



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA



BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO

**Avaliação de verniz experimental de própolis/quitosana
na prevenção de erosão dentária em dentes decíduos:
estudo *in vitro***

Ribeirão Preto

2022

BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO

**Avaliação de verniz experimental de própolis/quitosana
na prevenção de erosão dentária em dentes decíduos:
estudo *in vitro***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2022

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.

“Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ribeiro, Bruna Cristina de Freitas

Avaliação de verniz experimental de própolis/quitosana na prevenção de erosão dentária em dentes decíduos: estudo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2022.

57 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka.

1. Própolis. 2. Quitosana. 3. Erosão Dentária. 4. Dente Decíduo. 5. Esmalte Dentário. 6. Desmineralização do Dente. 7. Ácidos.

Ribeiro BCF. Avaliação de verniz experimental de própolis/quitosana na prevenção de erosão dentária em dentes decíduos: estudo *in vitro* [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022.

Data de Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida. Ao senhor Deus por iluminar o meu caminho, guiar os meus passos e dar forças para seguir lutando pelos meus sonhos e objetivos. Agradeço a ti senhor, por tornar esse sonho possível.

Aos meus pais, João de Souza Ribeiro e Eliana Aparecida de Freitas Ribeiro. São pessoas inspiradoras, exemplo de honestidade, humildade, caráter e humanidade. Agradeço o apoio, carinho, dedicação e por estarem sempre ao meu lado. Esse sonho jamais seria possível sem esse amor incondicional. Dedico a vocês, que são a razão do meu viver.

Ao Marcelo Faria de Lima, pelo apoio e incentivo para que eu pudesse cursar a faculdade de odontologia. Agradeço a oportunidade e a confiança em mim.

Ao meu avô Francisco Braz de Freitas e minha tia Eunice Aparecida de Freitas. Hoje estão ao lado do pai, em outro plano. Como foi doloroso e ainda é, duas partidas num intervalo tão curto de tempo, e ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sei que de onde estiverem estarão felizes e orgulhosos de mim. Dedico a vocês essa conquista.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Regina Guenka Palma Dibb. Agradeço imensamente a acolhida, carinho, paciência e por compartilhar o seu vasto conhecimento. Foi um prazer conhecê-la e fazer parte do seu grupo de pesquisa. E uma honra ter convivido com uma pessoa tão especial ao longo desse projeto. Que você continue sendo essa pessoa acolhedora e disposta a ajudar a todos.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, em especial à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela acolhida e apoio durante todo o período de desenvolvimento desse projeto. Uma honra fazer parte de uma instituição tão renomada e da qual fazem parte pessoas tão competentes e comprometidas.

Ao programa de pós-graduação em Odontopediatria, pela recepção calorosa, apoio e incentivo. Agradeço a oportunidade de ter feito parte de um programa tão comprometido, do qual fazem parte professores e coordenadores tão competentes.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora, pela acolhida e disponibilidade durante o período de desenvolvimento laboratorial do projeto.

À Juliana Jendiroba Faraoni, pelo carinho, acolhimento e conhecimento compartilhado. Agradeço a convivência e parceria ao longo desses dois anos, foi um prazer conviver com uma pessoa tão especial!

Aos professores do programa de pós-graduação em Odontopediatria, pelo comprometimento e carinho com que exercem a odontopediatria. Agradeço todo o conhecimento compartilhado.

Aos colegas do mestrado, por toda vivência e conhecimento compartilhado em todas as disciplinas cursadas.

Às colegas do grupo de pesquisa da professora Regina, pela convivência e conhecimento compartilhado. Muito obrigada!

Aos secretários Mauro Henrique Leoni Bernardo, Mary Possani Carmessano, Carlos Feitosa dos Santos e Patricia Marchi. Agradeço a disponibilidade e ajuda no decorrer do curso.

Aos servidores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Agradeço a todos, dos guardas até aos responsáveis pela limpeza. São pessoas indispensáveis e que fazem com que a universidade seja um espaço de acolhimento.

Aos meus tios, tias, padrinhos, primos e amigos. Agradeço o incentivo, as palavras carinhosas, as orações. Sou muito grata por terem vocês em meu caminho. Muito obrigada!

À Fabiana Sodré de Oliveira. Agradeço o acolhimento, incentivo, apoio e amizade. Você que é uma pessoa inspiradora. Sempre tão dedicada e comprometida com a odontopediatria. Atenciosa e amorosa com todos ao seu redor. Sou muito grata a convivência e todo aprendizado compartilhado. Muito obrigada!

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Agradecimento ao laboratório de pesquisa do departamento de Odontologia Restauradora pelo uso do equipamento multiusuário MICROSCÓPIO CONFOCAL A LASER (Processo Fapesp 2011/12901-7), sob supervisão da professora Dra. Regina Guenka Palma Dibb e responsabilidade técnica da Dra. Juliana Jendiroba Faraoni.

RESUMO

Ribeiro BCF. Avaliação de verniz experimental de própolis/quitosana na prevenção de erosão dentária em dentes decíduos: estudo *in vitro* [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

A erosão dentária pode trazer prejuízos à dentição decídua, sendo necessário estudos que visem o seu controle. **Objetivo:** Avaliar a capacidade de verniz experimental de própolis/quitosana em inibir o processo erosivo no esmalte de dentes decíduos. **Material e métodos:** Este estudo *in vitro* foi fatorial com 1 fator em 3 níveis de tratamento: ausência de tratamento (controle), verniz Duraphat® e verniz experimental própolis/quitosana. Foram selecionados 42 incisivos decíduos humanos, divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=14). Os dentes foram fixados em blocos de resina acrílica e metade da face vestibular foi isolada com resina composta - área controle. Posteriormente, os espécimes foram submetidos a um ciclo erosivo inicial com Coca-Cola®. Após o ciclo inicial, metade da área exposta foi isolada com resina composta - área desmineralizada. Na sequência, os espécimes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: G1 controle/sem tratamento, G2 verniz Duraphat® e G3 verniz própolis/quitosana. Os vernizes foram aplicados na área exposta desmineralizada com microbrush por 15s, permanecendo por 4h. Posteriormente, o verniz foi removido e os espécimes foram submetidos aos desafios erosivos com Coca-Cola®. Foram realizados 6 desafios/dia durante 5 dias consecutivos. Ao final, a resina composta foi removida expondo as áreas controle e desmineralizada, para realização das análises no microscópio confocal a laser e microdureza. As variáveis de resposta quantitativa foram análise da perda mineral através da microdureza longitudinal, rugosidade da superfície e perfil de desgaste. As imagens da superfície do esmalte foram analisadas qualitativamente após os tratamentos por meio de análise morfológica. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** Na análise do perfil de desgaste, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados. Na rugosidade superficial observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Ao analisar internamente cada grupo, em todos eles a rugosidade na área controle foi

diferente estatisticamente das áreas desmineralizada e experimental ($p < 0,05$). No entanto, entre as áreas desmineralizada e experimental não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Para a microdureza analisou-se separadamente as áreas e observou que para as regiões controle, desmineralizada e experimental, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Ao analisar os grupos internamente, observou-se que nos grupos controle e experimental apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as áreas controle - desmineralizada e controle - experimental ($p < 0,05$). Entre as áreas desmineralizada - experimental houve um declínio nos valores da microdureza, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No grupo Duraphat[®], houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as áreas controle - experimental ($p < 0,05$). Morfologicamente, nos 3 grupos analisados, o esmalte nas áreas desmineralizada e experimental apresentou um aspecto rugoso, com porosidades e extensas áreas de desmineralização. **Conclusão:** O verniz experimental de própolis/quitosana não foi capaz de impedir a progressão da perda mineral na superfície de esmalte dos dentes decíduos decorrente do processo erosivo.

Palavras-chave: Própolis. Quitosana. Erosão Dentária. Dente Decíduo. Esmalte Dentário. Desmineralização do Dente. Ácidos.

ABSTRACT

Ribeiro BCF. Evaluation *in vitro* of experimental propolis/chitosan varnish in the prevention of dental erosion in enamel deciduous teeth [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

Dental erosion can cause damage to deciduous dentition, and studies are needed to control it. **Objective:** To evaluate the ability of experimental propolis/chitosan varnish to inhibit the erosive process on deciduous teeth enamel. **Material and methods:** This *in vitro* study was factorial with 1 factor treatment in 3 levels: no treatment (control), Duraphat® varnish, and experimental propolis/chitosan varnish. Forty-two human deciduous incisors were selected and randomly divided into 3 groups (n=14). The teeth were fixed in acrylic resin blocks and half of the buccal surface was isolated with a composite resin-control area. Subsequently, the specimens were subjected to an initial erosive cycle with Coca-Cola®. After the initial cycle, half of the exposed area was isolated with composite resin - demineralized area. Then, the specimens were randomly divided into 3 groups: G1 control/no treatment, G2 Duraphat® varnish, and G3 propolis/chitosan varnish. The varnishes were applied on the exposed demineralized area with a microbrush for 15s, remaining for 4h. Subsequently, the varnish was removed, and the specimens were subjected to erosive challenges with Coca-Cola®. Six challenges/day were performed for five consecutive days. In the end, the composite resin was removed exposing the control and demineralized areas for analysis by laser confocal microscopy and microhardness. The quantitative response variables were mineral loss analysis by longitudinal microhardness, surface roughness, and wear profile. Enamel surface images were qualitatively analyzed after the treatments by morphological analysis. The data obtained were submitted to ANOVA and Tukey ($p < 0.05$) tests. **Results:** In the wear profile analysis, it was observed that there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the groups analyzed. Surface roughness showed that there was no statistically significant difference between the groups ($p > 0.05$). In analyses internal of the group observed in all of them the roughness in the control area was statistically different from the demineralized and experimental areas ($p < 0.05$). However, between the demineralized

and experimental areas, there was no statistically significant difference ($p>0.05$). For microhardness, the areas were analyzed separately, and it was observed that for the control, demineralized and experimental regions, there was no statistically significant difference ($p>0.05$) between the groups. Internal in the group, it was observed that in the control and experimental groups there was a statistically significant difference between the control/demineralized and control/experimental areas ($p<0.05$). Between the demineralized - experimental areas there was a decline in microhardness values, however, this difference was not statistically significant ($p>0.05$). In the Duraphat® group, there was a statistically significant difference only between the control/experimental areas ($p<0.05$). Morphologically all groups showed the enamel in the demineralized and experimental areas had a rough appearance, with porosities and extensive areas of demineralization. **Conclusion:** The experimental propolis/chitosan varnish was not able to prevent the progression of mineral loss on the enamel surface of deciduous teeth due to the erosive process.

Keywords: Propolis. Chitosan. Tooth Erosion. Tooth, Deciduous. Dental Enamel. Tooth Demineralization. Acids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. PROPOSIÇÃO.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Aspectos Éticos.....	26
3.2 Delineamento Experimental.....	26
3.3 Seleção da Amostra.....	26
3.4 Preparo dos Espécimes.....	27
3.5 Desafio Erosivo Inicial.....	28
3.6 Preparo dos Espécimes.....	29
3.7 Tratamento.....	29
3.8 Desafios Erosivos.....	30
3.9 Microscopia Confocal a Laser.....	31
3.10 Microdureza Longitudinal em Profundidade.....	32
3.11 Análise de Dados.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Perfil de Desgaste.....	37
4.2 Rugosidade.....	37
4.3 Microdureza Longitudinal em Profundidade.....	39
4.4 Análise Morfológica.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO.....	56

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida moderno tem resultado em uma mudança significativa de hábitos alimentares, com aumento na ingestão de bebidas e alimentos ácidos [1-4]. Nos últimos anos, o consumo de refrigerantes e bebidas energéticas cresceu substancialmente, principalmente entre crianças e adolescentes [3,5,6]. Essa mudança no estilo de vida impacta diretamente na saúde bucal, aumentando o fator de risco à erosão dentária, que é resultado de repetidos contatos ácidos com a superfície dental [2-4]. Os ácidos estão presentes naturalmente em alguns alimentos, como frutas e sucos naturais de frutas ou podem ser adicionados com o objetivo de realçar o sabor, como os refrigerantes, salgadinhos e doces [1-4,7-9]. Os principais incluem os ácidos cítrico, fosfórico, málico, acético, láctico e ascórbico, e todos contribuem para a erosão dentária [2,7,9]. Esta condição tem se tornado cada vez mais frequente entre os jovens, e isso tem despertado o interesse de pesquisadores na busca por um tratamento eficaz [3,4,7].

A erosão dentária é definida como a perda dos tecidos dentais mineralizados por dissolução química, sem envolvimento bacteriano [2,10]. Nos últimos anos, com o aumento da sua prevalência, houve uma mudança da sua percepção tanto na pesquisa quanto na prática clínica [3,7]. Em um estudo recente [11] calculou-se a estimativa global e a média de dentes decíduos acometidos foi entre 30% e 50%. No Brasil, a prevalência varia de 11,7% [12] a 78,2% [13] em escolares de 6 a 13 anos de idade, dependendo da cidade e região. Essa variação nos dados, tanto no Brasil como em outros países, pode ser explicada pelos diferentes padrões de avaliação utilizados e pela variação na população examinada [11-13]. Em geral, o que se observa é que a prevalência e a gravidade da erosão na dentição decídua tende a aumentar com a idade, devido aos efeitos cumulativos do processo erosivo [1,7,11,12].

A erosão pode ser causada por fatores extrínsecos, intrínsecos ou uma associação de ambos [1-3,7]. Dentre os fatores extrínsecos, a dieta é o principal fator relacionado à sua etiologia, entretanto, existe um outro fator relevante que diz respeito ao uso de medicamentos. Estes geralmente são prescritos às crianças em sua forma

líquida e os ácidos estão presentes em sua formulação, visando a dispersão do fármaco e garantir estabilidade química, além de melhorar o sabor [14-18]. Uma atenção especial deve ser dada aquelas crianças que apresentam alguma doença crônica, como a asma, visto que uma frequente ingestão desses medicamentos pode levar a ocorrência ou agravamento da erosão na infância [14]. Os fatores etiológicos intrínsecos incluem distúrbios alimentares, regurgitação e a doença do refluxo gastroesofágico, em que há o contato direto de ácidos provenientes do estômago e a superfície dental [19-21]. A erosão é a manifestação bucal mais comum em pacientes que apresentam a doença do refluxo gastroesofágico, uma doença silenciosa e muitas vezes não diagnosticada, que pode ter como auxiliar no seu diagnóstico o cirurgião dentista, ao identificar lesões erosivas na superfície dentária. Isso demonstra que crianças que são acometidas com a doença têm um risco aumentado de desenvolver lesões erosivas [10,19-23]. Em relação aos distúrbios alimentares, tanto a anorexia quanto a bulimia podem aumentar potencialmente o risco de erosão, pois afetam a regulação da ingestão de alimentos, como escolhas restritas e vômitos induzidos, sendo mais prevalentes em mulheres jovens, entre 13 e 30 anos de idade [11,19].

A erosão começa com a desmineralização da superfície do esmalte, caracterizada principalmente por uma redução na microdureza [18]. O esmalte humano é altamente mineralizado ($\cong 97\%$ volume), possui uma estrutura prismática, tendo a camada mais externa aprismática e relativamente mais resistente à erosão. Esse tecido mineralizado é densamente composto com cristais de hidroxiapatita e outros componentes (água e material orgânico) em menor quantidade ($\cong 3\%$ volume) [2,24]. A desmineralização no esmalte é um processo centrípeto que começa com uma perda parcial de cristais de hidroxiapatita da superfície podendo levar à perda de minerais mais extensas [2]. A dentina é o tecido subjacente ao esmalte que forma a maior parte do dente, a sua matriz é formada por cerca de 45% a 50% em volume de mineral, na forma de hidroxiapatita carbonatada, 30% a 35% em volume de matéria orgânica, principalmente colágeno tipo I com proteína não colágeno associada. A apatita na dentina tem um tamanho de cristal menor, maior teor de carbonatos e é mais suscetível à dissolução ácida do que a apatita do esmalte, assim, uma vez que o processo de desmineralização envolva a dentina, essa desmineralização ocorrerá de forma mais acelerada [3]. Clinicamente, pode ser difícil diagnosticar a erosão nos estágios iniciais, sendo que a nível macroscópico o esmalte fica liso, sedoso, e às

vezes opaco, com a ausência de periquimácias. Se não houver interrupção desse processo, pode haver o arredondamento das cúspides e restaurações e uma severa sensibilidade dentinária devido à exposição dos túbulos dentinários [1,2,10,24], conseqüentemente pode ocorrer alteração estética e até perda da dimensão vertical de oclusão [1,25]. Os locais mais comuns de erosão nos dentes decíduos são a superfície oclusal dos molares e a superfície palatina dos incisivos superiores [26].

Na tentativa de paralisar ou minimizar o processo erosivo, diferentes formas de tratamento vêm sendo propostas. Algumas baseadas na utilização do flúor, entretanto, diferente do observado em relação à cárie, o efeito do fluoreto no contexto da erosão é limitado, e a principal razão é o menor pH dos ácidos erosivos comparados aos ácidos bacterianos. Os fluoretos convencionais (fluoreto de sódio e fluoreto de amina) atuam contra a desmineralização erosiva através da formação de uma camada de fluoreto de cálcio (CaF_2), que atua como uma barreira física e como um reservatório de íons cálcio e fluoreto, que em condições de baixo pH são liberados aumentando a saturação em relação à apatita, contudo, sob a ação de ácidos erosivos, essa camada de CaF_2 não é duradoura, o que limita o uso de fluoretos convencionais [5,6]. Em relação aos vernizes, devido à alta concentração de flúor e aderência prolongada à superfície dentária, foi sugerido que poderiam promover uma maior precipitação de CaF_2 e levar a uma maior proteção, no entanto, o efeito “protetor” é devido principalmente a uma barreira mecânica de verniz remanescente na superfície dentária. Clinicamente, essa barreira é transitória e essa “proteção” será momentânea, conseqüentemente, os vernizes baseados apenas em flúor não servirão como uma medida preventiva duradoura para a erosão [5].

Outro composto que vem sendo estudado é o CCP-ACP, o fosfopeptídeo de fosfato de cálcio amorfo de caseína, que é derivado da caseína, uma proteína do leite. Esse composto é baseado na estabilização de fosfato de cálcio amorfo (ACP) por fosfopeptídeos de caseína (CPP) e seus nanocomplexos fornecem alta concentração de íons cálcio e fosfato, que de acordo com alguns autores, promoveu uma remineralização do esmalte [26-30]. Além disso, foi sugerido que a caseína pode modificar algumas propriedades mecânicas do esmalte, tornando-o menos suscetível à perda de minerais [29,30]. Outros estudos fizeram uma associação do CCP-ACP e do verniz de fluoreto de sódio (NAF) e obtiveram resultados satisfatórios com o verniz CCP-ACP/NAF na diminuição da perda estrutural provocada pelo processo erosivo

[27,29,30]. Foi demonstrado também, a sua capacidade de remineralização do esmalte de dentes decíduos quando utilizado em associação ao laser [26]. Alguns estudos, porém, mostraram resultados contraditórios, e não observaram efeitos de remineralização ou redução do desgaste erosivo na superfície dentária [6,31,32].

Visto que ainda não há um tratamento estabelecido que visa inibir ou minimizar a desmineralização causada pelo processo erosivo, a busca por um material inovador se faz necessária, na tentativa de um tratamento seguro e eficaz, associado à orientação e ajuste dos hábitos dietéticos, principalmente para os dentes decíduos, visto que a maioria dos estudos são voltados para os dentes permanentes. Assim, o uso de substâncias naturais e alternativas ao flúor vem crescendo na odontologia, visando produtos com menor toxicidade, maior atividade terapêutica e custo reduzido [33,34]. Uma substância que vem sendo estudada é o própolis, uma resina natural produzida por abelhas e que apresenta diversas propriedades benéficas [33-40]. As abelhas o produzem para selar as lacunas da colmeia e protegê-la da luz, umidade, invasores e fatores externos, o própolis também mantém as condições assépticas e a temperatura interna [33,35,37,39]. É uma substância resinosa escura, complexa e composta por resina e bálsamos (50 a 70%), cera (30 a 50%), pólen (5 a 10%), aminoácidos, minerais, vitaminas A, B e E, fenóis e compostos aromáticos [33,35,37,39,40]. Algumas propriedades relatadas são atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antioxidante e antitumoral [33,35,36,41].

Atualmente as aplicações do própolis vão além da medicina popular e tradicional para a medicina moderna, devido aos resultados de pesquisas recentes baseadas em evidência [33-40], e isso tem despertado cada vez mais a atenção de clínicos e pesquisadores devido a algumas novas e promissoras áreas de uso [33]. Em odontologia, o própolis vem sendo utilizado em diversas áreas como cirurgia oral e maxilofacial (no controle pós-operatório de infecções), periodontia (no controle pós-operatório após cirurgia periodontal), endodontia (como irrigante do canal radicular), tratamento de hipersensibilidade dentinária e úlceras aftosas, isso devido as suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias [33,35,37,40]. O extrato de própolis também vem sendo associado a dentifrícios, vernizes e soluções para bochecho, como uma alternativa na diminuição da contagem de *Streptococcus Mutans* e prevenção da cárie [36-41].

A quitosana é um outro biomaterial bastante estudado na odontologia, é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina, um composto natural encontrado em exoesqueletos de artrópodes, conchas de crustáceos e cutículas de insetos [42-44]. A quitosana apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade, propriedade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras [42-47], e possui diferentes formas de processamento como solução, blend, esponja, filme, gel, pasta, comprimido, microesferas, micropartículas, demonstrando assim o quanto é um material versátil [42,43,45]. Devido a essas características, as suas nanopartículas despertaram a atenção das indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola, têxtil e de engenharia de tecidos [45,46].

Na odontologia, a quitosana vem sendo utilizada em diferentes áreas com resultados promissores como periodontia, endodontia, implantodontia, cirurgia, prótese dentária e dentística restauradora [42-45]. Devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, hemostática, atuar na reparação de feridas, capacidade quelante, e o fato de ser biocompatível e biodegradável, a quitosana pode desempenhar diferentes funções e assim ser explorada em diferentes tipos de estudos na área odontológica [42-47]. No que diz respeito à erosão dentária, diversos estudos têm utilizado este biopolímero como uma alternativa de tratamento, pois pressupõe que a quitosana seja capaz de formar uma camada ácido resistente na superfície dentária, que a protege do contato com ácidos erosivos [48-51]. A quitosana apresenta uma afinidade com o esmalte, devido ao forte potencial zeta positivo, que a permite adsorver por forças eletrostáticas a superfícies com forte potencial zeta negativo, como o esmalte [48,49,51,52]. A quitosana também pode adsorver em proteínas presentes na película salivar, principalmente a mucina, e dessa forma, proteger a superfície dentária [49]. Ademais, alguns estudos têm demonstrado que a sua associação aos dentifrícios e soluções fluoretadas ocasiona diminuição do desgaste erosivo [48-52].

Diante do exposto, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito de um verniz experimental que contém esses dois compostos naturais, o própolis e a quitosana, no processo erosivo em dentes decíduos.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de um verniz experimental a base do extrato de própolis e quitosana, em inibir o processo erosivo no esmalte de dentes decíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - CAAE: 38187420.6.0000.5419.

3.2 Delineamento experimental

Este foi um estudo *in vitro*, que teve como fator de estudo três níveis de tratamento: ausência de tratamento (controle), verniz fluoretado Duraphat® (fluoreto de sódio a 5%, Colgate-Palmolive, Alemanha) e verniz experimental de própolis/quitosana (modificado do depósito de pedido de patente nº BR 10 2021 008804-4). As unidades experimentais foram 42 incisivos decíduos humanos, divididos aleatoriamente em três grupos (n=14). As variáveis de resposta quantitativa foram análise da perda mineral através dos valores médios da microdureza em profundidade, rugosidade da superfície e perfil de desgaste por microscopia confocal. As imagens morfológicas da superfície do esmalte foram analisadas qualitativamente para verificar possíveis alterações desse substrato após os tratamentos propostos.

3.3 Seleção da amostra

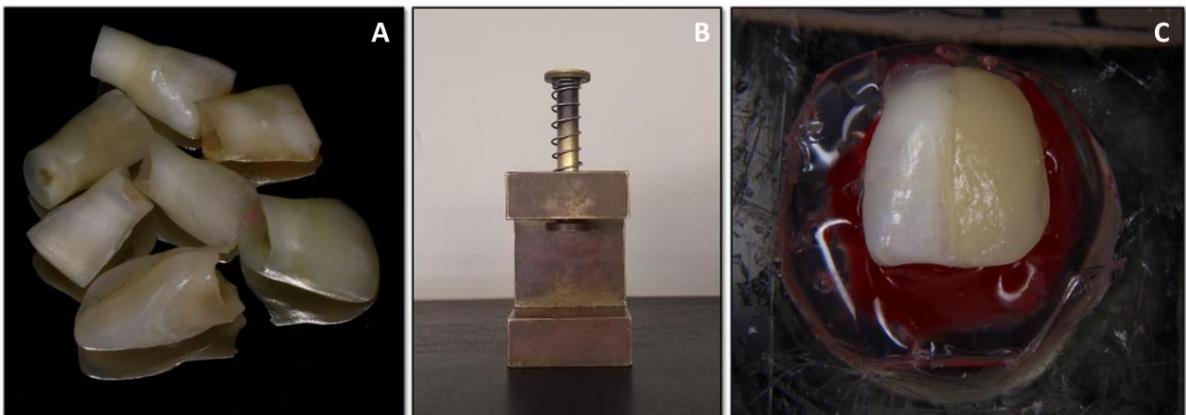
Foram selecionados 42 incisivos decíduos humanos, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. O critério para seleção dos dentes foi a ausência de lesão de cárie, trincas ou defeito de desenvolvimento do esmalte. Os dentes inicialmente foram limpos com pedra-pomes extrafina e água, utilizando escovas de Robinson. A desinfecção foi realizada com solução de timol 0,1%, na qual ficaram imersos durante uma semana. Na sequência,

os dentes foram lavados vigorosamente e mantidos em água deionizada sob refrigeração, sendo trocada diariamente durante o período de preparação dos espécimes.

3.4 Preparo dos espécimes

As raízes dentais quando presente foram seccionadas com disco diamantado (Buehler®, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos) sob refrigeração à água, acoplado em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos) 1 mm abaixo da junção amelo-cementária. Na sequência, os dentes foram fixados com cera e cola quente em blocos de resina acrílica, com auxílio de um paralelômetro de forma a deixar a superfície de esmalte paralela ao bloco. Posteriormente, metade da face vestibular foi isolada com resina composta (Filtek™ Z350, 3M ESPE, Estados Unidos) como área controle (AC), hígida (Figura 1).

Figura 1. A – Seleção dos dentes. B – Paralelômetro. C – Dente no bloco acrílico com resina na área controle.

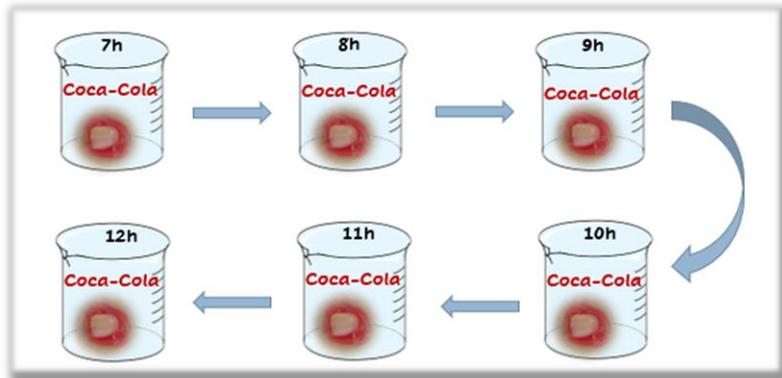


Fonte: Ribeiro, BCF.

3.5 Desafio erosivo inicial

Os espécimes foram submetidos a um ciclo erosivo inicial, em que cada espécime, ficou imerso sob agitação em 5 ml de Coca-Cola® (Coca-Cola®, São Paulo-SP, Brasil) (4°C) durante 20 segundos em uma mesa agitadora (Orbital CT- 155, Cientec Equipamentos, São Paulo, Brasil) [53]. Foram realizados seis desafios erosivos com intervalo de uma hora entre um desafio e outro, nesse intervalo os espécimes foram mantidos em saliva artificial (P-hidroxibenzoato de metila, 2,00; carboximetilcelulose de sódio, 10-0; KCl, 0-625; MgCl₂·6H₂O, 0-059; CaCl₂·2H₂O, 0-166; K₂HPO₄, 0-804; KH₂PO₄, 0-326) [54] em estufa (Odontobrás, Ribeirão Preto-SP, Brasil) a 37°C (Figuras 2 e 3).

Figura 2. Desenho esquemático demonstrando o ciclo erosivo.



Fonte: Ribeiro, BCF.

Figura 3. Mesa agitadora usada nos desafios erosivos.

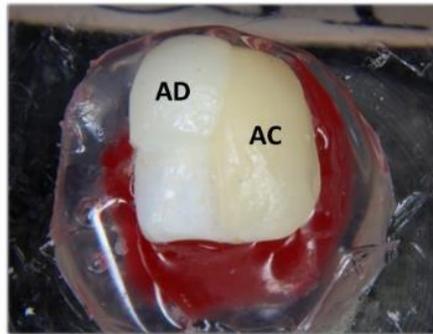


Fonte: Ribeiro, BCF.

3.6 Preparo dos espécimes

Após o desafio erosivo inicial, metade da área que ficou exposta foi isolada com resina composta (Filtek™ Z350, 3M ESPE, Estados Unidos), sendo considerada a área desmineralizada sem tratamento (AD), ou seja, a área que foi submetida a um desafio erosivo (Figura 4).

Figura 4. Dente no bloco acrílico com resina nas áreas controle e desmineralizada.



Fonte: Ribeiro, BCF.

3.7 Tratamento

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=14):

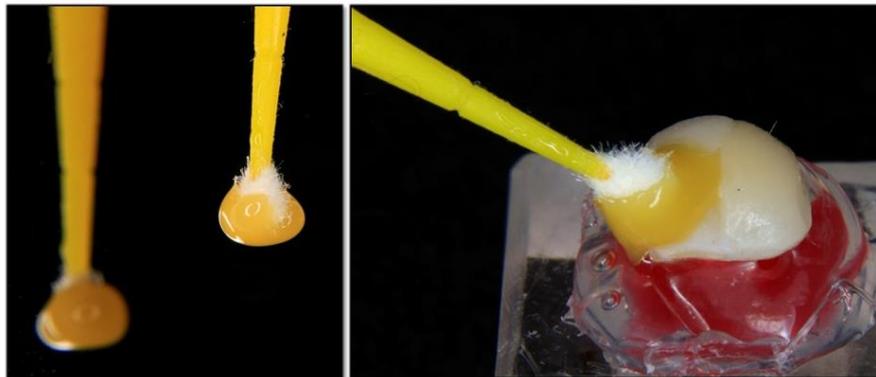
- G1 - Controle/sem tratamento;
- G2 - Verniz fluoretado Duraphat® 5%;
- G3 - Verniz experimental - modificado do depósito de pedido de patente n° BR 10 2021 008804-4.

O verniz Duraphat® e o verniz experimental foram aplicados na superfície do esmalte na área exposta (área experimental) de forma ativa com o auxílio de um microbrush por 15 segundos, permanecendo por quatro horas (Figuras 5 e 6). Nesse período os espécimes foram mantidos em saliva artificial em estufa a 37°C. Após

quatro horas, o verniz foi removido da superfície com gaze umedecida em água deionizada.

Ao final do tratamento, os espécimes foram acondicionados em saliva artificial a 37°C por 24 horas, para então iniciar os desafios erosivos.

Figura 5. Aplicação do verniz fluoretado Duraphat® na área experimental.



Fonte: Ribeiro, BCF.

Figura 6. Aplicação do verniz experimental na área experimental.



Fonte: Ribeiro, BCF.

3.8 Desafios erosivos

Cada espécime ficou imerso sob agitação em 5 ml de Coca-Cola® (4°C) durante 20 segundos em uma mesa agitadora. Foram realizados seis desafios erosivos por dia durante cinco dias consecutivos com intervalo de uma hora entre os desafios, nesse intervalo os espécimes foram mantidos em saliva artificial a 37°C. Ao final de

cada ciclo erosivo, a saliva foi substituída e os espécimes mantidos a 37°C até o próximo ciclo no dia seguinte.

Finalizado os desafios erosivos, os dentes permaneceram imersos em saliva artificial a 37°C por 24 horas. Posteriormente, a resina composta foi removida delicadamente com auxílio de uma lâmina de bisturi expondo as áreas controle e desmineralizada, e os espécimes foram limpos em uma cuba ultrassônica (Bio Wash, Bio-art, São Carlos-SP, Brasil) e armazenados em água deionizada para a realização das análises.

3.9 Microscopia confocal a laser

Análise do perfil de desgaste (Rv) e rugosidade superficial (Sa)

O perfil de desgaste e a rugosidade da superfície de esmalte foram avaliados por meio de um microscópio confocal a laser (LEXT OLS4100, Olympus, Tóquio, Japão) conectado a um computador com um software específico (OLS4100®, Olympus, Tóquio, Japão) (Figura 7). Os espécimes foram posicionados paralelamente a mesa do microscópio com auxílio de um paralelômetro e as imagens foram capturadas com objetiva de 10x com magnificação de 216x.

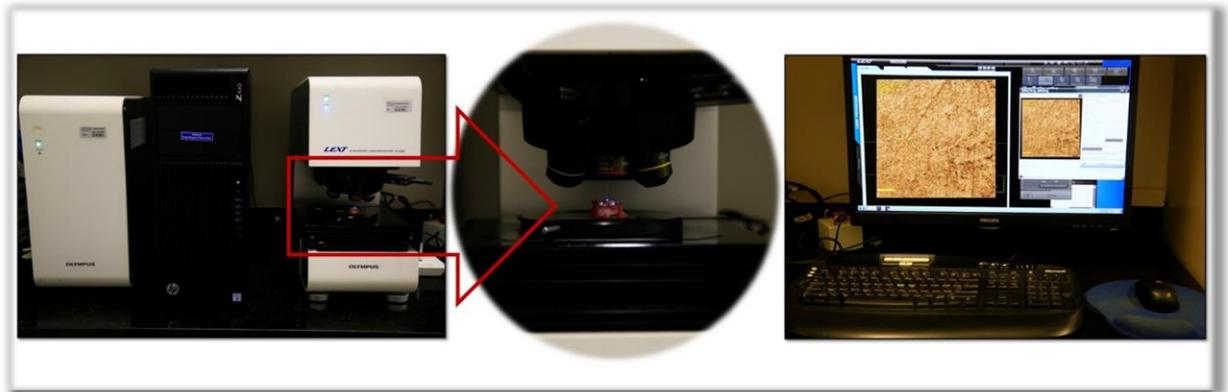
Para análise da rugosidade superficial (Sa), foram realizadas imagens das áreas controle, desmineralizada e experimental. As mensurações foram realizadas nas três áreas em μm .

Para avaliação do perfil de desgaste (Rv), as imagens foram obtidas englobando as interfaces: área controle-desmineralizada e área controle-experimental, sendo a área controle usada como referência. Foram realizadas dez mensurações de cada região em μm e obtido a média, e então realizou-se a somatória dos valores dessas interfaces para a análise de dados.

Análise morfológica

A avaliação morfológica da superfície de esmalte foi realizada após obtenção das imagens das áreas controle, desmineralizada e experimental, por meio de uma objetiva de 100x com magnificação final de 2131x. As imagens foram analisadas por um examinador previamente calibrado tanto em 2D como em 3D, e caracterizadas de acordo com os achados morfológicos.

Figura 7. Microscópio confocal a laser usado na realização das análises.



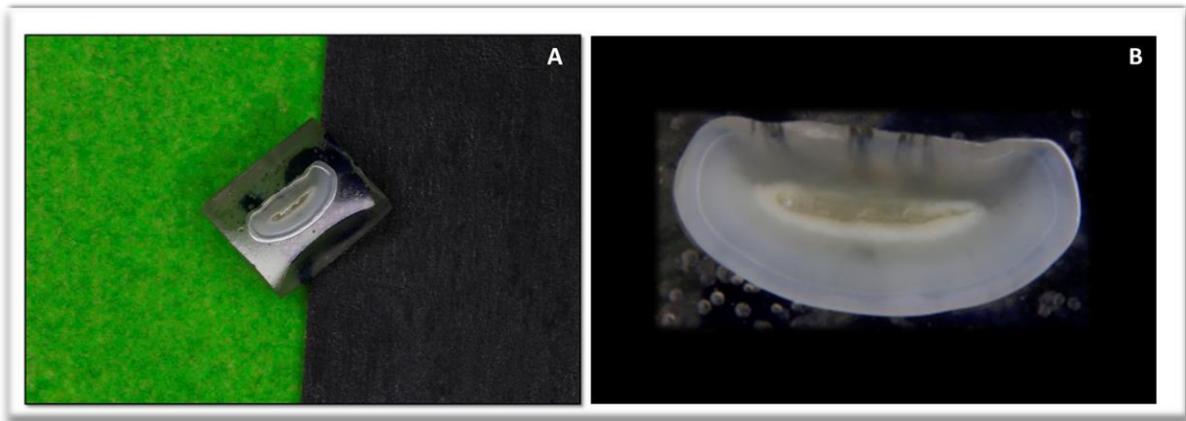
Fonte: Ribeiro, BCF.

3.10 Microdureza longitudinal em profundidade

Após a realização das análises no microscópio confocal a laser (LEXT OLS4100, Olympus, Tóquio, Japão) os espécimes foram incluídos em resina acrílica e posteriormente seccionados ao meio com disco diamantado (Buehler®, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos) em máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos) obtendo-se dois fragmentos contendo as áreas controle/desmineralizada e controle/experimental. A face lateral dos fragmentos foi planificada e polida em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo-SP, Brasil) com lixa de óxido de alumínio de granulação #1200 e disco de feltro e suspensão de

alumina 0,3 e 0,05 μm (Arotec SA Ind. e Comércio, São Paulo-SP, Brasil) (Figura 8). Ao final do polimento, os espécimes ficaram imersos sob ação do ultrassom (Bio Wash, Bio-art, São Carlos-SP, Brasil) por cinco minutos em água deionizada para lavagem e remoção de resíduos.

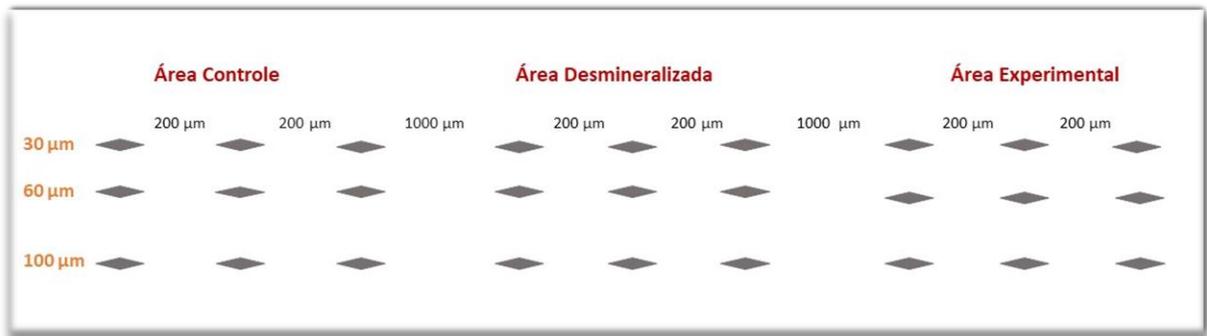
Figura 8. A - Disco de feltro e lixa usados no polimento dos espécimes.
B- Espécime incluído em resina acrílica com polimento finalizado.



Fonte: Ribeiro, BCF.

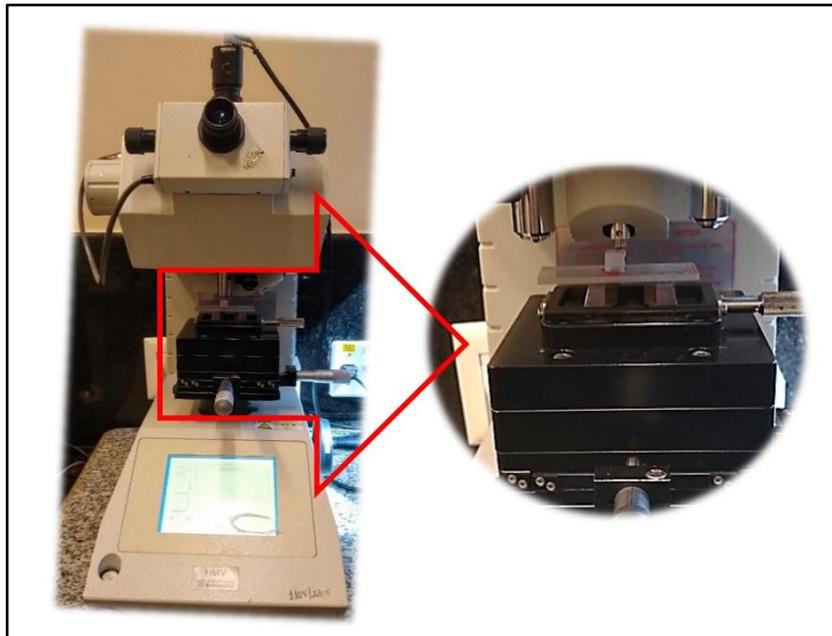
Para análise da microdureza em profundidade foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation – Kyoto - Japão) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, em profundidade utilizando carga estática de 25gf, aplicada por 10s. As indentações foram realizadas na região de subsuperfície (30 μm abaixo da superfície de esmalte e as marcações seguintes em 60 μm e 100 μm da superfície) nas três áreas. Entre cada uma destas áreas, foi mantida a distância de 1000 μm , com o objetivo de evitar qualquer interferência entre as áreas. Para cada profundidade e área, foram realizadas três indentações, com uma distância de 200 μm entre elas, totalizando nove indentações em cada área. Ao final, foi realizada uma média de cada área (controle, desmineralizada e experimental) e usado esses valores para análise dos dados (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Desenho esquemático demonstrando as indentações realizadas em cada área.



Fonte: Ribeiro, BCF.

Figura 10. Microdurômetro usado na análise de microdureza longitudinal.



Fonte: Ribeiro, BCF.

3.11 Análise de dados

Os dados foram analisados quanto a sua distribuição e homogeneidade, e se apresentaram normais e homogêneos, assim realizou-se a análise de variância a um critério (ANOVA One-Way) para as análises do perfil de desgaste, rugosidade superficial e microdureza longitudinal. Para a comparação das médias, empregou-se o teste de Tukey em nível de significância de 5%. As imagens obtidas por microscopia confocal a laser foram analisadas qualitativamente.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Perfil de desgaste

Na análise do perfil de desgaste foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos controle, Duraphat® e experimental. Pode-se observar que todos eles apresentaram perda mineral similar do esmalte superficial (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio-padrão, em μm , do perfil de desgaste dos grupos analisados.

Grupos	Perfil de desgaste (Rv)
Controle	$4,22 \pm 1,02^a$
Duraphat®	$4,09 \pm 0,86^a$
Experimental	$4,19 \pm 0,73^a$

*Mesma letra indica similaridade estatística.

Fonte: Ribeiro, BCF.

4.2 Rugosidade

Na rugosidade superficial de cada área isoladamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p>0,05$). Ao fazer uma análise da rugosidade interna do grupo, em todos eles o valor de rugosidade na área controle foi diferente estatisticamente das áreas desmineralizada e experimental ($p<0,05$). No entanto, entre as áreas desmineralizada e experimental não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Tabela 2). Assim, no início do estudo

a superfície de esmalte apresentava-se mais rugosa, e após o primeiro desafio erosivo houve uma diminuição da rugosidade superficial que se manteve até o final do estudo (Figura 11).

Tabela 2. Média e desvio-padrão, em μm , da rugosidade da superfície de esmalte das áreas analisadas.

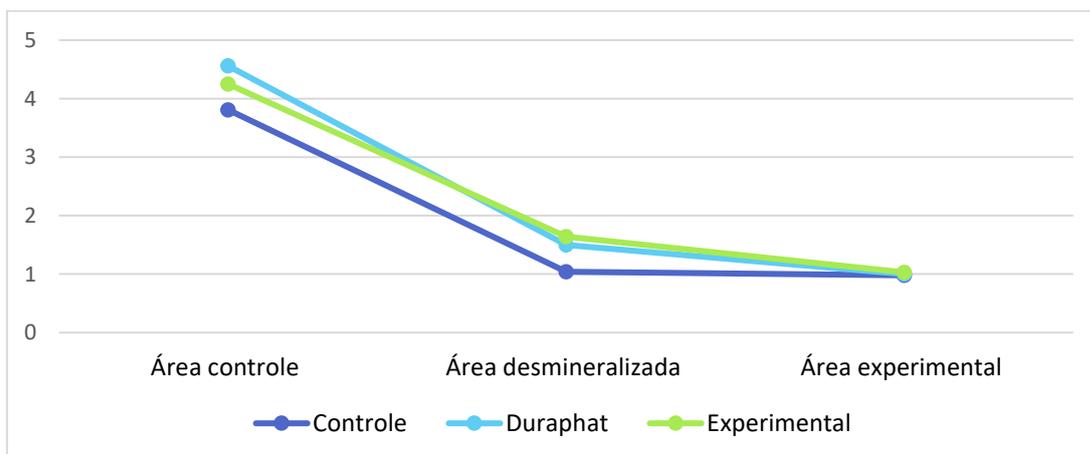
Grupos	Área controle	Área desmineralizada	Área experimental
Controle	$3,81 \pm 0,76^{aA}$	$1,04 \pm 0,41^{aB}$	$0,98 \pm 0,38^{aB}$
Duraphat®	$4,56 \pm 1,18^{aA}$	$1,50 \pm 0,68^{aB}$	$1,00 \pm 0,40^{aB}$
Experimental	$4,25 \pm 0,93^{aA}$	$1,64 \pm 0,67^{aB}$	$1,03 \pm 0,41^{aB}$

*Letra minúscula - comparação na coluna; letra maiúscula - comparação na linha.

*Mesma letra indica similaridade estatística.

Fonte: Ribeiro, BCF.

Figura 11. Alteração da rugosidade superficial ao longo do estudo para os diferentes grupos analisados.



Fonte: Ribeiro, BCF.

4.3 Microdureza longitudinal em profundidade

Para a microdureza analisou-se separadamente as diferentes áreas e observou-se que as regiões controle, desmineralizada e experimental, não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) (Tabela 3). Ao fazer uma análise dos grupos internamente, observou-se que os grupos controle e experimental apresentaram diferença estatisticamente significante entre as áreas controle - desmineralizada e controle - experimental ($p<0,05$). Entre as áreas desmineralizada - experimental houve um declínio nos valores da microdureza, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significante ($p>0,05$) (Figura 12). No grupo Duraphat[®], houve diferença estatisticamente significante apenas entre as áreas controle - experimental ($p<0,05$).

Tabela 3. Média e desvio-padrão, em μm , da microdureza longitudinal das áreas analisadas.

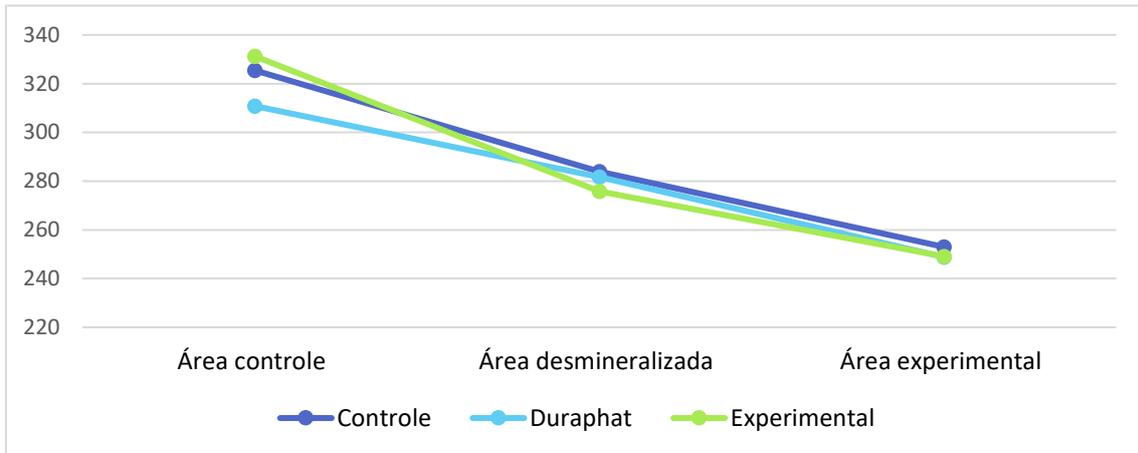
Grupos	Área controle	Área desmineralizada	Área experimental
Controle	325,46 \pm 37,10 ^{aA}	283,89 \pm 32,01 ^{aB}	253,00 \pm 55,50 ^{aB}
Duraphat [®]	310,81 \pm 32,27 ^{aA}	281,73 \pm 46,05 ^{aAB}	248,85 \pm 66,41 ^{aB}
Experimental	331,27 \pm 62,34 ^{aA}	275,83 \pm 50,94 ^{aB}	249,09 \pm 41,79 ^{aB}

* Letra minúscula - comparação na coluna; letra maiúscula - comparação na linha.

*Mesma letra indica similaridade estatística.

Fonte: Ribeiro, BCF.

Figura 12. Alteração da microdureza longitudinal ao longo do estudo para os diferentes grupos analisados.

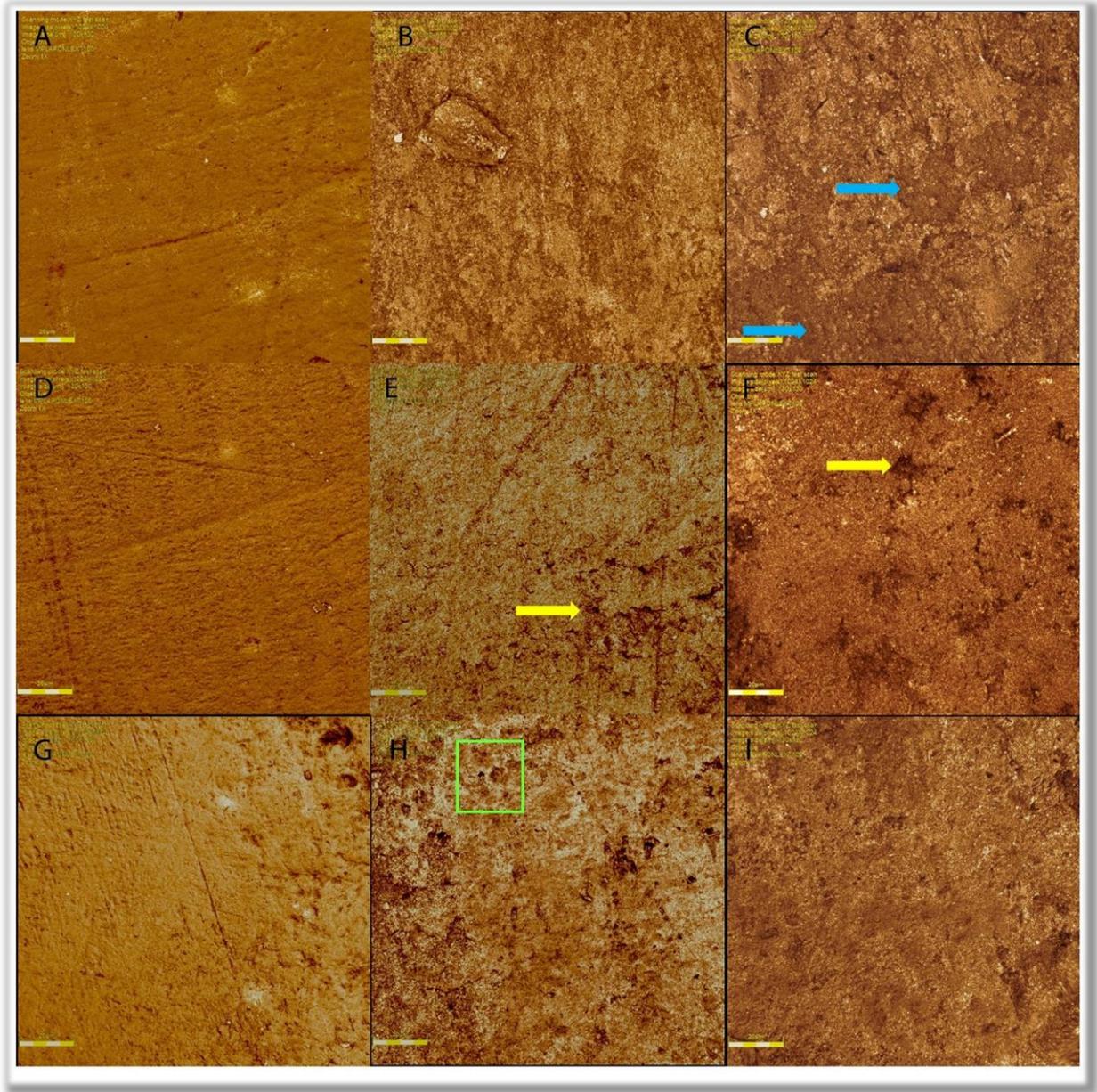


Fonte: Ribeiro, BCF.

4.4 Análise morfológica

Na análise das imagens realizadas no microscópio confocal a laser das áreas controle, desmineralizada e experimental, em todos os grupos observa-se uma mudança na superfície do esmalte. Nas imagens abaixo (Figuras 13 e 14) é possível observar a evolução do processo erosivo ao longo do estudo. Na área controle, o esmalte apresentava um aspecto mais uniforme, sem porosidades e ausência de áreas de desmineralização. Nas áreas desmineralizada e experimental, o esmalte apresentava um aspecto rugoso, com algumas porosidades e extensas áreas de desmineralização, sendo que em algumas imagens foi possível observar pequenas depressões na superfície, ficando evidente a perda mineral, principalmente, ao observar as imagens em 3D (Figura 14). As imagens foram semelhantes, portanto, morfológicamente, não houve diferença entre os grupos controle, Duraphat® e experimental.

Figura 13. Superfície de esmalte das áreas controle, desmineralizada e experimental dos grupos analisados. Grupo Controle: A – área controle. B – área desmineralizada. C – área experimental. Grupo Duraphat®: D – área controle. E – área desmineralizada. F – área experimental. Grupo Experimental: G – área controle. H – área desmineralizada. I – área experimental.



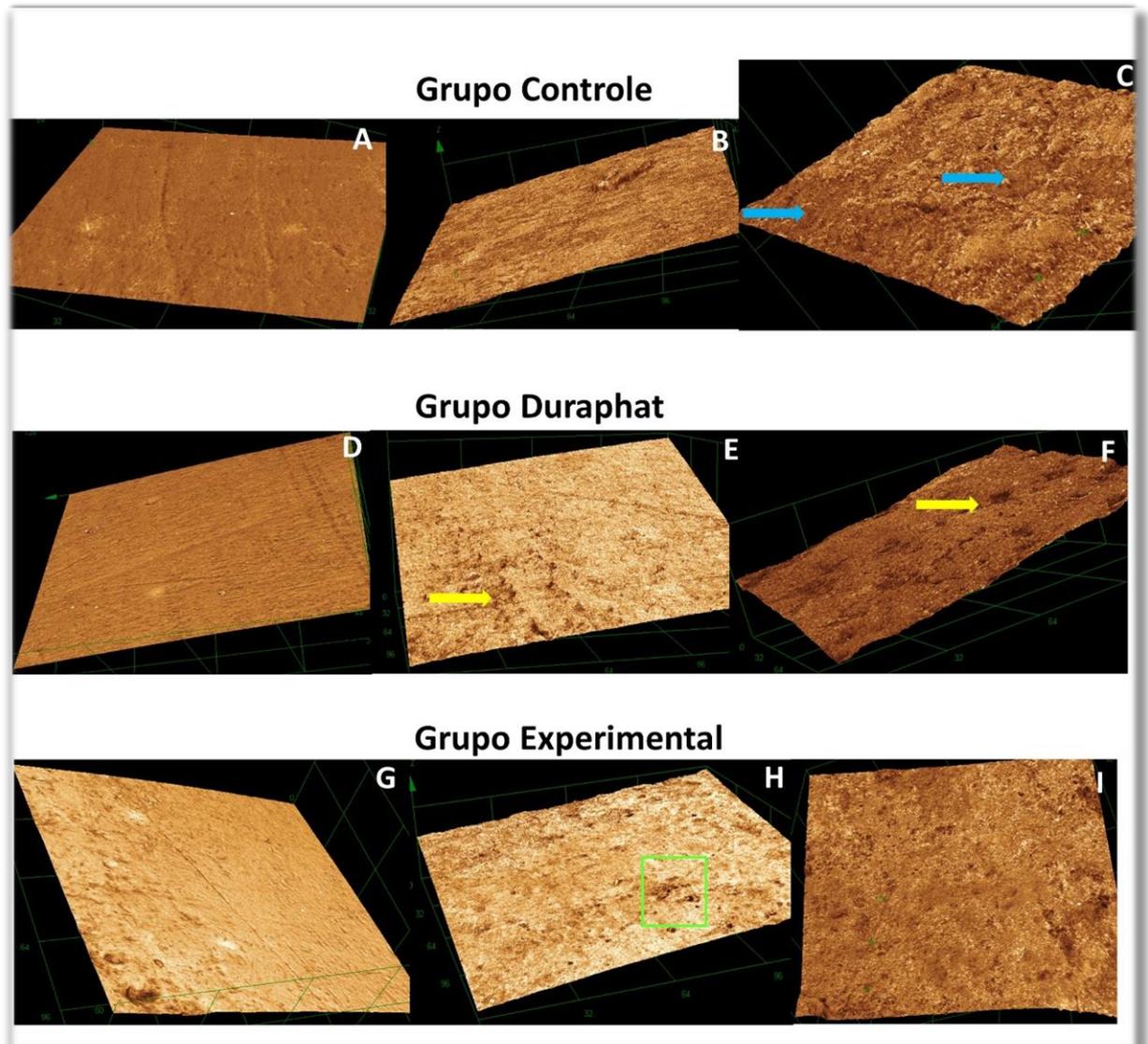
*Seta azul: áreas com leve depressão na superfície de esmalte.

Fonte: Ribeiro, BCF.

*Seta amarela: áreas com porosidades.

*Área demarcada em verde: superfície rugosa e desmineralizada.

Figura 14. Superfície de esmalte em 3D das áreas controle, desmineralizada e experimental dos grupos analisados. Grupo Controle: A – área controle. B – área desmineralizada. C – área experimental. Grupo Duraphat®: D – área controle. E – área desmineralizada. F – área experimental. Grupo Experimental: G – área controle. H – área desmineralizada. I – área experimental.



*Seta azul: áreas com leve depressão na superfície de esmalte.

Fonte: Ribeiro, BCF.

*Seta amarela: áreas com porosidades.

*Área demarcada em verde: superfície rugosa e desmineralizada.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, em todos os grupos analisados houve desmineralização da superfície de esmalte, e essa perda mineral foi semelhante ao comparar os grupos entre si. No grupo controle, como nenhum tratamento foi realizado, já era esperado uma perda mineral considerável. Nos grupos Duraphat® e experimental foi possível observar que os vernizes empregados não foram eficientes em proteger o esmalte e impedir a progressão da perda mineral causada pelo processo erosivo, que foi induzido por sucessivas imersões em Coca-Cola®.

Na realização deste estudo foram utilizados incisivos decíduos provenientes do Banco de Dentes. Os dentes decíduos apresentam as suas particularidades e difere dos dentes permanentes, pois são menores e apresentam uma camada de esmalte mais fina [5,55]. Em relação à composição mineral, o esmalte decíduo contém maior quantidade de carbonato incorporado em seus cristais, e esses íons CO_3^{2-} podem substituir um grupo OH^- e formar uma hidroxiapatita tipo A, ou substituir um grupo PO_4^{3-} e formar uma hidroxiapatita do tipo B. O esmalte decíduo é composto basicamente de hidroxiapatita tipo A que é significativamente mais solúvel [5,55]. Esses cristais de hidroxiapatita estão dispostos em feixes formando os prismas de esmalte, que também diferem nos dentes decíduos pois são menores, menos organizados e mais espalhados, tendo uma maior distância interprismática [5,55,56]. O esmalte decíduo também é menos mineralizado, enquanto o permanente apresenta cerca de 97% do seu volume de conteúdo mineral, o dente decíduo apresenta cerca de 81-94% [2]. Essas diferenças fazem com que os dentes decíduos sejam mais susceptíveis à desmineralização, e, portanto, o comportamento dos vernizes empregados podem ser distintos no dente permanente.

Para os desafios erosivos a Coca-Cola® foi utilizada, por ser uma bebida amplamente consumida e que apresenta pH baixo (2,5) e alta acidez titulável, características importantes para induzir a desmineralização do esmalte [8]. O intuito foi simular o dia a dia de uma criança que faz uso da bebida, visto que atualmente cada vez mais as crianças consomem refrigerantes [3]. Diversos estudos também utilizaram a Coca-Cola® para induzir a desmineralização [3,4,26,28,29], porém houve uma variação na forma como os ciclos erosivos foram realizados. A metodologia

empregada neste estudo já foi utilizada pelo grupo de pesquisa em estudo anterior [53] e a proposta de realizar seis ciclos erosivos por dia durante cinco dias consecutivos foi simular uma condição de desgaste erosivo intenso.

No presente estudo o microscópio confocal a laser foi utilizado para a realização das análises quantitativas de perfil de desgaste e rugosidade superficial, e análise qualitativa da morfologia da superfície de esmalte. O microscópio confocal a laser gera imagens de planos focais específicos e em alta resolução, através do escaneamento da superfície pelo laser, isso permite analisar detalhadamente a topografia da superfície de esmalte, como também, quantificar a perda e a profundidade de tecido mineral perdido [57,58]. A perda da dureza superficial foi medida através de um penetrador de diamante romboide knoop, é um método muito utilizado em estudos *in vitro*, e sensível a alterações na camada mais superficial de uma lesão erosiva, assim, é possível obter informações precisas de lesão erosiva precoce na superfície de esmalte [57].

O verniz fluoretado Duraphat® foi utilizado pois vem sendo bem estudado na prevenção da erosão dentária [5,6,56] e utilizado como controle comercial, além disso, é um produto comumente utilizado na clínica odontológica. Neste estudo, o verniz Duraphat® não foi eficaz em impedir a progressão do desgaste erosivo da superfície dentária. Assim como o estudo de Murakami et al. [56], em que o verniz fluoretado não conseguiu proteger a superfície de esmalte de dentes decíduos submetidos a desafios erosivos com Coca-Cola®, e houve também, redução da dureza knoop ao longo do experimento, o que corrobora com os resultados deste estudo.

Para a erosão dentária, o própolis já foi utilizado visando modificar a película salivar devido aos polifenóis que fazem parte da sua composição química, e assim aumentar o seu efeito protetor, entretanto, os resultados não foram satisfatórios [59,60]. E para remineralizar o esmalte dentário após o processo erosivo, em que se mostrou eficaz quando utilizado o óleo de própolis e houve um aumento da microdureza Vickers [61]. Estes estudos foram *in vitro* e realizados com dentes permanentes. No presente estudo, empregou-se o extrato e em saliva artificial que não possui proteínas para interagir com o própolis, sendo provavelmente uma possível explicação dos resultados obtidos.

A quitosana, por sua vez, vem demonstrando ser um material promissor em estudos de erosão dentária. A sua utilização tanto em esmalte quanto em dentina, mostra que esse biopolímero consegue aderir aos substratos dentais e dessa forma proteger a superfície, reduzindo a perda mineral [62-65]. Nesse contexto, um estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa [64], obteve resultados interessantes com a utilização de uma solução de quitosana semelhante à empregada no presente estudo. A solução utilizada foi capaz de controlar o processo erosivo, diminuindo a perda de estrutura dentinária. No entanto, foram usados dentes bovinos, que apresenta características semelhantes aos dentes permanentes humanos [66]. A associação de quitosana, flúor e íons metálicos (estanho/tetrafluoreto de titânio) também vem sendo bastante investigada e demonstrado resultados animadores [48-52]. No entanto, a literatura ainda é escassa de estudos com soluções de quitosana aplicadas em dentes decíduos, e como estes diferem dos dentes permanentes, é necessário o seu estudo. No presente trabalho observou-se que a solução a base de quitosana não foi eficaz na paralisação do processo erosivo, essa diferença com a literatura é provavelmente devido as particularidades da estrutura analisada.

Existem poucos estudos que analisaram a associação de própolis e quitosana, sendo que estes avaliaram a sua eficácia contra biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Como ambos possuem propriedade antimicrobiana, esse sinergismo foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme [67], inclusive em dentes decíduos [68], na qual a solução de própolis/quitosana demonstrou ser efetiva como medicação intracanal. Não há pesquisas envolvendo o verniz própolis/quitosana no processo erosivo que possa servir de comparação.

Ao avaliar os valores da rugosidade superficial (Sa) observa-se que houve uma diminuição ao longo do estudo, ou seja, no início o esmalte estava mais rugoso. Isso pode ser explicado devido ao poder de desmineralização da Coca-Cola®, que ao entrar em contato com a superfície de esmalte acarreta perda mineral e consequentemente proporciona uma certa homogeneidade dessa superfície. Evidenciando assim, tanto o efeito erosivo da Coca-Cola®, quanto a ineficiência dos vernizes empregados que não conseguiram impedir esses efeitos na superfície dentária. No entanto, ao analisar detalhadamente a morfologia da superfície de esmalte, no início do estudo o esmalte tinha uma topografia menos irregular e ao final aumentou-se a aparência irregular. Essa diferença provavelmente ocorreu devido a

análise morfológica ser realizada em uma magnificação muito maior que a análise da rugosidade, e assim, observou-se os detalhes de uma área bem pontual da superfície.

Pode-se observar a perda mineral contínua em decorrência dos desafios erosivos para todos os grupos, que foi demonstrado pela diminuição dos valores de microdureza ao longo do estudo. Da mesma forma, em relação ao perfil de desgaste, houve perda mineral semelhante nos três grupos, nas áreas submetidas aos desafios erosivos (áreas desmineralizada e experimental). Demonstrando que nenhum tratamento realmente conseguiu paralisar e nem diminuir a perda estrutural.

Apesar dos resultados mostrarem que não houve uma eficácia do verniz experimental, é importante ressaltar a proposta inovadora do estudo ao utilizar um verniz de origem natural e com dois biomateriais com propriedades farmacológicas bem relatadas na literatura [34,35,42,45]. Além disso, a busca por novos materiais na tentativa de impedir ou minimizar os danos causados pela erosão dentária é desejável, principalmente na dentição decídua, visto que essa condição tem se tornado cada vez mais prevalente e atinge cada vez mais a população jovem [7]. Os refrigerantes carbonatados vêm sendo bastante consumido pelas crianças, e como tem uma alta capacidade de desmineralização, é essencial que o cirurgião-dentista oriente os pais/responsáveis sobre o seu consumo, no intuito de prevenir a erosão dentária e evitar danos maiores a dentição decídua, dado a importância de manter os dentes decíduos saudáveis até a sua esfoliação. Desse modo, mais estudos que visem o tratamento da erosão dentária em dentes decíduos são necessários.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada no presente estudo, conclui-se que:

- O verniz experimental de própolis/quitosana não foi capaz de impedir a progressão da perda mineral na superfície de esmalte dos dentes decíduos decorrente do processo erosivo.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Donovan T, Nguyen-Ngoc C, Abd Alraheem I, Irusa K. Contemporary diagnosis and management of dental erosion. *J Esthet Restor Dent.* 2021 Jan;33(1):78-87.
2. Rajeev G, Lewis AJ, N S. A time based objective evaluation of the erosive effects of various beverages on enamel and cementum of deciduous and permanent teeth. *J Clin Exp Dent.* 2020 Jan1;12(1):e1-e8.
3. Poggio C, Gulino C, Mirando M, Colombo M, Pietrocola G. Preventive effects of different protective agents on dentin erosion: an *in vitro* investigation. *J Clin Exp Dent.* 2017 Jan1;9(1):e7-e12.
4. Haghgou HR, Haghgoo R, Asdollah FM. Comparison of the microhardness of primary and permanent teeth after immersion in two types of carbonated beverages. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016 Jul-Aug;6(4):344-8.
5. Lussi A, Buzalaf MAR, Duangthip D, Anttonen V, Ganss C, João-Souza SH, *et al.* The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019 Dec;20(6):517-527.
6. Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:18-29.
7. Souza BM, Vertuan M, Gonçalves IVB, Magalhães AC. Effect of different citrus sweets on the development of enamel erosion *in vitro*. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20200182.
8. Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, Demarco FF. Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: results of a meta-analysis and meta-regression. *J Dent.* 2015 Aug;43(8):865-75.
9. Tocolini DG, Dalledone M, Brancher JA, de Souza JF, Gonzaga CC. Evaluation of the erosive capacity of children's beverages on primary teeth enamel: an *in vitro* study. *J Clin Exp Dent.* 2018 Apr 1;10(4):e383-e387.
10. Yip K, Lam PPY, Yiu CKY. Prevalence and associated factors of erosive tooth wear among preschool children - a systematic review and meta-analysis. *Healthcare (Basel).* 2022 Mar 7;10(3):491.
11. Schlueter N, Luka B. Erosive tooth wear - a review on global prevalence and on its prevalence in risk groups. *Br Dent J.* 2018 Mar 9;224(5):364-370.
12. Frazao JB, Machado LG, Ferreira MC. Dental erosion in schoolchildren and associated factors: a cross-sectional study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2018 Apr-Jun;36(2):113-119.
13. Santana NMS, Silva DR, Paiva PRR, Cardoso AMR, Silva ACB. Prevalence of dental erosion and associated factors in a schoolchildren population. *Rev Odontol UNESP [online].* 2018 Jun;47(3):155-160.
14. Scatena C, de Mesquita-Guimarães KSF, Galafassi D, Palma-Dibb RG, Borsatto MC, Serra MC. Effects of a potentially erosive antiasthmatic medicine on the enamel and dentin of primary teeth: an *in situ* study. *Microsc Res Tech.* 2018 Sep;81(9):1077-1083.

15. Mahmoud EF, Omar OM. Erosive and cariogenic potential of various pediatric liquid medicaments on primary tooth enamel: A SEM study. *Dent Med Probl.* 2018 Jul-Sep;55(3):247-254.
16. Kulkarni P, Anand A, Bansal A, Jain A, Tiwari U, Agrawal S. Erosive effects of pediatric liquid medicinal syrups on primary enamel: an *in vitro* comparative study. *Indian J Dent.* 2016 Sep;7(3):131-133.
17. Scatena C, Galafassi D, Gomes-Silva JM, Borsatto MC, Serra MC. *In vitro* erosive effect of pediatric medicines on deciduous tooth enamel. *Braz Dent J.* 2014 Jan-Feb;25(1):22-7.
18. Maurya A, Shashikiran ND, Gaonkar N, Gugawad S, Taur S, Hadakar S, *et al.* Evaluation of change in microhardness by application of MI Varnish on primary tooth enamel, affected by use of frequently prescribed paediatric syrups: an *in vitro* study. *Cureus.* 2020;12(1):e6533.
19. Moazzez R, Austin R. Medical conditions and erosive tooth wear. *Br Dent J.* 2018 Mar 9;224(5):326-332.
20. Sarath Kumar KS, Mungara J, Venumbaka NR, Vijayakumar P, Karunakaran D. Oral manifestations of gastroesophageal reflux disease in children: a preliminary observational study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2018 Apr-Jun;36(2):125-129.
21. Ramachandran A, Raja Khan SI, Vaitheeswaran N. Incidence and pattern of dental erosion in gastroesophageal reflux disease patients. *J Pharm Bioallied Sci.* 2017 Nov;9(Suppl 1):S138-S141.
22. Picos A, Badea ME, Dumitrascu DL. Dental erosion in gastro-esophageal reflux disease. a systematic review. *Clujul Med.* 2018 Oct;91(4):387-390.
23. Milani DC, Borba M, Farré R, Grando LGR, Bertol C, Fornari F. Gastroesophageal reflux disease and dental erosion: the role of bile acids. *Arch Oral Biol.* 2022 Jul;139:105429.
24. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion - an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12.
25. Assunção CM, Schlueter N, Rodrigues JA, Carvalho TS, Lussi A. Do fluoride toothpastes have similar preventive effect in permanent and primary teeth against erosive tooth wear? *Int J Paediatr Dent.* 2018 Nov15.
26. Elwardani GE, Harhash TAH, Zaky AA. Effect of Er,Cr:YSGG on remineralization using CPP - ACPF (MI - Paste Plus) after enamel erosion caused by carbonated soft drink in primary teeth: *in-vitro* study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019 Apr 13;7(7):1184-1192.
27. Alexandria A, Valença AMG, Cabral LM, Maia LC. Comparative effects of CPP-ACP and xylitol F-varnishes on the reduction of tooth erosion and its progression. *Braz Dent J.* 2020 Nov-Dec;31(6):664-672.
28. Yu H, Jiang NW, Ye XY, Zheng HY, Attin T, Cheng H. *In situ* effect of tooth mousse containing CPP-ACP on human enamel subjected to *in vivo* acid attacks. *J Dent.* 2018 Sep;76:40-45.

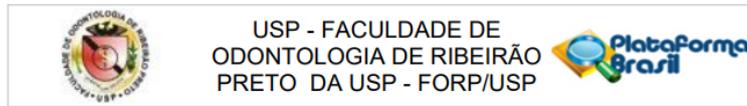
29. Alexandria AK, Valença AMG, Cabral LM, Maia LC. Fluoride varnishes against dental erosion caused by soft drink combined with pediatric liquid medicine. *Braz Dent J*. 2017 Jul-Aug;28(4):482-488.
30. Alexandria AK, Vieira TI, Pithon MM, da Silva Fidalgo TK, Fonseca-Gonçalves A, Valença AM, *et al*. *In vitro* enamel erosion and abrasion-inhibiting effect of different fluoride varnishes. *Arch Oral Biol*. 2017 May;77:39-43.
31. Wiegand A, Attin T. Randomised *in situ* trial on the effect of milk and CPP-ACP on dental erosion. *J Dent*. 2014 Sep;42(9):1210-5.
32. Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odontol Scand*. 2012 May;70(3):177-83.
33. Carvalho C, Fernandes WHC, Moutinho TBF, Souza DM, Marcucci MC, D'Alpino PHP. Evidence-based studies and perspectives of the use of Brazilian green and red propolis in dentistry. *Eur J Dent*. 2019 Jul;13(3):459-465.
34. da Silva Barboza A, Aitken-Saavedra JP, Ferreira ML, Fábio Aranha AM, Lund RG. Are propolis extracts potential pharmacological agents in human oral health? A scoping review and technology prospecting. *J Ethnopharmacol*. 2021 May 10;271:113846.
35. Zuhendri F, Felitti R, Fearnley J, Ravalía M. The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *J Oral Biosci*. 2021 Mar;63(1):23-34.
36. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S. Evaluation of antibacterial effect of propolis and its application in mouthwash production. *Front Dent*. 2019 Jan-Feb;16(1):1-12.
37. Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M, Gema SM, Ghadirian H, Seifi H, *et al*. Applications of propolis in dentistry: a review. *Ethiop J Health Sci*. 2018 Jul;28(4):505-512.
38. Airen B, Sarkar PA, Tomar U, Bishen KA. Antibacterial effect of propolis derived from tribal region on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An *in vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2018 Jan-Mar;36(1):48-52.
39. Khurshid Z, Naseem M, Zafar MS, Najeeb S, Zohaib S. Propolis: a natural biomaterial for dental and oral healthcare. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2017 Dec;11(4):265-274.
40. Piekarcz T, Mertas A, Wiatrak K, Rój R, Kownacki P, Śmieszek-Wilczewska J, *et al*. The influence of toothpaste containing Australian melaleuca alternifolia oil and ethanolic extract of polish propolis on oral hygiene and microbiome in patients requiring conservative procedures. *Molecules*. 2017 Nov 13;22(11):1957.
41. Saeed MA, Khabeer A, Faridi MA, Makhdoom G. Effectiveness of propolis in maintaining oral health: a scoping review. *Can J Dent Hyg*. 2021 Oct 1;55(3):167-176.
42. Zhang C, Hui D, Du C, Sun H, Peng W, Pu X, *et al*. Preparation and application of chitosan biomaterials in dentistry. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jan 15;167:1198-1210.

43. Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, *et al.* Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol.* 2020 Nov 1;162:956-974.
44. Cicciù M, Fiorillo L, Cervino G. Chitosan use in dentistry: a systematic review of recent clinical studies. *Mar Drugs.* 2019 Jul 17;17(7):417.
45. Sharifianjazi F, Khaksar S, Esmaeilkhanian A, Bazli L, Eskandarinezhad S, Salahshour P, *et al.* Advancements in fabrication and application of chitosan composites in implants and dentistry: a review. *Biomolecules.* 2022 Jan 18;12(2):155.
46. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res.* 2017 Jul;8(4):387-392.
47. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, *et al.* Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single- and multispecies biofilms: an *in vitro* and *in situ* study. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1332-1336.
48. 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 Dec;40(12):1036-43.
49. Carvalho TS, Lussi A. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *J Dent.* 2014 Apr;42(4):450-9.
50. Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn²⁺-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomised *in situ* trial. *Clin Oral Investig.* 2014 Jan;18(1):107-15.
51. de Souza BM, Santi LRP, João-Souza SH, Carvalho TS, Magalhães AC. Effect of titanium tetrafluoride/sodium fluoride solutions containing chitosan at different viscosities on the protection of enamel erosion *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 2020 Dec;120:104921.
52. Pini NI, Lima DA, Lovadino JR, Ganss C, Schlueter N. *In vitro* efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel. *Caries Res.* 2016;50(3):337-45.
53. dos Reis Derceli J, Faraoni-Romano JJ, Azevedo DT, Wang L, Bataglioni C, Palma-Dibb RG. Effect of pretreatment with an Er:YAG laser and fluoride on the prevention of dental enamel erosion. *Lasers Med Sci.* 2015 Feb;30(2):857-62.
54. 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.
55. Carvalho TS, Lussi A, Schlueter N, Baumann T. Differences in susceptibility of deciduous and permanent teeth to erosion exist, albeit depending on protocol design and method of assessment. *Sci Rep.* 2022 Mar 9;12(1):4153.

56. Murakami C, Bönecker M, Corrêa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol.* 2009 Nov;54(11):997-1001.
57. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:13-23.
58. Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, *et al.* Quantification of dental erosion - a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater.* 2010 Apr;26(4):326-36.
59. Niemeyer SH, Baumann T, Lussi A, Meyer-Lueckel H, Scaramucci T, Carvalho TS. Salivary pellicle modification with polyphenol-rich teas and natural extracts to improve protection against dental erosion. *J Dent.* 2021 Feb;105:103567.
60. Habluetzel A, Schmid C, Carvalho TS, Lussi A, Eick S. Impact of honey on dental erosion and adhesion of early bacterial colonizers. *Sci Rep.* 2018 Jul 19;8(1):10936.
61. Ali S, Farooq I, Bugshan A, Siddiqui IA, Al-Khalifa KS, Al-Hariri M. Efficacy of propolis in remineralising artificially induced demineralisation of human enamel - an *in vitro* study. *J Taibah Univ Med Sci.* 2020 Dec 14;16(2):283-287.
62. Visveswaraiah PM, Prasad D, Johnson S. Chitosan - A novel way to intervene in enamel demineralization - An *in vitro* study. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014 3 (11):617-27.
63. Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D, *et al.* Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci.* 2012 Nov 1;385(1):235-43.
64. Yamakami SA. Efeito de diferentes tratamentos na interceptação da erosão dentinária [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019.
65. Souza BM, Machado PF, Vecchia LR, Magalhães AC. Effect of chitosan solutions with or without fluoride on the protection against dentin erosion *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 2020 Dec;128(6):495-500.
66. Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies - insights and rational concepts. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:53-9.
67. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Siddalingam RP, Yuen KH, Ambu SP, *et al.* Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS One.* 2017 Mar 31;12(3):e0174888.
68. Shamma B, Arrag E, Rajab A, Kurdi S. Anti-bacterial activity of applying chitosan and propolis dressing against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: *in vitro* study. *Journal of Stomatology.* 2022;75(1):36-43.

ANEXO

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Forp-USP.

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

Título da Pesquisa: Emprego do própolis para a prevenção de erosão dentária em dentes decíduos: estudo in vitro

Pesquisador: BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38187420.6.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.402.245

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 241ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 11/11/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1611358.pdf	09/10/2020 16:35:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOFINALBRUNA.pdf	22/08/2020 08:34:52	BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoBiobancoBruna.pdf	22/08/2020 08:26:08	BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoInfraestruturaBruna.pdf	22/08/2020 08:24:58	BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoBruna.pdf	22/08/2020 08:22:08	BRUNA CRISTINA DE FREITAS RIBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 16 de Novembro de 2020

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br