Comar et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Martines de Souza et al., 2017; Pini et al., 2019). A maioria destes estudos apresentou resultados positivos quanto ao controle e diminuição da progressão das lesões erosivas. Além disso, o precipitado formado pelo complexo de fosfato de titânio é mais resistente ao ácido que o precipitado de CaF_2 formado pela aplicação de NaF, o que significa que o verniz de TiF_4 tem a capacidade de proteger a dentina de desafios erosivos (Martines de Souza et al., 2017). Esse aspecto é importante, pois normalmente a dentina apresenta menores valores de desgaste quando comparada ao esmalte (Martines de Souza et al., 2018), e isso pode ocorrer devido à presença de uma matriz orgânica desmineralizada rica em fibrilas de colágeno, que pode prevenir o contato do ácido com o tecido mineralizado subjacente, reduzindo assim, a progressão da erosão dentinária através de uma camada superficial estável a agressão do ácido (Schlueter et al., 2010). Por ser crucial garantir a estabilidade da matriz orgânica no processo erosivo, a quitosana foi empregada neste estudo para ser a base do hidrogel experimental, levando-se em conta às suas propriedades benéficas de adesão e sustentação das fibras de colágeno.

A quitosana (2-amino-2-desoxi- β -d-glucopirranose) é um biopolímero que apresenta em sua cadeia polimérica, um grande número de grupos amina e hidroxila livres; estes agrupamentos podem se ligar a diferentes moléculas, e conseqüentemente, formar ligações cruzadas com o colágeno (Madhavan et al., 2010; Resende et al., 2019). A interação química da quitosana com a matriz orgânica pode promover forte adesão deste material à estrutura dentária, além de auxiliar na diminuição da degradação da dentina (Fawzy et al., 2013; Pini et al., 2019). O mecanismo de adesão da quitosana pode produzir uma superfície dentinária menos lisa (partículas de quitosana continuam aderidas na superfície da dentina), e conseqüentemente, resultar em valores mais altos de rugosidade superficial, como o encontrado neste estudo. Os grupos quitosana e hidrogel experimental apresentaram valores de rugosidade semelhantes ao grupo controle e foram estatisticamente diferentes do grupo verniz de TiF_4 (erosão gasosa). Entretanto, além de interagir e aderir firmemente a matriz orgânica, a quitosana

também pode facilitar a deposição de uma camada de fosfato de cálcio nos túbulos dentinários da dentina erodida (Xu et al., 2011; Ururahy et al., 2017).

Este biopolímero é amplamente utilizado por sua capacidade de auxiliar o processo de biomineralização através da deposição de íons cálcio e fosfato e neutralizar a atividade das metaloproteinasas da matriz (MMPs) presentes na dentina e na saliva (Xu et al., 2011; de Souza et al., 2017). As MMPs são ativadas em pH ácido durante um ataque erosivo e, conseqüentemente, degradam as fibrilas de colágeno presentes na matriz orgânica da dentina (Buzalaf et al., 2012; de Souza et al., 2017). A quitosana auxilia na integridade das fibrilas de colágeno, proporcionando maior resistência à erosão dentária (Buzalaf et al., 2012). Além disso, esse polímero pode favorecer a reticulação entre as fibras de colágeno, construir arranjos microfibrilares com propriedades mecânicas superiores para tornar a estrutura da dentina mais resistente a enzimas que degradam o colágeno (Dash et al., 2011; Fawzy et al., 2013; Martines et al., 2017).

O processo de degradação da dentina está relacionado a dissolução ou desnaturação de proteínas bem como de moléculas proteoglicanas responsáveis por aderir os minerais de hidroxiapatita na matriz orgânica do colágeno (Yassen et al., 2013). Desta forma, qualquer tratamento capaz de sustentar a ultraestrutura do colágeno e paralisar a atividade da colagenase, prolongará a integridade superficial da dentina contra a dissolução ou desnaturação protéica (Kishen, 2016). Neste sentido, espera-se que o processo de reticulação forme ligações cruzadas intra e intermoleculares no colágeno e melhore a estabilidade mecânica e orgânica da dentina (Bedran-Russo et al., 2007; Kishen et al., 2016). Isto contradiz, em certa medida, o nosso estudo que mostrou uma menor resistência nas amostras tratadas com quitosana evidenciadas pelo maior degrau, perfil de desgaste e perda de volume, além de serem estatisticamente semelhantes ao grupo controle (sem tratamento). No entanto, estas asserções concordam parcialmente com os resultados do presente estudo que demonstraram a eficácia do hidrogel experimental na interceptação do processo erosivo, diminuindo a perda de estrutura dentinária principalmente para as análises de degrau, perfil de desgaste e perda de volume.

Com base nestas propriedades, pode-se considerar que a quitosana é um meio promissor para estabilizar a estrutura de colágeno presente na matriz orgânica

da dentina, porém a quitosana isolada não é eficaz para promover a remineralização do tecido afetado, conseqüentemente, a inserção de íons minerais em sua composição torna-se necessária para induzir o processo reparativo, remineralizar a matriz de colágeno, formar cristais de hidroxiapatita intrafibrilar, e por fim, estimular a precipitação de minerais para a oclusão dos túbulos dentinários (Han et al., 2017; El Gezawi et al., 2019). Com esta finalidade, o hidrogel experimental, criado à base de quitosana, foi formulado para comportar íons minerais em sua composição e aprimorar o desempenho deste material frente ao processo de desmineralização dentária.

A literatura tem mostrado que novos agentes para interceptar a erosão e a hipersensibilidade dentinária têm seguido nesta mesma direção, a de formular um produto capaz de remineralizar a superfície desmineralizada (sem a presença de flúor) por meio da transferência de fosfato de cálcio, hidroxiapatita, fosfopeptídeo de caseína/fosfato de cálcio amorfo entre outros (Kyaw et al., 2019; Mushtaq et al., 2019; Machado et al., 2019). Estudos mostraram que estes novos tratamentos têm tido resultados tão eficazes quanto aos produtos comumente utilizados no mercado para a obliteração dos túbulos dentinários e alívio da hipersensibilidade (Kanehira et al., 2019; Kyaw et al., 2019; Mushtaq et al., 2019; Machado et al., 2019). Estes resultados promissores têm demonstrado que a utilização de materiais, baseados na interação química com a estrutura do dente, podem obliterar os túbulos dentinários abertos e bloquear a estimulação térmica, mecânica e química do dente por meio de componentes naturais (Kanehira et al., 2019; Machado et al., 2019).

Desta forma, o hidrogel experimental e a quitosana demonstraram ser eficazes na obliteração dos túbulos dentinários, principalmente o grupo experimental, que apresentou diferença estatística, nas análises de contagem do número, área e perímetro dos túbulos dentinários quando comparada com os demais grupos. Outros estudos também corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo (Kurita et al., 1998; Silva et al., 2012) e demonstraram que a propriedade quelante da quitosana empobrece os componentes inorgânicos da camada de esfregaço, levando a uma maior concentração de partículas nos túbulos dentinários e não na superfície. No entanto, um estudo recente mostrou que a quitosana apresenta uma grande cadeia polimérica com ligações de hidrogênio e grupos hidroxila em sua estrutura, e quando os prótons são perdidos pela ação de

quelação, ligações covalentes são formadas com a estrutura dentária, levando ao acúmulo de partículas na dentina peritubular, sendo responsável pela obliteração dos túbulos dentinários (Ururahy et al., 2017) expostos. Alternativamente, outro estudo apresentou resultados contrários aos nossos, demonstrando a eficácia do verniz TiF_4 na diminuição do diâmetro e da área dos túbulos dentinários, uma vez que os íons de titânio têm afinidade com o oxigênio das moléculas de fosfato, levando à deposição de partículas no áreas com maior mineralização, por exemplo na porção peritubular da dentina (Mantilla et al., 2017). Este resultado promissor do verniz TiF_4 na obliteração dos túbulos dentinários não foi encontrado no presente estudo.

Com relação à análise da tomografia de coerência óptica, este método é baseado no princípio da interferometria de luz, no qual a magnitude e o atraso de tempo de eco da luz retroespalhada são analisados para fornecer informações sobre a intensidade de dispersão da luz em diferentes camadas de tecido. Tanto o esmalte quanto a dentina apresentam propriedades de espalhamento diferentes nas quais o tecido saudável difere do tecido desmineralizado, proporcionando uma compreensão da espessura, morfologia e porosidade mineral das lesões erosivas (Attin et al., 2014). Neste estudo, observou-se uma diminuição significativa nos valores do coeficiente de atenuação óptica após o ciclo erosivo/abrasivo. Esse achado corrobora com alguns estudos prévios (Mujat et al., 2003; Cara et al., 2014; Pereira et al., 2018) que demonstraram o processo de desmineralização promovido por ácido, como o ácido clorídrico usado neste estudo, o qual criou vazios na estrutura da dentina que aumentou a dispersão da luz e diminuiu os valores dos coeficientes de atenuação óptica. Nossos resultados também mostraram que a quitosana apresentou coeficientes de atenuação óptica mais baixos e não foi capaz de remineralizar eficientemente a estrutura da dentina, o que contradiz o único estudo (Arnaud et al., 2010), no entanto a quitosana foi testada na superfície do esmalte e encontrou resultados encorajadores.

Até onde temos conhecimento, não foi encontrado nenhum estudo sobre a eficácia do verniz TiF_4 na dentina desmineralizada pela OCT, portanto, é difícil fazer qualquer comparação com este estudo. No entanto, observou-se que o verniz TiF_4 produziu coeficientes de atenuação óptica mais altos relacionados ao processo de remineralização na estrutura dental, o que corrobora os resultados deste estudo pela

microscopia confocal a laser que mostrou desempenho superior do verniz TiF_4 na análise de perda de volume, e perfil de desgaste. Embora não tenhamos estudos testando o verniz TiF_4 na análise OCT, outras pesquisas com verniz fluoretado (de Moraes et al., 2017) podem atestar o melhor desempenho do flúor em relação a outros tratamentos na remineralização dentária pela técnica OCT. Em relação à profundidade da remineralização, o hidrogel de quitosana apresentou valores ligeiramente mais altos, o que demonstrou a sua penetração nas porções mais profundas da estrutura dentinária, diferentemente do verniz TiF_4 que apresentou valores menores em relação a profundidade de remineralização. Essa diferença mostra que a quitosana pode interagir em profundidade com a estrutura dentária e o verniz fluoretado interage com maior eficácia na superfície das amostras, conforme suportado na literatura (Magalhães et al., 2008; Comar et al., 2012; Comar et al., 2017).

A análise espectroscópica das ligações químicas também mostrou que o hidrogel experimental apresentou maior intensidade dos picos relacionados ao grupo fosfato (ν_1 960 cm^{-1} , ν_3 1044 cm^{-1} , ν_4 582 cm^{-1}) e carbonato (1073 cm^{-1}). O formato destes picos foi semelhante ao grupo dentina sadia (picos estreitos com alta intensidade) que estão relacionados a cristalinidade e a concentração relativa de minerais do material (Toledano et al., 2015). Diferentemente dos picos relacionados ao verniz que apresentaram-se mais abaulados. Estes dados permitem interpretar que o hidrogel experimental possui potencial para remineralizar a estrutura dentinária. Os picos fosfato e carbonato apresentaram-se com intensidade e formato semelhantes nos grupos controle e quitosana, ambos tiveram picos menos intensos representativos da menor quantidade de minerais presentes no espécime.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que apesar da erosão dentária ser mais severa com o líquido se comparado ao gasoso, os tratamentos interceptores foram mais efetivos na erosão com HCl líquido do que na erosão com HCl gasoso. O verniz fluoretado e o hidrogel experimental apresentam-se como uma alternativa ao tratamento da erosão causada por líquidos. Entretanto, se o processo erosivo está associado a presença de gás, então provavelmente os tratamentos poderão ter a sua eficácia reduzida já que o seu comportamento frente a esta agressão não demonstrou ser capaz de controlá-lo.

Dentro das limitações deste estudo, o grupo hidrogel experimental apresentou resultados promissores na interceptação do processo erosivo, sendo particularmente eficaz no fechamento dos túbulos dentinários. Por outro lado, o verniz TiF_4 foi capaz de remineralizar a superfície da dentina e o hidrogel experimental de penetrar mais profundamente na estrutura dentinária já que o colágeno cumpre o seu papel de trazer os minerais da superfície para dentro de sua estrutura, facilitando desta maneira, a remineralização nas porções mais profundas da dentina. No entanto, em especial para o hidrogel experimental, estudos adicionais são necessários para elucidar ainda mais a interação e a durabilidade desse tratamento com a estrutura dentária. Ainda não foram realizados ensaios clínicos para testar o hidrogel experimental na cavidade bucal, portanto, extrapolar para as condições clínicas é fundamental para entender a durabilidade do efeito protetor e a validade deste material promissor.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados da metodologia proposta, pode-se concluir que:

De modo geral, o processo erosivo líquido teve um efeito mais lesivo sobre o substrato dentinário do que o processo erosivo gasoso. A abrasão promoveu alterações estruturais mais evidentes no substrato dentinário. O grupo experimental e o verniz de TiF_4 foram capazes de interceptar o processo erosivo, contudo, não conseguiu paralisá-lo.

Em relação ao desgaste observado por meio das análises de degrau, perda de volume e perfil de desgaste, o grupo experimental promoveu um efeito protetor mais intenso sobre a dentina radicular erodida com HCl líquido. A rugosidade da superfície não foi afetada pelos diferentes tratamentos. Os túbulos dentinários foram eficazmente obliterados pelo grupo experimental que promoveu a redução da área e perímetro do lúmen dos túbulos dentinários. Em relação a mineralização da superfície, o grupo experimental apresentou maior mineralização superficial da dentina radicular.

Os tratamentos foram mais eficazes no processo erosivo líquido, diferentemente do processo erosivo gasoso que não permitiu a redução ou paralisação da erosão mesmo com a aplicação dos diferentes tratamentos para mineralização dentária.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Techniques for production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil*; 1999 26:97-102.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. In *Erosive Tooth Wear*. Vol. 25. Karger Publishers; p. 123-142.

Bae JY, Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Kang SW, Han SJ, Kang YH. (-) Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem. Toxicol*; 2008 46(4):1298-1307.

Bajaj M, Poornima P, Praveen S, Nagaveni NB, Roopa KB, Neena IE, Bharath KP. Comparison of CPP-ACP, tri-calcium phosphate and hydroxyapatite on remineralization of artificial caries like lesions on primary enamel-An in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*; 2016 40(5):404-409.

Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MAR. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J*; 2011 56(3):317-321.

Basting RT, Leme AA, Bridi EC, Amaral FLB, França FMG, Turssi CP et al. Nanomechanical properties, SEM and EDS microanalysis of dentin treated with 2.5% titanium tetrafluoride, before and after an erosive challenge. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 2015 103(4):783-789.

Bedran-Russo AKB, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B*, 2007 80(1):268-272.

Botelho JN, Del Bel Cury AA, Silva WJD, Tenuta LMA, Cury JA. The effect of fluoride toothpaste on root dentine demineralization progression: a pilot study. *Braz Oral Res*; 2014 28(spe): 1-5.

Buzalaf MAR, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012 24:72-6.

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

Buzalaf MA, Charone S, Tjäderhane L. Role of host derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res*; 2015 49:30-37.

Buyukyilmaz T, Øgaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetrafluoride treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*; 1997 105(5):473-477.

Cara AC, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of

enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med*; 2014 46(9):666-671.

Chandak S, Bhondey A, Bhardwaj A, Pimpale J & Chandwani M. Comparative evaluation of the efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide–Amorphous calcium phosphate in reducing *Streptococcus mutans* counts in dental plaque of children: An in vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent*; 2016 6(5):423-429.

Choi M, Hasan N, Cao J, Lee J, Hlaing SP, Yoo JW. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and in vivo healing activities in MRSA biofilm-infected wounds. *Int. J. Biol. Macromol*, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.009

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

Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*; 2010 89(10): 1187-1197.

Collado-González MAR, González Espinosa Y, Goycoolea Francisco M. Interaction between chitosan and mucin: fundamentals and applications. *Biomimetics*, 2019 4(2):32.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomao PA, Grizzo LT, Magalhaes AC. Effect of NaF, SnF₂, and TiF₄ toothpastes on bovine enamel and dentin erosion-abrasion in vitro. *Int J Dent*, 2012: 134350.

Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MA, Buchalla W et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci*. 2012 Aug; 120(4):342–348.

Comar LP, Cardoso CDAB, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhaes 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.

Comar LP, Souza BM, Martins J, Santos MG, Buzalaf MA, Magalhães AC. Response of carious enamel to TiF₄ varnish treatment under diverse cariogenic activities in situ. *J Dent*. 2017 63:81–84.

Comar LP, Souza BM, Al-Ahij LP, Martins J, Grizzo LT, Piasentim IS 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.

da Silva VRM, Viana ÍEL, Lopes RM, Zezell DM, Scaramucci T, Aranha ACC. Effect of Er, Cr: YSGG laser associated with fluoride on the control of enamel erosion progression. *Arch. Oral Biol*, 2019 99:156-160.

Dash MF, Chiellini RM, Ottenbriteb E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*; 2011 36:981-1014

Dehghan M, Ozorio JEV, Chanin S, Tantbirojn D, Versluis A, Garcia-Godoy F. Protocol for measurement of enamel loss from brushing with an anti-erosive toothpaste after an acidic episode. *Gen Dent*, 2017 65(4):63-68.

Delgado AJ, Dias AR, Quesada A, Rodríguez LE, Hernández R, Wynkoop B, Dilbone DA. Potential erosive effect of mouthrinses on enamel and dentin. *Gen Dent*, 2018 66(3):75-79.

de Moraes MDR, Carneiro JRM, Passos VF, Santiago SL. Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. *Braz Oral Res* 2016 30(1):e13.

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.

de Souza BM, Vertuan M, Buzalaf MAR, Magalhaes 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.

dos Santos DMS, Pires JG, Silva AB, Salomão PMA, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Protective Effect of 4% Titanium Tetrafluoride Varnish on Dentin Demineralization Using a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res*, 53(4) :495-502.

Ebrahimi M, Mehrabkhani M, Ahrari F, Parisay I, Jahantigh M. The effects of three remineralizing agents on regression of white spot lesions in children: A two-week, single-blind, randomized clinical trial. *J Clin Exp Dent*; 2017 9(5):e641-e648.

El Gezawi M, Wölfle UC, Haridy R, Fliefel R, Kaisarly D. Remineralization, Regeneration, and Repair of Natural Tooth Structure: Influences on the Future of Restorative Dentistry Practice. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019 5(10): 4899-4919.

Elsaka SE, Elnaghy AM. Antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chitosan solutions and the outcomes on the bond strength of RealSealer sealer to radicular dentin. *J Biomed Res*; 2012 26:193-199.

El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 63:871-880.

Fang QQ, Wang XF, Zhao WY, Shi BH, Lou D, Chen CY, Zhang MX, Wang X et al. Development of a Chitosan-Vaseline Gauze Dressing with Wound-Healing Properties in Murine Models. *Am J Trop Med Hyg*. 2019. doi: 10.4269/ajtmh.19-0387.

Faraoni JJ, Toro CVT, de Matos LLM, Palma-Dibb RG. Efficacy of different strategies to treat root dentin eroded by liquid or gaseous hydrochloric acid associated with brushing abrasion. *Arch. Oral Biol*; 2018 89:65-69.

Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo JT. Chitosan/riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J Mech Behav Biomed Mater*; 2013 17: 278-289

Fialho MPN, Hass V, Nogueira RP, França FMG, Turssi CP, Basting RT, Amaral FLB. Effect of epigallocatechin-3-gallate solutions on bond durability at the adhesive interface in caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019 91:398-405.

Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of tooth brushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci*; 2009 117:255-260.

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

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 40:1036-1043.

Garcia-Godoy F, HONG L. A novel antimicrobial and remineralizing toothpaste containing CaCl/chitosan microspheres. *Am J Dent*, 2018 31(3):149-154.

Gonzalez Ayerbe JI, Hauser B, Salvatore S, Vandenplas Y. Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease in Infants and Children: from Guidelines to Clinical Practice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2019 22(2):107-121.

Grippio JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*; 2004 135:1109-1118.

Grippio JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncarious cervical lesions: a 20-year perspective. *J Esthet Restor Dent*, 2012 24(1):10-23.

Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, Zerbib F, Mion F, Smout AJ et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut*, 2018 67(7): 1351-1362.

Hals E, Tveit AB, Tötdal B, Isrenn R. Effect of NaF, TiF₄ and APF solutions on root surfaces in vitro, with special reference to uptake of F. *Caries Res*; 1981 15(6):468-476.

Han M, Li QL, Cao Y, Fang H, Xia R, Zhang ZH. In vivo remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system. *Sci Rep*, 2017 7:41955.

Hannas AR, Kato MT, Cardoso CDAB, Magalhães AC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Preventive effect of toothpastes with MMP inhibitors on human dentine erosion and abrasion in vitro. *J Appl Oral Sci*; 2016 24:61-66.

Herbella FA, Patti MG. Gastroesophageal reflux disease: from pathophysiology to treatment. *World J Gastroenterol*; 2010 16:3745–3749.

Higo T, Mukaisho K, Ling ZQ, Oue K, Chen KH, Araki Y et al. An animal model of intrinsic dental erosion caused by gastro-oesophageal reflux disease. *Oral diseases. Oral Dis*; 2009 15(5):360-365.

Jung J, Bae Y, Cho YK, Ren X, Sun Y. Structural insights into conformation of amphiphilic quaternary ammonium chitosans to control fungicidal and anti-biofilm functions. *Carbohydr*, 2020 228:115391.

Kanehira M, Ishihata H, Araki Y, Takahashi H, Sasaki K, Finger WJ. Effect of artificial saliva on permeability of dentin treated with phosphate containing desensitizer measured by digital flow meter. *Dent Mater J*, 2019 38(6):963-969.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MAR. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*; 2009 17: 560-564.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MAR. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*; 2010a 89:468-472.

Kato MT, Leite ADL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MAR. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res*; 2012 91(12):1119-1123.

Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*; 2014 93:74-77.

Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110627

Kim M, Kim S. Chito-oligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *FEBS Letters*; 2006 580:2661-2666.

Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater*, 2016 32(8):968-977.

Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*; 2016 150(3):483-490.

Kumar RMNV. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym*;46:1-27.

Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and stability*, 1998 59(1-3): 117-120.

Kyaw KY, Otsuki M, Segarra MS, Hiraishi N, Tagami J. Effect of Calcium-phosphate Desensitizers on Staining Susceptibility of Acid-eroded Enamel. *Oper Dent*, 2019 44(3):281-288.

Lee LH, Park SY, Park JE, Jung BO, Park JE, Park JK, Hwang YJ. Anti-Oxidant Activity and Dust-Proof Effect of Chitosan with Different Molecular Weights. *Int. J. Mol*, 2019 20(12): 3085.

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.

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

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*, 2019 20(6):517-527.

Machado AC, Rabelo FEM, Maximiano V, Lopes RM, Aranha ACC, Scaramucci T. Effect of in-office desensitizers containing calcium and phosphate on dentin permeability and tubule occlusion. *J Dent* 2019 86:53-59.

Madhavan K, Belchenko D, Motta A, Tan W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomater*, 2010 6(4):1413-1422.

Magalhães AC, Comar LP, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *J Dent*. 2008 36(2):158-62.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent*; 2010 38(2):153-157.

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.

Mantilla TF, Turssi CP, Ramos-Oliveira TM, Silva CVD, Suzuki LC, Freitas PMD. The in situ effect of titanium tetrafluoride gel on erosion/abrasion progression in human dentin. *Braz Dent J*, 2017 28(3):337-345.

Mantilla TF, Silva CVD, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PMD. TiF₄ gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. *Microsc Res Tech*, 2017 80(11):1182-1188.

Martin V, Ribeiro IA, Alves MM, Gonçalves L, Almeida AJ, Grenho L et al. Understanding intracellular trafficking and anti-inflammatory effects of minocycline chitosan-nanoparticles in human gingival fibroblasts for periodontal disease treatment. *Int. J. Pharm*, 2019 572:118821.

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.

Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, Sletta H, Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int. J. Mol*, 2017 20(23): 5889.

Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr. Polym*; 2007 67:640-644.

Mirkarimi M, Toomarian L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an in vitro study. *J Dent*; 2012 9(4): 224-228.

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.

Moraes-Filho JPP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol*; 2005 42(2):122-127.

Mujat C, Van Der Veen MH, Ruben JL, Ten Bosch JJ, Dogariu A. Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light induced fluorescence and lesions characteristics. *Appl. Opt.* 2003 42:2079–2086.

Mushtaq S, Gupta R, Dahiya P, Kumar M, Bansal V, Melwani SR. Evaluation of different desensitizing agents on dentinal tubule occlusion: A scanning electron microscope study. *Indian Journal of Dental Sciences*, 2019 11(3):121-124.

Nobrega CBC, Fujiwara FY, Cury JA, Rosalen PL. TiF4 varnish-A (19) F-NMR stability study and enamel reactivity evaluation. *Chem Pharm Bull*; 2008 56(1):139-141.

Oliveira-Reis B, Maluly-Proni AT, Fagundes TC, Vasconcelos G, Bresciani E, Prakki A, Dos Santos PH. Influence of protease inhibitors on the degradation of sound, sclerotic and caries-affected demineralized dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019 97:1-6.

Orr WC. Sleep issues in gastroesophageal reflux disease: beyond simple heartburn control. *Rev Gastroenterol Disord*; 2003 3:522–529.

Patcharatrakul T, Gonlachanvit S. Gastroesophageal reflux symptoms in typical and atypical GERD: roles of gastroesophageal acid refluxes and esophageal motility. *J Gastroenterol Hepatol*; 2014 29:284-290.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion, *Oral Diseases*, 2002 8(3):117–129.

Philip N. State of the art enamel remineralization systems: the next frontier in caries management. *Caries Res*; 2019 53(3): 284-295.

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*, 2019:103247.

Rala S, Çakir M, Kose T, Bor S, Aydogdu S. Prevalence of Gastroesophageal Reflux Disease and Reflux-Related Symptoms in Infants; Development and Validation of a Novel Gastroesophageal Reflux Disease Questionnaire to Use for Turkish Infants (SM Reflux Questionnaire). *J Pediatr Res*; 2014 1(4):189-198.

Ranjitkar S, Kaidonis JA, Smales RJ. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion. *Int J Dent*, 2012:479850. doi: 10.1155/2012/479850.

Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW. The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent*, 2009 37(4):250-254.

Resende AHM, Farias JM, Silva DD, Rufino RD, Luna JM, Stamford TCM, Sarubbo LA. Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids and surfaces B*, 2019 181:77-84.

Savarino E, Bredenoord AJ, Fox M, Pandolfino JE, Roman S, Gyawali CP. Advances in the physiological assessment and diagnosis of GERD. *Nat. Rev. Gastroenterol*, 2018 15(5):323.

Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine, *Arch. Oral. Biol* 2010 55(4):294-299.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn⁺² - containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomized in situ trial. *Clin Oral Investig*; 2014 18:107–115.

Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res*; 2019:1-5.

Sen BH, Büyükyılmaz T. The effect of 4% titanium tetrafluoride solution on root canal walls-a preliminary investigation. *J Endod*, 1998 24:239–243.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 32-45). Karger Publishers. 2014.

Sieber KR, Schmidt C, Baumann T, Lussi A, Carvalho TS. Acquired Enamel Pellicle Modification with Casein and Mucin in Different Concentrations and its Impact on Initial Dental Erosion. *Caries Res*, 2019 53(4): 458-467.

Sifrim D, Holloway R, Silny J, Xin Z, Tack J, Lerut A et al. Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings. *Gastroenterology*; 2001 120:1588-1598.

Silva PV, Guedes DFC, Nakadi FV, Pécora JD, Cruz-Filho AMD. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*, 2013 46(4): 332-338.

Sun T, Zhou D, Xie J, Mao F. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*; 2007 225:451-456.

Svensson O, Lindh L, Cárdenas M, Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan – influence of surface properties, concentration and type of mucin. *J Colloid Interface Sci*; 2006 299:608–616.

Tatarian T, Pucci MJ, Palazzo F. A Modern Approach to the Surgical Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *J Laparoendosc Adv Surg Tech*; 2016 26:174-179.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*; 1998 77(8):1622-1629.

Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015 50:131-149.

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

van der Mei HC, Engels E, De Vries J, Dijkstra RJ, Busscher HJ. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci*; 2007 115:303–307.

Wang GR, Zhang H, Wang ZG, Jiang GS, Guo CH. Relationship between dental erosion and respiratory symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *J Dent*; 2010 38(11):892-898.

Wang YL, Chang HH, Chiang YC, Lu YC, Lin CP. Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. *J Formos Med Assoc*, 2018 117(4):276-282.

Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ. Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res*; 1988 67(12):1483-1487.

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

Woodland P, Sifrim D. The refluxate: the impact of its magnitude, composition and distribution. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 2010 24(6):861-87.

Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo ECM, Chu CH. Prevention of secondary caries using silver diamine fluoride treatment and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate modified glass-ionomer cement. *J Dent*; 2017 57:38-44.

Yassen GH, Platt JA. The effect of nonsetting calcium hydroxide on root fracture and mechanical properties of radicular dentine: a systematic review. *Inter Endod J*, 2013 46(2):112-118.

Yates RB, Oelschlager BK. Surgical treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surg Clin North Am*; 2015 95:527-553.

Yu H, Buchalla W, Cheng H, Wiegand A, Attin T. Topical fluoride application is able to reduce acid susceptibility of restorative materials. *Dent Mater J*, 2012 31(3), 433-442.

Xu Z, Neoh KJ, 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*, 2011 98:150-159.

Anexo

CRE-2019-10-18 Manuscript submission confirmation

De: Caries Research (cre@manuscriptmanager.net)

Para: jujfaraoni@yahoo.com.br

Data: sexta-feira, 25 de outubro de 2019 11:16 BRT

Submission: CRE-2019-10-18 - Effectiveness of in vitro preventive treatments on dentin erosion by intrinsic acid.

Submitting author: Dr. Juliana Faraoni

Attention: Dr. Faraoni

Thank you very much for submitting the above manuscript. Please use the manuscript number as listed above on all correspondence about the manuscript.

The manuscript will now be forwarded to our reviewers and we shall inform you as soon as a decision has been made by the editorial board.

The progress of your manuscript can be followed from the progress report accessed from your account overview.

Kind regards, *

Editorial Office

Would you like to publish your paper without extra cost?

Follow this link <https://de.surveymonkey.com/r/X8CLT9M> to take part in a short author survey and win a voucher towards your publication costs.

YOUR SIGN IN INFORMATION

Website: <https://www.manuscriptmanager.net/cre>

Email: jujfaraoni@yahoo.com.br

Forgot password or not signed in before?

Click the URL below to create/reset your password.

https://www.manuscriptmanager.net/sLib/v4/retrieve_pw.php?paramScreen=HHYP+4rCZteFRdFvD9hkBIQht2WiMJB9XowpbE57+zA=