



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

TAIANA PAOLA PRADO WRZESINSKI

EFEITO ANTIEROSIVO DE SOLUÇÕES FLUORETADAS
ASSOCIADAS AO COPOLIMERO AMINOMETACRILATO: estudo
in situ randomizado cruzado

2022

TAIANA PAOLA PRADO WRZESINSKI

**EFEITO ANTIEROSIVO DE SOLUÇÕES FLUORETADAS ASSOCIADAS AO
COPOLIMERO AMINOMETACRILATO: estudo in situ randomizado cruzado**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo programa de pós-graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Dentística. Linha de pesquisa: Diagnóstico, prevenção e tratamento de alterações dos tecidos dentais.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Bühler Borges

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Wrzesinski, Taiana Paola Prado

Efeito antierosivo de soluções fluoretadas associadas ao copolímero Aminometacrilato: estudo in situ randomizado cruzado / Taiana Paola Prado Wrzesinski. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Alessandra Bühler Borges.

1. Erosão dental. 2. Esmalte dental. 3. Polímeros. 4. Fluoreto de sódio. I. Borges, Alessandra Bühler, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.

Renata Aparecida Couto Martins CRB-
8/8376

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Alessandra Bühler Borges (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Carlos Rocha Gomes Torres

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia

Câmpus de Araçatuba

São José dos Campos, 13 de dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico essa pesquisa a **Deus** e **minha família** que constantemente alicerçam minha vida para que eu possa alçar voos mais altos.

A **todas as mulheres** que são inspiração para mim. Em especial a minha mãe **Márcia**, meu grande exemplo de mulher persistente, trabalhadora e amorosa. Ensina-me constantemente sobre o valor do esforço e a importância de lutar por nossos sonhos. Com seu grande modelo, eu não poderia fazer nada além de seguir os seus passos e lutar pela minha felicidade. Obrigada por existir, mãe!

A **todos** que com suas ações contribuem para a transformação da sociedade por meio da ciência e popularização do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu guia e fonte de paz. Obrigada por permitir que tantas coisas boas aconteçam em minha vida.

A **minha família**, que constantemente me ensina que tudo posso quando realizo com amor e dedicação! Só de pensar em vocês, meu coração transborda amor e gratidão. A meu irmão **Iago Emanuel Prado** e meus pais **Claudemir do Prado** e **Márcia Ivoni Pitarelli do Prado** que são minha inspiração e meus maiores incentivadores na busca por realizar meus sonhos, amo muito vocês! A meu esposo **Eduardo Augusto Wrzesinski** que abraça sempre meus projetos e sonhos, caminha ao meu lado e me ajuda a realiza-los. Te amo por tudo que você é e pela força que você me traz!

Gratidão especial a minha orientadora **Alessandra Bühler Borges**, pela mulher brilhante e profissional que é. Muito obrigado por compartilhar sua sabedoria, seu tempo e sua experiência. Tenho muita admiração por sua dedicação e competência! Seus conselhos e incentivos abrem meus horizontes e me fazem uma pessoa e profissional muito melhor.

Ao professor **Carlos Rocha Gomes Torres**, por seu exemplo de profissionalismo, pelos conselhos e pelas oportunidades oferecidas a mim. Aprender com o senhor é um privilégio. Muito obrigada por aceitar fazer parte da banca examinadora da minha dissertação.

Ao professor **Juliano Pelim Pessan**, muito obrigada por contribuir com seu tempo e considerações para esse trabalho.

A **direção, administração, corpo docente e demais colaboradores** do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP de São José dos Campos, por oportunizarem um ambiente de crescimento e aprendizado. Tenho muito orgulho de realizar o Mestrado nessa reconhecida instituição, que hoje chamo de segunda casa.

Sobretudo, agradeço aos professores, **Cesar Rogério Pucci**, **Eduardo Bresciani**, **Karen Cristina Kazue Yui**, **Maria Filomena Rocha Lima Huhtala** e **Taciana Marco Ferraz Caneppele** do Departamento de Odontologia Restauradora. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao professor **Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, pelas considerações no exame geral de qualificação e por acreditar no meu potencial em todas as atividades que realizamos juntos.

A professora **Tais Scaramucci Forlin** do Departamento de Odontologia Restauradora da USP por ter prontamente aceitado fazer parte da banca examinadora do meu exame geral de qualificação e cuja participação enriquece este trabalho.

A professora **Idalina Vieira Aoki** do Departamento de Engenharia Química da Poli-USP por todo suporte oferecido para a realização de nossa pesquisa.

A **todos os professores** que contribuíram com seu conhecimento e dedicação para minha jornada profissional. Agradeço aos professores da minha primeira casa na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), **Adriano Picolotto, Bianca Medeiros Maran, Danielle Shima Luize Sottovia, Fabiana Scarparo Naufel, Vera Lucia Schmitt, Veridiana Camilotti e Virgínia Bosquioli**. Obrigada pelos ensinamentos compartilhados, pela confiança e amizade durante a minha formação acadêmica e pessoal. Obrigada por todas as oportunidades concedidas a mim, sem elas eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao professor **Julio Katuhide Ueda**, exemplo de profissional incentivador, cujo trabalho e dedicação me ensinou os primeiros passos da vida acadêmica, ainda na iniciação científica. Muito obrigada por acreditar em meu trabalho!

Aos **amigos** que se fazem presente mesmo de tão longe. Aos **colegas e amigos da pós-graduação** que constantemente me apoiam e deixam o trabalho mais leve e feliz, eu desejo muito sucesso a vocês! **Jefferson Moreira, Raquel Campos e Victória Carvalho** obrigada por todo apoio e amizade! Juntos compartilhamos dos inúmeros desafios e novidades com a vinda da pandemia do coronavírus e tudo enfrentamos com o espírito colaborativo.

Agradecimento especial aos antigos e atuais integrantes do time Ale Borges: **Douglas Ferreira, Maria Aparecida Holanda, Mariane Mailart, Marina Augusto, Manuela Spinola e Victor Bottesini**. Sou muito grata por fazer parte dessa equipe, pela parceria e por tudo que aprendi e aprendo com cada um de vocês.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Giovanna Lotto, Karine Carvalho, Luís Silva e Maria Rufino**, obrigada por todo auxílio e parceria na execução dos trabalhos. Vocês foram muito importantes para o meu desenvolvimento.

A todos os **participantes voluntários do estudo**, por toda colaboração e diligência, nossa pesquisa não seria possível sem vocês, por isso muito obrigada! Agradeço também ao técnico **Fernando Fontes** do laboratório de Prótese do Departamento de Odontologia Restauradora, pelo auxílio no desenvolvimento dos dispositivos.

As **funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora** pelo auxílio todas às vezes que precisei. Aos **funcionários da Secretaria de Pós-graduação**, por toda assistência sempre que dúvidas surgem e ao **supervisor do Escritório de Pesquisa**, que nos auxilia com todos os trâmites e esclarecimentos sobre o processo FAPESP.

Ao **Centro de Tecnologias das Radiações do IPEN** por disponibilizar o uso do Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 para esterilização dos espécimes com radiação gama. Estendo o agradecimento ao professores **Guilherme de Siqueira Ferreira de Anzaloni Saavedra** e **Eduardo Shigueyuki Uemura**, além da colega **Leticia Oba Sakae** que possibilitaram a logística para entrega dos espécimes em São Paulo. Muito obrigada!

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado-DS, nos períodos de 01/02/2020 a 31/07/2021 e 01/03/2022 a 13/12/2022.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Mestrado, pelo Processo nº 2020/10284-0, no período de 01/08/2021 a 31/02/2022.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Quando penso em minha vida profissional fico muito agradecida por tudo o que estou conquistando e por trabalhar com o que amo!

“Pela presença e fidelidade de Deus, daí nasce a alegria e a certeza de que estou no caminho certo”.

Edina Margarida Pitarelli

Wrzesinski TPP. Efeito antierosivo de soluções fluoretadas associadas ao copolímero Aminometacrilato: estudo in situ randomizado cruzado [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

Como continuidade ao processo de entendimento e caracterização do mecanismo de ação preventivo, o objetivo deste trabalho foi mensurar o efeito antierosivo da associação de soluções na presença da película adquirida sobre o esmalte e a dentina, frente a desafios erosivos, por meio de um estudo randomizado cruzado de modelo in situ. Para tal, no período da manhã doze voluntários previamente selecionados instalaram um dispositivo intraoral contendo seis espécimes de dentes bovinos (três em esmalte e três em dentina) e aguardaram 5 min para formação da película adquirida inicial. Após, realizaram o bochecho com uma das soluções a serem testadas (1 min), e permaneceram por 30 min sem se alimentar utilizando o dispositivo palatal, para permitir a maturação da película adquirida. Em seguida, os espécimes foram submetidos ao desafio com ácido clorídrico 0,01M, pH 2,3 por 3 min extraoralmente. Esses passos foram repetidos, para implementar uma ciclagem erosiva, com seis aplicações das soluções de tratamento, sendo: Água ultrapura (controle negativo); F; S; AMC; F associado ao S; AMC associado ao F; AMC associado ao F e S. Cada solução foi testada em uma fase com os mesmos voluntários, com um intervalo de dois dias de washout. Após o término da ciclagem, os espécimes foram removidos do dispositivo, sendo quatro (dois de esmalte e dois de dentina) separados para a análise da microbiópsia de esmalte e dentina para posterior leitura da concentração de cálcio e fósforo no ácido coletado por método colorimétrico em espectrofotômetro que posteriormente foram convertidos em valores de perda erosiva em micrometro (μm). Adicionalmente os espécimes de esmalte também foram submetidos a análise da microdureza superficial para o cálculo do percentual de redução da microdureza (%KHNred). Os dois espécimes restantes (um de esmalte e um de dentina) foram armazenados para leitura adicional da concentração de flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística ANOVA de medidas repetidas (Rm-ANOVA) e Tukey (5%). Para o substrato de esmalte os valores de perda erosiva calculada foram: C ($8,46^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^A, S ($8,61^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^A, AMC ($7,76^{-3} \pm 0,9^{-3}$)^{AB}, F ($7,15^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^B, FS ($7,82^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^{AB}, AMC+F ($5,98^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^C, AMC+FS ($6,86^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^{BC}. Para o substrato de dentina os valores de perda erosiva calculada foram: C ($11,2^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^A, S ($11,2^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^A, AMC ($9,86^{-3} \pm 0,8^{-3}$)^B, F ($9,49^{-3} \pm 0,5^{-3}$)^B, FS ($9,70^{-3} \pm 0,8^{-3}$)^B, AMC+F ($6,99^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^C, AMC+FS ($8,13^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^D. Quanto ao percentual de redução de microdureza frente a erosão em esmalte medido por microdureza, os grupos contendo polímero e soluções fluoretadas (AMC+F e AMC+FS) apresentaram melhor desempenho. Os grupos F, FS e AMC apresentaram potencial protetor intermediário e significativamente maior que o controle negativo. Os dados de concentração de flúor solúvel em KOH para o esmalte foram: C = S = AMC < F < AMC+F ≤ AMC+FS ≤ FS e em dentina foram: C = S = AMC < F = AMC+F = AMC+FS < FS. Conclui-se que não houve diferença na concentração de flúor solúvel em KOH em esmalte e dentina entre os grupos que não continham flúor e o grupo

FS exibiu maior concentração de flúor adsorvido na superfície. O biopolímero Aminometacrilato foi capaz de aumentar o efeito protetor de soluções fluoretadas na presença da película adquirida em esmalte e dentina, sendo um promissor agente a ser incorporado a soluções para controle do desgaste dental erosivo.

Palavras-chave: Erosão dental; Esmalte dental; Polímeros; Fluoreto de sódio.

Wrzesinski TPP. Anti-erosive effect of fluoride solutions associated with Aminomethacrylate copolymer: a randomized crossover in situ study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

In order to understand and characterize the preventive mechanism of action. The objective of this work was to measure the effect of the association of solutions in the anti-erosion potential of the acquired pellicle over enamel and dentin, in the face of erosive challenges, using a randomized cross-over in situ study. For this, twelve previously selected volunteers installed an intraoral device containing six specimens of bovine teeth (three in enamel and three in dentin) and waited 5 minutes for the formation of the initial acquired pellicle. Afterwards, they rinsed the mouth with one of the solutions to be tested (1 minute), and remained for 30 minutes without eating using the palatal device, to allow the maturation of the acquired pellicle. Then, the specimens were subjected to the erosive challenge with 0.03% hydrochloric acid, pH 2.3 for 3 minutes extra-orally. These steps were repeated, implementing an erosive cycle, with six applications of the treatment solutions, being: Ultrapure water (negative control); F; S; AMC; FS; AMC associated with F; AMC associated with FS. Each solution was tested in a phase with the same volunteers, with a two-day washout interval. After the end of cycling, the specimens were removed from the device, four (two enamel and two dentin) separated for analysis microbiopsy of enamel and dentin for later reading of the concentration of calcium and phosphorus in the acid collected by method colorimetric in spectrophotometer which were later converted into erosive loss values in micrometer (μm). The enamel specimens were also subjected to analysis of surface microhardness in enamel to calculate the percentage of microhardness reduction (%KHNred). The two remaining specimens (one enamel and one dentin) were stored for further reading of the concentration of KOH-soluble fluoride ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The data obtained were submitted to statistical analysis ANOVA of repeated measures (Rm-ANOVA) and Tukey (5%). The analysis of calculated erosive loss for the enamel substrate was: C ($8,46^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^A, S ($8,61^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^A, AMC ($7,76^{-3} \pm 0,9^{-3}$)^{AB}, F ($7,15^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^B, FS ($7,82^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^{AB}, AMC+F ($5,98^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^C, AMC+FS ($6,86^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^{BC}. For the dentin substrate, the calculated erosive loss values were: C ($11,2^{-3} \pm 0,7^{-3}$)^A, S ($11,2^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^A, AMC ($9,86^{-3} \pm 0,8^{-3}$)^B, F ($9,5^{-3} \pm 0,5^{-3}$)^B, FS ($9,7^{-3} \pm 0,8^{-3}$)^B, AMC+F ($7,0^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^C, AMC+FS ($8,13^{-3} \pm 0,1^{-2}$)^D. As for the percentage of KHN reduction against enamel erosion measured by microhardness, the groups containing polymer and fluoridated solutions (AMC+F and AMC+FS) performed better. The F, FS, and AMC groups showed intermediate and significantly greater protective potential than the negative control. The KOH-soluble fluoride concentration values for the enamel were: C = S = AMC < F < AMC+F $\leq$ AMC+FS $\leq$ FS and in dentin were: C = S = AMC < F = AMC+F = AMC+FS < FS. It is concluded that there was no difference in the concentration of KOH-soluble fluoride in enamel and dentin between the groups that did not contain fluoride and the FS group exhibited a higher concentration of fluoride adsorbed on the surface. The Aminomethacrylate increased the protective effect of fluoride solutions in the presence of acquired pellicle on enamel and dentin, being a promising agent to be

incorporated into solutions to control erosive dental wear.

Keywords: Tooth erosion; Dental enamel; Polymers; Sodium fluoride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores envolvidos na etiologia do desgaste erosivo dental	26
Figura 2 – Desenho esquemático de formação da película adquirida	29
Figura 3 – Esquema representando os estágios do processo de desgaste dental erosivo	32
Figura 4 – Divisão dos grupos, viscosidade (cP) e concentração de flúor (µg/ml) das soluções experimentais após preparo e ajuste de pH para 4,5	46
Figura 5 – Preparo inicial do espécime	48
Figura 6 – Embutimento e polimento do espécime	49
Figura 7 – Dispositivo intraoral	51
Figura 8 – Esquema passo-a-passo da sequência de procedimentos realizados a cada fase do experimento, no período matutino	52
Figura 9 – Esquema da coleta das amostras no tubo Eppendorf até o posicionamento no leitor de microplacas	54
Figura 10 – Avaliação de microdureza Knoop	56
Figura 11 – Fluxograma CONSORT do recrutamento e aleatorização dos voluntários do estudo em diferentes soluções experimentais	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Especificações dos materiais a serem utilizados	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey da concentração de cálcio/fósforo (mg/ml) e da perda erosiva calculada (μm) de acordo com a solução experimental (tratamento) realizada sob a superfície dos espécimes de esmalte 60

Tabela 2 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey do percentual de redução da KHN (%KHN_{red}) e do flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de acordo com a solução experimental (tratamento) realizada sob a superfície dos espécimes de esmalte 61

Tabela 3 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey da concentração de cálcio/fósforo (mg/ml), da perda erosiva (μm) e do flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de acordo com a solução experimental (tratamento) realizada sob a superfície dos espécimes de dentina 62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Definição e prevalência do desgaste dental erosivo.....	24
2.2 Etiologia e patogênese do desgaste dental erosivo.....	25
2.3 Características clínicas, histopatológicas e diagnóstico do desgaste dental erosivo.....	31
2.4 Métodos de controle da progressão da erosão dental.....	33
2.5 Métodos para análise quantitativa e qualitativa da erosão dental	36
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Aspectos éticos	40
4.2 Delineamento do estudo	40
4.3 Tamanho amostral.....	41
4.4 População do estudo	42
4.5 Sequência de alocação aleatória e implementação	44
4.6 Cegamento	45
4.7 Intervenções	45
4.7.1 Preparo das soluções a serem testadas	45
4.7.2 Preparo dos espécimes bovinos.....	47
4.7.3 Preparo dos dispositivos intraorais.....	50
4.7.4 Procedimento experimental.....	51
4.7.5 Cálculo da perda erosiva por meio da mensuração da concentração de cálcio e fósforo por método colorimétrico em espectrofotômetro	53
4.7.6 Análise da microdureza superficial em esmalte para o cálculo do percentual de redução da microdureza.....	55
4.7.7 Determinação da concentração de flúor solúvel em KOH.....	56
4.8 Delineamento estatístico	57
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Fluxograma CONSORT	59

5.2 Cálculo da perda erosiva, percentual de redução da microdureza e flúor solúvel em KOH para esmalte	60
5.3 Cálculo da perda erosiva e flúor solúvel em KOH para dentina.....	62
6 DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE	83
ANEXO.....	89

1 INTRODUÇÃO

O desgaste dental erosivo é definido como um processo químico-mecânico que resulta em perda cumulativa de tecido dental duro, não causado por bactérias. Sua etiologia é multifatorial, o que torna complexo o estudo dessa condição, mas tem como causa principal a exposição frequente a substâncias erosivas de origem intrínseca ou extrínseca no meio bucal (Carvalho et al., 2015; Schlueter et al., 2020).

Além disso, diversos fatores quando inter-relacionados podem modular o processo. Dentre eles, temos os fatores biológicos, relacionados ao fluxo e capacidade de tamponamento da saliva, à presença e composição da película adquirida, à frequência de episódios de vômitos e refluxo gastroesofágico, à anatomia e estrutura dos dentes, bem como o contato dos tecidos moles com os dentes. Quanto aos fatores químicos, pode-se citar o tipo do ácido (pk), a adesão à estrutura dental, a concentração de flúor, fosfato e cálcio disponíveis, o pH e capacidade de tamponamento da solução ingerida. Outros fatores que também podem interferir no processo são os comportamentais, sendo eles hábitos alimentares, hábitos de higiene, padrão de ingestão de bebidas ou medicamentos ácidos, consumo de drogas ilícitas, ocupação, conhecimento da doença e condição socioeconômica (Amaechi, Higham, 2005; Carvalho et al., 2015; Jarvinen et al., 1991; Lussi, Hellwig, 2014).

Sabe-se que o início da erosão dental ocorre através de um processo chamado amolecimento (*softening*), que envolve a perda parcial do conteúdo mineral superficial do esmalte, levando ao aumento da rugosidade e a diminuição da dureza (Attin et al., 1997; Lussi et al., 2011). Com a continuidade da exposição ao ácido, a superfície do esmalte é perdida camada a camada, sendo que a ação do ácido na superfície do esmalte torna sua aparência acetinada ou opaca (Carvalho et al., 2015; Lussi et al., 2011). Com a progressão do processo pode haver a total perda do esmalte, com exposição da dentina, o que tende a resultar em dor, comprometimento pulpar, perda de função e estética (Ganss et al., 2005), podendo causar implicações na qualidade de vida dos que sofrem dessa condição (Mehta et al., 2020).

Portanto, considerando sua natureza irreversível, o diagnóstico precoce e a adoção de medidas preventivas que possam controlar sua progressão, se revelam de grande importância, uma vez que tem sido observado um aumento da frequência de indivíduos acometidos pelo problema. Uma revisão sistemática demonstrou que a prevalência de desgaste erosivo em dentes permanentes de crianças e adolescentes é de 30,4% (Salas et al., 2015), o que pode estar relacionado ao consumo crescente de bebidas e alimentos ácidos nas últimas décadas, especialmente pela população jovem (Bartlett et al., 2013; Jaeggi, Lussi, 2014). Outro estudo recente, estimou a prevalência global de desgaste dental erosivo entre 20-45% em dentes permanentes, podendo apresentar envolvimento da dentina em até 45% dos casos (Schlueter, Luka, 2018). Esse dado é preocupante, considerando que o desgaste tende a se acentuar com o passar do tempo e grande parte desses estudos são realizados com crianças e adultos jovens, que precisam manter a sua dentição com função durante toda a vida.

Frente a isso diversas estratégias têm sido adotadas, incluindo a aplicação regular de produtos contendo fluoretos (Lussi, Carvalho, 2015; Magalhães et al., 2009). Uma vez que fluoretos já são regularmente utilizados no cotidiano dos indivíduos devido a sua comprovada eficácia anticariogênica, seu uso para o controle do processo erosivo seria conveniente.

Compostos monovalentes como o fluoreto de sódio (NaF) e o fluoreto de amina (AmF) podem levar à formação de precipitados semelhantes ao fluoreto de cálcio (CaF₂), que atuam como uma camada de sacrifício a ser dissolvida durante o desafio erosivo, evitando temporariamente a dissolução do tecido dentário subjacente e liberando íons cálcio e flúor para o meio, retardando assim o processo de desmineralização (Huysmans et al., 2014; Magalhães et al., 2009). No entanto, a eficácia destes compostos em inibir o processo erosivo se mostrou limitada, devido à deposição de CaF₂ depender da concentração, do tempo e da frequência de aplicação do agente fluoretado, bem como de um baixo pH da solução (Huysmans et al., 2014; Magalhães et al., 2011; Petzold, 2001). Além disso, sabe-se que esses sais são solúveis em meio ácido (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2016) sendo, portanto, menos estáveis sob condições mais erosivas (Schlueter et al., 2016).

Diante disso, o emprego de compostos polivalentes de cátions metálicos, como o fluoreto de estanho (SnF_2) e o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), bem como a associação de compostos fluoretados ao cloreto de estanho (SnCl_2), vêm demonstrando uma proteção superior contra o desgaste erosivo. Formulações contendo a combinação de flúor e estanho têm apresentado maior evidência, devido à formação de uma camada superficial rica em Sn sobre a superfície dental, que demonstrou ser mais ácido-resistente (Ganss et al., 2010a, 2010b; Scaramucci et al., 2015; Schlueter et al., 2009). No entanto, exibem limitações relacionadas à sensação de ardência na mucosa e potencial de manchamento dental (Addy, 2008; Frese et al., 2019; Sälzer et al., 2015).

Com o objetivo de aumentar a substantividade dos ativos presentes em formulações farmacêuticas, a indústria tem utilizado polímeros bioadesivos como Sistema de Liberação de Fármaco ou *Drug Delivery System*. Esse sistema de administração foi desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentando sua concentração plasmática e sendo capaz de transportar um composto farmacêutico pelo corpo durante determinado tempo até que atinja seu local de devida absorção (Lenaerts, Robert, 1989; Villanova et al., 2010; Zaman et al., 2010).

Esses compostos são capazes de se ligar a substratos biológicos através de mecanismos complexos. Dentre as teorias propostas, pode-se citar a atração eletrostática entre a superfície do polímero e o substrato biológico, devido à diferença em suas cargas iônicas; a capacidade bioadesiva resultante do contato íntimo entre o polímero o substrato biológico; a capacidade de interação entre o polímero e o substrato biológico por ligações covalentes, bem como interações químicas secundárias como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interação hidrófoba (Lenaerts, Robert, 1989).

Além disso, a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica (Lenaerts, Robert, 1989; Villanova et al., 2010). Isto nos leva a crer que os polímeros bioadesivos podem exibir efeito protetor no esmalte e dentina contra a dissolução ácida, provavelmente devido à sua interação com a superfície da hidroxiapatita, formando um filme capaz de reduzir a troca iônica entre a solução ácida e o

substrato dental (Barbour et al., 2005; Beyer et al., 2012). Ainda, podem ser capazes de potencializar o efeito protetor de compostos fluoretados (Ávila et al., 2017; Ganss et al., 2012; Moretto et al., 2010; White et al., 2011).

Diversos polímeros bioadesivos têm sido testados como ingredientes ativos em enxaguantes bucais e dentifrícios (Ganss et al., 2012; Manarelli et al., 2011) e também como aditivos em bebidas ácidas (Barbour et al., 2005; Beyer et al., 2012, 2010; Hemingway et al., 2010; Hooper et al., 2007; Scaramucci et al., 2011). Dentre os polímeros testados, os à base de metacrilato têm mostrado efeito promissor. Esses polímeros sintéticos possuem diferentes polaridades e são derivados de dimetilaminoetilmetacrilatos, ácido metacrílico e ésteres do ácido metacrílico, em várias proporções (Severino et al., 2011). Sua capacidade de formação de um filme ultrafino sobre as superfícies dentais foi observada previamente (Augusto et al., 2020; Nielsen et al., 2011). Acredita-se que esse revestimento polimérico ou deposição de um precipitado insolúvel de polimetacrilato leva à formação de uma camada de proteção sobre o esmalte contra a erosão (Baig et al., 2004). No entanto, o efeito protetor contra desafios ácidos parece ser dependente de sua estrutura química, uma vez que o tamanho da cadeias ramificadas está relacionado à afinidade pela hidroxiapatita, provavelmente devido à funcionalidade do éster polar, que através da força intermolecular dipolo-dipolo é capaz de se ligar à hidroxiapatita (Nielsen et al., 2011).

Polímeros com propriedades químicas distintas tem sido investigados com obtenção de diferentes graus de resposta quanto ao seu potencial antierosivo (Augusto et al., 2020; Ávila et al., 2020b, 2017). Dentre eles, o polímero aniônico Carbopol 980 foi capaz de melhorar o potencial protetor de soluções fluoretadas in vitro (Ávila et al., 2020a), porém, este efeito não foi significativo quando se considerou sua associação ao cloreto de estanho em um modelo in situ, considerando-se a ação da saliva e película adquirida (Ávila et al., 2020b). Como alternativa, o copolímero Aminometacrilato foi investigado em associação aos agentes fluoretados e mostrou potencial protetor mais evidente, capaz de se adsorver à hidroxiapatita, modificando seu potencial zeta, além de reduzir a dissolução da hidroxiapatita frente a desafios ácidos in vitro (Augusto et al., 2020). Ainda, demonstrou excelente capacidade de reduzir o desgaste erosivo do esmalte

quando adicionado a soluções fluoretadas simulando enxaguatórios bucais (Augusto et al., 2021), com valores de perda inferiores aos grupos controle fluoretados. Devido a estes resultados favoráveis, foi solicitado o depósito da patente junto ao INPI em 2019 (BR 10 2019 001958 1).

O Aminometacrilato é um copolímero do polimetacrilato utilizado para liberação de fármacos nas condições do pH estomacal (menor que 5), sendo portanto, solúvel nessas condições (Evonik, 2015a, 2015b) e utilizado como revestimento de fármacos, o que sugere seu promissor potencial de formação de uma barreira protetora sobre os dentes diante das variações do pH bucal. Sua estrutura é baseada no dimetilaminoetil metacrilato, butil metacrilato e metil metacrilato na proporção 2:1:1 (Evonik, 2015b).

Por se mostrar altamente promissor em testes in vitro, torna-se importante estender o conhecimento, por meio de estudos que envolvam o aminometacrilato sob um contexto clinicamente relevante, em que a ação da saliva ocorre em condições reais, considerando-se o fluxo salivar, capacidade de limpeza, conteúdo mineral, formação da película adquirida, bem como a retenção dos agentes ativos nos tecidos moles (Creeth et al., 2013; Meurman, Frank, 1991).

A película salivar é um filme orgânico livre de bactérias, que cobre tecidos orais. É composto de glicoproteínas e proteínas, incluindo várias enzimas, e funciona como uma rede semipermeável de macromoléculas salivares adsorvidas que fornecem proteção parcial contra desafios ácidos (Hannig, Hannig, 2014). É formada por duas camadas, sendo uma externa de estrutura globular menos densa que apresenta solubilidade comparativamente alta ao ácido, e outra camada basal, densa em elétrons e caracterizada com baixa solubilidade ao ácido (Nekrashevych, Stösser, 2003). Essa baixa solubilidade se deve muito provavelmente aos peptídeos e proteínas salivares adsorvidos na camada basal da película, que possuem afinidade pelos sítios de ligação cálcio e fosfato do esmalte dental (Barbour et al., 2005; Hannig, Hannig, 2014; Scaramucci et al., 2012). Isso nos leva a acreditar que a presença do polímero possa exercer algum potencial de interação com as proteínas presentes na camada basal da película, assim como demonstrado para soluções contendo o estanho, uma vez que este é capaz de formar ligações cruzadas com as proteínas da película adquirida (Algarni et al., 2015).

Frente a isso, o foco desse trabalho está na avaliação da interação entre o polímero formador de filme associado a compostos fluoretados na presença da película adquirida, uma vez que sua proteção pode ser potencializada contra erosão em condições clínicas. Desta forma, a investigação do efeito antierosivo da película associada às soluções de tratamento contendo polímeros e fluoretos pode nos fornecer subsídios para a escolha das associações mais promissoras, que em testes de eficácia adicionais podem abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de formulações capazes de prevenir a progressão da erosão dental para estágios mais avançados, que requerem tratamentos restauradores complexos e onerosos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Visando facilitar a compreensão dos assuntos abordados, apresentamos uma revisão de literatura contendo relevantes pesquisas sobre a erosão dental, bem como o estudo de produtos e técnicas para prevenção dessa condição.

2.1 Definição e prevalência do desgaste dental erosivo

Ao longo da vida, os dentes são expostos a agressões físicas e químicas que contribuem para o desgaste dos tecidos dentais, e embora esses fatores atuem juntos, a morfologia dos defeitos pode variar dependendo da causa predominante (Carvalho et al., 2015; Ganss, 2012).

Em fevereiro de 2019, foi realizado um seminário de curta duração para definição e padronização dos termos mais comumente utilizados relacionados ao desgaste dental erosivo por uma equipe de 15 especialistas, selecionados pela European Organisation for Caries Research (ORCA) e o Grupo de Pesquisa em Cariologia da International Association of Dental Research (IADR). Considera-se desgaste dental o processo de perda cumulativa de tecido mineralizado devido à ação de processos físicos ou químico-físicos. Sua origem pode derivar predominantemente dos processos de atrição (desgaste através do contato dente-dente), abrasão (desgaste produzido pela interação entre os dentes e outros materiais) e erosão. Define-se erosão dental como a perda química da estrutura mineralizada causada pela exposição aos ácidos de origem não bacteriana. Quando a erosão é o fator etiológico primário relacionado ao desgaste dental, este denomina-se desgaste dental erosivo (Schlueter et al., 2020). Independentemente de sua origem, observações clínicas e experimentais mostram que os processos de desgaste individuais muitas vezes se sobrepõem clinicamente, o que dificulta uma diferenciação precisa (Kanzow et al., 2016).

Quando ocorre ao longo da vida trata-se de um processo natural (Carvalho et al., 2015; Ganss et al., 2012; Lussi et al., 2011), já que o impacto dessas

microagressões não pode ser evitado, gerando portanto desgaste do tecido dental duro ao longo dos anos (Ganss et al., 2012; Lussi, Hellwig, 2014). Porém, é considerado patológico quando compromete e danifica seriamente a função e estética dos dentes (Ganss et al., 2012; Smith Knight, 1984) concomitantemente com progressões que ocorram em um curto período de tempo como no caso de adolescentes ou jovens adultos (Ganss et al., 2012).

Devido ao potencial danoso sobre as estruturas dentais principalmente em indivíduos jovens, torna-se importante analisar a prevalência da doença nas faixas etárias mais baixas. Porém, pelo fato dos estudos aplicarem diferentes índices de avaliação, tamanhos amostrais e delineamentos, torna-se difícil compará-los e estimar a média global com precisão (Carvalho et al., 2015; Schlueter, Luka, 2018).

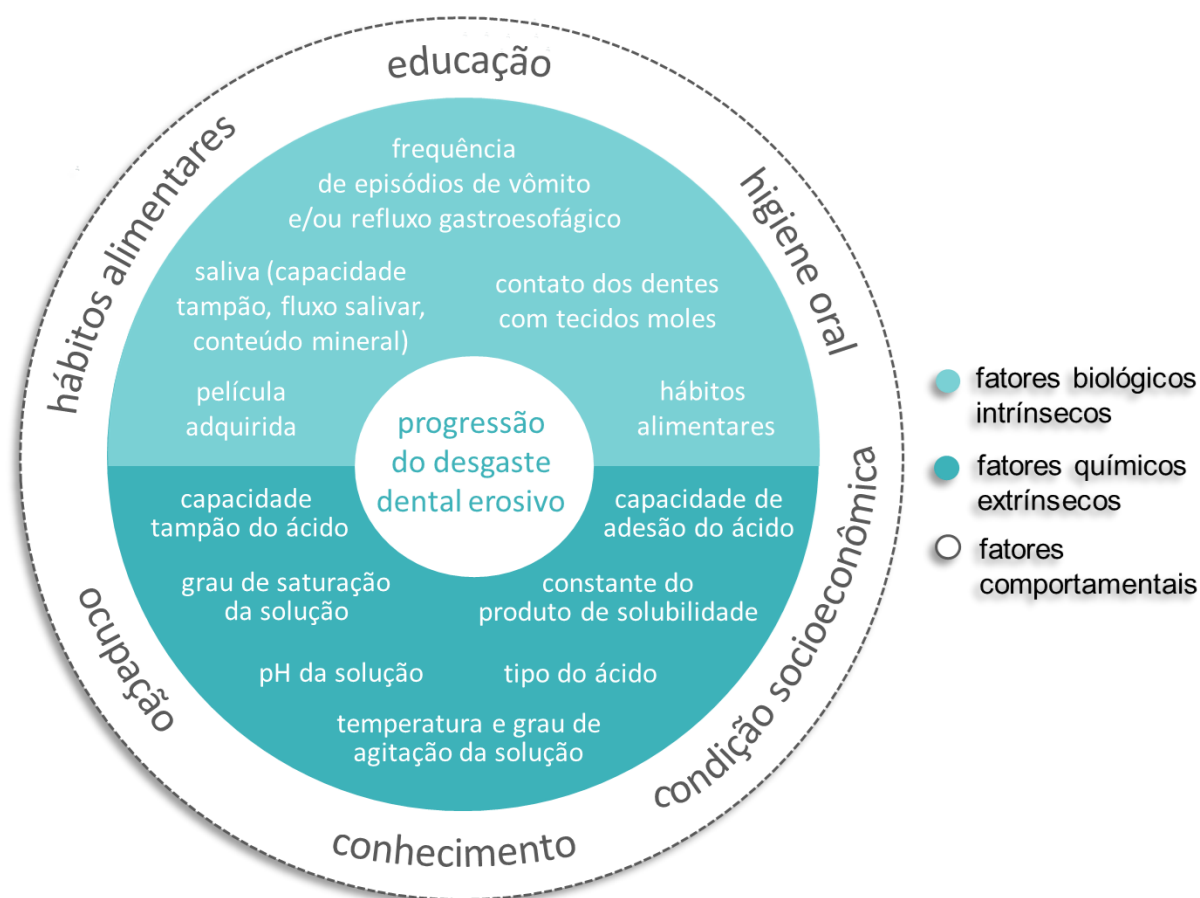
Uma revisão sistemática com metanálise demonstrou que a prevalência de desgaste dental erosivo em dentes permanentes de crianças e adolescentes é de 30,4% (Salas et al., 2015). Uma revisão narrativa mais recente estima a prevalência média mundial de desgaste dental erosivo em dentes decíduos entre 30-50% e em dentes permanentes entre 20-45% podendo apresentar envolvimento da dentina em até 45% dos casos (Schlueter, Luka, 2018). Isto pode estar relacionado ao consumo crescente de bebidas e alimentos ácidos nas últimas décadas, especialmente pela população jovem (Bartlett et al., 2013; Jaeggi, Lussi, 2014). Este dado é preocupante, considerando que o desgaste tende a se acentuar com o passar do tempo e grande parte desses estudos são realizados com crianças e adultos jovens, que precisam manter a sua dentição com função durante toda a vida.

2.2 Etiologia e patogênese do desgaste dental erosivo

O desgaste dental erosivo é uma condição multifatorial e de etiologia complexa, pois diversos fatores interagem e desempenham um papel na sua indução ou prevenção. Porém, a exposição ao ácido de origem intrínseca ou extrínseca é a principal causa, uma vez que, se esse fator puder ser controlado, a progressão cessa (Carvalho et al., 2015; Ganss et al., 2012; Lussi et al., 2011; Lussi, Hellwig, 2014; Magalhães et al., 2011).

Para fins de estudo, os fatores capazes de modular o mecanismo da erosão têm sido divididos em biológicos, químicos e comportamentais, apesar de interagirem simultaneamente e serem cruciais para ajudar a explicar por que indivíduos expostos aos mesmos desafios têm diferentes graus de erosão dental (Figura 1) (Lussi, Carvalho, 2014).

Figura 1 – Fatores envolvidos na etiologia do desgaste erosivo dental



Fonte: Ilustração adaptada e traduzida de Lussi, Carvalho, 2014.

Os fatores biológicos podem estar relacionados à saliva, película adquirida, frequência de episódios de vômitos e refluxo gastresofágico, anatomia/estrutura dos dentes e seu contato dos tecidos moles (Carvalho et al., 2015).

A saliva é considerada o fator biológico mais importante na prevenção da erosão dentária, apesar de não ser suficiente contra desafios erosivos severos (Hara

et al., 2006). A ação da saliva começa antes mesmo do ataque ácido, com o aumento do fluxo salivar como uma resposta aos estímulos externos. Durante o desafio erosivo, este aumento permite que a saliva atue como um agente diluente de ácidos e os remova gradualmente pelo processo de deglutição. Devido ao seu conteúdo mineral, a saliva também pode prevenir a desmineralização, bem como promover a remineralização, uma vez que é supersaturada em relação aos minerais do dente. A saliva também possui ação tamponante, por meio dos tampões de fosfato e bicarbonato que se dissociam, além da enzima anidrase carbônica, que possui a capacidade de catalisar a reação reversível $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ neutralizando a ação do ácido frente à desmineralização. Porém, o papel protetor da saliva está principalmente relacionado a sua atuação na formação da película adquirida (Hara et al., 2006; Hara, Zero, 2014).

Todas as superfícies dentais expostas ao ambiente oral são naturalmente revestidas pela película salivar adquirida. A película salivar fisiológica é um filme orgânico livre de bactérias, que cobre tecidos orais. É composto de macromoléculas do ambiente oral (saliva, fluidos creviculares), carboidratos, lipídios, glicoproteínas e proteínas, incluindo várias enzimas e funciona como uma rede semipermeável de que fornece proteção parcial contra exposição a desafios ácidos de curto prazo, graças a seu padrão estrutural e sua composição (Hannig, Joiner, 2006; Hannig, Hannig, 2014; Moazzez et al., 2014).

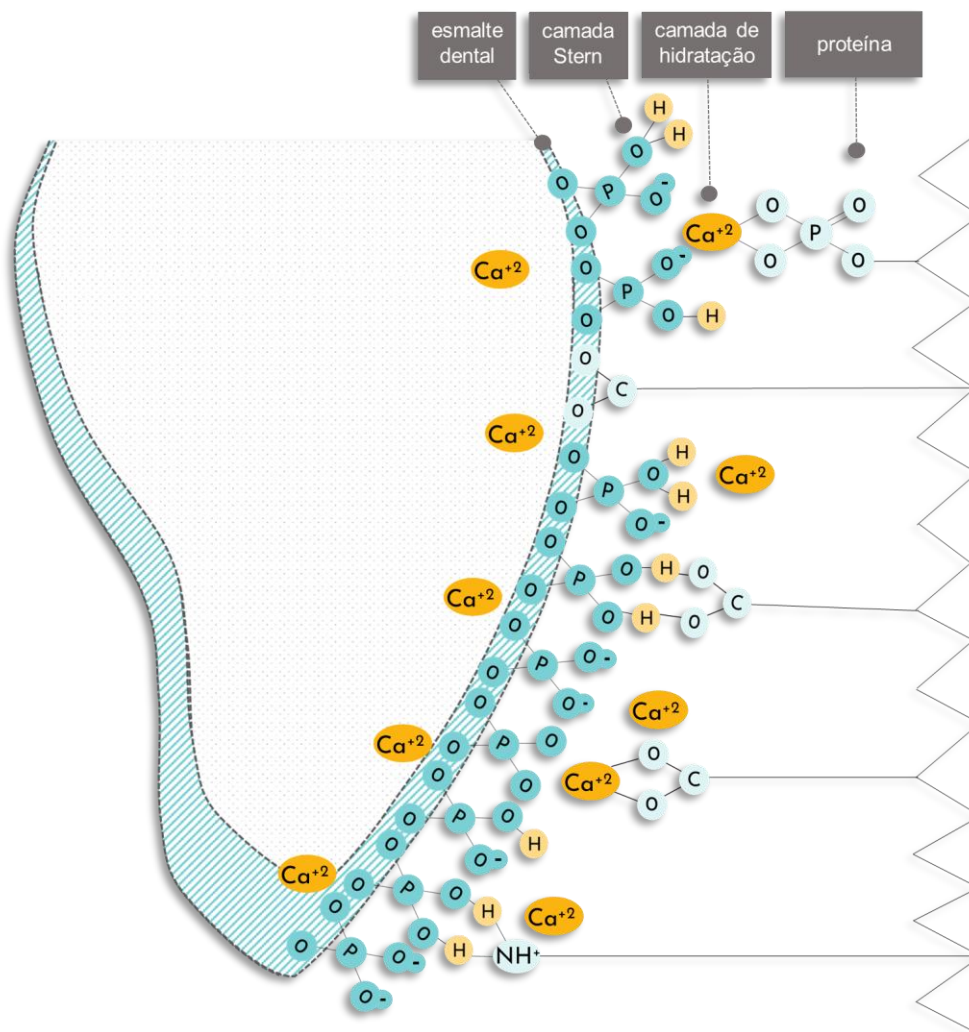
A película salivar é composta por duas camadas. A camada basal começa a se formar poucos segundos após o contato da saliva com a superfície dental, uma vez que os íons cálcio da saliva se adsorvem aos íons fosfato predominantemente presentes na superfície do esmalte, formando uma camada de hidratação com carga elétrica positiva. Essa mudança de carga elétrica superficial, quando combinada a forças de Van der Waals e interações hidrófobas, permite que as proteínas salivares com carga elétrica negativa como as histatinas, estaterinas e proteínas ricas em prolina (PRPs) adsorvam-se sobre a superfície dental (Barbour et al., 2005; Hannig, Hannig, 2014; Lee et al., 2013; Scaramucci et al., 2012). Estas proteínas são capazes de se ligar ao cálcio, mantendo altas concentrações destes íons no interior da película e na região próxima à superfície da hidroxiapatita, auxiliando na homeostase mineral da interface esmalte-película frente a desafios erosivos e

consequentemente, reduzindo sua desmineralização (Figura 2) (Hannig, Hannig, 2014; Hannig, Joiner, 2006; Jager et al., 2011). Essa camada de peptídeos e proteínas salivares densa em elétrons aumenta de espessura (entre 10 e 20 nm) em poucos minutos e permanece estável por cerca de 30 minutos.

A camada externa, formada no estágio de maturação, se desenvolve tardiamente e possui uma espessura que varia de 100 a 1000 nm, dependendo de sua localização e tempo na cavidade bucal (Hannig, 1999). Essa camada apresenta alta solubilidade ao ácido (Nekrashevych, Stösser, 2003). Sua estrutura globular pouco densa é considerada complexa devido à composição heterogênea de ácidos graxos (Reich et al., 2013), enzimas e agregados de proteínas heterotípicas (mucinas, esterinas, histatinas, cistatinas, lisozima para MG1 e as proteínas ricas em prolina), que se depositam de acordo com o tempo e são em sua maioria capazes de se ligar as outras proteínas presentes na camada basal (Hannig, Joiner, 2006; Hannig, Hannig, 2014; Iontcheva et al., 2016; Lee et al., 2013). Dentre as enzimas que se acumulam na película, a anidrase carbônica salivar VI mantém sua atividade enzimática e auxilia a neutralização do ácido frente à desmineralização (Hannig, Joiner, 2006; Leinonen et al., 1999).

Embora apresente potencial protetor, esta complexa estrutura da película é incapaz de impedir a desmineralização dental frente a desafios erosivos severos (Moazzez et al., 2014; Jager et al., 2011), uma vez que é permeável e sofre dissolução gradual durante a exposição ácida (Hannig, 2002; Hannig et al., 2003). Diante do importante papel protetor da película contra a erosão, estratégias preventivas utilizando a chamada “engenharia de película” têm sido estudadas, envolvendo o uso de lipídios, polifenóis (Joiner et al., 2006; White et al., 2011) e proteínas como a caseína (White et al., 2011), cistatina, esterina (Taira et al., 2021) e hemoglobina (Carvalho et al., 2020; Pelá et al., 2021), com resultados promissores, mas ainda incipientes.

Figura 2 – Desenho esquemático de formação da película adquirida



Fonte: Ilustração adaptada e traduzida de Hannig, Joiner, 2006.

Uma vez que o ácido atinge a superfície do esmalte, parte das moléculas se dissocia ($\text{R-COOH} \rightleftharpoons \text{R-COO}^- + \text{H}^+$) disponibilizando íons de hidrogênio (H^+) e ânions (agentes quelantes) que se ligam ao íon cálcio presente na superfície da hidroxiapatita do esmalte ou dentina, levando ao deslocamento do conteúdo mineral dos tecidos para o meio ácido. Isto proporciona a dissolução dos prismas de esmalte da superfície para o núcleo, deixando a aparência do mesmo com aspecto microscópico semelhante a favos de mel (Meurman, Frank, 1991).

Além disso, devido a capacidade de tamponamento da saliva, parte das moléculas do ácido permanecem em sua forma indissociada, com ausência de carga

elétrica, penetrando mais rapidamente pela superfície dental. Uma vez na subsuperfície dental, essas moléculas então se dissociam, agindo como portadores de H^+ capazes de dissolver os cristais minerais subsuperficiais (Lussi et al., 2011; Shellis et al., 2014). Isto contribui para o amolecimento do tecido, que se torna mais vulnerável à ação de forças externas como por exemplo da escovação, capazes de promover subsequentemente perda irreversível de estrutura dental (Featherstone, Rodgers, 1981; Lussi, Carvalho, 2014; Shellis et al., 2013). No que diz respeito à dentina, os eventos ocorridos resultantes da erosão são os mesmos, mas a presença de maior porção de matriz orgânica neste tecido reduz a difusão do agente ácido e com isso a saída de minerais da estrutura remanescente (Ganss et al., 2004; Hara et al., 2005; Kleter et al., 2016).

Os fatores químicos capazes de modular o mecanismo da erosão estão relacionados às soluções ácidas: tipo do ácido, constante do produto de solubilidade (Kps), pH, consistência e capacidade de adesão à estrutura dental (Carvalho et al., 2015; Magalhães et al., 2011). Ainda, a concentração de cálcio, fosfato e flúor na solução, são fatores determinantes para estabelecer o potencial erosivo de uma solução ácida, pois a presença desses minerais estabelece grau de saturação da solução (Lussi et al., 2012b, 2011). Quanto ao pH, diferentemente da cárie dental, não se pode determinar um valor fixo de 'pH crítico' para uma solução erosiva, uma vez que outras variáveis tem maior influência sobre o potencial de dissolução, como o grau de saturação da solução mencionado acima, a temperatura e a velocidade (grau de agitação) que a solução ácida entra em contato com superfície dental (Lussi et al., 2012; Lussi, Jaeggi, 2006; Shellis et al., 2014).

Outros fatores que também podem interferir no processo são os comportamentais, sendo eles hábitos alimentares, hábitos de higiene (tipo de escova dental e técnica utilizada), padrão de ingestão de bebidas ou medicamentos ácidos, consumo de drogas ilícitas, ocupação (como o caso de funcionários da indústria química, profissional provadores de vinho, devido ao contato dente-ácido aumentado ou nadadores e atletas profissionais, devido à exposição excessiva à água e bebidas esportivas com pH baixo), conhecimento do problema e condição socioeconômica (Amaechi, Higham, 2005; Carvalho et al., 2015; Jarvinen et al., 1991; Lussi, Hellwig, 2014).

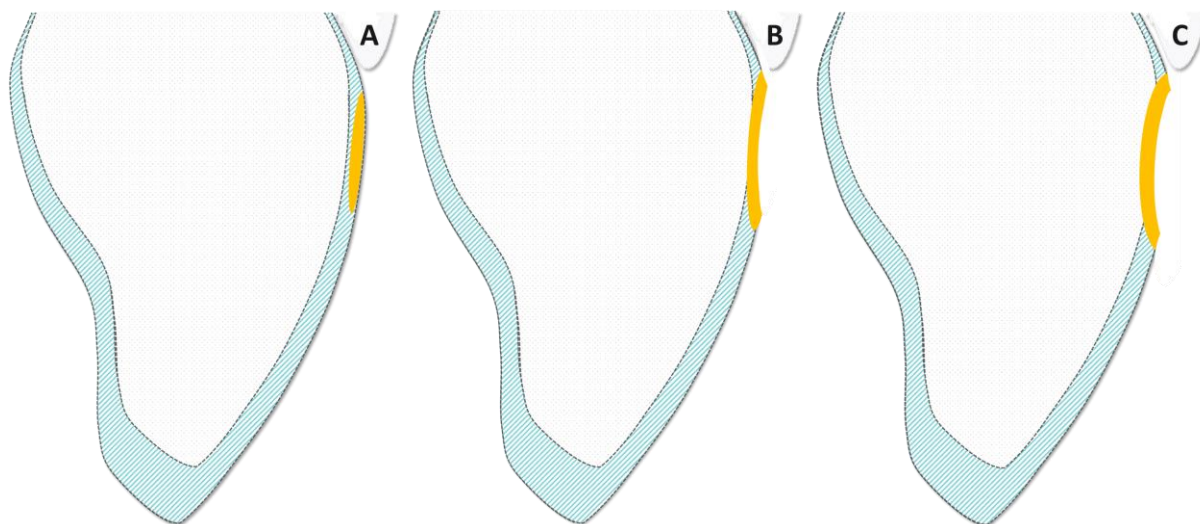
2.3 Características clínicas, histopatológicas e diagnóstico do desgaste dental erosivo

Sabe-se que o início da erosão dental ocorre através de um processo chamado amolecimento (*softening*), que envolve a perda parcial do conteúdo mineral superficial do esmalte (Figura 3A), levando ao aumento da rugosidade e diminuição da dureza (Attin et al., 1997; Lussi et al., 2011), o que proporciona mudanças nas propriedades físicas e histológicas da superfície remanescente (Ganss, 2012). Quando ocorre a desmineralização erosiva em esmalte, o mineral altamente compactado com estrutura hexagonal é dissolvido na superfície, que se torna irregular e rugosa (Ganss et al., 2014; Ganss, Lussi, 2006). Estudos apontam que a zona de desmineralização pode atingir entre 2 a 5 μm (Wiegand et al., 2007) com desafios erosivos brandos. Já em casos de exposição severa, pode chegar a até cerca de 100 μm . Esta perda mineral resulta em redução da microdureza do esmalte (Attin et al., 1997; Ganss et al., 2014).

Com a continuidade da exposição ao ácido, a superfície do esmalte é perdida camada a camada (Figura 3B e 3C), o que torna sua aparência acetinada ou opaca (Carvalho et al., 2015; Lussi et al., 2011). Já em dentina, por ter uma estrutura biologicamente distinta, o desafio erosivo causa uma rápida dissolução mineral peri e intertubular, mas sem degradar a porção orgânica, proporcionando a formação de uma estrutura remanescente esponjosa e completamente desmineralizada, que mantém a mesma altura e volume, desde que permaneça hidratada (Breschi et al., 2002; Ganss et al., 2014). As características histológicas da erosão do esmalte e dentina in vivo ainda são pouco compreendidas (Ganss et al., 2014). Clinicamente, quando tais lesões ocorrem em dentina, apresentam quando sondadas aspecto duro e brilhante, o que contrasta com lesões in vitro que são resilientes e opacas. Acredita-se que tal diferença ocorra devido ao colágeno humano desmineralizado ser digerido mais rapidamente por collagenases e outras enzimas proteolíticas em condições clínicas, atuando na remoção de tais estruturas assim que o mineral é dissolvido (Ganss et al., 2014; Schlueter et al., 2010).

Na região cervical, a ação do ácido resulta no achatamento das áreas convexas, formando lesões rasas, com concavidades que são mais largas que profundas. Além disso, observa-se uma borda intacta de esmalte ao longo da margem gengival, possivelmente devido à presença de biofilme que atua como uma barreira para a difusão dos ácidos (Ganss, Lussi, 2006) ou devido à ação neutralizante do fluido crevicular que é ligeiramente alcalino (Stephen et al., 1980). Em superfícies oclusais, as cúspides tornam-se arredondadas ou em forma de concha e as bordas das restaurações parecem subir acima do nível das superfícies dos dentes adjacentes (Ganss, 2012; Ganss, Lussi, 2006). Com a progressão do processo, pode haver a total perda do esmalte, com exposição da dentina, o que tende a resultar em dor, comprometimento pulpar, perda de dimensão vertical e estética, nos casos mais severos (Ganss et al., 2005).

Figura 3 – Esquema representando os estágios do processo de desgaste dental erosivo



Legenda: A) Amolecimento superficial do esmalte (sem perda visível); B) Perda tecidual de esmalte e amolecimento da superfície subjacente; C) Perda tecidual envolvendo dentina e amolecimento da superfície subjacente.

Fonte: Ilustração adaptada e traduzida de Schlueter et al., 2012.

Frente a isso, torna-se pertinente desenvolver um processo diagnóstico que contemple as informações obtidas por exame clínico dental, o conhecimento

biológico das estruturas remanescentes e uma anamnese detalhada, questionando quanto a todos os fatores etiológicos mencionados anteriormente. Para auxiliar no diagnóstico e visando o monitoramento da progressão do desgaste dental erosivo clinicamente, vários índices foram propostos (Bardsley, 2008). O índice mais aceito atualmente é o Exame Básico de Desgaste Erosivo (BEWE) (Bartlett et al., 2008). Trata-se de um sistema de pontuação simples em que os dentes são divididos em sextantes e têm suas faces avaliadas para quantificar o tamanho das lesões de acordo com a porcentagem em relação à superfície afetada. O dente com a pontuação mais alta em um sextante é registrado para cálculo do valor obtido com o índice, o que sugere qual o tipo de abordagem terapêutica deve ser empregada (Bartlett et al., 2008; Ganss, Lussi, 2006). Visando facilitar o acesso dos clínicos a este índice, foi desenvolvido um *website* por seus criadores (<https://www.erosivetoothwear.com/bewe>).

2.4 Métodos de controle da progressão da erosão dental

As abordagens preventivas mais eficazes envolvem o controle da exposição dental aos fatores etiológicos relacionados à erosão. Ainda, tentativas de se reduzir o potencial erosivo de alimentos ácidos vêm sendo realizadas por meio da adição de cálcio, fosfato e flúor em bebidas, com resultados favoráveis. No entanto, a aceitação de tais modificações é prejudicada devido à alteração de sabor e problemas de estabilidade (Barbour et al., 2005; Beyer et al., 2012, 2010; Hemingway et al., 2010; Hooper et al., 2007; Scaramucci et al., 2011).

Além disso, diversas estratégias têm sido adotadas visando proteger a estrutura dental frente aos desafios erosivos. A mais comumente utilizada envolve o uso tópico de fluoretos, já que os mesmos são regularmente utilizados no cotidiano dos indivíduos devido a sua comprovada eficácia anticariogênica, tornando conveniente seu uso para o controle do processo erosivo (Lussi, Carvalho, 2015; Magalhães et al., 2009).

Compostos monovalentes como o fluoreto de sódio (NaF) e o fluoreto de amina (AmF) podem levar à formação de precipitados semelhantes ao fluoreto de

cálcio (CaF_2) na superfície dental. Estes depósitos atuam como uma “camada de sacrifício” a ser dissolvida durante o desafio erosivo, evitando temporariamente a dissolução do tecido dental subjacente e liberando íons cálcio e flúor para o meio, retardando assim o processo de desmineralização (Huysmans et al., 2014; Magalhães et al., 2009). No entanto, a eficácia destes compostos em inibir o processo erosivo se mostrou limitada, devido à deposição de CaF_2 depender da concentração, do tempo e da frequência de aplicação do agente fluoretado, bem como de um baixo pH da solução (Huysmans et al., 2014; Magalhães et al., 2011; Petzold, 2001). Além disso, sabe-se que esses sais são solúveis em meio ácido (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2016) sendo, portanto, menos estáveis sob condições erosivas mais agressivas (Schlueter et al., 2016).

Diante disso, sua associação a compostos polivalentes de cátions metálicos, como o fluoreto de estanho (SnF_2), o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), bem como o cloreto estanhoso (SnCl_2), vêm demonstrando uma proteção superior contra o desgaste erosivo (Huysmans et al., 2014; Zanatta et al., 2018). Formulações contendo a combinação de flúor e estanho têm apresentado maior eficácia, devido à formação de uma camada superficial rica em Sn sobre a superfície dental, que demonstrou ser mais ácido-resistente (Ganss et al., 2010b, 2010a; Scaramucci et al., 2015; Schlueter et al., 2009). Isto ocorre com maior evidência quando sob desafios erosivos constantes (Ganss et al., 2012). No entanto, exibem limitações clínicas, relacionadas à sensação de adstringência na mucosa e potencial de manchamento dental (Addy, 2008; Frese et al., 2019; Sälzer et al., 2015).

Abordagens alternativas envolvem o uso de polímeros formadores de filme em produtos de aplicação tópica (Ávila et al., 2017; Ganss et al., 2012; Manarelli et al., 2011; Pini et al., 2020). Polímeros têm sido amplamente utilizados pela indústria farmacêutica com o objetivo de aumentar a substantividade dos ativos presentes em formulações (Sistema de Liberação de Fármaco ou *Drug Delivery System*). Esse sistema de administração foi desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentando sua concentração plasmática e sendo capaz de transportar um composto farmacêutico pelo corpo durante determinado tempo até que atinja seu local de devida absorção (Lenaerts, Robert, 1989; Villanova et al., 2010; Zaman et al., 2010).

Os polímeros são capazes de se ligar a substratos biológicos através de mecanismos complexos. Dentre as teorias propostas, pode-se citar a atração eletrostática entre a superfície do polímero e o substrato biológico, devido à diferença em suas cargas iônicas; a capacidade bioadesiva resultante do contato íntimo entre o polímero o substrato biológico; a capacidade de interação entre o polímero e o substrato biológico por ligações covalentes, bem como interações químicas secundárias como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interação hidrófoba (Lenaerts, Robert, 1989).

Além disso, a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica. A modulação da bioadesão depende da especificidade do polímero empregado e pode ser dependente de diferentes fatores como, ph, solubilidade ao meio, presença de sítios específicos de reconhecimento e pela presença de íons (Asane et al., 2008; Lenaerts, Robert, 1989; Villanova et al., 2010). Isto nos leva a crer que os polímeros bioadesivos podem exibir efeito protetor no esmalte e dentina contra a dissolução ácida, devido à sua interação com a superfície da hidroxiapatita, formando um filme capaz de reduzir a troca iônica entre a solução ácida e o substrato dental (Barbour et al., 2005; Beyer et al., 2012). Ainda, podem ser capazes de potencializar o efeito protetor de compostos fluoretados (Ávila et al., 2017; Ganss et al., 2012; Moretto et al., 2010; White et al., 2011).

Polímeros com propriedades químicas distintas têm sido investigados, com obtenção de diferentes graus de resposta quanto ao seu potencial antierosivo (Augusto et al., 2020; Ávila et al., 2020b; 2017; Beyer et al., 2012; Bezerra et al., 2019; Sakae et al., 2020; Scaramucci et al., 2015). O efeito protetor contra desafios ácidos parece ser dependente de sua estrutura química (Nielsen et al., 2011).

Dentre os compostos testados, os polímeros à base de metacrilato têm mostrado efeito promissor. Esses polímeros sintéticos possuem diferentes polaridades e são derivados de dimetilaminoetilmetacrilatos, ácido metacrílico e ésteres do ácido metacrílico, em várias proporções (Severino et al., 2011). Sua capacidade de formação de um filme ultrafino sobre as superfícies dentais foi observada previamente (Augusto et al., 2020; Nielsen et al., 2011). Frente a isso, o copolímero Aminometacrilato foi investigado como agente antierosivo. Esse

copolímero do polimetacrilato é utilizado para liberação de fármacos no pH estomacal (menor que 5), sendo portanto, solúvel nessas condições (Evonik, 2015a, 2015b) e utilizado como revestimento de fármacos, o que sugere seu promissor potencial de formação de uma barreira protetora sobre os dentes diante das variações do pH bucal. Sua estrutura é baseada no dimetilaminoetil metacrilato, butil metacrilato e metil metacrilato na proporção 2:1:1 (Evonik, 2015b).

Quanto ao potencial protetor, sua associação aos agentes fluoretados mostrou ser mais evidente, capaz de se adsorver à hidroxiapatita, modificando seu potencial zeta, além de reduzir a dissolução da hidroxiapatita frente a desafios ácidos *in vitro* (Augusto et al., 2020). O potencial zeta ou potencial eletrostático está relacionado a busca dos íons pelo equilíbrio eletroquímico. Quando mensurado, pode descrever a capacidade de um campo elétrico (hidroxiapatita) de exercer força sobre outras cargas dispersas (polímero), modificando o potencial isoelétrico da hidroxiapatita (Arends, 1979; Young et al., 1997). A hidroxiapatita possui sua carga elétrica superficialmente negativa sob condições fisiológicas (Hannig, Hannig, 2014). Isto promove a afinidade elétrica aos grupamentos amina do polímero (com carga elétrica positiva), o que favorece sua adsorção e consequente redução do deslocamento de íons do substrato para o meio (Arends, 1979; Beyer et al., 2012; Matsumoto et al., 1989; Scaramucci et al., 2015).

O Aminometacrilato demonstrou ainda excelente capacidade de reduzir o desgaste erosivo do esmalte quando adicionado a soluções fluoretadas simulando enxaguatórios bucais (Augusto et al., 2021). Diante disso, os próximos avanços ao conhecimento devem seguir a avaliação da interação de tais polímeros com a película adquirida, uma vez que esta reveste a superfície dos dentes na realidade clínica e, portanto, atuam como uma camada intermediária entre o dente e os agentes de uso tópico diário.

2.5 Métodos para análise quantitativa e qualitativa da erosão dental

Várias técnicas são descritas para caracterização e mensuração da perda mineral, sendo que a maioria dos testes utilizados para detecção são realizados in

vitro ou in situ, devido a necessidade de se obter espécimes planos e altamente polidos para avaliação dos defeitos induzidos erosivamente ou para criar superfícies de referência (Attin, Wegehaupt, 2014). É importante ressaltar que a natureza complexa da perda mineral pelos desafios erosivos não pode ser compreendida por uma única técnica, e sim pela aplicação de diferentes abordagens para a compreensão ampla. Além disso, o limite de detecção e a precisão de um método pode depender do substrato a ser analisado, da técnica eleita (mensuração ou caracterização) e das circunstâncias envolvidas (com ou sem abrasão por exemplo) (Attin et al., 2005).

Para as avaliações qualitativas, diversas técnicas têm sido descritas, como o uso de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios-x de dispersão de energia, análise de reflexão óptica especular e difusa, tomografia de coerência óptica, teste de permeabilidade de iodeto, microscopia de varredura a laser confocal, nanoindentação, análise de elemento sólido, medição ultrassônica (Attin, 2006; Attin, Wegehaupt, 2014; Habib, Chew, 2019; Schlueter et al., 2011). Tais técnicas são consideradas qualitativas e possuem classificação dos resultados com maior grau de subjetividade por dependerem da interpretação do investigador na maioria dos casos, porém através delas é possível visualizar mudanças na estrutura do dente dando uma noção ao pesquisador quanto aos diferentes impactos da erosão nos substratos dentais (Attin, Wegehaupt, 2014).

A fim de obter dados objetivos e mensuráveis, sempre que possível deve-se optar por análises quantitativas utilizando diversos métodos, como microscopia óptica, microscopia de varredura 3D com variação de foco, espectroscopia de infravermelho – reflectância total atenuada, interferometria de luz branca, dureza superficial e de secção transversal, perfilometria de superfície, microradiografia, microtomografia computadorizada microscopia de força atômica, análise química de minerais dissolvidos (eletrodo para detecção de cálcio, espectrofotometria de absorção atômica, espectrometria de massa, espectrofotometria molecular com leitura de absorbância ultravioleta/visível) (Attin, 2006; Attin, Wegehaupt, 2014; Habib, Chew, 2019; Schlueter et al., 2011). As técnicas mais frequentemente utilizadas, por serem métodos bem estabelecidos com relativo baixo custo, são microdureza e perfilometria. Por meio da microdureza, é possível medir os estágios

iniciais da erosão do esmalte e dentina, quando não há perda de tecido dental mas sim o amolecimento da superfície (Witjes, Ruben, 1989) e a perfilometria é utilizada para análise da progressão da desmineralização diante da perda tecidual irreversível (Whitehead et al., 1999). Utiliza-se também a microscopia por força atômica, capaz de gerar imagens com alta resolução. Ainda, avaliações químicas da estrutura dental pela espectrofotometria de absorção atômica ou molecular e espectrometria de massa, são capazes de determinar o grau de dissolução do esmalte dentário avaliando a quantidade de cálcio ou fosfato dissolvido em hidroxiapatita e têm sido consideradas como excelentes ferramentas para avaliar os efeitos dos ácidos sobre os dentes (Attin, Wegehaupt, 2014).

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo geral mensurar o efeito antierosivo da associação de soluções contendo Fluoreto de Sódio e/ou Cloreto Estanhoso com o copolímero Aminometacrilato na presença da película adquirida sobre o esmalte e a dentina, frente a desafios erosivos, utilizando um estudo randomizado cruzado triplo cego de modelo in situ.

O efeito antierosivo foi mensurado especificamente por meio dos seguintes parâmetros:

- a) análise da perda erosiva calculada após microbiópsia do esmalte e dentina;
- b) análise da percentagem de redução da microdureza calculada por ensaio de microdureza superficial do esmalte;
- c) análise da concentração de flúor solúvel em KOH obtido sob a superfície de esmalte e dentina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais e Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT-UNESP) por se tratar de um estudo in situ, que envolveu a participação de voluntários com CAEE nº 43571021.7.0000.0077 (Anexo A).

A escrita da dissertação seguiu as normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) (Apêndice A).

4.2 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo cruzado, randomizado, controlado, triplo-cego de modelo in situ, em que os voluntários, selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade, utilizaram um dispositivo palatal removível contendo seis espécimes, três de esmalte e três de dentina bovina. O período de *washout* (intervalo para exposição as diferentes soluções) foi de dois dias (Kensche et al., 2017; Nehme et al., 2016) e os mesmos participantes foram expostos a todos os grupos de tratamento, distribuídos em sete níveis aleatoriamente, em diferentes momentos, empregando as seguintes soluções:

- a) **C:** água ultrapura (controle negativo);
- b) **F:** solução contendo Fluoreto de Sódio (225 ppm F⁻);
- c) **S:** solução contendo Cloreto Estanhoso (800 ppm Sn⁺²);
- d) **AMC:** solução contendo Aminometacrilato (2%);
- e) **FS:** solução contendo Fluoreto de Sódio (225 ppm F⁻) e Cloreto Estanhoso (800 ppm Sn⁺²);

- f) **AMC+F:** solução contendo Aminometacrilato (2%) + Fluoreto de Sódio (225 ppm F⁻);
- g) **AMC+FS:** solução contendo Aminometacrilato (2%) + Fluoreto de Sódio (225 ppm F⁻) e Cloreto Estanhoso (800 ppm Sn⁺²).

Os espécimes foram submetidos aos tratamentos e ciclagem erosiva com ácido clorídrico a 0,01 M (pH 2,3) seis vezes. Para o desfecho primário a variável resposta foi a perda erosiva (μm) por meio da concentração de cálcio e fósforo obtida após microbiopsia da superfície do esmalte e dentina, medida por método colorimétrico em espectrofotômetro. Para o desfecho secundário a variável dependente foi a quantidade de flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de esmalte ou dentina e a análise da porcentagem de proteção medida por meio da análise de microdureza superficial em esmalte. A variável independente foi representada pelas soluções de tratamento.

4.3 Tamanho amostral

Para determinar o número de indivíduos a serem incluídos no estudo, foi utilizado o programa estatístico G-power, em que aplicando-se os valores de média obtidos por meio de um estudo piloto com os desafios erosivos propostos, considerando 0.003 de desvio-padrão, foi calculado o “*effect size*” em 1,0169. Observou-se então ser necessário um tamanho amostral de dez indivíduos que participaram de todas as fases do estudo, tendo em vista o modelo de estudo cruzado esperando-se um poder de 80% e nível de significância 5%. Considerando possíveis desistências dos participantes no período do estudo, optou-se por aumentar em 20% o tamanho amostral, selecionando doze indivíduos que participaram das sete fases do estudo cruzado.

4.4 População do estudo

O recrutamento de participantes do estudo foi realizado na clínica do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT/SJC Unesp. Na primeira visita, os voluntários receberam instruções verbais sobre o estudo, incluindo todos os procedimentos nele envolvidos. Cada voluntário também foi informado dos possíveis riscos envolvidos no experimento e da confidencialidade dos dados. Todas as informações estão presentes na Carta de Informação ao Paciente (Apêndice B) e no Termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice C) desenvolvidos de acordo com a Resolução nº. 196 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Distrito Federal, Brasil, 10/03/1996, os quais foram assinados em duas vias, pertencendo uma ao voluntário, e outra aos pesquisadores.

Um formulário contendo a história médica do paciente também foi preenchido. Na sequência, os voluntários foram submetidos ao exame clínico para a determinação das suas condições orais, por meio de inspeção visual dental sob iluminação adequada e em superfície seca, bem como no tecido gengival circundante, buscando detectar alterações físicas características de patologias (Fejerskov, Kidd, 2011). Apenas foram incluídos participantes classificados com grau 0 segundo o índice de Løe (Løe, 1967). Com o objetivo de padronizar a detecção das lesões de cárie, foi empregado o sistema internacional de avaliação de lesões de cárie ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) (Dikmen, 2015). Para detectar sinais de desgaste dental erosivo foi utilizado o índice BEWE (Basic Erosive Wear Examination) (Bartlett et al., 2008). Indivíduos que apresentassem algum desses sinais clínicos seriam encaminhados para tratamento nas clínicas da instituição e não seriam incluídos no estudo.

Após esses procedimentos, os voluntários realizam um teste do fluxo salivar não-estimulado e estimulado (Scaramucci et al., 2012). Para o teste do fluxo salivar não estimulado, os voluntários ficaram sentado na cadeira odontológica por 5 min em silêncio. Após esse período, ingeriram toda a saliva presente na boca e iniciaram a coleta, cuspidando em tubos de centrifuga graduados. Para a coleta, eles permaneceram sentados, com apenas a cabeça abaixada e olhos abertos. A coleta

teve a duração de 5 min e durante esse período, os voluntários foram instruídos a não engolir a saliva. Após os 5 min, os voluntários cuspiram toda saliva restante na boca. A quantidade de saliva coletada no tubo foi medida (sem incluir a espuma) e esse valor dividido por 5, para a obtenção do fluxo em ml/min (Scaramucci et al., 2012).

Para a saliva estimulada, os voluntários mastigaram pedaços de Parafilm® M (Bemis Company, Inc, Neenah, Wisconsin, EUA) por 1 min. Para começar a coleta, os voluntários ingeriram toda a saliva e então começaram a cuspir em um novo tubo de centrífuga graduado. Essa coleta teve duração de 2 min, nos quais os voluntários mastigaram o parafilme, sem engolir a saliva em nenhum momento. A taxa de mastigação foi em torno de 70 mastigações por min. A posição de coleta foi semelhante à do fluxo não estimulado, ou seja, sentado, com a cabeça abaixada e olhos abertos. Ao final desse período, o volume coletado foi mensurado e dividido por 2, para a obtenção o fluxo estimulado em ml/min. Os voluntários foram incluídos no estudo com base nas informações coletadas nessa primeira visita, de acordo com os seguintes critérios (Scaramucci et al., 2012):

- a) ter pelo menos 18 anos de idade;
- b) apresentar uma boa saúde geral;
- c) ter um fluxo salivar estimulado de $>1,0$ mL/min (Dawes, 2008) e não estimulado de $>0,2$ mL/min (Bardow et al., 2001);
- d) não apresentar sinais de desgaste dental erosivo, cárie ativa ou doença periodontal (Moazzez et al., 2014);
- e) não fazer uso de aparelhos ortodônticos ou próteses removíveis;
- f) não ser dependente químico.

Os critérios de exclusão do estudo foram:

- a) condição médica que possa interferir na segurança do voluntário durante o período do estudo, como a utilização de medicamentos para tratamento de doenças crônicas ou reações alérgicas às substâncias e/ou produtos de higiene oral que serão utilizados;

- b) doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), pois a presença de algumas proteínas na saliva de tais indivíduos pode resultar em algum grau de proteção contra a erosão dental (Martini et al., 2020);
- c) gravidez ou intenção de engravidar durante o período do estudo;
- d) estar em outro estudo no mesmo período.

Os voluntários também receberam instruções de que podiam desistir do estudo a qualquer momento, por qualquer razão, se assim o desejassem. Foram informados também que os pesquisadores poderiam remover os voluntários do estudo, caso achassem necessário. Se os voluntários fossem removidos por condições médicas ou odontológicas, eles seriam encaminhados aos profissionais da área médica ou à clínica do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT/SJC Unesp, e monitorados pelos pesquisadores do estudo até a resolução do problema, ou até que este se tornasse não significativo clinicamente.

4.5 Sequência de alocação aleatória e implementação

Após a seleção dos voluntários de acordo com os critérios de elegibilidade, eles foram alocados aleatoriamente para utilizarem um dispositivo palatal removível contendo seis espécimes bovinos, que foram tratados com sete diferentes soluções. Estas tiveram sua ordem aleatorizada em blocos de acordo com o software estatístico online “RANDOM.ORG”, na sessão “Numbers”, item “Random Integer Set Generator”. Para identificação de cada voluntário e divisão do grupo, foi gerado 12 conjuntos correspondentes aos 12 voluntários selecionados com 7 colunas aleatórias cada, correspondentes as 7 soluções tratamento a qual cada dispositivo foi exposto. Esta lista numérica foi preparada por um indivíduo não envolvido no estudo e os resultados foram transferidos para envelopes selados com o código de cada paciente e a sequência de uso das soluções.

4.6 Cegamento

Os voluntários, operador e avaliadores foram cegados para o tratamento com as diferentes soluções, com padronização das embalagens, que foram codificadas com os dados determinados pelo processo de randomização por um pesquisador não envolvido no processo.

4.7 Intervenções

4.7.1 Preparo das soluções a serem testadas

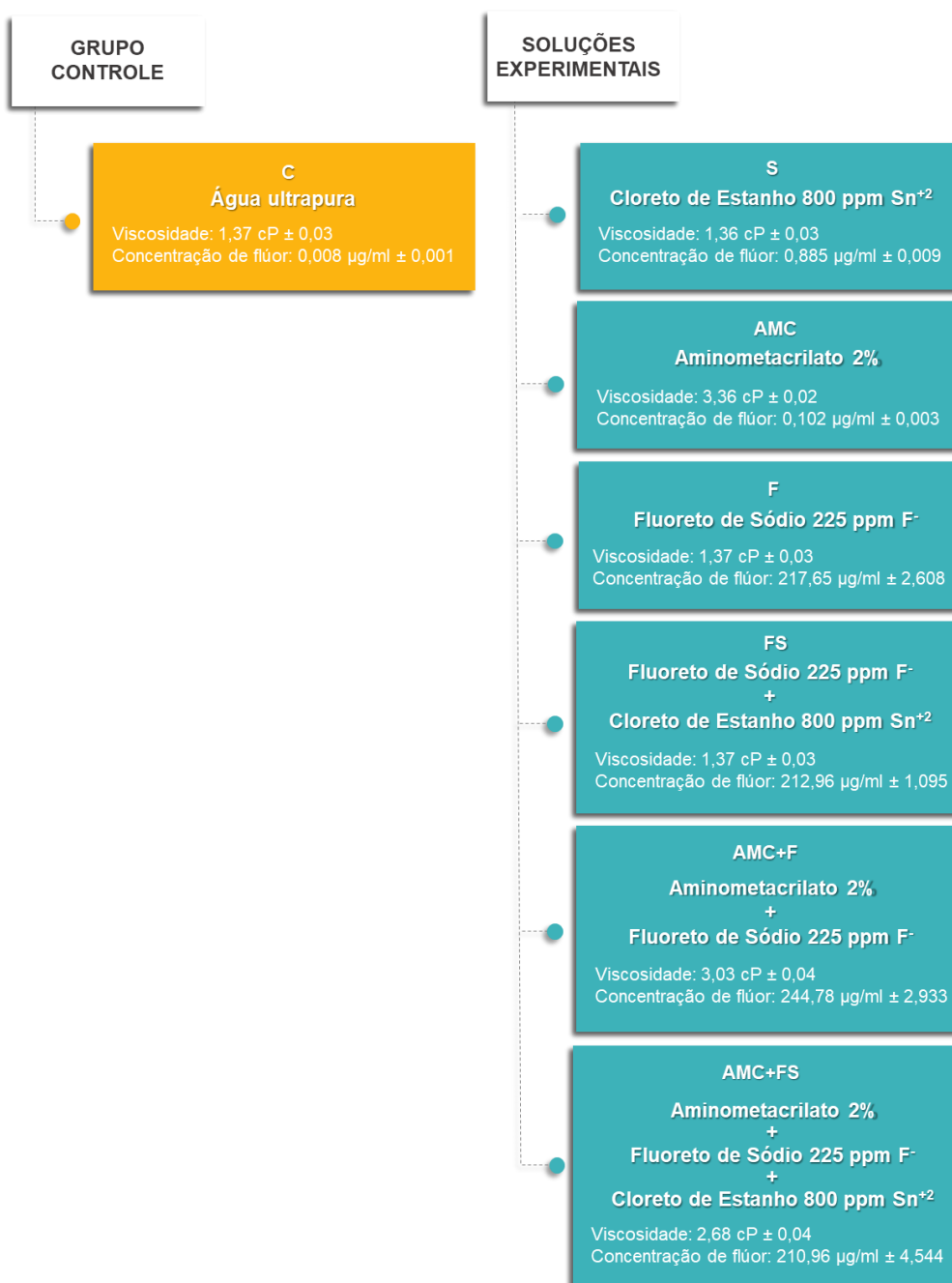
Todas as soluções foram preparadas no dia anterior ao experimento, respeitando os limites de solubilidade em função da concentração e do pH. A concentração do polímero utilizada foi baseada em estudos prévios (Augusto, 2019; Augusto et al., 2020). O pH das soluções utilizadas foi padronizado em 4,5 para eliminar um potencial fator de confusão na análise dos resultados. Para aumentar o pH foi utilizado solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1M e para diminuir foi utilizada solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M. A medição da viscosidade foi realizada utilizando-se um viscosímetro rotacional (Brookfield DV2T, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA) após o ajuste do pH. Os valores de viscosidade (em Cp) estão descritos na Figura 4.

A concentração de flúor nas soluções (Figura 4) foi determinada por meio de eletrodo sensível ao flúor (PerfectION, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suíça). Para tal foi construída uma curva de calibração com 5 soluções padrão de fluoreto de sódio de concentração conhecida (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm e 1000 ppm). Para calibração, 1 ml de cada solução foi misturado em 1 ml de TISAB II e as medidas foram feitas em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob agitação constante, e em triplicata. Após a calibração do eletrodo, 1 ml das soluções testadas foi misturado com 1 ml de TISAB II e então obtidos os valores de milivoltagem da

mesma forma que as soluções padrão, que posteriormente foram convertidos em $\mu\text{g/ml}$.

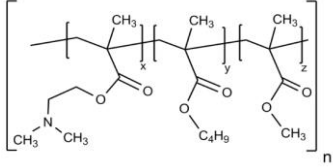
As especificações das substâncias testadas estão descritas no Quadro 1.

Figura 4 – Divisão dos grupos, viscosidade (cP) e concentração de flúor ($\mu\text{g/ml}$) das soluções experimentais após preparo e ajuste de pH para 4,5



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1 – Especificações dos materiais utilizados

Polímero	Fabricante	Fórmula estrutural
Aminometacrilato	Evonik Industries, Essen, Alemanha	
Fluoreto de Sódio	Sigma-Aldrich, Brasil	Na—F
Cloreto Estanhoso	Sigma-Aldrich, Brasil	Cl = Sn = Cl
Água Ultrapura	Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos	

Fonte: Elaborado pelo autor.

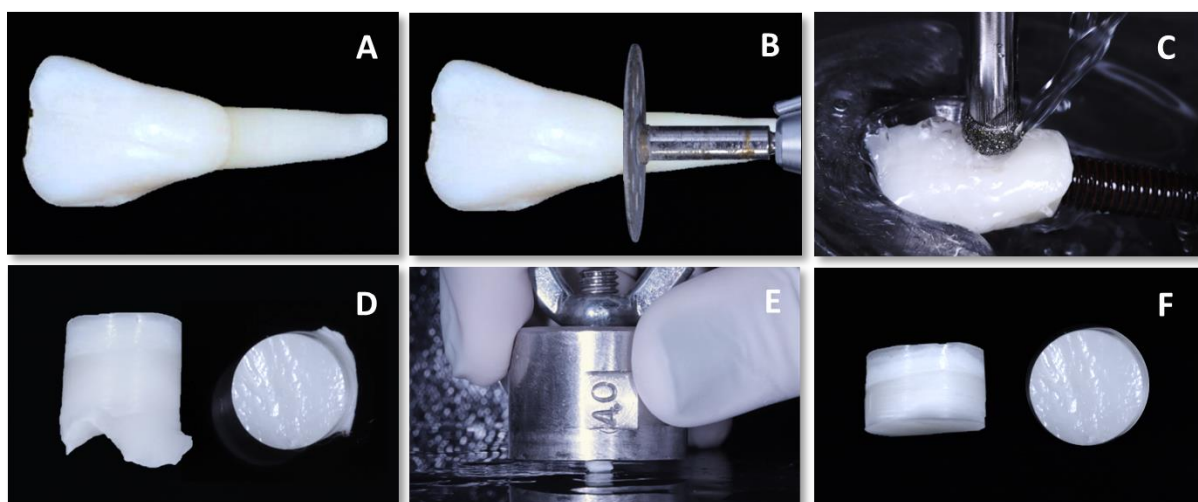
4.7.2 Preparo dos espécimes bovinos

Para este estudo foram utilizados 504 espécimes (252 em esmalte e 252 em dentina) obtidos de incisivos bovinos recém extraídos, de animais jovens, com idade média de 3 anos. Os dentes foram limpos (Figura 5A) com curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, USA) para remoção completa dos tecidos moles aderidos à superfície, e submetidos à profilaxia, com uma mistura de pedra-pomes e água, aplicada com escova de Robinson. Foram então imersos por 24 h em solução de timol a 0,1% para desinfecção e, na sequência, ficaram armazenados em água destilada, sob refrigeração a 4°C, até a época do seu uso.

Após remoção das raízes com um disco diamantado (Figura 5B), as coroas foram fixadas à base de uma cortadora de amostras circulares com a face vestibular voltada para cima e foram obtidas amostras cilíndricas de esmalte bovino e dentina radicular utilizando-se uma broca diamantada trefina com 4 mm de diâmetro interno (Figura 5C e 5D). A fim de padronizar a altura dos espécimes, eles foram posicionados em um dispositivo metálico que contém um orifício circular com diâmetro de 4 mm e altura de 2,1 mm e tiveram suas extremidades planificadas

utilizando lixas de carbeto de silício de granulação P600 (Extec Corp., CT, USA) acopladas a politriz circular (Panambra, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) à velocidade de 300 rpm, sob refrigeração constante (Figura 5E e 5F) (Borges et al., 2012).

Figura 5 – Preparo inicial do espécime



Legenda: A) Dente limpo; B) Separação da coroa e raiz com disco diamantado; C) Corte da amostra circular com broca diamantada trefina de 4 mm sob irrigação; D) Aspecto da amostra após corte; E) Padronização da altura do espécime utilizando um dispositivo metálico e lixa P600; F) Aspecto da amostra após padronização da altura.

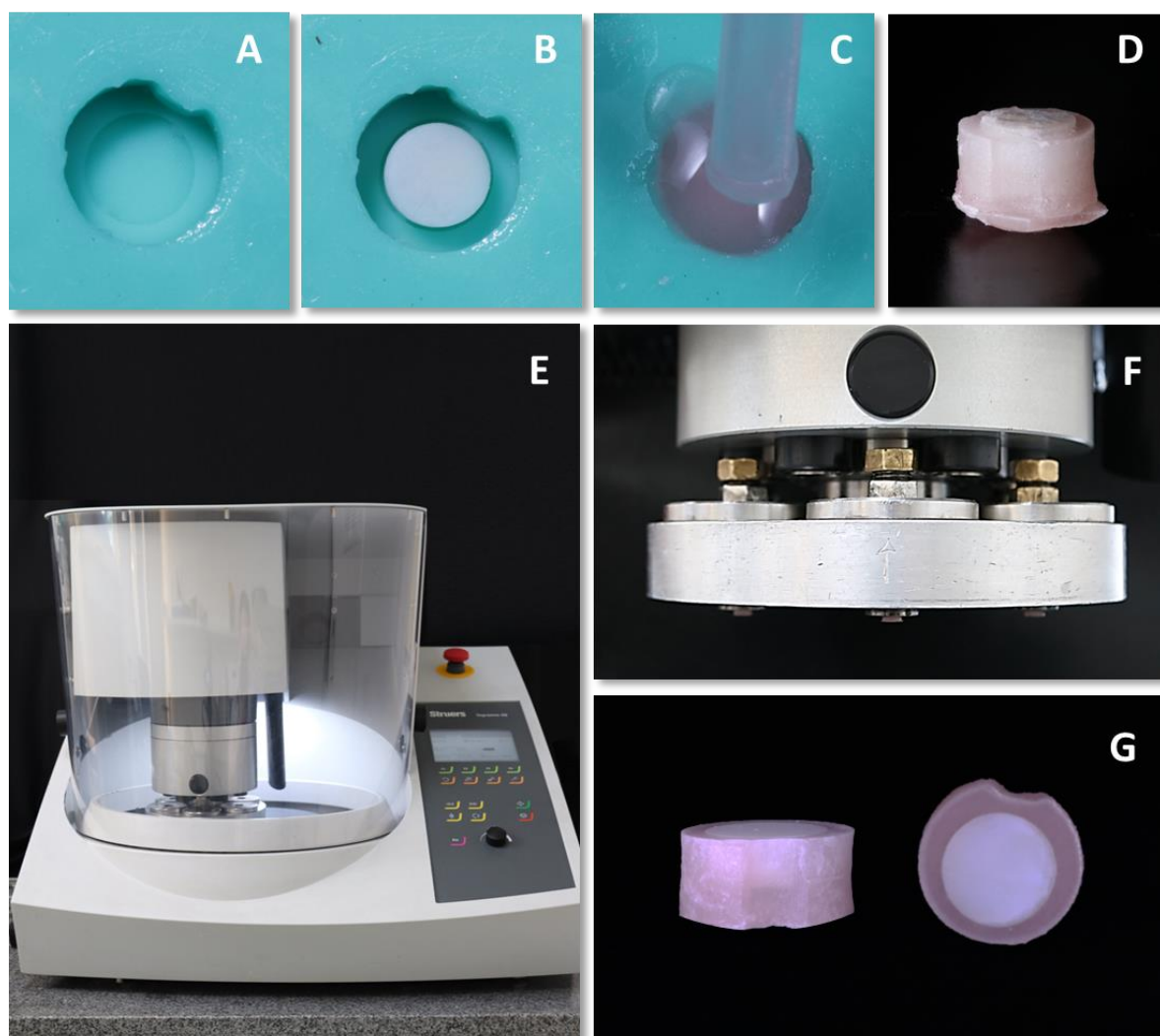
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espécimes planificados foram embutidos em resina acrílica utilizando uma matriz de silicone que possuía orifícios com diâmetro de 6 mm, profundidade de 3 mm (Figura 6A, 6B, 6C e 6D).

Após o embutimento, os espécimes foram posicionados com sua base voltada para baixo em um dispositivo metálico com 6 mm de diâmetro e profundidade definida em 2 mm para padronização da altura (Figura 6F) utilizando a lixa de carbeto de silício de granulação P1200 (Struers A/S, Denmark), acoplada a uma politriz semiautomática (Tegamin 25, Struers A/S, Denmark) (Figura 6E) com 30 N de força à velocidade de 120 rpm eixo superior e 300 rpm eixo inferior, sob refrigeração constante. Em seguida, para proporcionar o polimento, o topo dos espécimes foi voltado para baixo e foram utilizadas lixas de carbeto de silício de

granulação P1200, P2400 e P4000 seguidas de tecido para polimento MD Nap, MD Dac (Struers A/S, Denmark) durante 5s, 15s, 30s, 60s e 60s respectivamente sob refrigeração constante (Figura 6G). A cada troca de lixa foi realizado um banho em ultrassom utilizando água ultrapurificada durante 5 min para remoção de resíduos dos grãos abrasivos.

Figura 6 – Embutimento e polimento do espécime



Legenda: A) Matriz de silicone com 6 mm de largura e 3 mm de profundidade; B) Encaixe do espécime de 4 mm de largura com topo voltado para baixo; C) Inserção da resina acrílica; D) Aspecto do espécime após embutimento em resina acrílica; E) Politriz semiautomática com suporte metálico para posicionamento dos espécimes; F) Espécimes posicionados para polimento; G) Aspecto do espécime após polimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espécimes foram observados em lupa estereoscópica para detecção de trincas ou algum outro defeito de estrutura. Em seguida, os espécimes foram esterilizados com radiação gama, com uma dose de 25 kGy (Wegehaupt et al., 2012). A fonte de irradiação consiste de um irradiador multipropósito de Cobalto-60 localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil) (Aivazoglou, 2009; Ávila et al., 2020a).

As amostras foram previamente desmineralizadas em ácido clorídrico 0,01 M, pH 2,3, por 3 min visando produzir uma leve erosão inicial (Körner et al., 2020). Após, foi realizado a leitura da microdureza superficial para permitir a estratificação dos espécimes por grupos, a fim de padronizar a condição inicial (metodologia detalhada no item. 4.7.7). Em seguida os espécimes foram armazenados em umidade relativa 100%, a 4°C até a sua utilização.

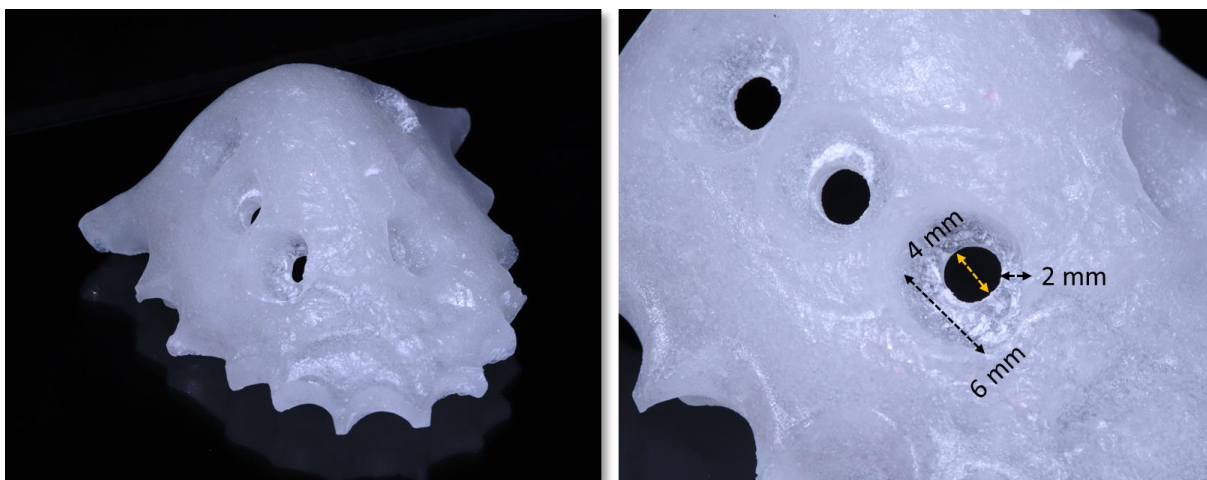
4.7.3 Preparo dos dispositivos intraorais

Os participantes tiveram suas arcadas superiores moldadas com alginato de presa rápida (Jeltrate® Plus, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). A partir do molde obteve-se o modelo de gesso, no qual foi confeccionado o dispositivo intraoral palatal com resina acrílica (Figura 7A).

Três nichos com profundidade de 2 mm e largura de aproximadamente 6 mm foram confeccionados nesses dispositivos, nas regiões de pré-molares e molares, em ambos os lados (Figura 7B) (Ávila et al., 2020b). Os nichos foram confeccionados no dispositivo de forma que a amostra fosse inserida pela face voltada para o palato, impedindo que se soltasse, e que apenas a superfície a ser avaliada ficasse em contato com a cavidade oral para formação da película adquirida e para que não acontecesse uma abrasão adicional indesejada na superfície dos espécimes, causada pela ação da língua. Os dispositivos foram instalados e ajustados nos participantes numa segunda consulta. Nessa mesma consulta, os participantes foram submetidos à profilaxia e receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo. Os dispositivos foram então desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por 10 min, seguido de lavagem com água corrente. No dia

anterior a cada fase do estudo, os espécimes foram fixados nos nichos dos aparelhos utilizando cera pegajosa.

Figura 7 – Dispositivo intraoral



Legenda: A) Dispositivo em resina acrílica; B) Nichos para inserção dos espécimes.
Fonte: Elaborado pelo autor.

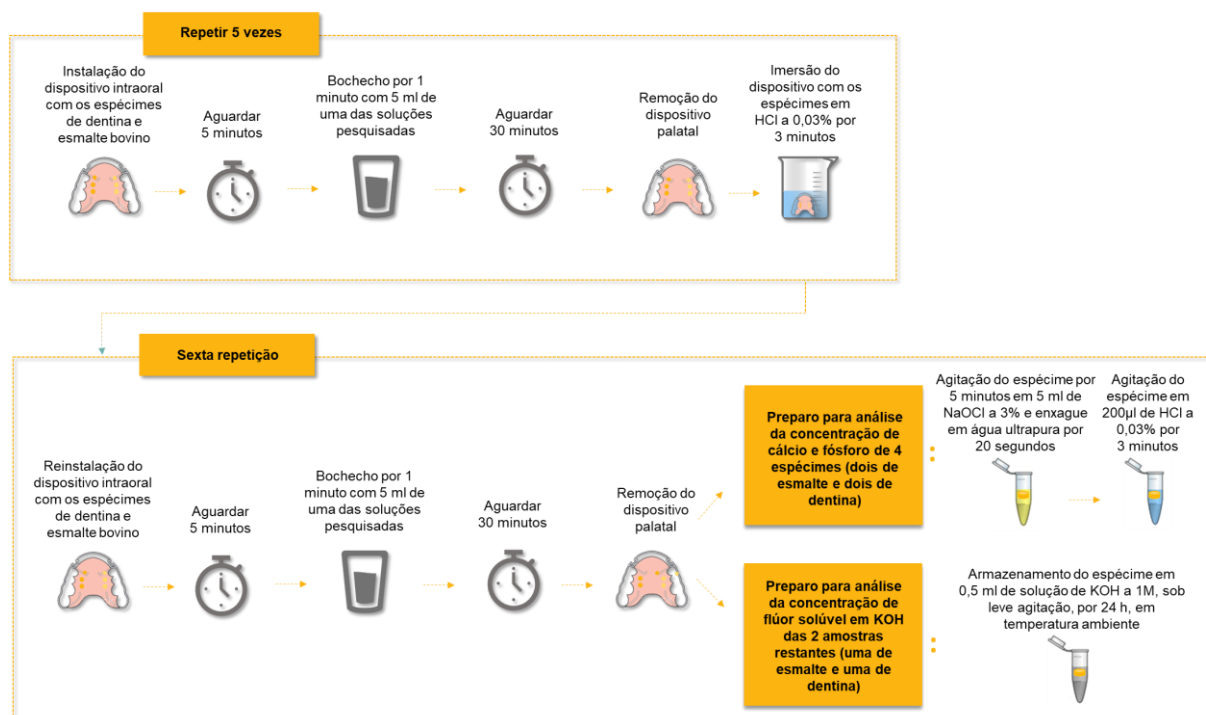
4.7.4 Procedimento experimental

A exposição às soluções de tratamento foi realizada no período matutino levando em consideração a influência do ciclo circadiano no fluxo e composição salivar (Ferguson, Botchway, 1980). Portanto, no dia do experimento o voluntário se alimentou normalmente pela manhã e logo após realizou a higiene bucal com dentífrico não fluoretado (Cocoricó, Bitufo, São Paulo, Brasil) fornecido. Compareceu à clínica do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT-SJC Unesp, e instalou o dispositivo no palato e aguardou 5 min para formação inicial da película adquirida e então realizou bochecho por 1 min com 5 ml da solução de tratamento determinada pela alocação aleatória (realizada pelo software Random.org). Os grupos de tratamento foram determinados conforme a solução empregada, mostrados na Figura 4.

Após o tratamento, o voluntário aguardou 30 min sem ingerir alimentos, intervalo necessário para a maturação da película adquirida na superfície dental (Niemeyer et al., 2021; Weber et al., 2015). Decorrido o tempo, foi realizada a exposição extraoral dos espécimes ao ácido clorídrico a 0,01 M, pH 2,3, sob agitação por 3 min, a fim de se evitar o contato dos dentes naturais do voluntário com a solução ácida (Figura 8). Os passos descritos foram repetidos seis vezes, caracterizando uma ciclagem erosiva de curta duração. Optou-se por realizar a ciclagem erosiva ao invés de uma aplicação única, para possibilitar maior exposição dos espécimes às soluções de tratamento, uma vez que resultados mais favoráveis foram observados com esta metodologia no estudo piloto realizado.

Em cada uma das sete fases do estudo, foram realizados os mesmos procedimentos experimentais citados acima, com um intervalo mínimo de dois dias, para garantir o período de *wash-out* entre a exposição às diferentes soluções tratamento (Kensche et al., 2019; Nehme et al., 2019).

Figura 8 – Esquema passo-a-passo da sequência de procedimentos realizados a cada fase do experimento, no período matutino



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.5 Cálculo da perda erosiva por meio da mensuração da concentração de cálcio e fósforo por método colorimétrico em espectrofotômetro

Após o último tratamento e exposição à saliva por 30 min, quatro dos seis espécimes (dois de esmalte e dois de dentina) foram removidos dos dispositivos intraorais para serem enxaguados sob agitação constante por 5 min em 5 ml de solução aquosa de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 3%, com objetivo de remover a película salivar da superfície antes da análise da concentração de cálcio e fósforo perdida (Brevik et al., 2013; Lussi et al., 2012), uma vez que o cálcio presente na película (devido à afinidade das proteínas da película por este íon) pode ser liberado no meio, atuando como um fator confundidor (Jager et al., 2011).

Em seguida, as amostras foram enxaguadas com água ultrapura (20 s) e secas com papel absorvente sem encostar na superfície dental para a última imersão no ácido em tubos Eppendorf. Tal procedimento permitiu realizarmos uma microbiópsia para a análise da concentração de cálcio e fósforo presentes nas soluções ácidas obtidas do esmalte e dentina (Attin et al., 2005; Hannig et al., 2005). Para isso, foram aplicados 200 µL de ácido clorídrico 0,01 M, pH 2,3, sob agitação por 3 min em cada espécime (Figura 9). Optou-se pelo uso do ácido clorídrico por ser mais adequado à análise de cálcio das amostras, uma vez que o ácido cítrico pode favorecer a formação de complexos quelantes, potencialmente interferindo na mensuração do cálcio nas amostras ácidas (Attin et al., 2005; Hannig et al., 2005).

Os espécimes de esmalte foram armazenados em umidade relativa, para posterior mensuração de microdureza superficial final. As amostras ácidas coletadas dos espécimes de esmalte e dentina foram armazenadas em tubo Eppendorf, a 4°C para subsequente cálculo da perda erosiva através da mensuração da concentração de cálcio e fósforo por método colorimétrico.

Essa avaliação ocorreu por meio de método colorimétrico utilizando um leitor de microplacas com função de espectrofotômetro (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader), combinado com o Kit K051 para mensuração do cálcio (Bioclin, 2020a) e o Kit K020 para o fósforo (Bioclin, 2020b).

Previamente às leituras, foi necessário o preparo da curva de calibração para estabelecer o grau de concordância entre uma solução padrão contendo uma

concentração de cálcio conhecida e a concentração de cálcio obtida nas amostras coletadas. A curva de calibração foi realizada em duplicata e gerou ensaios com 0 (ensaio branco); 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 $\mu\text{g/poço}$. Feito isso, partiu-se para as leituras em duplicata das amostras coletadas (5 μL de amostra cada), que foram removidas do tubo Eppendorf e depositadas nos poços restantes da microplaca transparente contendo 45 μL de água ultrapura. Posteriormente, 150 μL reagente enzimático Arsenazo III (Hannig et al., 2005) foi adicionado para permitir a detecção de cálcio na curva de calibração e amostras. A microplaca foi posicionada no leitor de microplacas (Figura 9) e então a absorbância foi avaliada utilizando um comprimento de onda de 675 nm à temperatura ambiente (Bioclin, 2020a).

Figura 9 – Esquema da coleta das amostras no tubo Eppendorf até o posicionamento no leitor de microplacas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para análise do fósforo, a técnica utilizada foi semelhante, sendo, portanto, preparada a curva padrão para leitura do fósforo, baseada na reação entre o fósforo e o molibdato (Bioclin, 2020b) com leitura sob comprimento de onda de 650 nm (Hannig et al., 2005). Os valores foram determinados em mg/ml.

A partir desses dados obtidos foi realizada a média das duplicatas possibilitando determinar a concentração de íons de cálcio e fósforo presentes nas amostras. Esses valores foram então convertidos em mmol/L e utilizados para o cálculo da perda mineral de cálcio e fosfato assumindo que

esmalte/dentina consistem em hidroxiapatita estequiométrica (HA), com 87%_{vol} e 50%_{vol} de conteúdo mineral para esmalte e dentina, respectivamente (Ganss et al., 2005, 2009), sendo que:

$$\text{Perda mineral } (\mu\text{g}) = (\text{concentração (mmol/L)} \times \text{volume da solução de erosão (L)} \times \text{M massa atômica do mineral analisado (u)}) / \text{fração em HA (p/p)}$$

Considerando o volume da solução de erosão de 200 µL (0,0002 L); a massa atômica do mineral analisado para cálcio de 40,078 u e de fósforo de 30,973 u; a fração de cálcio em hidroxiapatita de 0,399 p/p e de fósforo em hidroxiapatita de 0,185 p/p (Ganss et al., 2005, 2009; Nikiforuk, 1985). E a partir dos valores obtidos foi então determinada a perda erosiva:

$$\text{Perda erosiva } (\mu\text{m}) = \text{perda mineral para cálcio} + \text{perda mineral para fósforo } (\mu\text{g}) / (\text{densidade de HA (g/cm)} \times \text{área experimental (mm}^2\text{)})$$

Foi considerada a densidade de hidroxiapatita em esmalte de 3,15 g/cm³ e em dentina de 2.35 g/cm³ (Ganss et al., 2005, 2009; Nikiforuk, 1985). A área experimental foi calculada com base na superfície do espécime cilíndrico com 4 mm Ø (12,56 mm²).

4.7.6 Análise da microdureza superficial em esmalte para o cálculo do percentual de redução da microdureza

O ensaio de microdureza objetivou avaliar o efeito protetor dos tratamentos na presença dos episódios erosivos sobre os espécimes de esmalte e neste estudo foi realizado em dois momentos:

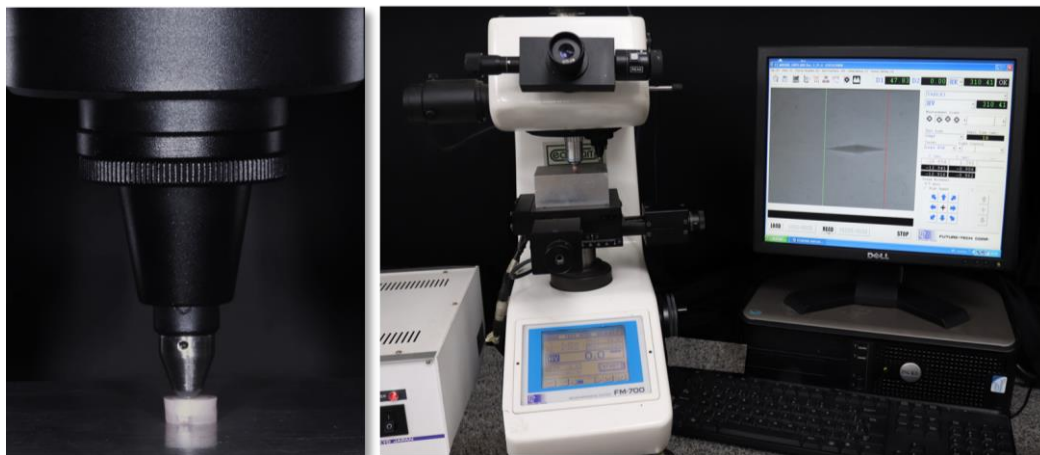
- a) **E1:** Após a primeira imersão em solução ácida (3 min) para se obter o valor de microdureza após desmineralização inicial;

- b) **E2:** Após o final da ciclagem erosiva, para se avaliar o potencial efeito protetor das soluções testadas.

A leitura da microdureza inicial e final dos espécimes foi realizada com indentador Knoop montado em microdurômetro (FM-700, Future-Tech, Tokyo, Japão), com aplicação de carga de 50 g durante 10 s sob a superfície do esmalte (Figura 10A e 10B). Foram realizadas três indentações com distância de 100 µm entre elas. Foi utilizada a média dos valores de dureza obtidos nas três indentações para o cálculo do percentual de redução da microdureza (%KHN_{red}), utilizando a equação:

$$\%KHN_{red} = [(E2 - E1) / E1] \times 100$$

Figura 10 – Avaliação de microdureza Knoop



Legenda: A) Indentador sobre a amostra; B) Aspecto da indentação inicial.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.7 Determinação da concentração de flúor solúvel em KOH

A concentração de flúor adsorvido à superfície dental foi determinada por um eletrodo sensível ao flúor (ThermoScientific Orion 9609NWP, Waltham, Massachusetts, EUA). Foi expressa em mV para posterior conversão em µg/cm² de

acordo com a comparação com uma curva de calibração com soluções padrão de fluoreto de sódio de concentração conhecida (0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, e 100 ppm). Para calibração, 500 µL de cada solução foi neutralizada com 500 µL de solução HClO₄ a 1 M e 1 ml de TISAB II.

Um espécime de esmalte e dentina de cada voluntário foi separado para a análise adicional de flúor solúvel. Para tal, cada espécime foi imerso em um tubo Eppendorf contendo 500 µL de solução de KOH a 1M, sob leve agitação, por 24 h, em temperatura ambiente (Calavska et al., 1975). Após esse período, os espécimes foram lavados em água ultrapura e armazenados em umidade relativa e uma amostra da solução de KOH (250 µL) foi transferida para um recipiente plástico e neutralizada com 250 µL de solução de HClO₄ a 1M. Então, 500 µL de solução de TISAB II foi adicionada ao recipiente. As medidas foram feitas em temperatura ambiente (25°C ± 2°C), sob agitação constante utilizando uma barra e agitador magnético. O valor de flúor fracamente adsorvido na superfície do esmalte e dentina foi calculado conforme o volume da solução de KOH utilizado e a área da superfície do espécime e assim foram obtidos os dados em µg/cm².

4.8 Delineamento estatístico

A estatística descritiva consistiu no cálculo da média e desvio-padrão obtidos em cada condição experimental. Para o desfecho primário a variável dependente foi a perda erosiva para esmalte ou dentina calculada com base nos valores de concentração de cálcio e fósforo coletados na solução ácida medidos por espectrofotometria colorimétrica. A variável independente foi representada pelas soluções de tratamento. Para os desfechos secundários a variável dependente foi a porcentagem de redução da microdureza obtida por microdureza superficial em esmalte ou a quantidade de flúor solúvel em KOH de esmalte e dentina com variável independente representada pelas soluções de tratamento.

A estatística inferencial foi realizada pelo software Statistica for Windows (StatSoft, California, EUA) para o esmalte e dentina separadamente. Os requisitos de normalidade e homoscedasticidade foram atendidos para os dados de perda

erosiva calculada e para porcentagem de redução da microdureza, verificados pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe e os dados de concentração de flúor solúvel em KOH foram transformados em $\log_{10}(X)$, para atenderem aos pressupostos da análise de variância. Realizou-se então a aplicação do teste estatístico ANOVA de medidas repetidas (Rm-ANOVA), considerando os voluntários como a variável de repetição e foi empregado o teste de comparações múltiplas de Tukey devido à detecção de diferença significativa. O nível de significância adotado foi de 5%.

As hipóteses de nulidade testadas foram:

H₀₁: Não há diferença no efeito antierosivo da película adquirida associada às diferentes soluções experimentais testadas, medido por concentração de perda erosiva calculada após microbiópsia do esmalte e dentina;

H₀₂: Não há diferença no efeito protetor das diferentes soluções testadas medido por análise da microdureza superficial do esmalte;

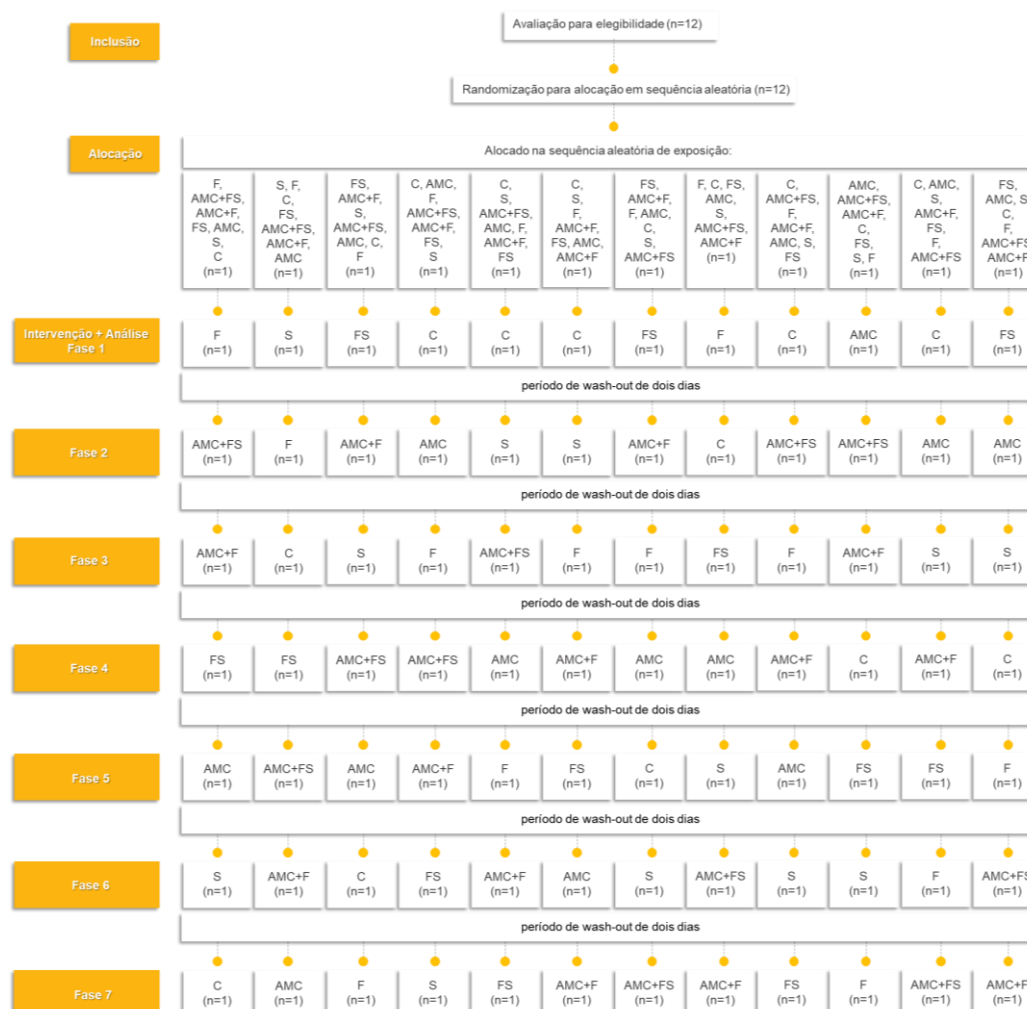
H₀₃: Não há diferença na concentração de flúor solúvel em KOH obtido sob a superfície de esmalte e dentina para os diferentes tratamentos.

5 RESULTADOS

5.1 Fluxograma CONSORT

Por se tratar de um estudo cruzado e aleatorizado foi elaborado um fluxograma, seguindo as normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) para estudos cruzados (Dwan et al., 2019), projetado para documentar o fluxo de registros de participantes do ensaio, seguindo os critérios de inclusão e aleatorização dos voluntários (Figura 11).

Figura 11 – Fluxograma CONSORT do recrutamento e aleatorização dos voluntários do estudo em diferentes soluções experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Cálculo da perda erosiva, percentual de redução da KHN e flúor solúvel em KOH para esmalte

Os resultados apresentados abaixo referem-se a concentração de cálcio e fósforo mensurados por método colorimétrico em espectrofotômetro nas amostras ácidas coletadas, o percentual de redução da microdureza e a concentração de flúor solúvel em KOH para o substrato de esmalte. Os dados de concentração de cálcio e fósforo foram inseridos nas fórmulas previamente descritas a fim de se obter valores de perda erosiva para os espécimes tratados com cada solução experimental. Os dados descritivos de média e desvio-padrão da perda erosiva para esmalte estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey da concentração de cálcio/fósforo (mg/ml) e da perda erosiva calculada (μm) de acordo com a solução experimental (tratamento) realizada sob a superfície dos espécimes de esmalte

Solução	Concentração de cálcio	Concentração de fósforo	Perda erosiva	
C	$0,3950 \pm 0,030$	$0,1267 \pm 0,018$	$8,46^{-3} \pm 0,7^{-3}$	A
S	$0,4017 \pm 0,032$	$0,1292 \pm 0,031$	$8,61^{-3} \pm 0,1^{-2}$	A
AMC	$0,3508 \pm 0,039$	$0,1217 \pm 0,023$	$7,76^{-3} \pm 0,9^{-3}$	AB
F	$0,3275 \pm 0,038$	$0,1100 \pm 0,014$	$7,15^{-3} \pm 0,7^{-3}$	B
FS	$0,3667 \pm 0,058$	$0,1167 \pm 0,018$	$7,82^{-3} \pm 0,1^{-2}$	AB
AMC+F	$0,2767 \pm 0,058$	$0,0908 \pm 0,017$	$5,98^{-3} \pm 0,1^{-2}$	C
AMC+FS	$0,3117 \pm 0,061$	$0,1067 \pm 0,023$	$6,86^{-3} \pm 0,1^{-2}$	BC

Legenda: Letras mostram diferença nas colunas para tratamento com as diferentes soluções experimentais ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste estatístico ANOVA de medidas repetidas (Rm-ANOVA), considerando os voluntários como a variável de repetição, evidenciou diferença significativa entre as soluções testadas ($p = 0,00001$). Foi então aplicado o teste de

comparações múltiplas de Tukey para localização das diferenças. O grupo AMC+F exibiu os menores valores de perda erosiva calculada, similar ao grupo AMC+FS. O grupo F exibiu valores intermediários, significativamente menores do que o controle negativo. Os demais grupos não diferiram do controle.

Os dados descritivos de média e desvio-padrão do percentual de redução da KHN e flúor solúvel em KOH para esmalte estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey do percentual de redução da KHN (%KHN_{red}) e do flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de acordo com o tratamento realizado sob a superfície dos espécimes de esmalte

Solução	Microdureza E1	Microdureza E2	% de redução da KHN		Flúor solúvel em KOH	
C	282,15 $\pm$ 11,88	170,03 $\pm$ 13,67	-37,74 $\pm$ 4,66	A	0,0533 $\pm$ 0,03	A
S	289,17 $\pm$ 12,27	179,28 $\pm$ 17,18	-37,85 $\pm$ 4,98	A	0,0931 $\pm$ 0,07	A
AMC	296,92 $\pm$ 19,69	216,64 $\pm$ 13,58	-26,83 $\pm$ 2,56	B	0,0543 $\pm$ 0,03	A
F	293,09 $\pm$ 12,42	203,30 $\pm$ 13,31	-31,05 $\pm$ 3,45	B	0,7844 $\pm$ 0,24	B
FS	280,21 $\pm$ 17,28	194,73 $\pm$ 11,09	-30,39 $\pm$ 5,04	B	1,7415 $\pm$ 0,41	D
AMC+F	296,21 $\pm$ 7,11	233,35 $\pm$ 12,99	-21,02 $\pm$ 4,92	C	1,2747 $\pm$ 0,21	C
AMC+FS	293,25 $\pm$ 19,02	235,16 $\pm$ 12,37	-19,37 $\pm$ 4,16	C	1,4915 $\pm$ 0,36	CD

Legenda: Letras mostram diferença nas colunas para tratamento com as diferentes soluções experimentais ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para os dados de percentual de redução da microdureza superficial contra a erosão inicial observa-se que os grupos com melhor desempenho foram os compostos por polímero e soluções fluoretadas (AMC+F e AMC+FS). Os grupos F, FS e AMC apresentaram potencial protetor intermediário e significativamente maior que o controle negativo.

Para os dados de concentração de flúor solúvel em KOH em esmalte o resultado do teste de comparações múltiplas de Tukey evidenciou que não houve diferença entre os grupos que não continham flúor. O grupo FS exibiu maior

concentração de flúor adsorvido na superfície do esmalte, similar ao grupo AMC+FS. O grupo AMC+F foi similar ao AMS+FS e significativamente maior do que o F, que exibiu valores intermediários.

5.3 Cálculo da perda erosiva e flúor solúvel em KOH para dentina

Os resultados apresentados abaixo referem-se a concentração de cálcio e fósforo mensurados por método colorimétrico em espectrofotômetro nas amostras ácidas coletadas e a concentração de flúor solúvel em KOH para o substrato de dentina. Os dados descritivos de média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey da concentração de cálcio, fósforo e perda erosiva estão apresentados na Tabela 3, assim como os valores obtidos para a análise adicional da concentração de flúor solúvel em KOH.

Tabela 3 – Média, desvio-padrão e comparações múltiplas de Tukey da concentração de cálcio/fósforo (mg/ml), da perda erosiva (μm) e do flúor solúvel em KOH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de acordo com o tratamento realizado sob a superfície dos espécimes de dentina

Solução	Concentração de cálcio	Concentração de fósforo	Perda erosiva		Flúor solúvel em KOH	
C	0,3683 $\pm$ 0,0204	0,1367 $\pm$ 0,0137	11,2 ⁻³ $\pm$ 0,7 ⁻³	A	0,0828 $\pm$ 0,0428	A
S	0,3792 $\pm$ 0,0239	0,1292 $\pm$ 0,0239	11,2 ⁻³ $\pm$ 0,1 ⁻²	A	0,1387 $\pm$ 0,0888	A
AMC	0,3333 $\pm$ 0,0365	0,1150 $\pm$ 0,0138	9,86 ⁻³ $\pm$ 0,8 ⁻³	B	0,0390 $\pm$ 0,0198	A
F	0,3058 $\pm$ 0,0162	0,1175 $\pm$ 0,0122	9,49 ⁻³ $\pm$ 0,5 ⁻³	B	1,0726 $\pm$ 0,4920	B
FS	0,3258 $\pm$ 0,0382	0,1142 $\pm$ 0,0090	9,70 ⁻³ $\pm$ 0,8 ⁻³	B	1,6565 $\pm$ 0,5458	C
AMC+F	0,2233 $\pm$ 0,0373	0,0875 $\pm$ 0,0160	6,99 ⁻³ $\pm$ 0,1 ⁻²	C	0,8165 $\pm$ 0,3355	B
AMC+FS	0,2675 $\pm$ 0,0452	0,0983 $\pm$ 0,0153	8,13 ⁻³ $\pm$ 0,1 ⁻²	D	0,8644 $\pm$ 0,3116	B

Legenda: Letras mostram diferença nas colunas para tratamento com as diferentes soluções experimentais ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na perda erosiva para o substrato de dentina o grupo AMC+F exibiu os menores valores de perda erosiva calculada, seguido do grupo AMC+FS. Os grupos F, FS e AMC exibiram valores intermediários, significativamente menores do que o controle negativo. O grupo S não diferiu do controle.

Os dados de concentração de flúor solúvel em KOH para dentina evidenciaram que não houve diferença entre os grupos que não continham flúor. O grupo FS exibiu maior concentração de flúor adsorvido na superfície da dentina. Os grupos F, AMC+F e AMS+FS exibiram valores intermediários.

6 DISCUSSÃO

Buscando mimetizar condições mais clinicamente relevantes, este estudo foi desenvolvido empregando um modelo *in situ*, com voluntários selecionados de acordo com os critérios de inclusão previamente descritos. Para minimizar fatores confundidores, todos os voluntários selecionados apresentavam adequado fluxo salivar e ausência de sinais de desgaste erosivo. Além disso, em situações clínicas, as superfícies dentárias estão recobertas pela película adquirida, e portanto, a formação desta em condições naturais no estudo evita que as proteínas salivares coletadas possam sofrer alteração ou degradação, como pode ocorrer em estudos *in vitro* (Batista et al., 2016; Pelá et al., 2020). Ressalta-se que a presença da película contribui para um melhor entendimento da interação entre as soluções experimentais formadoras de filme e o conjunto proteínas presentes na película adquirida/dente. Porém, é preciso considerar o desenvolvimento da mesma de acordo com o tempo de exposição do dente à saliva, uma vez que o aumento da espessura da película formada sobre o esmalte tem influência sobre o efeito protetor (Hannig, 1999), assim como a influência do tratamento com fluoretos e compostos metálicos na formação e composição da película (Rykke et al., 1991).

A camada basal da película adquirida começa a se formar poucos segundos após o contato da saliva com a superfície dental, uma vez que os íons cálcio da saliva se adsorvem aos íons fosfato predominantemente presentes na superfície do esmalte, formando uma camada de hidratação com carga elétrica positiva. Essa mudança de carga elétrica superficial, quando combinada a forças de Van der Waals e interações hidrófobas, permite que as proteínas salivares com carga elétrica negativa como as histatinas, estaterinas e proteínas ricas em prolina (PRPs) adsorvam-se sobre a superfície dental (Barbour et al., 2005; Buzalaf et al., 2012; Hannig, Hannig, 2014; Lee et al., 2013; Scaramucci et al., 2012). Estas proteínas são capazes de se ligar ao cálcio, mantendo altas concentrações destes íons no interior da película e na região próxima à superfície da hidroxiapatita, auxiliando na homeostase mineral da interface esmalte-película frente a desafios erosivos e consequentemente, reduzindo sua desmineralização (Hannig, Hannig, 2014; Hannig, Joiner, 2006; Jager et al., 2011).

Essa camada de peptídeos e proteínas salivares densa em elétrons aumenta em espessura (entre 10 e 20 nm) em poucos minutos e permanece estável por cerca de 30 minutos, o que justifica nossa escolha para tempo de formação de película inicial de 5 minutos, seguido de tratamento com a solução experimental objetivando aperfeiçoar o entendimento do quanto ambas competiriam pelos sítios de ligação disponíveis no substrato, e subsequente aguardo por 30 minutos para realização do desafio erosivo visando permitir o início do período de maturação da mesma, uma vez que a camada externa formada após esse período apresenta alta solubilidade ao ácido (Nekrashevych, Stösser, 2003).

Devido à presença de cálcio no interior da película, resultante da interação de tais íons com as proteínas (Jager et al., 2011), foi aplicada uma solução de hipoclorito de sódio ao final do ciclo erosivo, previamente à exposição ao último desafio ácido para coleta final da amostra ácida a ser analisada, visando eliminar da análise o fator confundidor (cálcio presente na película adquirida) (Brevik et al., 2013; Lussi et al., 2012).

Quanto à escolha do ácido clorídrico como desafio erosivo, o objetivo foi simular uma condição de susceptibilidade ao desgaste por ácidos de origem intrínseca, como no caso de indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) (Martini et al., 2020), bulimia, anorexia (Carvalho et al., 2015), desordens somáticas envolvendo períodos de gravidez, alcoolismo e problemas gastrointestinais, com recorrentes quadros de refluxos, regurgitações e vômitos (Hara et al., 2005). O padrão de desgaste erosivo nestes pacientes tende a ser severo, uma vez que o potencial erosivo do suco gástrico pode ser ainda mais agressivo que o promovido por ácidos de origem extrínseca, como bebidas carbonatadas (Bartlett, Coward, 2001). Ademais, o ácido clorídrico é considerado mais adequado como desafio erosivo para análises químicas de cálcio das amostras, uma vez que o ácido cítrico, comumente utilizado para simular o desafio ácido de origem extrínseca, pode favorecer a formação de complexos quelantes, potencialmente interferindo na mensuração do cálcio nas amostras ácidas pelo método colorimétrico (Attin et al., 2005; Hannig et al., 2005).

Apesar da quantificação de perda mineral de cálcio e fósforo ser considerado um método estabelecido e sensível, ele não permite a percepção da

perda espacial do tecido. Com o objetivo de facilitar a compreensão dos resultados obtidos, buscou-se por meio de uma fórmula preestabelecida, converter os mesmos em dados comparáveis à perda erosiva em altura. Portanto, calculou-se a perda mineral de cálcio e fósforo, considerando que estes íons são apenas alguns dos componentes presentes no esmalte e dentina. Os valores foram calculados em função do volume da solução ácida analisada, massa atômica dos minerais e fração do mineral em relação à hidroxiapatita. Estes dados de perda mineral foram posteriormente analisados com relação à densidade da hidroxiapatita considerando-se o esmalte e dentina e a área da superfície do espécime. Desta forma, os valores finais foram obtidos em micrometros (Ganss et al., 2009, 2005). Deve-se ressaltar que estes cálculos consideram que o esmalte e dentina apresentam composição semelhante à hidroxiapatita estequiométrica e que levam em conta a variação do conteúdo mineral correspondente a cada tecido e, portanto, têm maior valor comparativo e não devem ser necessariamente extrapolados às condições reais.

Optou-se por realizar a ciclagem erosiva ao invés de uma aplicação única, para possibilitar maior exposição dos espécimes às soluções de tratamento, uma vez que resultados mais favoráveis foram observados com esta metodologia no estudo piloto realizado.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que as simulações da ciclagem erosiva *in situ* permitiram rejeitar a primeira e segunda hipótese nula de que não há diferença no efeito antierosivo das diferentes soluções experimentais testadas na presença da película adquirida, medida por concentração de perda erosiva calculada após microbiópsia do esmalte e dentina e percentagem de redução da microdureza em esmalte após análise de microdureza superficial. As formulações contendo Fluoreto de Sódio (F) mostraram potencial de proteção estatisticamente superior ao controle negativo com Água ultrapura (C) frente à perda erosiva, tendo o tratamento com F reduzido a perda erosiva calculada em 15% em relação ao grupo controle negativo para o substrato de esmalte; e 16% em dentina.

Embora o baixo pH das soluções experimentais possa favorecer a adsorção de fluoretos na superfície dental (Huysmans et al., 2014; Magalhães et al., 2011; Petzold, 2001), a concentração e o tempo utilizados em enxaguatórios podem não ser suficientes para permitir a formação de depósitos fluoretados (Lussi et al., 2019).

Portanto, a eficácia do fluoreto de sódio em inibir o processo erosivo vem se mostrando limitada, devido à sua solubilidade em meio ácido (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2016) sendo menos estável sob condições erosivas (Schlueter et al., 2016).

Compostos polivalentes de cátions metálicos, como o fluoreto de estanho (SnF_2) e o cloreto de estanho (SnCl_2) combinado ao flúor vêm demonstrando uma proteção superior contra o desgaste erosivo (Ganss et al., 2008; Huysmans et al., 2014; Wiegand et al., 2009). Como foi possível observar em nosso estudo, estes compostos devem estar associados, uma vez que o grupo tratado com Cloreto estanhoso (S) não mostrou potencial de proteção comparado ao controle negativo com Água ultrapura (C) frente à perda mineral do dente.

Formulações contendo a combinação de flúor e estanho (FS) têm apresentado maior eficácia, devido à formação de uma camada superficial rica em Sn^{+2} sobre a superfície dental, que demonstrou ser mais ácido-resistente, além de reduzir a solubilidade dos reservatórios de CaF_2 formados, quando empregados em alta concentração (Ganss et al., 2010b, 2010a; Scaramucci et al., 2015; Schlueter et al., 2009). Corroborando com esses resultados, a análise adicional da concentração de flúor solúvel em KOH adsorvido à superfície do esmalte e dentina evidenciou resultados para FS estatisticamente superiores a todos os demais grupos contendo flúor (F, AMC+F e AMC+FS), embora estes também tenham apresentados resultados estatisticamente superiores aos grupos que não possuíam flúor (C, S e AMC). Assim, também foi rejeitada a terceira hipótese de nulidade.

No entanto, a associação do enxaguatório contendo FS ao potencial protetor da película adquirida não mostrou potencial protetor contra a erosão estatisticamente superior ao grupo F quando calculada a perda erosiva. Tais resultados podem ter ocorrido devido a necessidade de interação dinâmica dos compostos contendo estanho com a estrutura dental desmineralizada, de forma a apresentar eficácia protetora (Schlueter et al., 2009). Assim, resultados favoráveis têm sido obtidos com maior evidência quando sob exposição prolongada às ciclagens erosivas (Ganss et al., 2012).

O maior potencial protetor verificado pela perda erosiva foi obtido com as soluções contendo o biopolímero Aminometacrilato associado ao Fluoreto de sódio

com ou sem o Cloreto estanhoso (AMC+F e AMC+FS). Esse copolímero do polimetacrilato é utilizado como revestimento de medicamentos para liberação de fármacos no pH estomacal (menor que 5), sendo portanto, solúvel nessas condições (Evonik, 2015a, 2015b), o que sugere seu promissor potencial de formação de uma barreira protetora sobre os dentes diante das variações do pH bucal.

O tratamento com AMC reduziu a perda erosiva calculada em apenas 8% em relação ao grupo C para o substrato de esmalte; e 12% em dentina. A ação do polímero parece estar associada à sua interação com a superfície do substrato dental, por meio de seus grupamentos funcionais amina ($-\text{NH}^+(\text{CH}_3)^2$), que por estarem protonados em pH ácido, ao entrarem em contato com um pH mais alto, como o da saliva humana, levam à precipitação do polímero (Arends, 1979; Beyer et al., 2012; Matsumoto et al., 1989; Scaramucci et al., 2015).

Os melhores resultados, por sua vez, foram resultantes da associação do polímero com os fluoretos. O grupo tratado com AMC+F foi estatisticamente superior a todos os demais grupos para dentina e similar apenas ao AMC+FS para o esmalte quando calculada a perda erosiva. Especula-se que por meio de atrações eletrostáticas, o copolímero AMC seja capaz de se ligar aos sítios de ligação negativos dos íons fosfato, enquanto o flúor se liga aos sítios de ligação positivos dos íons cálcio do substrato dental (Scaramucci et al., 2015), se adsorvendo à superfície dental e modificando seu potencial zeta (Augusto et al., 2020). O tratamento com AMC+F reduziu a perda erosiva em 29% em relação ao grupo controle para o substrato de esmalte; e 38% em dentina, mostrando-se promissor como agente protetor contra a erosão dental. Além disso, devido a seu potencial de interação com o flúor, esta associação pode favorecer a retenção deste íon nos tecidos moles. Sabe-se que a retenção de flúor nestes tecidos pode prolongar sua disponibilidade no meio bucal, aumentando o potencial de interação do mesmo com o cálcio da saliva (Zero et al., 1992).

Para a combinação AMC+FS, o tratamento reduziu a perda erosiva em 19% em esmalte e 28% em dentina possuindo valores ligeiramente inferiores de proteção se comparado ao AMC+F. Embora também eficaz, acredita-se que a redução da porcentagem de proteção dos substratos se deva ao fato de que os íons de estanho, por possuírem carga positiva, poderiam competir com o biopolímero pela interação

com as proteínas presentes na camada basal da película (Algarni et al., 2015) ou até mesmo pelos sítios de ligação negativos do fosfato presente no substrato dental (Augusto et al., 2021). Além disso, íons cátions bivalentes como o Sn^{+2} podem induzir uma reação de entrecruzamento das cadeias poliméricas (Bezerra et al., 2019), como as do AMC (Augusto et al., 2021), unindo-as e reduzindo a ligação do estanho ao substrato (Maitra, Shukla, 2014).

Os resultados favoráveis quanto ao potencial antierosivo da associação dos polímeros com as soluções fluoretadas foram confirmados pelo teste de microdureza. Observa-se que o potencial protetor dos grupos AMC+F e AMC+FS foi ainda mais evidente quando comparados ao controle negativo. Isto pode estar relacionado à presença de um filme polimérico formando uma barreira física interposta entre a superfície dental analisada e a ponta do indentador. O efeito protetor observado é resultante da associação entre a barreira física e sua capacidade de reduzir a troca iônica entre a solução ácida e o substrato dental.

Deve-se ressaltar que o mecanismo de ação dos diferentes compostos investigados pode variar dependendo do substrato avaliado. Quando comparados os resultados de perda erosiva em μm , é possível observar que a dentina apresentou maiores valores que o esmalte. Isso pode estar relacionado às diferenças da evolução do processo erosivo nos dois substratos. Sabe-se que o esmalte é um mineral altamente compactado com estrutura hexagonal e que quando dissolvido na superfície, se torna irregular e rugoso (Ganss et al., 2014; Ganss, Lussi, 2006).

Já na dentina, por ter uma estrutura biologicamente distinta, o desafio erosivo de curta duração causa uma rápida dissolução mineral peri e intertubular, mas sem degradar a porção orgânica, proporcionando a formação de uma estrutura remanescente esponjosa e completamente desmineralizada (Breschi et al., 2002; Ganss et al., 2014; Prati et al., 2003). Quando a desmineralização erosiva continua, uma densa camada de colágeno desmineralizado forma-se na superfície (Lussi et al., 2011). Esta camada se transforma em uma barreira de difusão para as interações químicas entre o substrato e o meio, levando a uma diminuição na progressão da erosão (Ganss et al., 2004; Hara et al., 2005) o que possivelmente influencia a eficácia dos ingredientes ativos (Ganss et al., 2004). Porém, pouco se sabe sobre o tempo de permanência de tais estruturas sobre a superfície de dentina

altamente erodida, uma vez que esse colágeno pode ser degradado por enzimas em condições clínicas (Ganss et al., 2014; Schlueter et al., 2010).

A capacidade de proteção com o uso do biopolímero nas combinações AMC+F e AMC+FS parece ser potencialmente superior em dentina, possivelmente devido a capacidade bioadesiva do polímero capaz de promover um contato íntimo com as fibras colágenas expostas da dentina, conforme observado previamente com o biopolímero quitosana. A quitosana também possui características catiônicas promovidas pelo grupamento amina ($-NH_3^+$), que proporciona sua reticulação entre as fibras colágenas dentinárias e a formação de interações eletrostáticas de ligação entre o grupamento amina ($-NH_3^+$) e os grupos carboxilato ($-COO^-$) presentes no colágeno que possuem carga elétrica negativa disponível (Persadmehr et al., 2014; Taravel, Domard, 1993; Ururahy et al., 2017).

Deve-se ressaltar que a escovação pode afetar a eficácia protetora de agentes antierosivos, uma vez que a abrasão pela escovação potencializa os efeitos das soluções ácidas na superfície dentária, acelerando sua perda (Huysmans et al., 2011; Schlueter et al., 2020). Além disso, o efeito dos agentes formadores de filme pode ser potencializado pela interação frequente com o substrato e película adquirida. Assim, estudos futuros devem ser conduzidos a fim de avaliar o comportamento dos agentes protetores diante dos desafios erosivo/abrasivos em períodos de exposição a solução experimental (tratamento) e desafio erosivos mais prolongados.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o biopolímero Aminometacrilato aumentou efeito antierosivo do Fluoreto de Sódio associado ou não ao Cloreto Estanhoso na presença da película adquirida sobre o esmalte e a dentina.

REFERÊNCIAS

Addy M. Oral hygiene products: potential for harm to oral and systemic health? *Periodontol* 2000. 2008; Aug;48(1):54–65. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00253.x.

Aivazoglou MU. Influência de soluções de armazenamento, métodos de esterilização e suas associações sobre a microdureza dentinária radicular em dentes humanos: estudo in vitro [dissertação]. São José dos Campos (São Paulo): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2009.

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent*. 2005; Mar;33(3):243–52. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.014. PMID: 15725524.

Arends J. Zeta potentials of enamel and apatites. *J Dent*. 1979; Sep;7(3):246–53. doi: 10.1016/0300-5712(79)90096-4.

Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008; Oct;34(11):1246–66. doi: 10.1080/03639040802026012.

Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006; (20):152–72. doi: 10.1159/000093361. PMID: 16687893.

Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Hilgers R. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res*. 2005; Sep;39(5):432–6. doi: 10.1159/000086852. PMID: 16110217.

Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(3):243–50. doi: 10.1016/0003-9969(06)00073-2.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:123–42. doi: 10.1159/000360355. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24993262.

Augusto MG. Efeito antierosivo de soluções contendo diferentes polímeros [tese]. São José dos Campos (São Paulo): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

Augusto MG, Santos TMA, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CRG, Hara AT, et al. Protective effect of solutions containing polymers associated with fluoride and stannous chloride on hydroxyapatite dissolution. *Caries Res*. 2021;55(2):122-9. doi: 10.1159/000513444. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33503639.

Augusto MG, Silva LFO, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CRG, Borges AB. Protective

effect of anti-erosive solutions enhanced by an aminomethacrylate copolymer. *J Dent.* 2021; Feb;105:103540. Epub 2020 Nov 26. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103540.

Ávila D, Augusto MG, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CRG, et al. Enhancing the anti-erosive properties of fluoride and stannous with the polymer carbopol. *Caries Res.* 2020a;54(3):250–7. doi: 10.1159/000506467.

Ávila D, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Gomes Torres CR, Borges AB. Randomized in situ trial on the efficacy of Carbopol in enhancing fluoride / stannous anti-erosive properties. *J Dent.* 2020b;103347. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103347.

Ávila D, Zanatta RF, Scaramucci T, Aoki IV, Torres CRG, Borges AB. Influence of bioadhesive polymers on the protective effect of fluoride against erosion. *J Dent.* 2017;56:45–52. doi: 10.1016/j.jdent.2016.10.015.

Baig AA, Faller RV, White Jr DJ, inventores. The Procter & Gamble Company. Method of protecting teeth against erosion. Patent US6685920B2. 2004.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):457–61. doi: 10.1111/j.1600-0722.2005.00248.x.

Bardsley PF. The evolution of tooth wear indices. *Clin Oral Investig.* 2008;12(1):15–9. doi: 10.1007/S00784-007-0184-2.

Bartlett D, Ganss C, Lussi A. Basic Erosive wear examination (BEWE): A new scoring system for scientific and clinical needs. *Clin Oral Investig.* 2008;12:65–8. doi: 10.1007/s00784-007-0181-5. PMID: 18228057.

Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent.* 2013;41(11):1007–13. doi: 10.1016/j.jdent.2013.08.018. PMID: 24004965.

Beyer M, Reichert J, Heurich E, Jandt KD, Sigusch BW. Pectin, alginate and gum arabic polymers reduce citric acid erosion effects on human enamel. *Dent Mater.* 2010;26(9):831–9. doi: 10.1016/j.dental.2010.04.008.

Beyer M, Reichert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Morphology and structure of polymer layers protecting dental enamel against erosion. *Dent Mater.* 2012;28(10):1089–97. doi: 10.1016/j.dental.2012.07.003.

Bezerra SJC, João-Souza SH, Aoki IV, Borges AB, Hara AT, Scaramucci T. Anti-erosive effect of solutions containing sodium fluoride, stannous chloride, and selected film-forming polymers. *Caries Res.* 2019;53(3):305–13. doi: 10.1159/000493388.

Borges AB, Torres CRG, de Souza PAB, Caneppele TMF, Santos LFTF, Magalhães

AC. Bleaching gels containing calcium and fluoride: effect on enamel erosion susceptibility. *Int J Dent*. 2012;2012:347848. doi: 10.1155/2012/347848. PMID: 23193404.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002;18(1):26–35. doi: 10.1016/S0109-5641(01)00017-3.

Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *J Dent*. 2013;41(5):428–35. doi: 10.1016/J.JDENT.2013.02.011.

Calcium Colorimetric Assay Kit [bula]. Belo Horizonte: Bioclin. 2020a. 6p.

Carvalho TS, Araújo TT, Ventura TMO, Dionizio A, Câmara JVF, Moraes SM, et al. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. *J Dent*. 2020;102:103478. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103478. PMID: 32950632.

Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, et al. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management. *Clin Oral Investig*. 2015;19(7):1557–61. doi: 10.1007/s00784-015-1511-7. PMID: 26121968.

Creeth J, Zero D, Mau M, Bosma ML, Butler A. The effect of dentifrice quantity and toothbrushing behaviour on oral delivery and retention of fluoride in vivo. *Int Dent J*. 2013;63:14–24. doi: 10.1111/idj.12075.

Dikmen B. ICDAS II criteria (international caries detection and assessment system). *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2015;49(3):63. doi: 10.17096/jiufd.38691.

Eudragit E100, Eudragit EPO, Eudragit E12 [ficha técnica]. Kirschenallee: Evonik. 2015a. 6p.

Eudragit Brochure [ficha técnica]. Armstadt: Evonik. 2015b. 4p.

Featherstone JDB, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res*. 1981;15(5):377–85. doi: 10.1159/000260541. PMID: 6942921.

Fejerskov O, Kidd EAM. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. 2. ed. São Paulo: Santos; 2011. 640p.

Ferguson DB, Botchway CA. A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Arch Oral Biol*. 1980;25(8–9):559–68. doi: 10.1016/0003-9969(80)90068-0.

Frese C, Wohlrab T, Sheng L, Kieser M, Krisam J, Wolff D. Clinical effect of stannous fluoride and amine fluoride containing oral hygiene products: A 4-year randomized controlled pilot study. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi: 10.1038/s41598-019-44164-9. PMID: 31118458.

Ganss C. Is erosive tooth wear an oral disease? Erosive tooth wear from diagnosis to ther. *Monogr Oral Sci.* 2012;25:16–21. doi: 10.1159/000359931. PMID: 24993254.

Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks A-K, Klimek J, Schlueter N. Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine. In vitro tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. *Eur J Oral Sci.* 2010a;118(4):376–84. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00742.x.

Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):931–5. doi: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2004.05.010.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:32–43. doi: 10.1159/000093349.

Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res.* 2005;39(3):178–84. doi: 10.1159/000084795.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:99–107. doi: 10.1159/000359939. PMID: 24993260.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. Dental erosion as oral disease. Insights in etiological factors and pathomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. *Am J Dent.* 2012 Dec;25(6):351-64. PMID: 23409626.

Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res.* 2010b;89(11):1214–8. doi: 10.1177/0022034510375291. PMID: 20581352.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: A comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42(1):2–7. doi: 10.1159/000111743.

Ganss, Von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent.* 2012;40(12):1036–43. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.005.

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: Release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005;50(6):541–52. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.11.002. PMID: 15848147.

Hannig M. The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J.* 2002;52(5):417–23. doi: 10.1111/J.1875-595X.2002.TB00731.X.

Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 1999;3(2):88–95. doi: 10.1007/S007840050084.

Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:206–14. doi: 10.1159/000360376. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24993268.

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, de Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 2003;7(3):158–61. doi: 10.1007/S00784-003-0219-2.

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

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res.* 2005;39(2):134–8. doi: 10.1159/000083159. PMID: 15741726.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:88-99. doi: 10.1159/000093355. PMID: 16687887.

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

Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME. Enamel erosion in dietary acids: inhibition by food proteins in vitro. *Caries Res.* 2010;44(6):525–30. doi: 10.1159/000320984.

Herkströter FM, Witjes M, Ruben J, Arends J. Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentine compared with human enamel. *Caries Res.* 1989;23(5):342-4. doi: 10.1159/000261203.

Hooper S, Hughes J, Parker D, Finke M, Newcombe RG, Addy M, et al. A clinical study in situ to assess the effect of a food approved polymer on the erosion potential of drinks. *J Dent.* 2007;35(6):541–6. doi: 10.1016/j.jdent.2007.03.001.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:230-43. doi: 10.1159/000360555. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24993271.

Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin mg1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res.* 2016;76(3):734–43. doi: 10.1177/00220345970760030501.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral*

Sci. 2014;25:55–73. doi: 10.1159/000360973.

Jager DHJ, Vieira AM, Ligtenberg AJM, Bronkhorst E, Huysmans MCDNJM, Vissink A. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res.* 2011;45(6):532–7. doi: 10.1159/000331938. PMID: 21997255.

Jarvinen VK, Rytomaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991;70(6):942–7. doi: 10.1177/00220345910700060601.

Joiner A, Elofsson UM, Arnebrant T. Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(4):337–42. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00364.x.

Kanzow P, Wegehaupt FJ, Attin T, Wiegand A. Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence Int (Berl).* 2016;47(4):275–8. doi: 10.3290/J.QI.A35625.

Kensche A, Buschbeck E, König B, Koch M, Kirsch J, Hannig C, et al. Effect of fluoride mouthrinses and stannous ions on the erosion protective properties of the in situ pellicle. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-019-41736-7. PMID: 30926846.

Kensche A, Kirsch J, Mintert S, Enders F, Pötschke S, Basche S, et al. Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. *Sci Rep.* 2017 Nov 29;7(1):16584. doi: 10.1038/s41598-017-16677-8. PMID: 29185495; PMCID: PMC5707358.

Kleter GA, Damen JJM, Everts V, Niehof J, Cate JM Ten. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 2016;73(9):1523–9. doi: 10.1177/00220345940730090701.

Körner P, Inauen DS, Attin T, Wegehaupt FJ. Erosive/abrasive enamel wear while using a combination of anti-erosive toothbrush/-paste. *Oral Heal Prev Dent.* 2020;18(1):53–60. doi: 10.3290/j.ohpd.a43352.

Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *Plos One.* 2013;8(7):e67919. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0067919.

Leinonen J, Kivelä J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme vi is located in the human enamel pellicle. *Caries Res.* 1999;33(3):185–90. doi: 10.1159/000016515. PMID: 10207193.

Lenaerts VM, Gurny R. Bioadhesive drug delivery systems. 1. ed. Florida: CRC Press; 1989.

Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967;38(6):610–6. doi: 10.1902/jop.1967.38.6.610.

Lussi A, Bossen A, Hoschele C, Beyeler B, Megert B, Meier C, et al. Effects of enamel abrasion, salivary pellicle, and measurement angle on the optical assessment of dental erosion. *J Biomed Opt.* 2012;17(9):097009. doi: 10.1117/1.JBO.17.9.097009.

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

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:1–15. doi: 10.1159/000360380. PMID: 24993253.

Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and causal preventive measures. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:220–9. doi: 10.1159/000360612.

Lussi A, Jaeggi T. Chemical factors. *Dent Eros.* 2006;20:77–87. doi: 10.1159/000093353. PMID: 16687886.

Lussi A, Megert B, Shellis RP, Wang X. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *Br J Nutr.* 2012b;107(2):252–62. doi: 10.1017/S0007114511002820.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion - an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45(1):2–12. doi: 10.1159/000325915. PMID: 21625128.

Habib M, Chew HP. Methods of assessment of early dentine erosion: a review. *J Pak Med Assoc.* 2019;69(10):1509–13. PMID: 31622307.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:158-170. doi: 10.1159/000325167. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21701198.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):75–86. doi: 10.1590/s1678-77572009000200002. PMID: 19274390.

Manarelli MM, Vieira AEM, Matheus AA, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. *Caries Res.* 2011;45(6):506–9. doi: 10.1159/000331929.

Martini T, Rios D, Dionizio A, Cassiano LPS, Taioqui PV, Silva CMS, et al. Salivary hemoglobin protects against erosive tooth wear in gastric reflux patients. *Caries Res.* 2020;54(5–6):466–74. doi: 10.1159/000507110.

Matsumoto M, Miyake T, Noshi H, Kambara M, Konishi K. Zeta potential studies on the adsorption of proteins on a synthetic hydroxyapatite. *Colloids Surf.* 1989;40:77–84. doi: 10.1016/0166-6622(89)80008-3.

Mehta SB, Loomans BAC, Banerji S, Bronkhorst EM, Bartlett D. An investigation into the impact of tooth wear on the oral health related quality of life amongst adult dental patients in the United Kingdom, Malta and Australia. *J Dent.* 2020;99:103409. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103409. PMID: 32533998.

Meurman J, Frank R. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1991;25(1):1–6. doi: 10.1159/000261335.

Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, et al. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. *Caries Res.* 2014;48(1):57–62. doi: 10.1159/000352042.

Moretto MJ, Magalhães AC, Sassaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res.* 2010;44(2):135–40. doi: 10.1159/000302902.

Nehme M, Jeffery P, Mason S, Lippert F, Zero DT, Hara AT. Erosion remineralization efficacy of gel-to-foam fluoride toothpastes in situ: a randomized clinical trial. *Caries Res.* 2016;50:62–70. doi: 10.1159/000443187.

Nehme M, Parkinson CR, Zero DT, Hara AT. Randomised study of the effects of fluoride and time on in situ remineralisation of acid-softened enamel. *Clin Oral Investig.* 2019;23(12):4455–63. doi: 10.1007/s00784-019-02900-5. PMID: 30997568.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 2003;37(3):225–31. doi: 10.1159/000070449.

Neumüller O-A, Römpf H, Ühlein E. *Römpps chemie-lexikon*. 7. ed. Califórnia: Franckh; 1973.

Nielsen B V, Nevell TG, Barbu E, Smith JR, Rees GD, Tsibouklis J. Multifunctional poly(alkyl methacrylate) films for dental care. *Biomed Mater.* 2011;6(1):015003. doi: 10.1088/1748-6041/6/1/015003.

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;105:103567. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103567.

Nikiforuk G. *Understanding dental caries: etiology and mechanisms. Basic and clinical aspects*. 1. ed. Toronto: Karger; 1985. doi 10.1159/isbn.978-3-318-05263-3.

Pelá VT, Buzalaf MAR, Niemeyer SH, Baumann T, Silva FH, Toyama D, et al. Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface. *J Dent.* 2021;107:103612. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103612.

Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF precipitation and

microstructure. *Caries Res.* 2001;35(1):45–51. doi: 10.1159/000049110.

Pini NIP, Lima DANL, Luka B, Ganss C, Schlueter N. Viscosity of chitosan impacts the efficacy of F/Sn containing toothpastes against erosive/abrasive wear in enamel. *J Dent.* 2020;92:103247. doi: 10.1016/J.JDENT.2019.103247.

Phosphor Colorimetric Assay Kit [bula]. Belo Horizonte: Bioclin. 2020b. 6p.

Reich M, Kümmerer K, Al-Ahmad A, Hannig C. Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): an in-situ study. *Lipids.* 2013;48(9):929–37. doi: 10.1007/S11745-013-3822-2.

Sakae LO, Niemeyer SH, Bezerra SJC, Borges AB, Turssi CP, Scaramucci T. The addition of propylene glycol alginate to a fluoride solution to control enamel wear: an in situ study. *Caries Res.* 2020;54(5):517–23. doi: 10.1159/000511261. PMID: 33176315.

Salas MMS, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: An epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent.* 2015;43(1):42–50. doi: 10.1016/j.jdent.2014.10.012. PMID: 25446243.

Sälzer S, Slot D, Dörfer C, Weijden GV. Comparison of triclosan and stannous fluoride dentifrices on parameters of gingival inflammation and plaque scores: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg.* 2015;13(1):1–17. doi: 10.1111/idh.12072.

Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Zero DT, Aoki IV, Hara AT. Anti-erosive properties of solutions containing fluoride and different film-forming agents. *J Dent.* 2015;43(4):458–65. doi: 10.1016/j.jdent.2015.01.007.

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

Scaramucci T, Sobral MAP, Eckert GJ, Zero DT, Hara AT. In situ evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives. *Caries Res.* 2012;46(1):55–61. doi: 10.1159/000335572.

Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. Terminology of erosive tooth wear: consensus report of a workshop organized by the orca and the cariology research group of the iadr. *Caries Res.* 2020;54(1):2–6. doi: 10.1159/000503308.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45(1):13–23. doi: 10.1159/000326819. PMID: 21625129.

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):294–9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.02.003.

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

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? *Adv Dent Res.* 2012;24(2):68–71. doi: 10.1177/0022034512449836. PMID: 22899683.

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. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.167. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29495027.

Schlueter N, Lussi A, Tolle A, Ganss C. Effects of erosion protocol design on erosion/abrasion study outcome and on active agent (NaF and SnF) efficacy. *Caries Res.* 2016;50(2):170–9. doi: 10.1159/000445169.

Shellis RP, Barbour ME, Jesani A, Lussi A. Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. *Caries Res.* 2013;47(6):601–11. doi: 10.1159/000351641. PMID: 24061229.

Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. Erosive tooth wear from diagnosis to ther. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163–79. doi: 10.1159/000359943.

Smith B, Knight J. An index for measuring the wear of teeth. *Br Dent J.* 1984;156:435–8.

Stephen K, McCrossan J, Mackenzie D, Macfarlane C, Speirs C. Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;9(1):51–5. doi: 10.1111/J.1365-2125.1980.TB04796.X.

Taira EA, Ferrari CR, Carvalho G, Ventura TMO, Martini T, Dionizio AS, et al. Rinsing with statherin-derived peptide alters the proteome of the acquired enamel pellicle. *Caries Res.* 2021;55(4):333–40. doi: 10.1159/000517959. PMID: 34344000.

Villanova JCO, Oréfice RL, Cunha AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polimer.* 2010;20(1):51–64. doi: 10.1590/S0104-14282010005000009.

Weber M-T, Hannig M, Pötschke S, Höhne F, Hannig C. Application of plant extracts for the prevention of dental erosion: an *in situ/in vitro* study. *Caries Res.* 2015;49(5):477–87. doi: 10.1159/000431294.

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;70(3):177–83. doi: 10.3109/00016357.2011.600713.

White AJ, Gracia LH, Barbour ME. Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. *Caries Res.* 2011;45(1):13–20. doi: 10.1159/000322300. PMID: 21160185.

Whitehead SA, Shearer AC, Watts DC, Wilson NHF. Comparison of two stylus methods for measuring surface texture. *Dent Mater.* 1999;15(2):79–86. doi: 10.1016/S0109-5641(99)00017-2.

Wiegand A, Rosemann A, Hoch M, Barke S, Dakna M, Kanzow P. Erosion-Protective capacity of the salivary pellicle of female and male subjects is not different. *Caries Res.* 2019;53(6):636–42. doi: 10.1159/000500046.

Wiegand A, Wegehaupt F, Werner C, Attin T. Susceptibility of acid-softened enamel to mechanical wear – ultrasonication versus toothbrushing abrasion. *Caries Res.* 2007;41(1):56–60. doi: 10.1159/000096106. PMID: 17167260.

Young A, Smistad G, Karlsen J, Rølla G, Rykke M. Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):560-565. doi: 10.1177/08959374970110042501.

Zaman MA, Martin GP, Rees GD. Bioadhesion and retention of non-aqueous delivery systems in a dental hard tissue model. *J Dent.* 2010;38(9):757–64. doi: 10.1016/j.jdent.2010.06.005.

Zanatta RF, Bresciani E, Hara A, Borges AB. *Odontopediatria, o estado atual da arte, educação diagnóstico e intervenção estético funcional*. 1. ed. São Paulo: Editora Quintessence; 2018.

APÊNDICE A – CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials)



Lista de informações CONSORT 2010

Seção/Tópico	Item nº	Itens da Lista	Relatado na pg nº
Título e Resumo	1a	Identificar no título como um estudo clínico randomizado	1
	1b	Resumo estruturado de um desenho de estudo, métodos, resultados e conclusões para orientação específica, consulte CONSORT para resumos	8
Introdução			
Fundamentação e objetivos	2a	Fundamentação científica e explicação do raciocínio	18
	2b	Objetivos específicos ou hipóteses	39
Métodos			
Desenho do estudo	3a	Descrição do estudo clínico (como paralelo, factorial) incluindo a taxa de alocação	40
	3b	Alterações importantes nos métodos após ter iniciado o estudo clínico (como critérios de elegibilidade), com as razões	-
Participantes	4a	Critérios de elegibilidade para participantes	40
	4b	Informações e locais de onde foram coletados os dados	40
Intervenções	5	As intervenções de cada grupo com detalhes suficientes que permitam a replicação, incluindo como e quando eles foram realmente administrados	41
Desfechos	6a	Medidas completamente pré-especificadas definidas de desfechos primários e secundários, incluindo como e quando elas foram avaliadas	53
	6b	Quaisquer alterações nos desfechos após o estudo clínico ter sido iniciado, com as razões	-
Tamanho da amostra	7a	Como foi determinado o tamanho da amostra	40
	7b	Quando aplicável, deve haver uma explicação de qualquer análise de interim e diretrizes de encerramento	-
Randomização: Sequência geração	8a	Método utilizado para geração de sequência randomizada de alocação	40
	8b	Tipos de randomização, detalhes de qualquer restrição (tais como randomização por blocos e tamanho do bloco)	40
Alocação Mecanismo de ocultação	9	Mecanismo utilizado para implementar a sequência de alocação randomizada (como recipients numerados seqüencialmente), descrevendo os passos seguidos para a ocultação da sequência até as intervenções serem atribuídas	40 e 41
Implementação	10	Quem gerou a sequência de alocação randomizada, quem inscreveu os participantes e quem atribuiu as intervenções aos participantes	40
Cegamento	11a	Se realizado, quem foi cegado após as intervenções serem atribuídas (ex. Participantes, cuidadores, assessores de resultado) e como	41
	11b	Se relevante, descrever a semelhança das intervenções	-
Métodos estatísticos	12a	Métodos estatísticos utilizados para comparar os grupos para desfechos primários e secundários	53
	12b	Métodos para análises adicionais, como análises de subgrupo e análises ajustadas	53

Resultados			
Fluxo de participantes	13a	Para cada grupo, o número de participantes que foram randomicamente atribuídos, que receberam o tratamento pretendido e que foram analisados para o desfecho primário	55
	13b	Para cada grupo, perdas e exclusões após a randomização, junto com as razões	-
Recrutamento	14a	Definição das datas de recrutamento e períodos de acompanhamento	84
	14b	Dizer os motivos de o estudo ter sido finalizado ou interrompido	-
Dados de Base	15	Tabela apresentando os dados de base demográficos e características clínicas de cada grupo	-
Números analisados	16	Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluídos em cada análise e se a análise foi realizada pela atribuição original dos grupos	37 e 55
Desfechos e estimativa	17a	Para cada desfecho primário e secundário, resultados de cada grupo e o tamanho efetivo estimado e sua precisão (como intervalo de confiança de 95%)	56
	17b	Para desfechos binários, é recomendada a apresentação de ambos os tamanhos de efeito, absolutos e relativos	-
Análises auxiliares	18	Resultados de quaisquer análises realizadas, incluindo análises de subgrupos e análises ajustadas, distinguindo-se as pré-especificadas das exploratórias	-
Danos	19	Todos os importantes danos ou efeitos indesejados em cada grupo (observar a orientação específica CONSORT para danos)	84
Discussão			
Limitações	20	Limitações do estudo clínico, abordando as fontes dos potenciais vieses, imprecisão, e, se relevante, relevância das análises	60
Generalização	21	Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados do estudo clínico	60
Interpretação	22	Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	60
Outras informações			
Registro	23	Número de inscrição e nome do estudo clínico registrado	86
Protocolo	24	Onde o protocolo completo do estudo clínico pode ser acessado, se disponível	86
Fomento	25	Fontes de financiamento e outros apoios (como abastecimento de drogas), papel dos financiadores	7

APÊNDICE B - Informação ao Voluntário



RECOMENDAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- Você está participando de uma pesquisa sobre o potencial antierosivo de diferentes soluções, considerando-se a ação da saliva humana em um modelo de estudo in situ. Os dados serão obtidos por meio da microbiópsia do esmalte e dentina bovinos dos espécimes inseridos em um dispositivo intraoral e será possível investigar quantitativamente o conteúdo mineral (cálcio e fosfato) da superfície do esmalte e dentina, a fim de se verificar se as soluções a serem testadas conseguem reduzir a desmineralização do esmalte causada pelos diferentes desafios erosivos presentes na rotina diária.
- O procedimento será realizado no período matutino levando em consideração a influência do ciclo circadiano no fluxo e composição saliva.
- Você será treinado com relação aos procedimentos de higiene bucal para que haja padronização da escovação dental entre os participantes da pesquisa.
- No dia do procedimento, você deverá se ALIMENTAR e REALIZAR A HIGIENE BUCAL NORMALMENTE após deverá procurar a clínica da Pós-Graduação da Disciplina de Dentística do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.
- Sua colaboração é extremamente importante para este estudo.

Agradecemos muito a sua colaboração!

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-EROSIVO DE SOLUÇÕES CONTENDO O AMINOMETACRILATO: Estudo in situ cruzado randomizado, que possui como pesquisador responsável a Profa. Adj. Alessandra Bühler Borges, do Departamento de Dentística do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos. Antes de concordar em participar desse estudo, é importante que você leia com atenção esse formulário. Ele descreve os objetivos, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo. As informações contidas neste formulário têm objetivo de firmar acordo escrito mediante o qual você (o voluntário) autoriza a sua participação na pesquisa, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre-arbítrio e sem qualquer coação.

Contexto e objetivos da pesquisa

O maior tempo de permanência dos dentes na cavidade bucal associado ao consumo crescente de bebidas e alimentos ácidos propiciaram um aumento na prevalência de desgaste erosivo (processo químico-mecânico que resulta em uma perda cumulativa de tecido dental duro, não causado por bactérias) nas últimas décadas, especialmente na população jovem. Os casos mais severos podem levar à dor, além do comprometimento da função e estética dos dentes.

Para prevenir a erosão dental, diversas estratégias têm sido adotadas, incluindo a utilização e aplicação regular de produtos contendo fluoretos e polímeros, que irão atuar como uma camada superficial protetora sobre os dentes durante o desafio ácido, evitando temporariamente a dissolução do tecido.

O uso de polímeros bioadesivos tem sido investigado como potencial agente protetor contra a erosão dental. Este trabalho propõe a mensurar o potencial antierosivo de diferentes soluções contendo ou não o polímero Aminometacrilato associado a soluções fluoretadas sobre o esmalte dental bovino dos espécimes inseridos no dispositivo intraoral utilizado pelos voluntários. O efeito protetor frente a desafios erosivos será medido por meio da análise da concentração de cálcio e fósforo, bem como da microdureza do esmalte bovino após o uso do dispositivo intraoral pelos participantes.

Justificativa

Diante da necessidade de se proteger as estruturas dentais frente a desafios erosivos e tendo em vista os resultados promissores obtidos com polímeros formadores de filme, em especial o Aminometacrilato em combinação com fluoreto, torna-se oportuno testá-los em uma condição clínica mais relevante, com a presença de saliva e da película adquirida.

Tipo de pesquisa e intervenção

O trabalho propõe mensurar o potencial antierosivo de soluções fluoretadas isoladas ou associadas ao polímero Aminometacrilato aplicadas sobre o esmalte e dentina dental bovino, na presença da película adquirida, frente a desafios erosivos por agentes intrínsecos (ácido clorídrico) por meio de um estudo in situ. Para isso, os voluntários selecionados utilizarão um dispositivo palatal removível contendo espécimes de esmalte e dentina bovino polido, que posteriormente serão extraídos oralmente analisados quanto a concentração de cálcio e fósforo, mensurado por meio da microbiópsia e espectroscopia.

Seleção dos voluntários

Estamos convidando pacientes adultos com uma boa saúde geral; que não apresente sinais de desgaste erosivo, cárie ativa ou doença periodontal; e que não façam uso de aparelhos ortodônticos ou próteses removíveis; que não sejam fumantes, dependentes químicos, ou com gravidez ou intenção de engravidar durante o período do estudo.

Descrição das soluções

Todas as soluções mostraram eficácia em estudos laboratoriais prévios e já vêm sendo utilizadas em enxaguatórios bucais e medicamentos, mostrando-se seguras. Dentre os compostos presentes nas diferentes soluções temos o polímero Aminometacrilato com concentração de 2%, que é um copolímero do polimetacrilato frequentemente utilizado em fármacos. Testaremos também compostos de Fluoreto de Sódio (NaF) com concentração de 225 ppm F⁻, que podem estar ou não combinados com o Cloreto Estanhoso (SnCl₂) com concentração de 800 ppm Sn⁺², comumente empregados em produtos de higiene bucal. O controle será composto por bochecho com água deionizada.



Procedimentos

A. Procedimentos prévios

O recrutamento de voluntários para o estudo será realizado na clínica do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT/SJC Unesp. Na primeira visita, você receberá instruções verbais sobre o estudo, incluindo todos os procedimentos nele envolvidos. Em seguida, preencheremos um formulário contendo sua história médica e realizaremos um exame clínico para a determinar como estão suas condições orais. Após esse procedimento, realizaremos um teste do fluxo salivar não-estimulado e estimulado. Além disso, será realizada a moldagem de sua arcada superior para confecção do dispositivo intraoral em que as amostras de dentes bovinos esterilizadas a serem analisadas, serão inseridas. Em uma segunda visita, será realizada uma profilaxia profissional e raspagem supragengival (se necessário), seguidas do treinamento dos procedimentos. Os pesquisadores acompanharão você cuidadosamente durante todo o estudo. Se você tiver qualquer dúvida ou dificuldade durante o estudo, você deve nos informar o mais rápido possível.

B. Descrição do procedimento

Você precisará comparecer à clínica do Departamento de Odontologia Restauradora para nove visitas, sendo as duas primeiras para realização dos procedimentos prévios descritos anteriormente. Já no dia, deverá realizar a alimentação pela manhã, seguida da escovação. Na sequência, deverá comparecer à clínica do Departamento de Odontologia Restauradora do ICT-SJC Unesp, instalar o dispositivo no palato e aguardar 5 minutos para formação inicial da película adquirida e então realizar bochecho por 1 minuto com 5 ml da solução de tratamento determinada pela alocação aleatória. Os grupos de tratamento serão determinados conforme a solução teste designada. Após o tratamento, o voluntário deverá aguardar 30 minutos sem ingerir alimentos. Decorrido o tempo, será realizada a exposição extraoral dos espécimes ao ácido clorídrico a 0,03%, pH 2,3, sob agitação por 3 minutos, a fim de se evitar o contato dos dentes naturais do voluntário com a solução ácida. Os passos descritos serão repetidos cinco vezes, caracterizando a ciclagem erosiva.

Em cada uma das sete fases do estudo, serão realizados os mesmos procedimentos experimentais citados acima, com um intervalo mínimo de dois dias. Ao final de cada fase do estudo será realizada a microbiópsia de esmalte e dentina dos espécimes.

Duração

O estudo total será realizado por um ano, sendo que sua participação terá duração de cerca de 1 mês.

Efeitos adversos

Não são esperados efeitos adversos relevantes devido ao uso único dos produtos testados. Pode haver, no entanto, a percepção de sabor metálico na boca durante o uso de algumas soluções.

Benefícios

Os resultados desta pesquisa contribuirão para melhorar o conhecimento nesta área da Ciência. Clinicamente, pacientes com desgaste podem ser beneficiados com os avanços da pesquisa. Os participantes envolvidos podem se beneficiar por receberem exame intraoral, profilaxia dental e raspagem de cálculo supragengival, se necessário, no início do estudo.

Forma de acompanhamento e assistência

Todos os procedimentos serão acompanhados pelas pesquisadoras. Além disso, elas oferecerão toda a assistência necessária durante a pesquisa.

Garantia de Sigilo da identidade do sujeito da pesquisa:

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. As informações fornecidas e o material que indique a sua participação serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Nada será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no prontuário do participante, uma ficará de posse do pesquisador e uma terceira cópia será entregue a você.



Garantia de esclarecimentos, Liberdade de Recusa

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. A sua participação é voluntária e você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem prejuízos.

Custos da Participação, Ressarcimento ou indenização

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Contato

Se você tiver alguma dúvida, você pode nos perguntar agora ou mais tarde, até mesmo depois que o estudo tenha iniciado. Caso você queira perguntar alguma coisa mais tarde, você pode entrar em contato:

- Taiana Paola Prado

Telefone: (45) 999959046

E-mail: taiana.prado@unesp.br

- Professora Adjunta Alessandra Bühler Borges

Telefone: (12) 3947-9000.

E-mail: alessandra@ict.unesp.br

Se você tiver qualquer dúvida sobre questões éticas da pesquisa, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPh) do Instituto de Ciência e Tecnologia - São José dos Campos (Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777 – CEP: 12245-000 São José dos Campos – SP, Brasil. Telefone: (12) 3947-9076) e comunique-se com a Coordenadora Denise Nicodemo.

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora, declaro que concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local – dia/mês/ano

Nome do participante

Assinatura

RG ou CPF

Nome do pesquisador

Assinatura

CRO/SP

ANEXO A — CAEE (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética)

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP

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

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-EROSIVO DE SOLUÇÕES CONTENDO O AMINOMETACRILATO: Estudo In Situ Cruzado Randomizado

Pesquisador: Alessandra Buhler Borges

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43571021.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.589.533

Apresentação do Projeto:

Por se mostrar altamente promissor em testes in vitro, torna-se importante dar continuidade aos estudos que envolvem o aminometacrilato sob um contexto clinicamente relevante, em que a ação da saliva ocorre em condições reais, considerando-se o fluxo salivar, capacidade de limpeza, conteúdo mineral, formação da película bem como a retenção do flúor nos tecidos moles.

Frente a isso, a investigação do efeito antierosivo da película associada às soluções de tratamento contendo polímeros e fluoretos pode nos fornecer subsídios que permitirão novas perspectivas para a escolha das associações mais promissoras para testes de eficácia adicionais, visando o desenvolvimento de formulações capazes de prevenir o desenvolvimento da erosão dental seja por condições extrínsecas (ácido cítrico) ou intrínsecas (ácido clorídrico).

Objetivo da Pesquisa:

O trabalho propõe a avaliar o potencial antierosivo de soluções fluoretadas isoladas ou associadas ao AMC (Aminometacrilato) aplicadas sobre o esmalte dental bovino, na presença da película adquirida, frente a desafios erosivos por agentes intrínsecos (ácido clorídrico) e extrínsecos (ácido cítrico), utilizando um estudo randomizado cruzado triplo cego de modelo in situ, por meio da mensuração da concentração de cálcio, fósforo e microdureza de superfície do esmalte dental.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP**



Continuação do Parecer: 4.589.533

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não são esperados efeitos adversos relevantes com o uso das soluções a serem testadas, uma vez que os componentes ativos são amplamente utilizados em produtos odontológicos e medicamentos de uso oral. Pode haver, no entanto, eventualmente a percepção de sabor metálico na boca durante o uso das soluções avaliadas. Os espécimes em dentes bovinos serão esterilizados antes de serem inseridos no dispositivo intra-oral e os voluntários não serão expostos às soluções ácidas utilizadas no experimento, pois esta fase será conduzida extra-oralmente.

Benefícios:

Os resultados desta pesquisa contribuirão para melhorar o conhecimento nesta área da Ciência. Clinicamente, pacientes com desgaste podem ser beneficiados com os avanços da pesquisa. Os participantes envolvidos podem se beneficiar por receberem exame intraoral, profilaxia dental e raspagem de cálculo supragengival, se necessário, no início do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa é de excelência e muito contribuirá no estudo para evolução de enxaguantes bucais com função antierosiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores obedeceram as normas do CONEP na apresentação dos Termos.

Recomendações:

Recomenda-se 1) atenção no cronograma exposto em Informações Básicas que está divergente do apresentado no Projeto; 2) revisão do quadro "Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro" em Informações Básicas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicita-se que os autores atentem às recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPUS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP**



Continuação do Parecer: 4.589.533

Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1654833.pdf	22/02/2021 18:23:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	22/02/2021 18:22:44	Alessandra Buhler Borges	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_plataforma_brasil.docx	22/02/2021 18:22:22	Alessandra Buhler Borges	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	22/02/2021 00:36:34	Alessandra Buhler Borges	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 13 de Março de 2021

**Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))**

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br