



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**Núbia Inocência Pavesi Pini**

***Efeito de agentes anti-erosivos: estudo in situ  
analisando condições normais e de hipossalivação e  
estudo in vitro variando a viscosidade de um composto  
experimental***

***Effect of anti-erosive agents: in situ study under normal  
and hiposalivatory conditions and in vitro study changing  
the viscosity of an experimental compound***

**PIRACICABA  
2016**

**NÚBIA INOCÊNCYA PAVESI PINI**

***AVALIAÇÃO DE AGENTES ANTI-EROSIVOS: ESTUDO IN SITU ANALISANDO  
CONDIÇÕES NORMAIS E DE HIPOSALIVAÇÃO E ESTUDO IN VITRO  
VARIANDO A VISCOSIDADE DE UM AGENTE EXPERIMENTAL***

***EVALUATION OF ANTI-EROSIVE AGENTS: IN SITU STUDY UNDER NORMAL  
AND HIPOSALIVATORY CONDITIONS AND IN VITRO STUDY CHANGING THE  
VISCOSITY OF AN EXPERIMENTAL COMPOUND***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas comoparte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Clínica Ondontológica, na Área de Dentística.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinical Dentistry, in Restorative Denstistry Area.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Alves Nunes Leite Lima**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE DOUTORADO DEFENDIDA PELA ALUNA NÚBIA INOCÊNCYA PAVESI PINI, ORIENTADA PELA PROFa. DRa. Débora Alves Nunes Leite Lima.

PIRACICABA  
2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

P655e Pini, Núbia Inocência Pavesi, 1987-  
Efeito de agentes anti-erosivos : estudo *in situ* analisando condições normais e de hipossalivação e estudo *in vitro* variando a viscosidade de um composto experimental / Núbia Inocência Pavesi Pini. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Debora Alves Nunes Leite Lima.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Erosão dentária. 2. Esmalte. 3. Quitosana. I. Lima, Debora Alves Nunes Leite, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Effect of anti-erosive agents : *in situ* study under normal and hyposalivatory conditions and *in vitro* study changing the viscosity of an experimental compound

**Palavras-chave em inglês:**

Tooth erosion

Enamel

Chitosan

**Área de concentração:** Dentística

**Titulação:** Doutora em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Debora Alves Nunes Leite Lima [Orientador]

Flávio Henrique Baggio Aguiar

Renata Corrêa Pascotto

Diogo de Azevêdo Miranda

Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo

**Data de defesa:** 04-02-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 04 de Fevereiro de 2016, considerou a candidata NÚBIA INOCÊNCYA PAVESI PINI aprovada.

PROFª. DRª. DEBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

PROFª. DRª. RENATA CORRÊA PASCOTTO

PROF. DR. DIOGO DE AZEVEDO MIRANDA

PROF. DR. LUIS ALEXANDRE MAFFEI SARTINI PAULILLO

PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## *Dedicatória*

À minha mãe, **Gleide Pavesi Pini**, que com toda sua simplicidade faz com que os meus sonhos sejam sempre grandiosos... e com todo seu amor faz com que eles sejam reais! Obrigada pelo seu exemplo, pela sua presença constante em minha vida e por me amparar sempre que preciso, acreditando em mim mais do que ninguém!

Ao meu pai, **Ademar Pini** (*in memoriam*), pelo amor incondicional nos nossos 13 anos de convivência. Um amor indescritível que me inspira viver e seguir mesmo na sua ausência, na ânsia de que um dia estaremos juntos novamente.

*“Was immer Du tun kannst oder träumst es zu können,  
fang damit an.”*

*Johann Wolfgang von Goethe*

# *Agradecimentos*

## *A Deus...*

...pelos privilégios a mim oportunizados em todos os sentidos, tanto nas pessoas que compartilham a minha vida quanto nos caminhos traçados até aqui.

## *A minha família*

Aos meus irmãos, por sonhar e viver os meus sonhos!... Por me fortalecer nos momentos de fraqueza, por apoiarem e guiarem todos os meus passos. Tudo o que vivi e o pouco que conquistei foi possível graças ao amor e companheirismo de vocês. Ao meu irmão **Marlon Pini**, por me amparar como irmão, pai e amigo. A minha irmã, **Indianara Pini**, por ser meu esteio em todos os momentos da minha vida, nos felizes e nos mais difíceis, os quais sempre superamos juntas. A vocês toda a minha admiração, meu amor e meu MUITO OBRIGADA!

Aos meus avós, Eunice, Nair, José e Lino, por sempre me honrarem com o seu amor, que hoje é muita saudade... por serem grandes exemplos em minha vida. Em especial ao meu avô **Lino Pavesi**, que além de vô, dedicou a mim o seu amor de pai, de uma forma pura e sincera; e a minha vó **Eunice Pavesi**, por dedicar a sua vida a nossa família e nos amar incondicionalmente, sendo presença constante em nossas vidas, dando mais sentido a ela.

Aos irmãos que a vida me deu, meus cunhados **Edilene Mangolin Pini** e **José Anunciato Sonni**. Obrigada por me aceitarem como irmã e dedicarem todo o seu amor e carinho a mim em todos os momentos que partilhamos. Obrigada por fazerem a minha família melhor!

As minhas sobrinhas, **Julia e Geovana**, pela leveza e sentido que dão a minha vida pelo simples fato de existirem. Á minha afilhada **Bianca**, o melhor presente que eu poderia ter recebido. Vocês ainda são pequenas mas me fazem enorme por poder viver esse amor imensurável e indescritível!

A todos que, com laços de sangue, de muito carinho e amor, eu sei que torcem e vibram por mais esse passo dado na minha jornada!

## *Aos meus amigos*

A todos os meus amigos que, de uma forma ou outra, estão presentes em minha vida e transformam-na com a sua amizade.

Aos meus amigos da graduação - **Odontologia UEM 2006-2010** - que me acompanham desde o início nessa jornada acadêmica.

...Em especial às minhas amigas **Christine Martins** e **Mariana Nagata**, que em todos esses anos estiveram presentes na minha caminhada, torcendo, apoiando e vibrando a cada passo meu. Sempre dizemos o quanto a nossa amizade é um presente, isso porque reunimos os melhores sentimentos que podemos ter umas as outras, sempre com companheirismo, cumplicidade e muito carinho. Vocês me fizeram muita falta esses anos, mas sabemos que a distância só fortalece nossos laços de amizade que com certeza serão para sempre!

Aos meus amigos da **pós-graduação**, Mestrado e Doutorado, pelo companheirismo durante essa jornada de 5 anos.

...A todos os amigos de turma que, além de partilharem sua jornada com a minha, sempre me ofereceram vontade e disposição para que eu realizasse a minha pesquisa, sendo voluntários dos estudos realizados com o único propósito de me ajudar e enriquecer o meu trabalho.

...Em especial a minha amiga **Thatiana de Vicente Leite**, um presente que a FOP me oportunizou e que com certeza será para a vida toda. Obrigada pelo seu carinho ímpar comigo, pela nossa tão saudável convivência diária e pela cumplicidade que isso nos proporcionou em uma amizade sincera, única e pura! Você é com certeza uma das pessoas mais especiais e diferenciadas da minha vida... e sempre só terei a agradecer por essa amizade que pretendo cultivar para sempre!

...Ao **Daniel Sundfeld** pela parceria e companheirismo nos trabalhos, nas pesquisas e nos ideais, somando muito a minha vivência durante todos esses anos.

...Ao **Waldemir Vieira** pela amizade incansável para comigo e pela parceria incrível durante o meu doutorado, em todos os sentidos! Obrigada por esses anos, por abraçar a minha causa e me ajudar para que, além de um bom trabalho, eu tivesse um amigo singular! Eu admiro muito você!... com sua simplicidade, honestidade, tamanho conhecimento e esforço, me sinto honrada em, ao final dessa jornada, tê-lo como um dos meus melhores amigos!

...A **Jéssica Theobaldo**, pela energia única, por toda a ajuda e disposição nos últimos tempos, que com muito carinho e companheirismo resultou em uma grande amizade!

..As amigas **Cristiane, Mari, Michele, Suelem e Thayla**, pela amizade, pelo carinho e por sempre fazer a nossa jornada de trabalho mais prazerosa pelas pessoas incríveis que são!

...Aos meus amigos veteranos da pós-graduação, **Anderson Catelan, Diogo Miranda e Livia Aguilera**, pela receptividade, pela torcida e por me prestigiarem com seus grandes exemplos e sua amizade!

As minhas amigas **Juliana Nagata e Tereza Pedroza** pelo carinho e confiança por mim, mesmo em circunstâncias tão distantes!

As minhas amigas dos outros corredores da FOP que me abraçaram nesses anos e me presentearam com esse círculo de amizade único que me fez tão feliz! **Beatriz Porto, Caroline Odo, Carolina Ventura, Cindy Goes, Izabella Pereira, Larissa Rezende, Mabelle Monteiro, Pamela Saporski e Thatiana de Vicente Leite**... vocês fizeram esses anos muito mais fáceis, pois sempre em cada canto da faculdade eu sabia que encontraria uma de vocês para melhorar o meu dia, em qualquer circunstância!

Aos amigos ("**Rep. End**" e "**Acapulco**") que não só me receberam nessa casa, mas me fizeram sentir de fato como parte dela... e, ainda, me proporcionaram momentos inesquecíveis em que, em muitos, eu aprendi o quão importante é ter amigos!!!



Aos amigos conterrâneos mais que especiais que eu encontrei enquanto estava na Alemanha...

...a **Fernanda Hahn**, uma amiga incrível que a Alemanha me deu, que desde antes da minha viagem começou a me ajudar e, lá, fez de tudo para que eu aproveitasse ao máximo a minha experiência, me presenteando ainda com sua amizade que é, para mim, muito preciosa.

...A **Déborah Salomão, Carla Camargos, Christian Suarez, Laurício Pedrosa e Simone Backes**, que me integraram a sua “família de amigos brasileiros” e, em todos os momentos, me acolheram e me ampararam quando o maior desafio da minha vida era enfrentar a saudade. Vocês fizeram minha vida na Alemanha ser muito mais fácil, pois realmente me senti em uma família, compartilhando sentimentos muito especiais que podem ser transcrevidos em todos os momentos que partilhamos juntos. Espero realmente rever todos assim que possível, pois são pessoas únicas que abrilhantam a minha vida compondo esse tão especial capítulo da minha história!

## *A Faculdade de Odontologia de Piracicaba*

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba** da **Universidade de Campinas**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

À **Coordenadoria Geral da Pós-Graduação** da FOP/ÚNICAMP, em nome da Prof. Dra. Cinthia Correia Machado Tabchoury e da secretária Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, por toda atenção dispensada.

Ao **Coordenador de Pós-Graduação** em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, Prof. Dr. Karina Gonzales Silvério Ruiz.

A CAPES, pelo financiamento dos estudos realizados no Brasil e no exterior.

### **Aos professores...**

...A minha orientadora **Débora Alves Nunes Leite Lima** pela intensa convivência durante esses anos, por caminhar comigo permitindo e

impulsionando o meu crescimento. A senhora sempre foi o maior incentivo para que eu seguisse o caminho e chegasse ao final, que agora é também um início. Jamais esquecerei como fui recebida pela senhora na pós-graduação e como a senhora me orientou para que tudo acontecesse da melhor forma possível, como de fato foi! Obrigada pelo carinho, por todo o aprendizado e atenção a mim despendida!

...Ao professor **José Roberto Lovadino** por me receber e me integrar no programa, permitindo que eu tivesse o presente de ser orientada pela prof. Débora.

...Ao professor **Flávio Henrique Baggio Aguiar** pela parceria e por partilhar sua amizade, seus conselhos, conhecimento e sua vivência na prática docente.

...Aos demais professores da Área de Dentística, **Giselle Maria Marchi Baron, Luis Roberto Marcondes Martins e Marcelo Giannini**, pela convivência diária e pelo conhecimento transmitido.

...Ao professor **Alan Roger dos Santos Silva**, por abraçar a ideia do meu trabalho, me receber junto a sua equipe e proporcionar, além da execução da pesquisa, a convivência e o crescimento pessoal indescritível com os pacientes do Orocentro.

...Ao professor **Lourenço Correr Sobrinho** pelo apoio e suporte no laboratório para o uso dos equipamentos do laboratório da Área de Materiais Dentários.

...Aos professores da Área de Bioquímica, **Cinthia Tabchoury, Livia Tenuta e Jaime Cury**, por me receberem em seu laboratório e oportunizar todo o suporte para a realização do estudo.

#### **Aos alunos de graduação...**

...A todos os alunos de graduação por me propiciar o exercício da docência e assim, ampliar a minha prática, a minha convivência e a minha habilidade junto a esse caminho que escolhi. Aos alunos de iniciação científica, pela oportunidade de orientação nos trabalhos realizados.

#### **Aos funcionários...**

...A secretária da Área de Dentística, **Mônica Barnabé**. Obrigada pela prontidão e paciência durante esses anos! Obrigada por sempre ajudar nas

burocracias e pela convivência que oportunizou antes de qualquer coisa, a nossa amizade.

...Ao **Marcos Cangiani**, da Área de Materiais Dentários, ao **Marcelo Meneghin**, da Área de Odontopediatria, ao **Waldomiro Vieira Filho** e ao **José Alfredo da Silva**, da Área de Bioquímica, por sempre estarem dispostos a ajudar, ensinando com muita paciência e dedicação, facilitando, assim, o trabalho nos laboratórios.

...A toda a equipe do **Orocentro**, por acreditarem na minha pesquisa e me permitir trabalhar nesse ambiente tão rico de aprendizado e vivência pessoal.

...As funcionárias **Sandrinha, Vanessa e Magda**, que com sua alegria transformaram as minhas passagens pelos corredores da FOP.

### **Aos pacientes...**

...A todos os pacientes da faculdade que propiciaram o exercício da prática clínica e o aprimoramento do meu aprendizado.

..Aos pacientes do Orocentro, que, além de serem voluntários da minha pesquisa, são pessoas únicas que me enriqueceram com seus bons exemplos de coragem e superação, com seu carinho e com a dedicação a mim, com o único propósito de me ajudar participando da pesquisa.

## *Aos membros da banca*

### **Aos membros externos**

...A professora **Renata Corrêa Pascotto**, minha sempre orientadora que, no decorrer desses anos, nunca me esqueceu e sempre me oportunizou dividir com a senhora mais trabalhos e, com eles, muito aprendizado. Obrigada por sempre me receber como aluna, com muita dedicação e disposição. Ter a senhora como professora é uma honra, pois, por mais que o tempo passe, a senhora sempre continua como um exemplo a ser seguido e uma fonte de inspiração.

...Ao professor **Diogo de Azevedo Miranda** que antes de tudo, é um grande amigo. Obrigada por estar sempre perto de alguma maneira, torcendo pelas minhas conquistas e acompanhando meu caminho na pós-graduação.

...Ao professor, **Renato Sundfeld**, por aceitar o convite de compor essa banca, pois sua presença significa muito para mim. Obrigada pela convivência esses anos que, além de produção científica, proporcionou uma amizade e um carinho muito especial.

...A professora **Maria Beatriz Freitas D'arce** por aceitar o meu convite e dispensar o seu tempo para contribuir com o meu trabalho.

#### **Aos membros internos**

...Aos professores **Flávio Henrique Baggio Aguiar** e **Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo**, por aceitar e participar dessa banca de maneira tão pronta e entusiasmada. Obrigada por estarem presentes no encerramento desse ciclo, o qual durante todos esses anos, vocês atuaram compartilhando todo o seu conhecimento de maneira desmedida e assim, enriquecendo o meu aprendizado.

...Ao professor **Anderson Catelan**, uma pessoa com quem tive a oportunidade de conviver e aprender muito durante esses anos. Como amigo e um grande exemplo, você sempre contribuiu muito para a minha formação e me sinto honrada por hoje tê-lo na minha banca.

#### **Aos membros do exame de qualificação**

Aos professores **Américo Bortolazzo Correr**, **Anderson Catelan**, **Fernanda Miori Pascon** e **Lucia Trazzi Prieto**, por terem participado desse importante exame e me oportunizado muito conhecimento, o que com certeza me deixou melhor preparada para o exame de defesa.

## *To my experience in Germany*

To the **Justus-Liebig University – Giessen**, this important and renowned institution, that has received me and given me the chance to enrich myself in the culture and professional senses.

To the professor **Nadine Schlueter**, the person that made all of the things possible for me during this experience abroad. Thank you for trusting me even without know me or without any previous reference about my name. With this, you afforded the biggest dream of my life until now. You gave me the main chance to grow up, in all of the ways, providing to me the opportunity to be a better person and a better professional. With this chance, you make me trust in myself, because I realized that I am able to do things that I have never imagined that I could. Besides, thank you for receiving me and sharing with me your knowledge, your ideas and you experience. Thank you for helping me to write this wonderful chapter of the history of my life.

To the professor **Carolina Ganss** for endorsing my internship and, with this, supporting all of the opportunities that I have had during this time. Thank you for dedicating your time and your knowledge with my questions and in the discussions of our results.

To Mrs. **Birgit Meier**, my “German Mon”. I have no words to better prove how thankful I am to you. I have a lot of words to explain how great and special it was for me to find a person like you. Many words that I could write a lot of pages to count all the things that you did for me. You have received me in your laboratory, in your house and in your life as a daughter and, since the beginning, you did your best to make me the most happy that I could during this time. You cared me in a too special manner that I will never forget. Thank you for providing that I lived and enjoyed this experience in all of senses, in my work, in my trips, in my German life... You supported me in all of the things and I am sure that without you, I would not able to enjoy my experience in the same way that I did. Thank you a lot for this beautiful friendship that I really want to keep for me entire life!

To my friends around the world that I was lucky to find during this experience. Thank you for sharing your friendship with me and make this period of my life better and unforgettable...

...To my German friends: Mrs. **Julia Wallbott** for the coffee time in which I have learned a lot about German culture and language; **Heiko Klamm**, for always kindly helping me and for your precious friendship; **Ana Wennerkes** and **Melanie Schnarr**, for the moments shared in the lab and after work with the best ice-cream ever; and **Tania Chirico**, for receiving me in your apartment in a lovely and carefully way, with a lot of patience to help me in front of all of the new challenges that I found, being always a great friend besides a roomie.

...To **Alicia**, from Ecuador, to be so sweet with me in all of our moments together. Our friendship is a big present for me and I will never forget you! Thank you to be my partner, my confident and my friend during this time, and, for sure, you are one of the most important friends that I have found around the world!

...To **Charlene Farrugia** (from Malta), **Abo Ousama** and **Salim Hage** (from Syria) for the great moments that we have had together and for making me improve myself with your culture and friendship!

## RESUMO

Esse estudo avaliou a eficácia de diferentes agentes anti-erosivos *in situ*, variando o fluxo salivar (Capítulo 1); e, *in vitro*, frente aos desafios erosivo e erosivo/abrasivo (Capítulo 2). O estudo *In situ*, crossover e duplo-cego, utilizou amostras de esmalte bovino (4x4mm) em 4 fases experimentais (4h/cada) de acordo com os dentifrícios: placebo (Controle), fluoreto de sódio (NaF: 1400 ppm), fluoreto de estanho (SnF/NaF: 1100 ppm-SnF<sub>2</sub>, 300 ppm-NaF) e quitosana (NaF/Sn/Ch: 1450 ppm-NaF, 3500 ppm-SnCl<sub>2</sub>, 0,5% quitosana). Vinte voluntários foram divididos em 2 amostras (n=10), fluxo salivar normal ou reduzido, sendo cada voluntário um bloco estatístico. Os espécimes foram submetidos à erosão com ácido cítrico 1% (pH 3,5) previamente (Desmineralização 1 – D1) e após (D2) a exposição ao meio bucal. A microdureza foi analisada inicialmente, após D1, após o período *in situ* e após D2, para análise dos parâmetros %SMH (perda de dureza superficial), %SMR (recobrimento de dureza superficial) e %RER (resistência relativa à erosão). O fluxo, pH e capacidade tampão salivar foram analisados em todas as fases experimentais. No estudo *in vitro*, espécimes de esmalte humano (3x2mm) foram submetidos a desmineralização (Ácido cítrico 0,5%, 2 min/6x/10 dias) e remineralização, sem (Experimento 1) ou com (Experimento 2) escovação. Após a primeira e última erosão diárias, as amostras foram tratadas com diferentes soluções contendo quitosana ou não – 6 grupos: Ch50, Ch500, Ch1000, Ch2000 (0,5%) associados a flúor (500 ppm–AmF) e estanho (800 ppm–SnCl<sub>2</sub>), controle positivo (sem quitosana) e negativo (sem tratamento). No Experimento 2, as amostras foram escovadas (15s) com dentifrício não fluoretado previamente ao tratamento com soluções. As amostras foram analisadas com perfilometria (n=16), análise por energia dispersiva de raios-X (EDX/n=10) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV/n=4). Ambos

os estudos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc, além de análise de correlação de Pearson (*Estudo in situ*) ( $\alpha=5\%$ ). No estudo *in situ*, o dentifrício SnF/NaF apresentou o melhor desempenho, seguido pelo NaF/Sn/Ch, NaF e placebo, sob fluxo salivar normal ( $p<0,05$ ). Nos pacientes com hipossalivação, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o SnF/NaF e NaF/Sn/Ch ( $p>0,05$ ), que apresentaram o melhor resultado, e entre o NaF e o placebo ( $p>0,05$ ). A análise de Pearson evidenciou correlação entre alguns dentifrícios e o fluxo salivar para %SMR e %RER. No estudo *in vitro*, as soluções com quitosana foram eficientes em reduzir o desgaste do esmalte. No Experimento 1, o Ch2000 preveniu totalmente a perda de tecido, formando precipitados sobre o esmalte ( $p<0,05$ ), o que foi evidenciado pelo MEV. O EDX demonstrou a deposição de estanho sobre o tecido nos grupos tratados com soluções, sem diferenças entre eles. No Experimento 2, Ch50 e Ch500 apresentaram os melhores resultados para a perfilometria, o que foi confirmado pelo MEV. As soluções com quitosana, com exceção do Ch500, resultou em maior deposição de estanho sobre o esmalte com diferença em relação ao grupo controle positivo. A quitosana pode ser um componente ativo promissor a ser utilizado, visto que sua ação anti-erosiva foi demonstrada em ambos os estudos.

**Palavras-chave:** Erosão dental, microdureza, esmalte, fluxo salivar, quitosana.



## ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of different anti-erosive compounds *in situ*, varying the salivary flow (Chapter 1); and, *in vitro*, in front of erosive and erosive/abrasive challenges (Chapter 2). In the *in situ* study, a crossover and double blind study, it was used enamel samples (4x4mm) from bovine incisors in 4 experimental phases (4h each one) in according to the toothpastes under evaluation: placebo (control); sodium fluoride (NaF: 1400 ppm), stannous fluoride (SnF/NaF: 1100 ppm SnF<sub>2</sub>, 300 ppm NaF) and chitosan (NaF/Sn/Ch: 1450 ppm NaF, 3500 ppm SnCl<sub>2</sub>, 0,5% Chitosan). Twenty patients were allocated in 2 groups (n=10) – normal and low salivary flow, and each one was considered as a statistical block. The samples were eroded with citric acid 1% (pH 3.5) previously (Demineralization 1 – D1) and after (D2) the *in situ* period. Microhardness was measured at baseline, after D1, after *in situ* exposure and after D2, to assess the parameters %SMH (surface microhardness loss), %SMR (surface microhardness recovery) e %RER (relative resistance to erosion). Salivary flow, pH and buffering were evaluated in all experimental phases. In the *in vitro* study, samples from human enamel (3x2mm) were submitted to a cyclic treatment with demineralization (Citric acid 0,5%, 2 min/6x/10 days) and remineralisation, (Experiment 1). After the first and last erosive treatment each day, samples were treated with different anti-erosive solutions with chitosan or not – 6 groups: Ch50, Ch500, Ch 1000 and Ch 2000 (0.5%), all of them with fluoride (500 ppm – AmF) and stannous (800 ppm – SnCl<sub>2</sub>), positive (without chitosan) and negative (no treatment) control. In Experiment 2, samples were additionally brushed (15s) with non-fluoridated toothpastes previously the treatment with solutions. Samples were analyzed with profilometry (n=16), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX/n=10) and scanning electron microscopy (SEM/n=4). Both

studies were statistically analyzed with analysis of variance (ANOVA) and post-hoc tests, besides the Pearson's correlation (*in situ* study) ( $\alpha=5\%$ ). In the *in situ* study, SnF/NaF showed the best performance, followed by NaF/Sn/Ch and NaF in case of normal flow ( $p<0.05$ ). In patients with hyposalivation, no significant differences were found between SnF/NaF and NaF/Sn/Ch ( $p>0.05$ ), which presented the best results; and between NaF and placebo ( $p>0.05$ ). Pearson's analysis showed significant correlations between some toothpastes and salivary flow for %SMR and %RER. In the *in vitro* study, the Ch-based solutions were efficient in reducing enamel loss. In Experiment 1, Ch2000 totally prevented enamel loss with the formation of some precipitates under the enamel ( $p<0,05$ ), which was observed by SEM analysis. EDX showed increase in stannous content for the experimental groups, without statistical differences between them. In the Experiment 2, Ch50 and Ch2000 presented the best results for enamel loss, which was also verified in the SEM analysis. The Ch-based solutions, excluding Ch500, resulted in higher deposition of stannous under enamel with differences in relation to the positive control. Chitosan may be a promisor active agent to be used, once it showed its ant-erosive action in both studies.

**Keywords:** Tooth erosion, microhardness, enamel, salivary flow, chitosan.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. CAPÍTULOS.....	29
2.1 CAPÍTULO 1 - Effect of anti-erosive agents under normal and hyposalivatory conditions.....	29
2.2 CAPÍTULO 2 - <i>In vitro</i> efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel.....	47
3. DISCUSSÃO.....	67
4. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE – Detalhamento das Metodologias.....	82
ANEXOS – Parecer de Aprovação no Comitê de Ética	
Anexo 1.....	93
Anexo 2.....	94

## 1. INTRODUÇÃO

A erosão dental é uma condição multifatorial com mecanismo patogênico diferente da doença cárie (Lussi & Carvalho, 2014). O aumento da sua prevalência tem sido relatado devido a vários fatores, como o aumento da expectativa de vida e mudança nos hábitos dos pacientes, por exemplo em relação a sua dieta (Schlueter et al., 2012; Bartlett et al., 2013; Jaeggi & Lussi, 2014; Carvalho et al., 2015). Essa doença é causada por uma dissolução química dos tecidos mineralizados, sendo que os fatores etiológicos são ácidos de origem não bacteriana (Lussi et al., 2004; Lussi & Jaeggi, 2008), que podem ser de procedência intrínseca, oriundo do suco gástrico, mais comumente o ácido clorídrico, como para o caso de pacientes com refluxo gastroesofágico, anorexia ou bulimia nervosa; ou extrínseca, advindos da dieta, a partir de bebidas ácidas consumidas em excesso, como refrigerantes e sucos cítricos, em que os ácidos cítrico ou fosfórico predominam (Lussi et al., 2004; Carvalho et al., 2015).

Diferente da doença cárie, a erosão dental não tem um pH crítico definido a partir do qual pode ocorrer a dissolução dos tecidos bucais (Shellis et al., 2014). A definição de um pH crítico da solução erosiva depende tanto da solubilidade do sólido de interesse, nesse caso o substrato dental, quanto da concentração do conteúdo mineral da solução (Lussi et al., 2011). Especificamente em relação ao ácido, o seu pH e a sua capacidade tampão são determinantes para a sua ação desmineralizante (Shellis 2013; 2014; Lussi & Carvalho, 2014). De maneira geral, quanto menor o pH de um ácido e maior sua ação tamponante, maior o seu poder erosivo (Shellis et al., 2014). Ainda, em relação ao esmalte, a quantidade de ácido orgânico não-dissociado também é importante, visto que esse ácido não apresenta polaridade e assim, se difunde mais facilmente por entre a sua estrutura até

ocasionar sua dissolução (Shellis 2013; 2014). Por todos esses fatores, fica explícito que a capacidade erosiva varia de acordo com o ácido predominante na solução, como em um suco de frutas ou refrigerante, sendo que, para cada tipo de solução, há um pH crítico diferente.

O contato da superfície dental com os ácidos é a principal causa da erosão e é promovido por diversos fatores etiológicos (químicos, biológicos e comportamentais) que, assim, merecem importância para a prevenção e o tratamento da doença (Lussi & Jaeggi, 2008; Magalhães et al., 2012). Dentro desses fatores, destacam-se a susceptibilidade do dente à abrasão, à atrição e à dissolução química, o fluxo e as propriedades salivares do paciente, como a sua capacidade tampão e qualidade da película adquirida; entre outros. Esses fatores se interrelacionam com a solução erosiva e, assim, podem modular o processo erosivo (Magalhães et al., 2012; Buzalaf et al., 2012). Clinicamente, a erosão dental tem sido classificada como “desgaste erosivo patológico”, uma vez que, a dissolução superficial ocasionada pelo desafio erosivo torna a superfície do tecido mais susceptível ao desgaste mecânico, como o oriundo da abrasão ou da atrição dental; e, com interação entre os desafios químicos e mecânicos pode haver um desgaste progressivo dos tecidos dentais, esmalte e dentina (Lussi & Carvalho, 2014; 2015).

No esmalte, o desafio erosivo causa desmineralização superficial, caracterizada por um amolecimento, que aumenta proporcionalmente com a frequência do contato do tecido dental com o ácido (Ganss et al., 2014; Amaechi & Highan, 2005). Essa superfície alterada é susceptível ao desgaste e, portanto, facilmente removida com o esforço mecânico (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2014; Lussi & Carvalho, 2014). Porém, os estudos mostram que a camada de esmalte subjacente à camada afetada que foi removida, ainda se encontra alterada, com, por

exemplo, redução da microdureza e aumento da rugosidade, sendo, portanto, mais susceptível aos desafios erosivo/abrasivos subsequentes (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2014a). Dessa forma, constantes impactos de erosão sobre o esmalte resultam em um tecido com espessura diminuída, devido ao desgaste, e com seu remanescente parcialmente desmineralizado ou até mesmo na sua perda total com exposição de tecido dentinário (Magalhães et al., 2012; Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2014a). Na dentina, o mecanismo da erosão é um pouco mais complexo devido ao maior conteúdo orgânico e maior solubilidade dessa estrutura (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2004; 2014a).

Considerando a erosão como uma doença multifatorial modulada por fatores biológicos, comportamentais e ocupacionais (Lussi & Jaeggi, 2008), alguns fatores etiológicos tem sido correlacionados com a sua incidência e severidade. Os pacientes, considerados potenciais para o desenvolvimento da erosão dental, são os que possuem distúrbios gastroesofágicos (refluxo, anorexia ou bulimia); relatam consumo exagerado ou prolongado de bebidas, alimentos ou medicamentos ácidos (Schlueter & Tveit, 2014a; Carvalho et al., 2015); casos de pacientes que fazem ingestão excessiva de bebidas alcoólicas; e também casos de esportistas que consomem frequentemente bebidas energéticas ou os nadadores, que se expõe diretamente a água clorada (Schlueter & Tveit; 2014; Carvalho et al., 2015). Pacientes com alterações salivares, como os que estão sendo submetidos a tratamentos que alterem o fluxo salivar, como o uso de medicamentos ou radioterapia de cabeça e pescoço (Jensdottir et al., 2013) também são considerados como grupo de risco. Isso por que a qualidade da saliva do paciente (fluxo, capacidade tampão, composição e pH) é considerada um fator que pode estar

associado ao desenvolvimento e progressão da erosão dental (Järvinen et al., 2011; Jager et al., 2011; Ramsay et al., 2014).

O câncer na região de cabeça e pescoço é uma doença com alta incidência (Lieshout et al., 2013). De acordo com a *US National Cancer Institute*, aproximadamente 30 em 100.000 pessoas são acometidas pela doença. Dentre as diversas alterações decorrentes da radioterapia para o tratamento deste câncer, a hipossalivação e a redução da qualidade da saliva desses pacientes são as consequências mais comuns, com sério impacto na sua qualidade de vida (Jham et al., 2006). A esse fato, tem-se correlacionado a incidência de doenças bucais nesses pacientes, como a ocorrência de cárie e erosão dental (Jham et al., 2008; Järvinen et al., 2011; Ramsay et al., 2014). Em relação a erosão, a saliva é considerada o fator biológico mais importante para a prevenção dessa doença pela sua capacidade tampão e atividade de *clearance*, que agem diluindo, neutralizando e removendo o agente ácido do contato com a superfície dental (Hara & Zero, 2014); pela formação da película adquirida, uma barreira física que protege os tecidos dentais, prevenindo o seu contato direto com os ácidos (Hara et al., 2006; Cheaib & Lussi, 2011; Siqueira et al., 2012; Vukosavljevic et al., 2014); e pela sua composição inorgânica, com íons cálcio, fosfato, carbonato e flúor; e orgânica, com alto teor de diferentes proteínas, que possuem importante papel no processo de remineralização (Buzalaf et al., 2012). Em pacientes com hipossalivação, há uma diminuição da concentração desses íons e proteínas, diminuindo assim a capacidade de proteção da saliva contra a erosão dental (Jensdottir et al., 2013, Jager et al., 2011; Dawes, 2008).

O tratamento da erosão consiste na remoção e controle dos fatores etiológicos e na detecção precoce das lesões, para impedir sua progressão

(Amaechi & Highan, 2005). Como medida terapêutica para superfície dental submetida à erosão, há a possibilidade de aumentar a sua resistência aos desafios erosivos, seja pela modificação da sua estrutura cristalina, tornando-a menos solúvel (Wiegand et al., 2010; Schlueter et al., 2010; 2012) ou pela implementação de camadas orgânicas protetoras sobre os tecidos dentais (Ganss et al., 2012; Cheaib & Lussi, 2011; Jager et al., 2013). Os dentifrícios representam o meio ideal para se providenciar uma terapia ao tecido dental erodido (Jager et al., 2013; Hooper et al., 2007), sendo que, o composto fluoretado mais utilizado é o fluoreto de sódio. A ação dos dentifrícios é principalmente relacionada ao flúor, uma vez que na presença deste, também presente na saliva, há a precipitação de uma camada de fluoreto de cálcio sobre o tecido dental desmineralizado que pode, ainda que parcialmente, reduzir a susceptibilidade do esmalte a desmineralização (Magalhães et al., 2007; Moretto et al., 2010). Esse precipitado de fluoreto de cálcio age formando uma barreira sobre a estrutura dental que impede seu contato direto com os ácidos (Magalhães et al., 2011). No entanto, em condições de erosão dental (baixo pH), a barreira de fluoreto de cálcio formada não é considerada estável perante os eventos de erosão e erosão/abrasão que levam ao desgaste erosivo (Carvalho et al., 2014; Lussi & Carvalho, 2015). Frente a isso, o efeito relatado do fluoreto de sódio na concentração comumente utilizada em dentifrícios (1100 – 1450 ppm F) é considerado limitado. O aumento da concentração desse agente ativo nos dentifrícios (5000 ppm) não resulta em melhora da sua efetividade (Rios et al., 2008).

A maior efetividade do flúor frente a condição de erosão dental tem sido verificada com a sua associação a íons metálicos, como o estanho ou titânio, com a finalidade de melhorar sua disponibilidade sobre o tecido lesionado (Ganss et al.,



2011; Comar et al., 2012, Stenhagen et al., 2013). Ao estanho relaciona-se um potencial anti-erosivo (Ganss et al., 2011) e a capacidade de deposição sobre os tecidos dentais (Schlueter et al., 2009), formando uma barreira protetora, ocasionando, assim, a supressão da solubilidade da hidroxiapatita (Faller et al., 2011; Hooper et al., 2007). O principal modo de ação dos produtos que associam estanho é devido a reação desses íons com o tecido dental, formando diferentes sais como  $\text{Sn}_2\text{OHPO}_4$ ,  $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$  (Babcock et al., 1978). Esses sais formam uma camada de até 500 nm sob o tecido dental, que pode penetrar o esmalte em até 20  $\mu\text{m}$  (Schlueter et al., 2009), sendo, ainda, é estável e resistente a dissolução ácida (Hove et al., 2006). Essa camada permanece em posição por até 4 horas sob o esmalte, impedindo o seu contato com os ácidos, porém, permitindo a penetração do flúor entre os espaços interprismáticos, oferecendo assim uma proteção significativa contra desafios erosivos subsequentes (Faller et al., 2011; Khambe et al., 2014). O benefício dos regimes que associam flúor e estanho em um dentifrício é comprovado por estudos *in situ* (Hooper et al., 2007; Ganss et al., 2004; 2014) e *in vivo* (Young et al., 2006), que demonstraram que tal combinação pode reduzir a susceptibilidade dos tecidos dentais à perda mineral em até 80% (Ganss et al., 2011; Hooper et al., 2007; Stenhagen et al., 2013; Bellamy et al., 2014).

Outra abordagem é a utilização de biopolímeros, como proteínas, por exemplo, a caseína (Jager et al., 2013) ou polissacarídeos, como a quitosana (Ganss et al., 2012; Lussi & Carvalho, 2015). A quitosana é um polissacarídeo natural derivado da quitina (Ravi Kumar et al., 2004). As suas moléculas possuem uma força iônica positiva (zeta potencial positivo) e podem se ligar eletrostaticamente a estruturas com zeta potencial negativo (Claesson & Ninham, 1992), como o esmalte, a dentina, a película adquirida e também as partículas

abrasivas dos dentifrícios (Dedinaite et al., 2005; van der Mei et al., 2007; Ganss et al., 2011; 2014b; Xu et al., 2012; Schlueter et al., 2014b). Além disso, as suas micropartículas são capazes de se ligar aos íons flúor e transportá-los para sítios específicos, como o tecido dental erodido (Keegan et al., 2012). Assim, a quitosana induz a formação de múltiplas camadas estáveis sobre a superfície dental, protegendo-a contra a desmineralização (van der Mei et al., 2007; Lee et al., 2012; Schlueter et al., 2013). Tem sido sugerido que a quitosana, em conjunção com o estanho, pode também agir como agente protetor ou estabilizador da camada de estanho depositada sobre a superfície dental, reduzindo o impacto dos ácidos sobre o esmalte e, assim, aumentando sua resistência ao desafio erosivo (Carvalho & Lussi, 2014). Dessa forma, os dentifrícios ou exaguatórios bucais que contém esse composto são uma proposta promissora como terapia para o paciente com sinais clínicos de erosão (Ganss et al., 2012; Ganss et al., 2014b; Lussi & Carvalho, 2015). Estudos atestam a eficácia em se utilizar a combinação desse polímero com flúor e estanho, formando um dentifrício capaz de promover proteção contra os desafios erosivo e erosivo/abrasivo em até 70% (Ganss et al., 2014b; Schlueter et al., 2013; 2014b; Ganss et al., 2012).

Com controle e decréscimo na prevalência da doença cárie, a erosão dental tem sido evidenciada como um problema de importância e prevalência crescente (Lussi et al., 2006; Carvalho & Lussi, 2014), principalmente devido ao caráter multifatorial da doença e a variedade de fatores etiológicos que podem acarretá-la (Lussi & Jaeggi, 2008, Carvalho et al., 2015). O fato de que somente o flúor apresenta limitada eficácia para a erosão dental (Hove et al., 2015), pode explicar o alto índice de prevalência e severidade da doença em algumas populações (Barillet et al., 2013; Jaeggi & Lussi, 2014), já que não é corretamente

prevenida e/ou tratada. De acordo com Lussi & Carvalho 2015, os estudos científicos devem focar em terapias que combinem flúor e outro agente ativo, a fim de se desenvolver um meio adequado para prevenção e tratamento da erosão dental. Ainda, faz-se relevante considerar a importância dos grupos de risco, como os pacientes que apresentam hipossalivação, como aqueles que precisam de atenção e conhecimento para que sejam tomadas as devidas precauções a respeito do desenvolvimento da doença nesses casos. Nesse contexto, esse estudo teve como proposta avaliar, *in situ*, a eficácia de diferentes componentes ativos conjugados ao flúor, como o estanho e a quitosana, em pacientes com fluxo salivar normal e reduzido. Ainda, por meio de um estudo *in vitro*, a eficácia da quitosana com diferentes pesos moleculares e viscosidade foi avaliada com o intuito de se determinar a sua ação anti-erosiva frente as condições de erosão e erosão/abrasão.

## **2. CAPÍTULOS**

### **2.1 Capítulo 1**

#### **Effect of anti-erosive agents under normal and hyposalivatory conditions**

Pini NIP<sup>a</sup>, Schlueter N<sup>b</sup>, Santos-Silva AR<sup>c</sup>, Aguiar FHB<sup>a</sup>, Lovadino JR<sup>a</sup>, Lima DANL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Restorative Dentistry, Piracicaba Dental School, Univerity of Campinas – FOP/Unicamp, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Division for Cariology, Department of Operative Dentistry and Periodontology, Center for Dental Medicine, Albert-Ludwigs-University, Freiburg, Germany

<sup>c</sup>Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, Univerity of Campinas – FOP/Unicamp, São Paulo, Brazil

#### **Correponding Author**

#### **Debora Alves Nunes Leite Lima**

Professor - Department of Restorative Dentistry – dalima@unicamp.br

Piracicaba Dental School, P.O. BOX 52 - University of Campinas -UNICAMP

13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - Phone: +55 19 2101 5340

## Abstract

The action mechanism of some anti-erosive agents in normal and hiposalivatory conditions is not investigated so far. This double-blind crossover *in situ* study tested 4 randomly assigned toothpastes – Placebo (0 ppm F), Sodium-fluoride (NaF - 1450 ppm), Stannous-fluoride (SnF<sub>2</sub> - 1100 ppm + 350 ppm NaF) and NaF, Stannous and Chitosan (NaF/Sn/Ch – 1450 ppm NaF; 3500 ppm SnCl<sub>2</sub>; 0,5% Ch). Twenty patients were divided in 2 groups (n=10): normal and low salivary flow. They wore palatal appliances holding bovine enamel specimens previously eroded *in vitro* (Demin 1). A second *in vitro* erosive challenge (Demin2) was performed after *in situ* exposure. Surface microhardness was determined at baseline, after Demin1, after *in situ* exposure and after Demin2 to assess mineral loss (%SMH), mineral recovery (%SMR) and relative resistance to erosion (%RER). ANOVA and pairwise comparisons were performed and Persons correlation was applied to evaluate the relationship between microhardness analysis and salivary flow ( $\alpha=0.05$ ). Sn-based toothpaste showed higher anti-erosive effect for all parameters in relation to NaF and Placebo ( $p<0.05$ ). In case of normal flow, SnF<sub>2</sub> showed the best performance, with significant difference in relation to the other ( $p<0.05$ ). Under low flow, SnF<sub>2</sub> and NaF/Sn/Ch were statistically similar ( $p>0.05$ ) for all parameteres, like as NaF and Placebo. Comparing the groups of patients, there was significant difference for SnF<sub>2</sub> for %SMR and for all toothpastes in case of %RER. Pearson's analysis showed significant correlation for NaF ( $p=0.039$ ) and Placebo ( $p=0.048$ ) for %SMH<sub>total</sub>. Regarding %SMR, significant correlations were found for SnF<sub>2</sub> ( $p=0.031$ ) and NaF ( $p=0.006$ ) and for %RER, there were significant correlations for all toothpastes ( $p<0.05$ ). It was concluded that salivary flow has influence under the action mechanism of different active agents in toothpastes. Stannous-fluoride shower higher efficacy in preventing and protect against enamel erosion.

**Keywords:** enamel, erosion, saliva, microhardness.

## Introduction

Tooth erosion is recognized as a multifactorial condition in which salivary flow rate and its components are related as crucial predisposing factors (Jarvinen et al. 1991; Meurman et al. 1994; Piangprach et al. 2009; Ramsay et al. 2014). Individual's variation in salivary parameters affords different level of protection against erosion (Wetton et al. 2007; Jager et al. 2011). Patients with hyposalivation, such as those who received head and neck radiotherapy, have been related as risk group to develop tooth erosion (Lieshout et al. 2013; Jendosttir et al. 2013), once some protective functions of saliva depend on the salivary flow (Tenovuo, 1997; Hara & Zero, 2014).

Saliva is considered the main biological parameter that can modify the erosion process (Hara and Zero 2014) due its action in the remineralizing process (Buzalaf et al. 2012). Its protective effects in case of tooth erosion has been reported (Hara et al. 2006; Jager et al. 2011), and some *in situ* studies were performed in order to assess them in conjunction with anti-erosive agents in toothpastes (Schlueter et al. 2013; 2014; Creeth et al. 2015; Hove et al. 2014; 2015), which are the widespread form to delivery fluoride to the tooth surface (Amaechi and van Loveren 2013). Commonly, sodium fluoride (NaF) containing toothpastes are the largest used, however, its effects to prevent and treat tooth erosion are limited (Vieira et al. 2005; Huysmans et al. 2011; West et al. 2015; Hove et al. 2015), and the best predictive results are showed for the association of polyvalent metal cations, as stannous, with fluoride (Ganss et al. 2011; 2012; Hove et al. 2014; Algarni et al. 2015;). Nowadays, novel technologies, such as the use of natural biopolymers, like chitosan, are in evidence (Lussi and Carvalho 2015) and its anti-erosive effects were attested under *in situ* (Schlueter et al. 2013; 2014) and *in vivo* (Uysal et al. 2011) conditions.

Designing an *in situ* study with patients with hyposalivation may be relevant to achieve some findings and conclusions around the action mechanism of some anti-erosive compounds in different conditions of salivation. Therefore, the aim of this *in situ* study was to assess the protection of different toothpastes against enamel erosion in patients with normal and low salivary flow. Besides, the correlation between the salivary parameters and the mechanism action of toothpastes were also evaluated.

## Material and Methods

### Experimental Design

This *in situ* study tested the factors salivary flow (2 levels/groups of study: reduced and normal salivary flow) and toothpaste, at 4 levels, in 4 independent phases. It was a single-centre, crossover, randomized and blinded study to the subject and to the investigator. The toothpastes tested were different in relation to the active agent content: Placebo - without fluoride (pH= 6.88); Sodium fluoride (NaF; 1450 ppm F – pH 6.95); Stannous fluoride (SnF/NaF; SnF<sub>2</sub> - 1100 ppm F + NaF - 350 ppm F – pH: 4.3) and the association between NaF (1450 ppm F), Stannous (Sn - 3500 ppm from SnCl<sub>2</sub>) and Chitosan (Ch - 0.5%) (NaF/Sn/Ch; pH – 5.0) – all of active ingredients provided from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). All formulations were carried out with the same basis composition: Glycerin, Silica, Carboximethyl cellulose, water, Methyl P, Saccharin, Titanium dioxide, Sodium Lauryl Sulfate, Mint oil (Drogal Pharmaceuticals, Piracicaba, SP, Brazil). The toothpastes were always prepared immediately before each experimental phase. The response variable tested was microhardness and salivary flow.

### Volunteers and Ethical Aspects

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the local ethic committee in research (Process No. 010/2014). All subjects signed a written informed consent prior to screening. Twenty volunteers were selected and divided into two groups: 10 with low salivary flow and 10 with normal salivary flow. The patients with reduced flow (45-65 years old) received radiotherapy in the head and neck region at least after 2 years. The main inclusion criteria for these patients were to present reduced salivary flow (under 0,8 mL/min in stimulated flow), healthy buccal conditions, and no systemic disorders. The other inclusion criteria fulfilled also for the patients with normal flow (25-35 years old) were: absence of active caries, periodontal disease or dental erosion; no use of orthodontic appliance, good general and oral health, non-smoking, not pregnant or nursing, and no antibiotic use 2 months prior to the study. No subjects of both groups were taking medications that could cause a reduction of saliva flow. The groups were paired concerning the gender: 6 males and 4 females.

In each *in situ* phase, the subjects wore custom-made acrylic palatal appliances with 4 replicas of enamel for 4h (Hara et al., 2009), after treating the

specimens with the toothpaste assigned. While the appliances were in place, the participants were instructed not to eat and were only allowed to drink water. Each volunteer was considered as an experimental unit (entire sample - n=20). Before starting the study and between each phase, a lead-in period of 2 days and washout period of 5 days were assigned. During the washout, the subjects were instructed to use standard non-fluoridated toothpaste.

### Preparation of specimens

A total of 320 enamel/dentin blocks (4 x 4 mm) obtained from bovine incisors and with surface microhardness between 310-360 Kg/mm<sup>2</sup> were used. The bovine incisors were stored in 0.1% thymol solution for about 1 month, and the blocks were obtained using a precision saw (Isomet 1000; Buehler, IL, USA) and a diamond disc (Buehler, Illinois, USA). The enamel surface was planed and flattened using silicon carbide papers of decreasing granulation (until #4000), felts, and diamond paste (1 µm - Buehler, IL, USA); in a polishing machine, under water cooling (Arotec, São Paulo, SP, Brazil). Between the polishing steps and after the final polishing, all slabs were sonicated with distilled water for 15 min to remove debris. The samples were divided into 2 balanced experimental groups (normal and low salivary flow), and each group was divided into 4 subgroups based upon their post- in-vitro-erosion microhardness values.

### In vitro Erosive Challenge

The erosive agent was a citric acid solution (1% - pH 3,5) freshly prepared before each treatment. The specimens were fixed in a holder and immersed into 40 ml of the solution for 20 min, at room temperature, under agitation conditions (100 rpm). After this treatment (Demin1 - d1), the specimens were gently rinsed with tap water for 5 min. This erosive treatment was previously determined in a pilot study to cause an enamel surface loss around 30%. From of these results, the specimens were randomly assigned into the groups of study.

### In situ phase

Before the procedures in each experimental phase, it was performed collection of stimulated saliva of each patient. They were instructed to chew parafilm (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, IL, USA) and dispense the saliva in a Falcon tub (15 mL). The collection of saliva was performed always in



the same time, between 9 - 11 am or between 2 - 4 pm, at least with 1 hour of fasting and after brushing. Right after the collection, the salivary flow, pH and buffering effect of saliva were analyzed.

After the collection of saliva, the subjects were instructed to wear their palatal appliance for 5 min to allow the specimens to equilibrate with oral fluids. After this time, the subjects received an owner toothbrush (Curaprox - Curaden Swiss GbmH, Kriens, Switzerland) loaded with the assigned toothpaste (1,5g) similar to a pea size. With the appliance in position, the subjects were instructed to brush the buccal surface of their teeth for 25 s, without make contact between the toothbrush and the specimens, to create a mixture of toothpaste and saliva (slurry). After this, they remained with the appliances in position for 2 min to intend the contact of the specimens with the slurry. Then, they removed the appliance and the specimen's surface was brushed with the same toothbrush used by the patient by one researcher, for 20 s. After these procedures, the subjected reinserted the appliance, gently rinsed your mouth with 15 mL of water for 10 s and remained with it in position during the next 4 hours. After this period, the specimens were collected and stored moist in individual vials at 37<sup>0</sup>C until the next surface microhardness measurement. The same procedures were repeated in the subsequent phases, changing the toothpaste used according to crossover experimental design.

#### Microhardness analysis

The enamel surface microhardness (SMH) was analyzed in four times: baseline (b), after the first erosive treatment (Demin1/d1 - *in vitro*), after salivary exposition (*in situ* phase) and after the second erosive treatment (Demin2/d2 - *in vitro*). A Knoop indenter, at a load of 50g in an indentation time of 5s in a microhardness tester (HMV-2000 Shimadzu, Tokyo, Japan) was used. Five indentations, spaced 100 µm apart, were made in the centre of the enamel surface, and the mean values of the measuring points were then determined. From of the microhardness means obtained, four variables were calculated: Surface microhardness loss - %SMH - to indicate the enamel loss of surface microhardness, considering its initial condition and its condition after erosive challenge ( $\%SMH_{initial}=100[(SMH_{d1} - SMH_b)/SMH_b]$ ; used to distribute the specimens randomly); or after exposure to remineralizing agents ( $\%SMH_{total}=100[(SMH_{in situ} - SMH_b)/SMH_b]$ ), as toothpaste and saliva (Carvalho et al. 2014); Surface

microhardness recovery - %SMR - to represent enamel rehardening ( $\%SMR = [(SMH_{d1} - SMH_{in\ situ}) / (SMH_{d1} - SMH_b)] * 100$ .); and Relative erosion resistance - %RER - to assess the behavior of treated enamel in front of new erosive challenges; indicating its acid resistance of the acquired (%RER:  $[(SMH_{d1} - SMH_{d2}) / (SMH_{d1} - SMH_b)] * 100$ ). (Hara et al. 2009; Carvalho et al. 2014; Creeth et al. 2015).

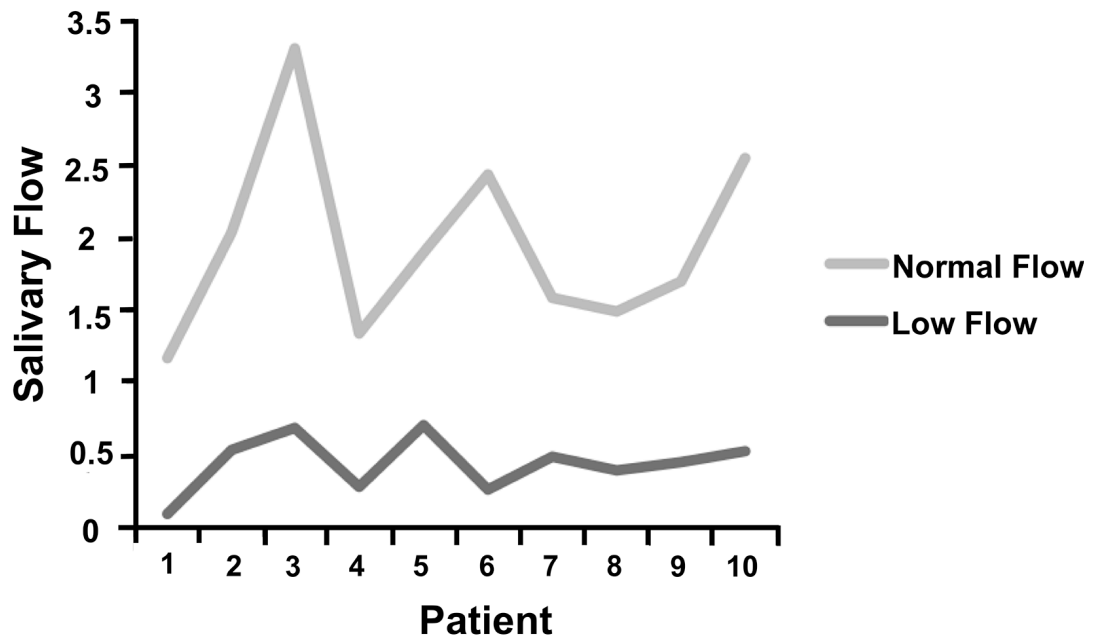
The mean of %SMH<sub>initial</sub>, %SMH<sub>total</sub>, %SMR and %RER for each subject for each treatment was calculated for each SMH measurement for each specimen averaged across the four enamel specimens used for each volunteer. In this way, a single observation per treatment for each patient was used for statistics evaluation.

### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS 22 for Windows (Armonk, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov-test was used to check for normal distribution. Data were statistically evaluated with an analysis of variance (ANOVA) for all groups with fixed factor (study period and toothpaste), and a randomized effect for volunteers. Comparisons were performed between different toothpastes and different conditions between volunteers (normal and low salivary flow) using Tamhane's post hoc test. Besides, all of patients were pooled in the same sample and statistically evaluated to support subsequent analysis of correlation. Linear contrasts were fitted using Pearson's correlation in order to establish the grade of relationship between microhardness measurements (%SMH, %SMR and %RER) and salivary flow. The level of significance was set at 0.05.

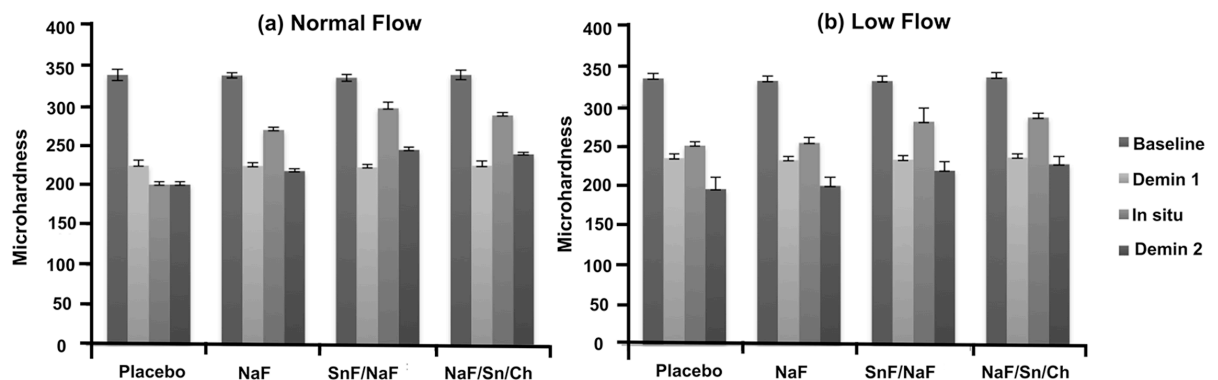
### **Results**

All volunteers completed the study and none of them reported some adverse effects due to the toothpaste used or the procedures applied. In each sample, the volunteers were codified from Patient 1 to 10, and their individual profile of salivary are presented in the Figure 1. The pH values (between 6.8 - 7.6) and the buffering capacity (4.0 - 4.5) showed the same variability for each group of patients.



**Figure 1.** Mean salivary flow for each patient during the study

The SMH values for the different toothpaste used, in the different moments assessed and for the groups, normal and low flow, is presented in Figure 2. These values were used as basis for the calculus of the parameters under evaluation: %SMH, %SMR and %RER.



**Figure 2.** SMH results for the different toothpaste and groups of study.

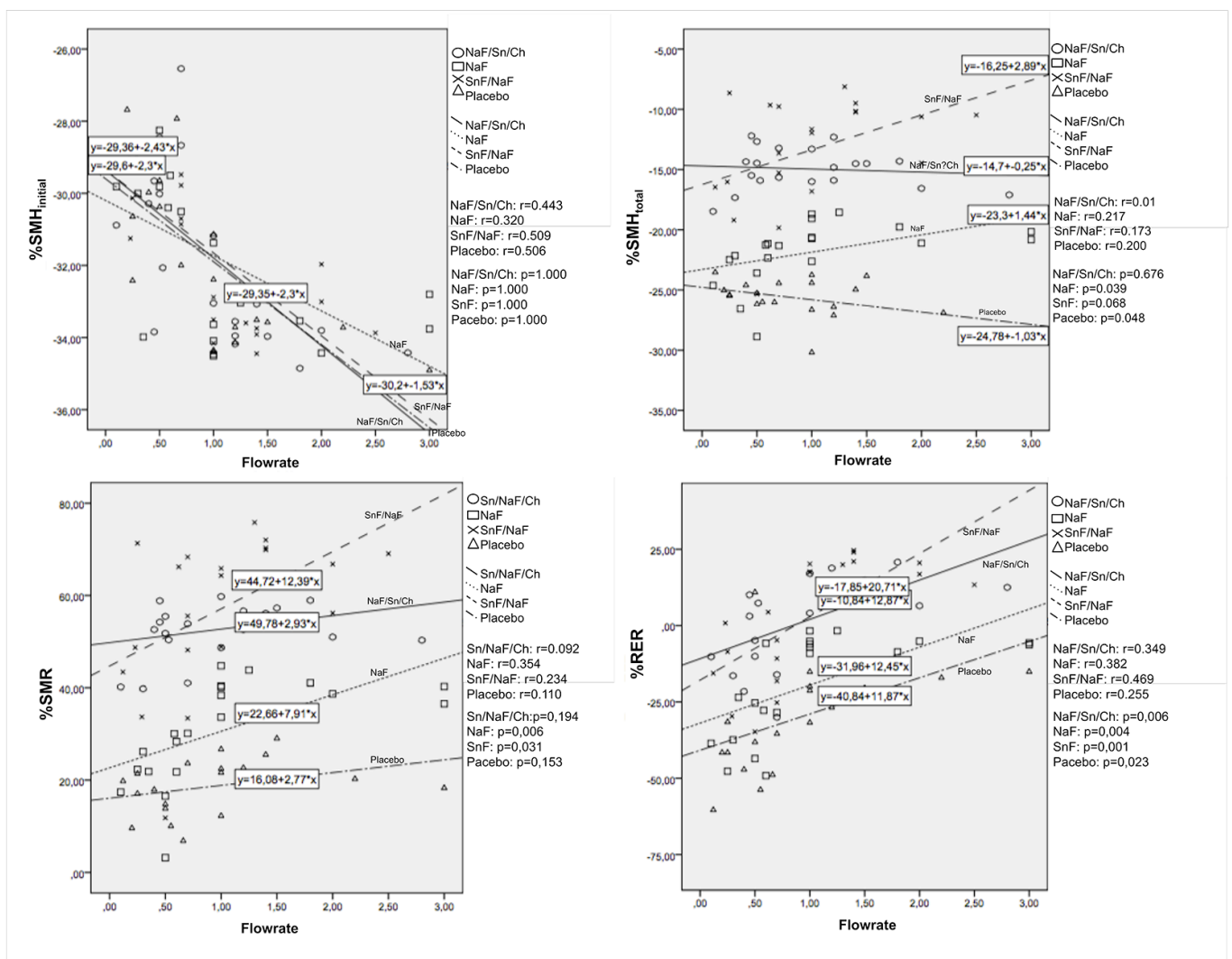
Table 1 presents the %SMH values after Demin1 (%SMH<sub>initial</sub>), after *in situ* phase (%SMH<sub>total</sub>), %SMR and %RER. There were no statistical differences for %SMH<sub>initial</sub> between the groups of toothpastes for normal (p=0.997) and low (p=0.991) flow and the between this both groups of patients (p=0.997), once this measurement was determined previously the randomization of the samples (p>0.05). Regarding the normal flow rate, for %SMH<sub>total</sub>, %SMR and %RER, it could be always verified the best performance for the SnF<sub>2</sub> toothpaste, followed by the NaF/Sn/Ch, NaF and Placebo toothpaste, with statistical difference between them (p<0.05). In case of low salivary flow, the best performance for all parameters were for the SnF<sub>2</sub> and NaF/Sn/Ch-based toothpaste, without significant difference between them (p>0.05), followed by NaF and placebo toothpaste, both statically similar (p>0.05). Comparing the flow rates conditions (normal x low), it was found differences for %SMR with SnF/NaF and for %RER in case of all groups, excluding the placebo toothpaste (p<0.05). Comparing SnF/NaF and NaF/Sn/Ch-based toothpaste, no statistical significant differences were found for any parameter tested (p>0.05).

**Table 1.** Results (mean ± standard deviation) for microhardness measurements (%SMH<sub>initial</sub>, %SMH<sub>total</sub>, %SMR and %RER) for each toothpaste in each group of patients (normal and low flow) and for all of patients.

		%SMH <sub>initial</sub>	%SMH <sub>total</sub>	%SMR	%RER
	Placebo	-33.58±1.01 <sup>a</sup>	-26.27±2.08 <sup>a</sup>	21,82±4.73 <sup>a</sup>	-20.79±5.69 <sup>a</sup>
Normal Flow	NaF	-33.56±0.96 <sup>a</sup>	-20.21±1.24 <sup>b</sup>	39.77±3.24 <sup>b</sup>	-5.63±2.46 <sup>b*</sup>
	SnF <sub>2</sub> /NaF	-33.51±0.72 <sup>a</sup>	11.39±2.53 <sup>c</sup>	65.91±7.95 <sup>c*</sup>	19.56±3.38 <sup>c*</sup>
	NaF/Sn <sup>2</sup> /Ch	-33.60±1.01 <sup>a</sup>	14.93±1.48 <sup>d</sup>	55.51±4.77 <sup>d</sup>	12.58±5.41 <sup>d*</sup>
	Placebo	-29.89±1.55 <sup>a</sup>	-25.19±1.55 <sup>a</sup>	15.48±5.48 <sup>a</sup>	-38.76±19.47 <sup>a</sup>
Low Flow	NaF	-29.97±1.59 <sup>a</sup>	-23.43±2.55 <sup>a</sup>	21.77±8.11 <sup>a</sup>	-32.72±13.23 <sup>a*</sup>
	SnF <sub>2</sub> /NaF	-29.75±0.95 <sup>a</sup>	-15.38±5.24 <sup>b</sup>	48.06±8.54 <sup>b*</sup>	-14.23±12.93 <sup>b*</sup>
	NaF/Sn <sup>2</sup> /Ch	-29.91±2.04 <sup>a</sup>	-14.97±2.00 <sup>b</sup>	49.82±6.93 <sup>b</sup>	-8.86±12.92 <sup>b*</sup>

Different letters indicate statistically significant differences between toothpastes in the same sample of patients, in the same analysis. (\*) Show statistically significant differences between the samples of patients with the same toothpaste used in the same analysis.

With Pearson's correlation analysis, for %SMH<sub>initial</sub> no significant correlations were found for all toothpastes used ( $p=1.000$ ). %SMH<sub>total</sub> showed significant correlations for NaF ( $p=0.039 - r=0.217$ ) and Placebo ( $p=0.048 - r=0.200$ ). Regarding %SMR, significant correlations were found for SnF/NaF ( $p=0.031 - r=0.234$ ) and NaF ( $p=0.006 - r=0.354$ ), but the same was not verified for NaF/Sn/Chi ( $p=0.194 - r=0.092$ ) and placebo ( $p=0.153 - r=0.354$ ). For %RER, there were significant correlations for all toothpastes: NaF/Sn/Chi ( $p=0.006 - r=0.349$ ), SnF/NaF ( $p=0.001 - r=0.382$ ), NaF ( $p=0.004 - r=0.469$ ) and placebo ( $p=0.023 - r=0.255$ ).



**Figure 2.** Scatter graphs correlating all of microhardness parameters assessed (%SMH<sub>initial</sub>, %SMH<sub>total</sub>, %SMR and %RER) with salivary flow for all of volunteers of the study.

## Discussion

The intention of this study was to assess the effect of toothpastes in the enamel after erosive challenge and brushing, in which despite altered enamel is removed due to abrasive forces, the remaining layer is still softening (Ganss et al. 2014), varying the salivary flow. For standardizing, brushing was always performed for one calibrated examiner. Laboratory-prepared toothpastes were chosen to assess the effect of their active agents excluding the influence of other ingredients, which can be different between the commercially available products. To the best of knowledge, this is the first study experiencing hyposalivatory conditions *in situ* and the current literature presents few data about the role of some anti-erosive compounds in the context of erosion and salivary flow. In general, *in vitro* studies use toothpaste slurries prepared with artificial saliva or water, without consider biological factors, as presence of saliva, with its physiological actions; and its compounds, like proteins, in the experimental set. Regarding the present study, it is important to remember that patients with low salivary flow are a group that is difficult to homogenize, once the recruitment and attendance of them is more complicated, because, often, they are elderly and physical and psychologically debilitated. Due to this fact, it was planned a short term *in situ* model (4 hours).

In general, stannous-based toothpastes showed the best results for all of parameters and groups of patients evaluated, with statistical significant difference in relation to NaF and placebo. These results are in the same way of previous *in situ* (Hove et al. 2008; 2014; 2015; Huiysmans et al. 2011) and *in vivo* (Young et al. 2006) ones. In normal flow, SnF/NaF toothpaste showed higher protection against erosion, with statistical difference in relation to NaF/Sn/Ch. However, considering the low salivary flow or all patients as an entire sample, this difference was not attested. Besides, for %SMR, SnF/NaF showed significant higher effectiveness in patients with normal flow than in patients with hyposalivation. This is probably related to the higher amount of saliva available, once the correlation analysis showed significant and positive relationship between this compound and salivary flow, for %SMR and %RER.

Stannous ion, in association with fluoride, is considered efficient to promote reduction of enamel solubility when compared with NaF, in case of erosion (Schlueter et al. 2009a; Bellamy et al. 2014; Algarni et al. 2015). They present highly reactivity with hydroxyapatite, forming a stable coating with different salts, mainly under low

pH, leading to its incorporation in the enamel, creating a more resistant substrate (Babcock, 1978; Schlueter et al. 2009b). Several studies confirmed the effectiveness of SnF/NaF even in presence of acquired pellicle (Huiysmans et al. 2011; Rakmatullina et al. 2013; Bellamy et al. 2014;), for example, due to the interaction between Sn and some proteins, like mucins and albumins (Algarni et al. 2015). These proteins are related to the dynamic process of dental mineral gain and loss, favoring the formation and stabilization of CaF<sub>2</sub>-like precipitates and the formation of a physical barrier against acids (Buzalaf et al. 2012; Hara and Zero 2014). Based on it, it can be hypothesized that the higher efficacy of SnF<sub>2</sub> under normal conditions of salivation is due to the ability of Sn in promoting cross-linking with proteins (Algarni et al. 2015) and ions (Babcock, 1978), once quality of saliva is dependent on salivary flow (Tenovuo, 1997; Jager et al. 2011).

The NaF/Sn/Ch-based toothpaste showed higher mineral recovery than NaF and placebo, being effective against tooth erosion. However, for patients with normal flow, this toothpaste was not efficient as SnF/NaF, while in hyposalivatory conditions, both active agents were statistically similar for all of parameters tested. Nevertheless, these results attest the anti-erosive action of chitosan, as previously related (Schlueter et al. 2013; 2014; Carvalho et al. 2014). It is a biopolymer able to bind with proteins from saliva (Van der Mei et al. 2008), fluoride (Keegan et al. 2012) and other ions from enamel surface (Lussi and Carvalho 2015), and abrasives from toothpastes (Lundin et al. 2008), forming a protective layer under the eroded tissue, which may increase the retention of Sn (Carvalho et al. 2014), and, in this way, the potential effect of toothpaste when both compounds are combined is increased (Lussi and Carvalho 2015). However, it can be suggested the linking between chitosan and saliva is not so relevant for its anti-erosive effect, once there were no significant differences for NaF/Sn/Ch comparing the conditions of salivation. In addition, Pearson's analysis showed no correlation between NaF/Sn/Ch and salivary flow for %SMH and %SMR.

Concerning NaF-based toothpaste, the results showed the limited efficacy of this compound in the conditions tested, once it presented some anti-erosive protection just in relation to placebo and in normal flow rate, as previously related (Schlueter et al. 2009; Huysmans et al. 2011; West et al. 2015). On the other hand, this result was not verified in patients with low salivary flow, in which NaF were always statistically similar to placebo, for all of the parameters tested. This can be

visibly noted also when the SMH values were analyzed (Figure 2). This results was expected, once the absence of protection against tooth erosion by NaF was previously related (Magalhães et al. 2008; Bellamy et al. 2014; Hove et al. 2015). In this way, the Pearson's analysis evidenced significant correlation between NaF and salivary flow for all parameters studied, indicating that NaF is dependent of the amount of saliva. The action of NaF is counteracted under low pH conditions, which damage its effect in the remineralizing process in case of tooth erosion. Besides, in low flow conditions, the absence of effect for NaF may be related to the lack of ionization of NaF or lack of presence of calcium and phosphate ions, necessary for the formation  $\text{CaF}_2$ -like precipitates (Lussi and Carvalho 2015), once lesser amounts of saliva are available in these patients.

Between the parameters tested and comparing the salivary conditions, %RER was always higher in patients with normal flow for all active agents used, with statistically significant differences. Person's correlation showed that %RER is dependent of salivary flow for all toothpastes used, including placebo. The effect of acquired pellicle should be excluded of this result, once it was proved that its protection is not efficient in case of erosive challenge with more than 20 minutes (Hara et al. 2006). In this way, this data is important because it confirms the relationship between salivary flow and the compounds used, in 4 hours of salivary exposure, and, probably, the results of this study are due to the role of saliva in the remineralizing process, with its compounds and ions important to this (Buzalaf et al. 2012; Hara and Zero 2014). In the present study, this is clearly from the results obtained, corroborating that the amount of saliva and, indirectly its quality, is substantial to enhance the resistance of enamel against to subsequent erosive challenge.

The most important roles of saliva in tooth erosion are related to its composition and formation of salivary pellicle (Hara et al. 2006) as above discussed, and due it's diluting action (clearance) and buffering effect on acids (Buzalaf et al. 2012; Hara and Zero 2014), contributing to the remineralisation. Hyposalivation is a common consequence in patients who received head and neck radiotherapy (Jendosttir et al. 2013; Lieshout et al. 2013), and, low pH and buffering of saliva are also related as adverse effects in these patients and to the erosion process (Meurman et al. 1994). In this study, it was not find variation in the pH and buffering between the patients with normal and low salivary flow and, because of this, these



factors were not evaluated in conjunction with the microhardness analysis. However, alteration in these parameters should not be discarded in patients with low flow and maybe it was not assessed in this study due to the long time of saliva collection requested by these patients, which may result in loss of CO<sub>2</sub> by saliva, changing its pH and influencing the buffer capacity measurements. About the clearance, it cannot be considered in this study design, once the specimens were extra-orally exposed to acids (Jager et al. 2011).

Based on the results of the current study, it can be concluded that salivary flow is an important factor to modulate tooth erosion, once it may influence the action mechanism of the active agent used in toothpaste. NaF-based toothpaste showed limited efficacy against enamel erosion in case of normal and low salivary flow. Chitosan is a promising additive to be used, once it showed higher anti-erosive action than NaF and placebo. Sn-based toothpaste, with chitosan or not, raised in higher anti-erosive protection irrespective to salivary flow, being considered the most predictive agent to be used in case of enamel erosion.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Department of Oral Diagnosis (Semiology and Oral Pathology Sections) for their indescribable support with the patients who received head and neck radiotherapy. Besides, the authors are grateful to Drogal Pharmaceuticals (Piracicaba, São Paulo, Brazil) for the support in formulating the toothpastes used and to Mr. Waldomiro Vieira Filho from Laboratory of Biochemistry of Piracicaba Dental Scholl for the technical assistance. Financial support was provided by Coordination of Training of Higher Education Graduate/Capes, Brazil.

### **References**

- Algarni AA, Mussi MC, Moffa EB, Lippert F, Zero DT, Siqueira WL et al. 2015. The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. *PLoS One*. 10(6):e0128196.
- Amaechi BT, van Loveren C. 2013. Fluorides and non-fluoride remineralisation systems. *Monogr Oral Sci*. 23:15-26.
- Babcock FD, King JC, Jordan TH. 1978. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J Dent Res*. 57:933-938.

Bellamy PG, Harris R, Date RG, Mussett AJS, Manly A, Barker ML, et al. 2014. In situ clinical evaluation of a stabilized, stannous fluoride dentifrice. *Int Dent J.* 64(Suppl 1):43-50.

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

Carvalho TS, Lussi A. 2014. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *J Dent.* 42(4):450-9.

Creeth JE, Kelly SA, Martinez-Mier EA, Hara AT, Bosma ML, Butler A et al. 2015. Dose-response effect of fluoride dentifrice on remineralisation and further demineralisation of erosive lesions: A randomized in situ clinical study. *J Dent.* 43: 823-831.

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

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

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. 2014. The histopathological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monograph Oral Sci.* 25:99-107.

Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MS, Zero DT. 2006. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res.* 85(7): 612-6.

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

Hara AT, Zero DT. 2014. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monograph Oral Sci.* 25: 197-205.

Hove LH, Holme B, Young Z, Tveit AB. 2008. The protective effect of TiF<sub>4</sub>, SnF<sub>2</sub> and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res.* 42:68-72.

Hove LH, Stenhagen KR, Holme B, Tveit AB. 2014. The protective effect of SnF<sub>2</sub> containing toothpaste and solution on enamel surfaces subjected to erosion and abrasion in situ. *Eur Arch Paediatr Dent.* 15:237-243.

Hove LH, Stenhagen KR, Mulic A, Holme B, Tveit AB. 2015. May caries-preventive fluoride have an effect on dental erosive wear? An in situ study. *Acta Odontol Scand.* 73: 114–120.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. 2011. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride containing toothpaste. *Carie Res.* 45(6):518-23.

Jager DHJ, Vieira AM, Ligtenberg AJM, Bronkhorst E, Huysmans MCDNJM, Vissink A. 2011. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Carie Res.* 45:532-537.

Järvinen VK, Rytömaa JI, Leinonen OP. 1991. Risk factor in dental erosion. *J Dent Res.* 70(6):942-947.

Jensdottir T, Buchwald C, Nauntofte B, Hansen HS, Bardow A. 2013. Saliva in relation to dental erosion before and after radiotherapy. *Acta Odontol Scand.* 71: 1008-1013.

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

Lieshout HFJ, Bots CP. 2014. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. *Clin Oral Investig.* 18(1):17-24.

Lussi A, Carvalho TS. 2015. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Carie Res.* 49(Suppl 1): 18-29.

Lundin M, Macakova L, Dedinaite A, Claesson P. 2008. Interactions between chitosan and SDS at a low-charged silica substrate compared to interactions in the bulk – The effect of ionic strength. *Langmuir.* 24:3814-3827.

Magalhães AC, Rios D, Marthinho CCR, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Machado MAAM. 2008. The influence of residual salivary fluoride from dentifrice on enamel erosion: an in situ study. *Braz Oral Res.* 22(1):67-71.

Meurman JH, ten Cate HM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. 1996. *Eur J Oral Sci.* 104:199-206.

Piangpach T, Hengtrakool C, Kukiattrakoon B, Kedjarune-leggat U. 2009. The effect of salivary factors on dental erosion in various age groups and tooth surfaces. *JADA.* 140(9):1137-1143.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. 2013. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 123(4):296-302.

Ramsay DS, Rothen M, Scott JM, Cunha-Cruz J. 2015. Tooth wear and the role of salivary measures in general practice patients. *Clin Oral Investig.* 19(1):85-95.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J and Ganss C. 2009. 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.* 117: 427-434.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. 2009. In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. *J Dent.* 37(12):944-8.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. 2013. Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Caries Res.* 47: 574-581.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. 2014. Effect of a chitosan additive to a Sn<sup>2+</sup>-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy – a controlled randomized in situ trial. *Clin Oral Invest.* 18(1):107-15.

Tenovuo J. 1997. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Comm Dent and Oral Epidemi.* 25(1):82-6.

Uysal T, Akkurt MD, Amasyali M, Ozcan S, Yagci A, Basak F et al. 2011. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? *Angle Orthod.* 81:319–325.

Van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Dijkstra RJB, Busscher HJ. 2007. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci.* 115:303-307.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. 2005. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 39:371–379.

West NX, Seong J, Hellin N, Eynon H, Barker ML, He T. 2015. A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice to a sodium fluoride/triclosan dentifrice. *Int J Dent Hyg.* In press.

Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M. 2007. The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentin: A study in vitro. *Caries Res.* 41(5):423-6.

Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonsk G, Röllä G. 2006. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci.* 114:180-183.

## 2.2 Capítulo 2

### ***In vitro* efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel**

#### **Anti-erosive action of chitosan-containing solutions**

Pini NIP<sup>a,b</sup>, Lima DANL<sup>b</sup>, Lovadino JR<sup>b</sup>, Ganss C<sup>a</sup>, Schlueter N<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Conservative and Preventive Dentistry, Dental Clinic, Justus Liebig University, Giessen, Germany

<sup>b</sup>Department of Restorative Dentistry, Piracicaba Dental School, State University of Campinas - FOP/Unicamp, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup>Division for Cariology, Department of Operative Dentistry and Periodontology, Center for Dental Medicine, Albert-Ludwigs-University, Freiburg, Germany

#### **Corresponding Author**

Núbia Inocencya Pavesi Pini – nubiapini01@gmail.com

Piracicaba Dental School, P.O. BOX 52 - University of Campinas -UNICAMP

13414-903, Piracicaba, SP, Brazil - Phone: +55 19 2101 5340

## Abstract

This study evaluated different chitosan molecules in association with fluoride (AmF) and stannous (Sn) in a solution with respect to protection against erosion (Experiment 1) and erosion/abrasion (Experiment 2). Six groups of study were assigned: negative-control (no solution), 4 types of Chitosan (Ch – 0.5%) in according to the viscosity (50, 500, 1000 and 2000) and Positive Control (AmF–500 ppm + Sn–800 ppm). In Exp. 1, samples were demineralized (10 days, 6x2 min/day, citric acid, pH 2.9), exposed to the solutions (2x2 min/day) and intermittently stored in a remineralisation solution. In Exp. 2, samples were additionally brushed with nonfluoridated toothpaste (15 s) before the solutions. The treatment effects were investigated by surface profilometry (n=16), energy-dispersive-X-ray (n=10) and scanning-electron-microscopy (n=4). Chitosan-based solutions were efficient in reducing enamel loss, at least at the same extent of the positive control. In Exp. 1, Ch2000 showed the best effect in preventing enamel loss, with formation of precipitates ( $p < 0.05$ ), which was verified by SEM. In Exp. 2, Ch50 and Ch500 showed the best performance, with statistical differences in relation to the other groups ( $p \leq 0.05$ ), and this was also confirmed by SEM analysis. For both experiments, the experimental groups showed increasing in carbon and tin content than negative control ( $p \leq 0.001$ ), being higher in Exp. 1 ( $p \leq 0.001$ ). In Exp. 2, the chitosan-solutions, excluding Ch500, showed higher tin deposition ( $P \leq 0.05$ ). Chitosan-solutions showed different potential in according to the experimental condition tested, but all of them were efficient in showing some anti-erosive/abrasive properties.

**Keywords:** Erosion, abrasion, enamel, chitosan.

## Introduction

Fluoride is recognized as the most commonly used active agent in oral hygiene products. Its caries protecting effect is undisputed [Marinho et al., 2004; Walsh et al., 2010]. In contrast, in case of tooth erosion, the fluoride ion on its own, mostly used in combination with sodium, shows only limited efficacy [Hughes et al., 2004; Huysmans et al., 2011; Vieira et al., 2005]; however, if it is used in combination with polyvalent metal cations, more precisely with stannous ions, it shows, at least used as a mouthrinse, notable efficacy [Ganss et al., 2010]. The stannous ion can be retained on and incorporated into the upper surface of the dental hard tissue, leading to a reduction of its acid solubility [Schlueter et al., 2009a]. Therefore, the current state of the art in preventing erosive as well as erosive-abrasive tissue loss is the use of stannous containing fluoride preparations [Carvalho et al., 2015].

Novel agents, like biopolymers, have been studied in order to further enhance the effects of anti-erosive fluoride compounds. Under *in vitro* conditions, chitosan formulations without fluoride had shown potential against enamel demineralization [Arnaud et al., 2010]. In a study comparing different types of toothpaste as anti-erosive/anti-abrasive agents even to the same extent of sodium fluoride-based toothpastes [Ganss et al., 2011]. “In vivo”, this effect was also attested in the context of caries [Uysal et al., 2011]. The molecule has also shown encouraging effects as an additive to stannous and tin containing toothpastes [Carvalho, and Lussi, 2014] with an increase of tissue loss reduction under *in vitro* and *in situ* conditions from 38% to 67% [Ganss et al., 2012; Schlueter et al., 2013]. The use of chitosan in mouthrinses as an anti-erosive agent, however, has not been investigated so far. Chitosan is able to increase the amount of tin retained on enamel surfaces [Ganss et al., 2012], therefore, the effect of a stannous and fluoride ion containing mouthrinses could potentially be increased by a chitosan additive.

Chitosan is available with different molecular weights leading to different properties such as viscosity [Synowiecki, and Al-Khateeb, 2003], antibacterial properties [No et al., 2002] or possibly lubricating effects. Therefore, it might be that differences in molecular weight and viscosities impact on the one hand the retention of tin on tooth surface, the effect of acids on tooth demineralisation or, on the other hand, even the resistance against toothbrushing abrasion of an erosively altered dental hard tissue.



The aim of the present *in vitro* study was, therefore, to investigate the effect of different types of chitosan, in accordance with its viscosity, as an additive to a stannous and fluoride ion containing experimental mouthrinses on erosive and erosive/abrasive tissue loss. To elucidate possible modes of action between chitosan, the dental hard tissue and the stannous ions, an element analysis and analysis of surface topography after treatment were performed.

## **Material and Methods**

This study was conducted in two experiments in which five different experimental solutions were investigated under erosive (experiment 1; E1) and erosive-abrasive conditions (experiment 2, E2) in comparison to a negative control group, resulting in 6 experimental groups per experiment (n=16 for tissue loss analysis, n=10 for element analysis and n=4 for analysis of surface topography) (Table 1). Once the study used human teeth, it was evaluated and approved by specific Ethical Committee (approval n. 143/09).

### *Specimen preparation*

A total of 192 enamel specimens were prepared from previously impacted, freshly extracted, human third molars without cracks, fluorosis or any type of tooth decay. All donors lived in an area with  $\leq 0.03$  ppm fluoride in the drinking water. Longitudinal slices were obtained from the tooth and their buccal surfaces were ground flat and polished with water-cooled abrasive papers (Exakt Abrasive Cutting System and Exakt Mikrogrinder, Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Germany; P800, P2400 and P4000 silicon abrasive paper, Leco, St. Joseph, USA). After these procedures, the specimens had a thickness of approximately 1 mm and an experimental area of 2 mm x 3 mm. They were mounted on specific sample holders for brushing machine (8 specimens per holder resulting in 2 holders per group) using light-curing acrylic (Technovit 7230 VLC, Kulzer-Exakt, Wehrheim, Germany). One half of the experimental area was covered with the acrylic to serve as reference for the profilometric analysis. The uncovered area was carefully checked for any contamination or damage at 10-fold magnification. Specimens were stored in 100% humidity at 4°C until use.

### *Solutions and Products Used*

All specimens were subjected to a cyclic demineralisation procedure with a 0.5% citric acid solution (5 g citric acid solved in 1 l distilled water; anhydrous citric acid, Merck, Darmstadt, Germany).

Between the demineralisation cycles, specimens were stored in a mineral salt solution containing 4.08 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20.10 mM KCl, 11.90 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and 1.98  $\text{CaCl}_2$  (all chemicals from Merck, Darmstadt, Germany), with a pH of 6.7.

Except for the negative control group, all groups were treated with different experimental fluoride- and tin-containing solutions (Table 1). Four of these solutions contained additionally different types of chitosan, which differ in molecular weight (degree of deacetylation in all cases 80%), resulting in different viscosity of the chitosan (Table 1). One fluoride- and tin-containing solution had no chitosan additive and served as positive control.

All solutions were freshly prepared at the beginning of each experimental day. For all groups except for negative control group, an amine fluoride/stannous chloride solution was prepared by solving 4 ml amine fluoride (RonaCare® OlaFlur – Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot: 12033580) and 306 mg stannous chloride (Tin(II) chloride dehydrate – Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot: 231-868-0) in 100 mL distilled water. For positive control this solution was diluted by adding 100 mL distilled water, resulting in a calculated fluoride and stannous ion concentration of 500 and 800 ppm, respectively and a pH of 4.3. For the chitosan-containing solutions, 50 mg of the respective type of chitosan (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Germany) was dissolved in 100 mL of 0.5% acetic acid (Acetic Acid, Morphisto, Frankfurt, Germany). One hundred ml of each one of the chitosan solutions was added to 100 ml of the amine fluoride/stannous chloride solution, resulting in a concentration of 500 ppm  $\text{F}^-$ , 800 ppm  $\text{Sn}^{2+}$  and 0.5% chitosan at pH between 4.4 and 4.5. pH values of all solutions were controlled at the beginning and the end of each experimental day.

In experiment 2 all brushing procedures were performed with a non-fluoridated toothpaste (Lavera Neutral Zahngel – Laverana GmbH & Co. Wennigsen, Germany - Lot: 08990634, for composition see Table 1).

**Table 1:** Group names and specifications of the solutions prepared. The available fluoride concentration and the pH were measured with an ion-selective fluoride electrode in the solutions.

Group	Viscosity (mPas)	Molecular weight (kDa)	pH	free F <sup>-</sup> (ppm)	Active Ingredients
Negative control	---	---	---	---	---
Ch 50 <sup>a</sup>	50	150	4.4	415	Chitosan 0.5% 500 ppm F <sup>-</sup> (AmF) 800 ppm Sn <sup>2</sup> (SnCl <sub>2</sub> )
Ch 500 <sup>b</sup>	500	350	4.4	375	
Ch 1000 <sup>c</sup>	1000	400	4.5	410	
Ch 2000 <sup>d</sup>	2000	450	4.5	405	
AmF <sup>e</sup> + SnCl <sub>2</sub> <sup>f</sup> (Positive Control)	---	---	4.3	420	500 ppm F <sup>-</sup> (AmF) 800 ppm Sn <sup>2</sup> (SnCl <sub>2</sub> )
Toothpaste	RDA	pH	Ingredients		
Lavera Neutral Zahngel	91.5±2.1 <sup>g</sup>	7.1	Sorbitol, Aqua, Hydrated Silica, Xylitol, Maris Sal, Sodium Cocoyl Glutamate, Disodium Cocoyl Glutamate, Xanthan Gum, Glycerin, Carvone, Calendula Officinalis Extract*, CI 75810		

<sup>a</sup> Chitosan 50– Heppe Medical Chitosan GmbH. Halle, Germany (Lot: 212-080513-04)

<sup>b</sup> Chitosan 500 – Heppe Medical Chitosan GmbH. Halle, Germany (Lot: 212-281014-01)

<sup>c</sup> Chitosan 1000 – Heppe Medical Chitosan GmbH. Halle, Germany (Lot: 212-020413-02)

<sup>d</sup> Chitosan 2000 – Heppe Medical Chitosan GmbH. Halle, Germany (Lot: 212-260313-01)

<sup>e</sup> RonaCare® OlaFlur – Merck KGaA. Darmstadt, Germany (Lot: 12033580)

<sup>f</sup> Tin(II) chloride dehydrate – Merck KGaA. Darmstadt, Germany (Lot: 231-868-0)

<sup>g</sup> Value determined in the Indiana University, School of Dentistry, Oral Health Research Institute

In both experiments, specimens were subjected to a cyclic demineralization with 0.5% citric acid (pH 2.9) 6 times per day (starting at 8 a.m.), for 2 minutes each over a total period of 10 days. The time between erosive cycles was 1h, in which the specimens were stored in the mineral salt solution. For the treatments, the specimen holders were put in special racks, which were transferred to containers with 200 mL of the demineralisation, remineralisation or experimental solution. All treatments were performed under gentle agitation in a shaking bath (Model 1083, GLF GmbH, Burgwedel, Germany) with horizontal movements (35/min) at room temperature (25°C). Before transferring specimens from one solution to the

next, they were rinsed with tap water for 30 s. After the first and last demineralisation of each day, the samples were immersed in one of the experimental solutions for 2 min except for the negative control. In E1 the negative control was eroded only. In E2 all specimens were additionally brushed with the non-fluoridated toothpaste for 15 seconds after demineralisation and prior to the immersion in the experimental solutions; the negative control was directly transferred after brushing and rinsing under tap water to the mineral salt solution. Brushing was performed in an automated brushing machine (SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen-Westerham, Germany) with a 'zig-zag' pattern (150 oscillations/min, linear travel path 6 mm, travel velocity 60 mm/s) using ADA (American Dental Association) reference brushes (soft) with load of 200 g.

#### *Tissue loss measurement*

After the last experimental day, the tissue loss was analysed by means of profilometric evaluation. The acrylic resin was carefully removed from the reference area, and the surfaces were checked for acrylic remnants or damages, at 10 fold magnification. For the measurement an optical device was used (MicroProf, Fries Research & Technology GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). In the centre of each specimen, 3 traces were made at intervals of 0.2 mm, each 2 mm in length (1 mm on the reference and 1 mm on the experimental area, 200 pixels, 1000 Hz, sensor H0). Special software was used to interpret the traces (Mark III, Fries Research & Technology GmbH). Two regression lines were constructed on each trace, one on the reference area and one on the experimental area, both 0.5 mm in length. The vertical distance between the regression lines was defined as tissue loss (micrometers;  $\mu\text{m}$ ); the value per specimen was calculated as the mean of the three measurements.

The reproducibility for this method (10-fold measurement of a given specimen,  $\mu\text{m}$ , mean $\pm$ SD) is in case of a large substance loss  $62.90\pm 0.25$  and in case of a small substance loss  $1.60\pm 0.22$ .

#### *Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and Scanning electron microscopy (SEM)*

Ten samples of each group were selected and analysed with EDX to assess the tin content after treatment with experimental solutions. For these analyses a Scanning Electron Microscope (JSM 6510 – JEOL Ltd, Tokyo, Japan) was used,

with an acceleration voltage set to 15kV. Emission current (83  $\mu$ A), take-off angle, life time (200 s), spot size (54) and magnification (2000x) were held constant for all specimens. Representative areas were selected and measured. Spectra were processed using the software package Esprit 1.9 (Quantax Brucker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Germany). The elements carbon, oxygen, calcium, phosphorus and tin have been quantified. After EDX analysis, four specimens of each group were selected out of the ten and sputtered with gold (90 s, Baltec MED/JEOL Ltd). SEM images of the enamel surfaces were also taken at 2000x magnification.

### *Statistical Analysis*

The statistical analysis was performed using SPSS 22 for Windows (Armonk, NY, USA). For tissue loss and for EDX values, in each experiment, the Kolmogorov-Smirnov-test was used to check for normal distribution. As sufficient normal distribution was given, comparison of groups was performed with an analysis of variance (ANOVA) both for all groups (tissue loss and EDX values) and for these groups only treated with solutions containing active agents without comparison to control groups (tissue loss). The latter was performed in order to analyse the differences between the various chitosan types in relation to the positive control and to turn out the active agents' effects. For EDX values, statistics were only made for the carbon and the tin content. Deviations from the homogeneity of variances were observed (Levene's test), therefore, Tamhane's post hoc test was used. For the comparison of the EDX results of both experiments t-test for independent samples were used. The level of significance was set at 0.05.

### **Results**

In both experiments, the negative control group showed the highest tissue loss, with statistically significant differences to all experimental groups treated with solutions containing active agents ( $p \leq 0.001$ ).

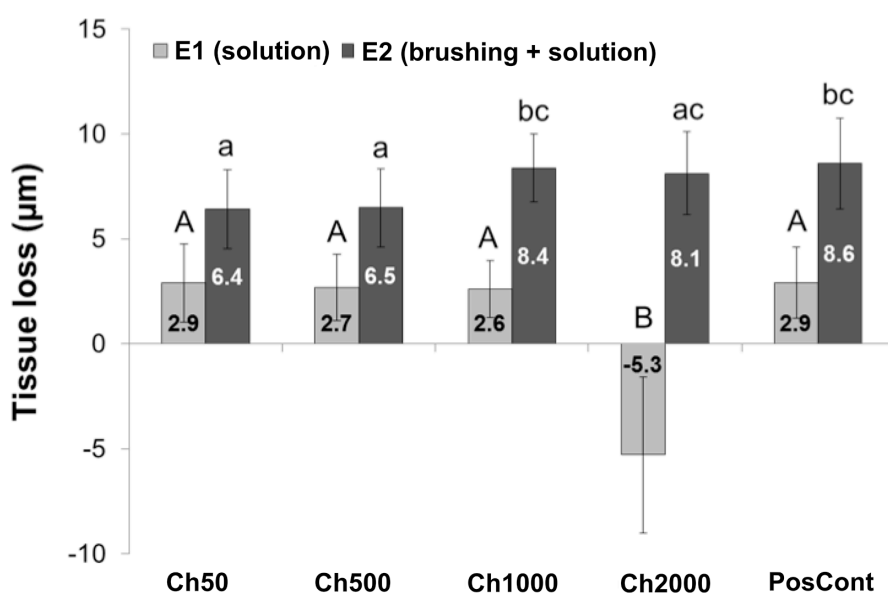
The erosive challenge only (Negative Control – E1) resulted in tissue loss values ( $\mu$ m, mean  $\pm$  standard deviation) of  $13.1 \pm 2.9$ ; the inclusion of physical impacts (Negative Control – E2) increased this value by 29% to  $16.9 \pm 3.9$ .

The experimental solutions in E1 (Figure 1) were able to reduce tissue loss by 77-80%. In case of Ch2000 tissue loss was even completely inhibited with

concomitant formation of precipitates on enamel surfaces. The comparison of the groups using active agents revealed that Ch2000 produced significantly less tissue loss compared to all other groups ( $p \leq 0.001$ ), between the other groups (Ch50, Ch500, Ch1000 and AmF/SnCl<sub>2</sub>), no significant differences were found.

In E2 (Figure 1), the experimental solutions reduced tissue loss in the range of 51-62% compared to the negative control group. The best results were found for the groups treated with Ch50 and Ch500 (62 and 61% reduction, respectively). The additive of Ch50 and Ch500 significantly increased efficacy compared to the positive control (AmF/SnCl<sub>2</sub> solution,  $p \leq 0.05$ ), but not the Ch1000 and the Ch2000 solutions (n.s.).

**Figure 1:** Tissue loss ( $\mu\text{m}$ ; means  $\pm$  standard deviation) for the experimental groups of E1 (treated with solutions containing active agents) and E2 (treated with solutions containing active agents and brushed with fluoride free toothpaste slurry for 15 s).



Statistically significant differences are marked by different upper case letters for E1 and by different lower case letters for E2. Negative values in group Ch2000 in E1 indicate precipitates on the surface.

The tin and carbon content measured with EDX is displayed in table 2. In E1 the negative control and the reference area showed comparable results, with a slight decrease in carbon content, possibly due to demineralisation and removal of organic parts from enamel. The application of each solution led to an increase of carbon and tin content ( $p \leq 0.001$ ), indicating a deposition of organic material and stannous ions from the solution. No differences between the groups were found

except for the Ch2000 group, where slightly more tin (n.s.) and less carbon (n.s.) were found on the surfaces.

In E2, the negative control showed again results comparable to the reference area with the same slight decrease in carbon content as found in E1. The chitosan additive, independent of the type used, caused an increase of carbon compared to negative control ( $p \leq 0.05$ ) as well as to the positive control ( $p \leq 0.05$ ). Tin content was, except for Ch500, significantly increased by all chitosan additives ( $p \leq 0.05$ ) compared to the positive control. In comparison to E1 the carbon and the tin content was decreased in all groups treated with active agents and brushing ( $p \leq 0.001$ ).

**Table 2:** Results of EDX analysis (carbon (C) and tin (Sn) content) on specimen surfaces; mean  $\pm$  standard deviation) of specimens treated with the experimental solutions, from the negative control (Neg.Cont.) and of the reference area.

	C		Sn	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Ch50	*20.87 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	*8.59 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	*13.75 $\pm$ 5.64 <sup>a</sup>	*5.64 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>
Ch500	*20.58 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>	*7.90 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	*13.22 $\pm$ 4.46 <sup>a</sup>	*4.46 $\pm$ 0.96 <sup>abc</sup>
Ch1000	*20.08 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	*7.33 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	*13.22 $\pm$ 4.59 <sup>a</sup>	*4.59 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>
Ch2000	*17.33 $\pm$ 3.37 <sup>a</sup>	*8.18 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>	*14.63 $\pm$ 4.45 <sup>a</sup>	*4.45 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>
AmF/SnCl <sub>2</sub>	*20.22 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	*5.66 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	*13.67 $\pm$ 3.47 <sup>a</sup>	*3.47 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>
Neg. Cont.	4.35 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	4.76 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>
Reference Area	5.98 $\pm$ 1.30		0.20 $\pm$ 0.10	

Different lower case letters indicate statistical significance between groups within one experiment. Between the experiments the values within on element showed, except for the negative control group, statistically significant differences (\*)

Representative SEM images are show in Figure 2. Since similar patterns were observed for most chitosan groups, only images from the solutions with lowest (Ch50) and the highest (Ch2000) viscosity in comparison to the negative and positive control group are shown.

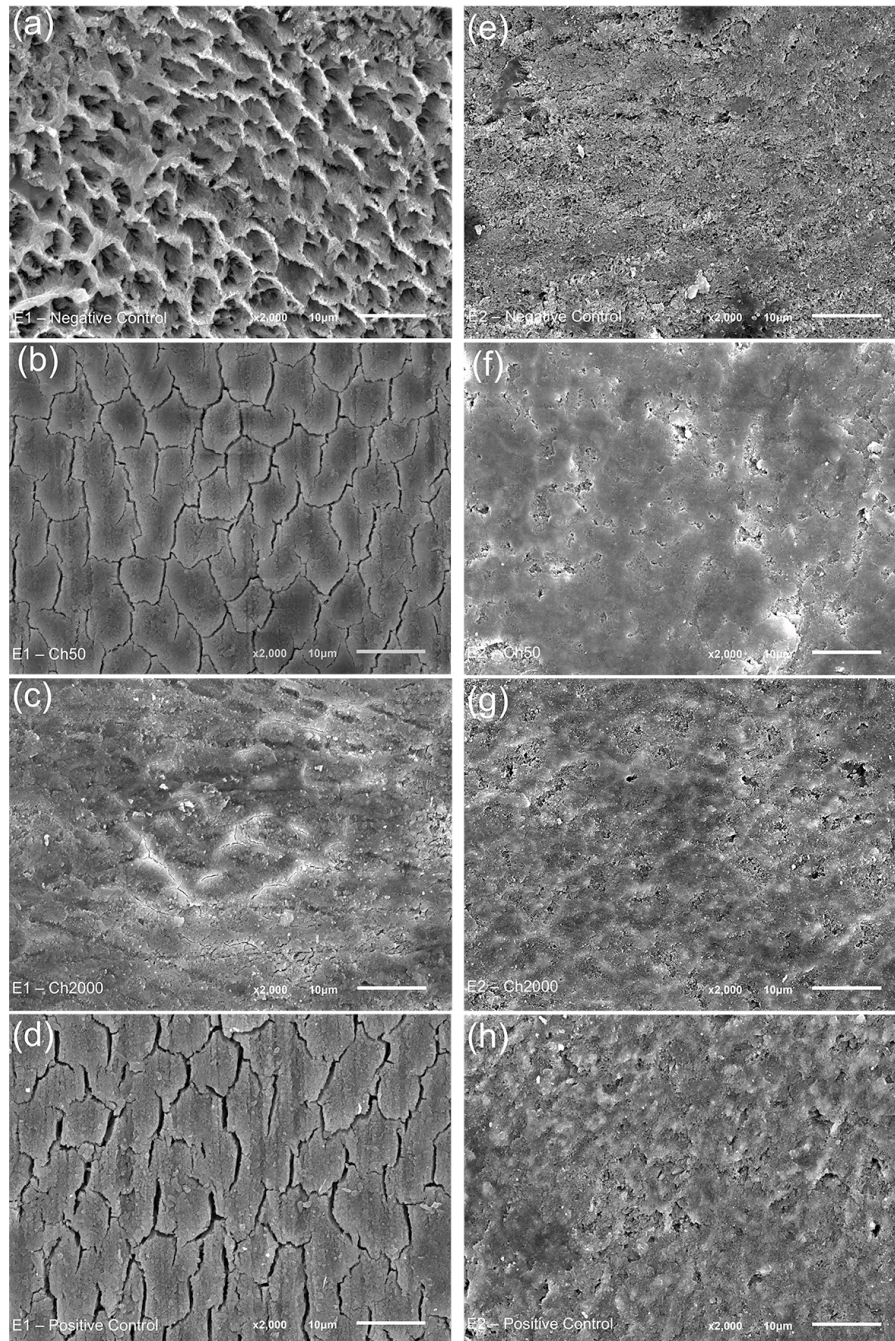
The specimen after erosion only (negative control - E1) showed the expected appearance with the typical etching pattern (Fig. 2a), which was levelled by the brushing procedure (negative control E2, Fig. 2e) and was only vaguely visible after the mechanic impact.

For E1, the treatment with the solutions (Fig. 2b-d) reduced the etched pattern found for the negative control. The appearance after the use of the Ch50 (Fig. 2b) and the positive control (Fig. 2d) was nearly the same. The surface appeared smooth; however, the orientation and the location of the prisms were still visible. For Ch2000 (Fig. 2c), a total coverage of the surface can be visualized, with no visible interprismatic spaces. This corroborates the results of the profilometric measurements finding some precipitates on the enamel surfaces.

With brushing treatment (E2, Fig. 2e-h), the appearance is quite similar in all groups and shows only small differences to the negative control (Fig. 2e). In all groups the surfaces appear smooth and some deposits can be observed. On the surfaces of the Ch50 group (Fig. 2f) these deposits are in tendency more pronounced than on the surfaces from Ch2000 (Fig. 2g) and the positive (Fig. 2h) groups. In the negative control group (Fig. 2e) flattened etching pattern and vaguely visible crystallites can be found.



**Figure 2:** Representative SEM images of the enamel surfaces from E1 (a-d, left column, demineralisation and treatment with solution) and E2 (e-h, right column, demineralisation, brushing and treatment with solution).



NegCont = negative control - (a) and (e); Ch50 = specimens treated with AmF/SnCl<sub>2</sub> solution containing 0.5% Chitosan with the viscosity of 50 mPas - (b) and (f); Ch2000 = specimens treated with AmF/SnCl<sub>2</sub> solution containing 0.5% Chitosan with the viscosity of 2000 mPas - (c) and (g); PosCont = positive control specimens treated with AmF/SnCl<sub>2</sub> solution - (d) and (h).

## Discussion

The present study investigated for the first time the impact of various types of chitosan with different viscosities on erosive and erosive/abrasive tissue loss. The study design was chosen according to current recommendations for erosion and erosion/abrasion studies [Shellis et al., 2011; Wiegand, and Attin, 2011] as well as to previously performed studies in order to achieve comparability [Ganss et al., 2012; Ganss et al., 2014]. The fluoride free toothpaste was used as the impact of the active agents in the solutions on its own should be investigated without any interference with additional active agents in the toothpaste. The positive control was an experimental solution containing amounts of fluoride and stannous ions comparable to a commercially available preparation, which is currently most effective against erosion. The types of chitosan were chosen according to viscosity as provided by the manufacturer and should cover a wide range in this parameter. All chitosan types had a degree of deacetylation (DD) of 80%. This DD is often used for clinical applications, since the biodegradation drastically declines, if the DD is higher than 70% [Lee et al., 1995; Zhang, and Neau, 2001]. In addition the amount of free amino groups increases with an increasing DD and, concomitantly, the reactivity of the molecule to bind to negatively charged surfaces [Prasitsilp et al., 2000].

In both experiments the highest tissue loss was found in the negative control in a dimension comparable to the literature [Ganss et al., 2013]. The positive control without abrasive challenges was able to reduce tissue loss by 78%, corresponding to results of previous studies testing the compounds under more severe conditions [Schlueter et al., 2009b; Schlueter et al., 2010]. The stability of the protective effect of the solution under erosive/abrasive conditions has only seldom been tested [Carvalho, and Lussi, 2014; Ganss et al., 2011]. The cited studies showed a better effect than the present study; however, the study of Carvalho and Lussi investigated only the very first stages of erosion; in the study of Ganss et al. more severe erosive conditions were used and the mode of application differs from the present study. In the present study a reduction by only 51% compared to control group was achieved in E2, thus leaving room for increase of efficacy and justifying the present study.

In comparison to the positive control group, only one chitosan additive (Ch2000) showed any effect under erosive conditions (E1) with a complete inhibition

of substance loss and a concomitant formation of remarkable precipitates on the surfaces; all other solutions showed the same effect as the positive control.

Chitosan is a natural polysaccharide derived from chitin mainly from shells of shrimps and other crustaceans [Synowiecki, and Al-Khateeb, 2003]. It is a biopolymer, which is positively charged [Tharanathan, and Kittur, 2003] and strongly binds with its amino groups [Lee et al., 2012] to surfaces with negative zeta-potential [Young et al., 1997], such as dental hard tissue, both pellicle coated [van der Mei et al., 2007] or without pellicle. Depending on its molecular weight properties, such as its viscosity and the shear strength of chitosan deposits, formed on surfaces after application, changes [Rinaudo et al., 2005]. It has been shown that rinsing procedures have the potential to remove weakly bound chitosan with low molecular weight [Lee et al., 2012]. The Ch2000 solution, however, contained a chitosan with a relatively high molecular weight, which probably formed deposits more stable than the others against shear forces appearing during the rinsing procedure after solution application.

It is well known that the effect of stannous ion containing fluoride solutions depends on the retention and incorporation of stannous ions on and in the dental hard tissue [Schlueter et al., 2009a]. The levelled efficacy of the different solutions is also reflected in the EDX results. No significant differences were found in the tin as well as in the carbon content for all solutions, even not for the Ch2000 group or the positive control. This is of particular interest since another study has shown at least for toothpastes that the amount of retained tin can be increased by the addition of chitosan [Ganss et al., 2014]. This has not been verified for the experimental solutions tested without any mechanical impact in the present study. Tin seems to be retained only to a maximum on surfaces if a given concentration is used [Schlueter et al., 2009a]. It might be that in the present study such a maximum of retention was already achieved by the positive control, which cannot be further increased by chitosan additives. In addition, one might have been expected that the organic polymer leads to an enrichment of carbon on the surface, at least if deposits are formed. However, the carbon content was nearly the same in all groups treated with active agents. This might be due to the presence of the organic fluoride compound (Olaflur) as a source for fluoride, which induces on its own an increase of carbon content on the surface. This, probably, masked an additional retention of chitosan. The use of amine fluoride, however, was necessary to stabilise the stannous ions in

the solution [Mühlemann, and Saxer, 1981; Mühlemann, and Schmid, 1985] and can hardly be replaced by another fluoride compound.

Tissue loss was increased by brushing in E2 by approximately 30% in the negative control and by 120-250% in the other groups. Additional brushing abrasion changed the effect of the chitosan additives in E2 compared to E1. In E2 the additive of Ch50 and Ch500 led to significant lower tissue loss compared to the positive control, but not the Ch1000 as well as the Ch2000 additive. The latter two showed an efficacy comparable to the positive control. Interestingly, the good effect of Ch2000 in E1 seems to be counteracted by the brushing procedure. Probably, the Ch2000 precipitates cannot offer resistance to the applied brushing forces used, anymore, independent of the potentially higher shear strength of such chitosan deposits. Other effects than the mere formation of chitosan deposits seem to play a role under erosive-abrasive conditions.

In contrast to E1, where simple solid-liquid interactions played a role, complex chemo-mechanical interactions occurred at the interface in E2. The study design included an erosive demineralisation, followed by abrasion and, as recommended for clinical purposes, an application of the experimental solutions after brushing as a finalisation of the oral hygiene procedure. This means that the solution treated specimens are exposed to one abrasive procedure and at least one (overnight storage) or even five erosive demineralisations (within one experimental day), before the solution was applied once again. Therefore, the effects found speak for a substantivity or long retention of solutions' components.

In a comprehensive study [Lee et al., 2012] the reaction between hydroxyapatite, coated with artificial saliva, and chitosan has been investigated. The study has shown that chitosan forms layers on the surface, which can be restructured by an acid treatment with a measurable increase of the coatings' viscoelasticity. A subsequent rinsing with distilled water recovered only in parts the previous condition. Different durations of acid impact seem to have different effect; the shorter the impact the more the layer is modified and in parts also thinned [Lee et al., 2012]. Acid treatment and rinsing are procedures also occurring in the present study, possibly modifying or even thinning potential chitosan coatings. Two aspects have, however, to be considered. First, the authors in the cited study used mucin for the artificial saliva which is known to form double layers with chitosan [Dedinaite et al., 2005]. Second, only one type of chitosan with a very low molecular weight of 60 kDa was

tested [Lee et al., 2012]. The lowest molecular weight used in the present study, however, was 150 kDa. The molecular weight affects not only the viscosity but also the reactivity and the tendency to form stabilising cross links under oxidation processes [Lee et al., 2012]. It can only be speculated, why the efficacy of the low viscosity chitosan types was better than that of the high viscosity ones; however, the lower molecular weight implies shorter chains of the biopolymer and as a consequence more available binding sites, necessary for retention on the enamel surface. Retention of the molecule, however, occurred in all groups after solutions' application, which was indicated by a significant increase in carbon content compared to positive control. Maybe, differences in type or stability of formed layer differed between groups. The type of formed layers on surfaces after chitosan application depends on several factors. The pH, the duration of application and the pH of the solution, where chitosan is solved in play a role as well as the concentration of the chitosan itself.

In a study investigating the absorption of the molecule on poly (lactide-co-glycolide) particles, chitosan forms organic monolayers so called Langmuir-layers on treated surfaces if concentrations up to 0.05% are used [Guo, and Gemeinhart, 2008]; at concentrations higher than 0.05% multilayer are also formed. The concentration used in the present study was 10-fold higher, meaning that multilayers are most likely formed. pH changes during and after application play also a role. The binding forces between the underlying substrate and the chitosan layer decreases if the pH is increased [Claesson, and Ninham, 1992]; however, this parameter will be recovered if the pH is again decreased. Interestingly, no loss of chitosan was found in the cited study after pH changes, indicating that the binding forces were still high enough. In the present study, a pH cycling was performed leading to alternating changes in binding forces. The cycles end with a rinsing procedure and, therefore, a more or less neutral pH. Chitosan at acidic pH shows cationised amino groups, which can bind via ionic binding to the dental hard tissue [Kampf et al., 2004]. An increase in pH, however, would reduce the ionic binding. Perhaps other binding modes play under those conditions a role, such as real atomic bindings, which might be less impacted by the pH. For atomic bindings the abovementioned increase of free binding sites in case of shorter chains of chitosan with lower molecular weight might be relevant. This would mean that the reactivity between the Ch50 and Ch500 chitosan and the dental hard tissue but also to the other components used in the

study is higher than that of the other two types. This could perhaps lead to a higher stability of a formed layer against abrasive forces and following to a better effect of Ch50 and Ch500 in comparison to Ch1000, Ch2000 and to the positive control. This consideration is in tendency also supported by the SEM findings of E2, showing slight differences between the Ch50 and the Ch2000 group but not between the Ch2000 and the positive control.

Concomitantly, the chitosan additive led in E2, in contrast to E1, also to an increase in tin content on the surface by approximately 30% to 60% compared to the positive control group. This clearly corroborates the results of the above mentioned study [Ganss et al., 2012]. However, only minor differences were found between the four chitosan groups, not being able to explain the better efficacy.

In conclusion, the exact mode of action between the dental hard tissue on the one hand and the fluoride ions, the stannous ions and the chitosan as active agents on the other hand remains unclear. However, the study has clearly shown that different types of chitosan can lead to different effects depending on the conditions used. It seems that chitosan with a higher molecular weight and therefore a higher viscosity shows better properties under erosive conditions without any mechanic impact than the types with lower weight; however, a lower molecular weight seems to be the better choice under chemo-mechanical challenges, where complex interactions between the dental hard tissue, the acid, the toothbrush and the abrasives of the toothpaste as well as the chitosan molecule and the other active ingredients of the solutions occur. Further research investigating the interaction in detail remains necessary, which might be further complicated if the active agents are used in toothpastes, preparations with complex composition or if they are used under *in situ* or *in vivo* conditions interacting with the organic components of the saliva.

### **Acknowledgements**

The study was supported by by Coordination of Training of Higher Education Graduate/Capes, Brazil. We gratefully thank B. Meier, University of Giessen, for her invaluable support as well as Professor A. Hara, Indiana University, for the measurement of the RDA value of the toothpaste.

## References

Arnaud TM, Neto BD, Diniz FB: Chitosan effect on dental enamel remineralization: An in vitro evaluation. *J Dent* 2010 Jun 19;38:848–852.

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 Sep;19:1557–1561.

Carvalho TS, Lussi A: Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. *J Dent* 2014 Apr;42:450–459.

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

Dedinaite A, Lundin M, Macakova L, Auletta T: Mucin-chitosan complexes at the solid-liquid interface: multilayer formation and stability in surfactant solutions. *Langmuir* 2005 Oct 11;21:9502–9509.

Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent* 2012;doi:10.1016/j.jdent.2012.08.005:-.

Ganss C, Klimek J, Schlueter N: Erosion/Abrasion-Preventing Potential of NaF and F/Sn/Chitosan Toothpastes in Dentine and Impact of the Organic Matrix. *Caries Res* 2014;48:163–169.

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

Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 2010;89:1214–1218.

Ganss C, Schulze K, Schlueter N: Toothpaste and erosion. *Monogr Oral Sci* 2013;23:88–99.

Guo C, Gemeinhart RA: Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Oct;70:597–604.

Hughes JA, West NX, Addy M: The protective effect of fluoride treatments against enamel erosion in vitro. *J Oral Rehab* 2004;31:357–363.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM: Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. *Caries Res* 2011;45:518–523.

Kampf N, Raviv U, Klein J: Normal and Shear Forces between Adsorbed and Gelled Layers of Chitosan, a Naturally Occurring Cationic Polyelectrolyte. *Macromolecules* 2004 Feb;37:1134–1142.

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

Lee KY, Ha WS, Park WH: Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials* 1995 Nov;16:1211–1216.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S: Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *CochraneDatabaseSystRev* 2004;CD002781–.

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

Mühlemann HR, Saxer UP: Reduction of plaque and gingivitis by stannous fluoride stabilised with amine fluoride (Abstr.). *Caries Res* 1981;15:186–.

Mühlemann HR, Schmid H: Orale Kompositionen mit stabilisierten Zinnsalzen. *EuropPat* 1985;NR. 0 026 539:-.

No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP: Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002 Mar 25;74:65–72.

Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P: Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J Mater Sci Mater Med* 2000 Dec;11:773–778.

Rinaudo M, Auzely R, Vallin C, Mullagaliev I: Specific interactions in modified chitosan systems. *Biomacromolecules* 2005 Oct;6:2396–2407.

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* 2009a;117:427–434.



Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Caries Res* 2013;47:574–581.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C: In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. *J Dent* 2009b;37:944–948.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C: Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand* 2010;68:180–184.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A: Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:69–77.

Synowiecki J, Al-Khateeb NA: Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:145–171.

Tharanathan RN, Kittur FS: Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:61–87.

Uysal T, Akkurt MD, Amasyali M, Ozcan S, Yagci A, Basak F, et al.: Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? *Angle Orthod* 2011 Mar;81:319–325.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC: Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2005;39:371–379.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *CochraneDatabaseSystRev* 2010;CD007868–.

Wiegand A, Attin T: Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:53–59.

Young A, Smistad G, Karlsen J, Rolla G, Rykke M: Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the Coulter DELSA 440. *Adv Dent Res* 1997 Nov;11:560–565.

Zhang H, Neau SH: In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 2001 Jun;22:1653–1658.

### 3. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os dois estudos realizados demonstram o efeito dos diferentes agentes anti-erosivos nas diferentes condições testadas. A presença do estanho teve sua eficácia demonstrada nos dois estudos e esses resultados são congruentes com os apresentados na literatura (Ganss et al., 2011; Algarni et al., 2015; Hove et al., 2014; 2015). A combinação de quitosana, estanho e flúor demonstrou efetividade nos dois estudos, sempre apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (dentífrico placebo ou sem tratamento com soluções). Em ambos, foi evidenciada a influência das condições experimentais sobre o mecanismo de ação dos compostos testados.

A associação do estanho ao flúor proporciona o aumento da disponibilidade de íons fluoreto frente ao tecido desmineralizado (Ganss et al., 2011; Comar et al., 2012, Stenhagen et al., 2013). Em caso de erosão, essa combinação já foi demonstrada como a mais efetiva para prevenir a perda dos tecidos dentais e aumentar a sua resistência contra os desafios erosivos, em estudos *in vitro* (Ganss et al., 2011; Algarni et al., 2015), *in situ* (Huiysmans et al., 2011; Hove et al., 2014; 2015) e *in vivo* (Young et al., 2006). O estanho pode ser associado ao flúor por meio de fluoreto de estanho ou a partir do cloreto de estanho. Com o fluoreto de estanho, há uma concentração limite a ser utilizada em dentífricos ou enxaguatório bucais, enquanto que, o cloreto de estanho pode ser utilizado em uma maior concentração. Com isso, pode-se aumentar a disponibilidade de íons estanho para compor a barreira física e estável que protege o tecido dental contra a desmineralização (Schlueter et al., 2009). Os resultados obtidos com o uso de estanho chegam a demonstrar redução da perda de tecido em até 80% (Ganss et al., 2011; Hooper et al., 2007; Stenhagen et al., 2013; Bellamy et al., 2014). De acordo com Lussi & Carvalho 2015, o futuro das pesquisas com agentes anti-erosivos depende da inclusão e do desenvolvimentos de outros compostos que possam agir em conjunto com o flúor, maximizando seu efeito anti-erosivo. Nesse contexto, a quitosana, um biopolímero natural, se apresenta como uma proposta promissora, visto que os seus resultados até então obtidos encorajam as pesquisas com essa molécula em relação aos seus efeitos frente a condição de erosão (Ganss et al., 2012; Carvalho & Lussi, 2014; Schlueter et al., 2013; 2014).

Dentro desse contexto, a quitosana foi incluída nos dois estudos realizados. No Capítulo 1, o uso desse composto foi sugerido associado ao flúor e

ao estanho como previamente utilizado por Schlueter et al., 2013; 2014. Frente aos resultados prévios da literatura e aos obtidos no primeiro estudo dessa tese, a quitosana foi o objeto de estudo no Capítulo 2, em que a premissa foi avaliar qual o tipo molecular desse composto que apresenta melhor desempenho e efetividade frente à erosão. Nos dois estudos, a associação de estanho e flúor foi também avaliada e, em ambos, os resultados dessa combinação foi efetivo, uma vez que, seja na forma de dentifrício ou solução, o seu efeito foi estatisticamente significativo em relação ao controle.

No Capítulo 1, o efeito da combinação de flúor (NaF), estanho (SnCl<sub>2</sub>) quitosana – NaF/Sn/Ch – foi superior a apenas o fluoreto de sódio (NaF), porém, não superou os efeitos obtidos com o fluoreto de estanho (SnF), sob as condições de fluxo salivar normal e reduzido. Comparando as duas amostras de voluntários, não houve diferença significativa para o efeito do NaF/Sn/Ch para os dados de microdureza, %SMH<sub>total</sub> e %SMR. A análise de Pearson não demonstrou correlação significativa para o NaF/Sn/Ch e a saliva, ou seja, o seu desempenho não parece ser dependente do fluxo salivar. Frente a esse resultado, suscita-se o questionamento de o quão dependente da saliva a quitosana é para prover sua ação remineralizante. Ainda, com esse dado, justifica-se a realização de estudos *in vitro* que investiguem o potencial dessa molécula, mesmo que na presença de saliva artificial, como realizado no Capítulo 2. Nesse segundo estudo, todas as moléculas de quitosana, com diferentes peso molecular e viscosidade, associadas ao flúor (AmF) e ao estanho (SnCl<sub>2</sub>) foram efetivas em reduzir a perda de esmalte em comparação com a solução do grupo controle positivo (AmF + SnCl<sub>2</sub>). Em cada um dos experimentos realizados no Capítulo 2, a ação da quitosana se apresentou modulada pelas condições experimentais testadas, sendo que os resultados para perda de tecido (perfilometria), retenção de estanho (EDX) e microscopia (MEV) foram diferentes frente aos desafios erosivo ou erosivo/abrasivo.

O interesse pela quitosana, em diversas indústrias e no campo da pesquisa odontológica, é devido a sua propriedade de agir como agente carreador de moléculas (Jain et al., 2013) e de, no caso da desmineralização, se depositar sobre o tecido lesionado formando um complexo de camadas que interfere no processo des-remineralização (van der Mei et al., 2007; Lee et al., 2012; Schlueter et al., 2013). A formação dessas camadas foi evidenciada no segundo estudo, porém se mostrou altamente influenciada frente as condições experimentais. No

Experimento 1 desse estudo *in vitro*, todas as moléculas de quitosana testadas foram eficientes. Porém a molécula com maior viscosidade e peso molecular (Ch2000) foi a mais efetiva em formar uma camada de precipitados estáveis sobre o esmalte erodido resultando na redução completa da perda desse tecido. Esse resultado é inovador, uma vez que, até então, sabia-se apenas que moléculas de quitosana de baixo peso molecular (60 KDa) não apresentam estabilidade frente a tratamentos enxaguatório com água ou solução ácida (Lee et al., 2012), como os realizados nesse estudo. No entanto, essa camada não foi estável frente aos episódios de abrasão (Experimento 2), em que as moléculas menores e menos viscosas (Ch50 e Ch500) se mostraram mais eficazes em reduzir a perda de tecido e também em promover maior retenção de íons estanho (Ch50) sobre o esmalte. Tais resultados são importantes pois demonstram o potencial da quitosana frente as diferentes condições.

Sabe-se que a ação da quitosana é modulada pelo seu peso molecular e pelas variações de pH (Claesson & NInham, 1992; Rinaudo et al., 2005; Guo & Geminhart, 2008; Lee et al., 2012), uma condição constante no desenho experimental do estudo *in vitro*. A inclusão de forças abrasivas em adição a desafios erosivos ocasiona o aumento da perda de tecido de maneira generalizada (Carvalho & Lussi, 2015; Ganss et al., 2011). Frente a essa interação químico-mecânica (erosão + abrasão), as moléculas mais efetivas são aquelas capazes de aderir ao tecido com ligações que não seja apenas iônicas, que são influenciáveis pelo pH, mas também com ligações do tipo covalente, que são mais estáveis (Kampf et al., 2004; Guo & Geminhart, 2008). Ainda, moléculas menores, como o Ch50, resultam na ligação de maior quantidade de moléculas ao mesmo tempo em que deixa sítios de ligações livres para outros agentes remineralizantes, como os íons flúor e o estanho. Essa hipótese é suportada pelos resultados do EDX que mostram que o Ch50 resulta em maior retenção de estanho no tecido, com diferença significativa em relação ao grupo controle positivo.

A diferença no desempenho da quitosana entre os dois estudos realizados pode ser devido a particularidades da formulação do dentifrício contendo NaF/Sn/Ch do Capítulo 1. De acordo com a literatura, o cloreto de estanho precisa ser estabilizado para ter sua efetividade garantida ao longo do tempo. Para isso, deve-se utilizá-lo em associação com o fluoreto de amerício (AmF) (Mühleman & Schmid, 1985), como no Capítulo 2, ou com digluconato de sódio (Algarni et al.,

2015). No Capítulo 1, nenhum desses compostos foram utilizados e, para otimizar a efetividade da formulação dos dentifrícios ao máximo, eles eram sempre manipulados imediatamente antes de cada período experimental.

No Capítulo 1, os diferentes agentes anti-erosivos testados também foram fortemente influenciados pelas condições do estudo, nesse caso, o fluxo salivar. O SnF apresentou o melhor desempenho independente da quantidade de saliva, porém, sua efetividade foi maior para o grupo com fluxo salivar normal, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com fluxo reduzido (%SMR). Esse resultado foi ainda confirmado pela análise de Pearson, que demonstrou correlação positiva entre esse dentifrício e o fluxo salivar em todos os parâmetros testados. Uma vez que a qualidade da saliva está relacionada ao fluxo salivar (Tenovuo et al., 2007; Jager et al., 2011), tais dados são suportados, pois o SnF é um composto com ação efetiva e modulada pela sua ligação a íons e proteínas da saliva (Bellamy et al., 2014; Algarni et al., 2015). O NaF também apresentou efeito dependente da saliva segundo a análise de Pearson. Embora não tenha sido encontradas diferenças significantes para o NaF quando o fluxo salivar é comparado, no grupo com fluxo reduzido, o seu efeito foi ainda mais limitado, uma vez que não apresentou diferença estatística em relação ao placebo (%SMH<sub>total</sub> e %SMR). Esse resultado já foi previamente encontrado na literatura, mesmo em condições normais de salivação, em estudos *in situ* (Magalhães et al., 2008; Faller et al., 2011; Bellamy et al., 2014; Hove et al., 2014; 2015). No presente estudo, além de o NaF apresentar efeito restrito devido a sua inabilidade em condições de baixo pH, como a erosão (Huiysmans et al., 2011; West et al., 2015), sob menor quantidade de saliva, sua ação não é garantida uma vez que pode não haver sua dissociação completa e, portanto, disponibilização de íons flúor.

Além das diferenças supracitadas quando se comparou as duas condições para fluxo salivar no estudo *in situ*, para os dados de %RER, foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de voluntários para todos os agentes anti-erosivos testados. Para esse parâmetro, que avalia a resistência do tecido a um desafio erosivo, os valores encontrados foram sempre melhores para o caso de fluxo salivar normal. Dessa forma, pode-se claramente observar que a quantidade de saliva, e indiretamente a sua qualidade, exerce influência sobre o mecanismo de ação dos diferentes agentes anti-erosivos testados nos dentifrícios. A importância da saliva frente a condição de erosão é confirmada na literatura (Hara et

al., 2006; Hara & Zero, 2014), devido a sua composição e propriedades, que faz com que a saliva seja eficiente em modular o processo des-remineralização, favorecendo a reparação tecidual (Buzalaf et al., 2012).

Sabe-se que, além da redução do fluxo salivar, a hipossalivação pode ocasionar outras sequelas aos pacientes, como alteração na composição, pH e capacidade tampão da saliva (Meurman et al., 1994; Lieshout et al., 2013), sendo importante a avaliação dessas condições *in situ*. Até o momento, os estudos disponíveis que variam o fluxo salivar são apenas *in vitro* (Scaramucci et al., 2013; 2015), e não consideram fatores biológicos como por exemplo, a presença de proteínas da saliva. Dessa forma, é relevante a realização de estudos *in situ* que contemplem essa variável, como realizado no Capítulo 1. Todos os voluntários com hipossalivação apresentavam fluxo salivar menor que 0,8 mL/min. Para melhor homogeneizar a amostra, foram incluídos os voluntários que apresentassem esse sintoma como uma sequela resultante do tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço. No entanto, pode-se observar uma variabilidade na amostra no que concerne ao fluxo salivar, que variou de 0,1 a 0,7 mL/min, que provavelmente refletiu em uma maior variabilidade para a análise de microdureza nesse grupo. Apesar disso e também do tamanho da amostra (n=10), diferenças estatísticas foram evidenciadas, o que confere relevância aos resultados obtidos. Frente a essas limitações, é importante considerar que voluntários com fluxo salivar reduzido são uma amostra peculiar, difícil de se compor e também de se homogeneizar. Isso porque, em geral, esses pacientes são mais senis, e apresentam alguma debilidade, física ou emocional, razão pela qual foi planejada um período experimental curto (4 horas).

Considerando as limitações de ambos os estudos, os resultados obtidos são salientes e revelam a importância de se pesquisar a cerca dos agentes anti-erosivos, encorajando para a realização de pesquisas futuras. A partir estudo *in situ*, pode-se entender que a ação limitada do fluoreto de sódio, o composto mais comumente utilizado nos dentifrícios, suscita que outros agentes anti-erosivos sejam estudados e utilizados para tratamento e prevenção da erosão dental. O fluoreto de estanho apresentou marcada eficácia, sendo então importante a busca por componentes que complementem sua ação anti-erosiva, como a quitosana. A quitosana se apresentou efetiva nos dois estudos realizados, sendo que, a partir do Capítulo 2, pode-se inferir que diferentes moléculas de quitosana levam a diferentes

efeitos dependendo das condições em que é utilizada. Dessa forma, estudos futuros devem atentar para que a utilização desse composto em associação com outros agentes anti-erosivos seja otimizada ao máximo para que se consiga produtos, dentifrícios e soluções enxaguatórias, inovadores para o tratamento e prevenção da erosão dental.

#### **4. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos e dentro das limitações dos estudos realizados, pode-se concluir que:

##### **→ Capítulo 1:**

O fluxo salivar é um fator determinante para o mecanismo de ação dos agentes anti-erosivos utilizados nos dentifrícios em estudo. Independente do fluxo salivar, os dentifrícios contendo estanho apresentaram o melhor desempenho em relação ao seu efeito anti-erosivo. A adição de quitosana ao dentifrício contendo flúor e estanho não resultou em aumento da sua efetividade. O fluoreto de sódio apresentou eficácia limitada, principalmente para os pacientes com fluxo salivar reduzido, em que esse dentifrício apresentou resultados estatisticamente similares aos obtidos com o uso do dentifrício placebo.

##### **→ Capítulo 2:**

O efeito anti-erosivo da quitosana foi demonstrado, uma vez que nas condições de erosão e erosão/abrasão, a adição dessa molécula resultou em melhora do desempenho da solução, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle positivo. Porém, diferentes tipos de quitosana podem levar a diferentes efeitos dependendo das condições testadas. Frente apenas ao desafio erosivo, a quitosana com maior viscosidade (Ch2000) apresentou a melhor performance em reduzir o desgaste do esmalte, com concomitante formação de precipitados sobre o tecido. Porém, esses precipitados parecem não oferecer resistência frente ao desafio abrasivo, uma vez que, sob condições de erosão/abrasão, as soluções com quitosana de menor peso molecular (Ch50 e Ch500) resultaram em menor perda de espessura do esmalte e maior deposição de estanho sobre o tecido (Ch50). Esse resultado indica que, quitosana com diferentes peso molecular e viscosidade pode induzir a formação de camadas sob o esmalte com diferentes níveis de resistência quando o impactos mecânicos de escovação, bem como o uso de dentifrícios, são associados ao desafio erosivo.



## <sup>1</sup>REFERÊNCIAS

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent.* 2005; 33: 243-252.

Algarni AA, Mussi MC, Moffa EB, Lippert F, Zero DT, Siqueira WL et al. The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0128196.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1978; 57: 933-938.

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: 1007–1013. doi: 10.1016/j.jdent.2013.08.018.

Bellamy PG, Harri R, Date RF, Musset AJS, Manly A, Barker ML, Hellin N, West NX. In situ clinical evaluation of a stabilised, stannous fluoride dentifrice. *Int Dent J.* 2014; 64 Suppl 1: 43-50. doi: 10.1111/idj.12102.

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

Carvalho TS, Bönecker M, Altenburger MJ, Buzalaf MAR, Sampaio FC, Lussi A. Fluoride varnishes containing calcium glycerophosphate: fluoride uptake and the effect on in vitro enamel erosion. *Clin Oral Invest.* 2014; 19(6): 1429-36. doi: 10.1007/s00784-014-1363-6.

Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Tveit AB, Wiegand A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear-diagnosis and treatment. *Clin Oral Invest.* 2015; 19(7): 1557-61. doi: 10.1007/s00784-015-1511-7

Cheab Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Carie Res.* 2011; 45(2): 107-12. doi: 10.1159/000324803

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

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

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomão PA, Grizzo LP, Magalhães AC. Effect of NaF, SnF<sub>2</sub>, and TiF<sub>4</sub> toothpaste on bovine and dentin erosion-abrasion in vitro. *Int J Dent*. 2012; 2012: 134350. doi: 10.1155/2012/134350.

Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139 Supp: 18S-24S.

Dedinaite A, Lundin M, Macakova L, Auletta T. Mucin-Chitosan complexes at the solid-liquid interface: multilayer formation and stability in surfactant solutions. *Langmuir*. 2005;21:9502-9509.

Faller RV, Eversole SL, Tzeghai GF. Enamel protection: A comparison of marketed dentifrice performance against dental erosion. *Am J Dent*. 2011; 24: 205-210.

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

Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: Effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res*. 2011; 45:581-589. doi: 10.1159/000334318.

Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpaste on enamel erosion/abrasion. *Journal of Dentistry* 2012; 40: 1036-1043. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.005.

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

Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/Abrasion-Preventing potential of NaF and F/Sn/Chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res*, 2014; 48(2): 163-9. doi: 10.1159/000354679.

Guo C, Gemeinhart RA Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70:597–604. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.008.

Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MS, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res.* 2006; 85(7): 612-6.

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

Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent.* 2007; 35: 476-481.

Hove L, Holme B, Ogaard B, Wilumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF<sub>4</sub>, SnF<sub>2</sub> and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white interferometry. *Carie Res.* 2006; 40(5): 440-3.

Hove LH, Stenhagen KR, Holme B, Tveit AB. The protective effect of SnF<sub>2</sub> containing toothpaste and solution on enamel surfaces subjected to erosion and abrasion in situ. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014; 15: 237-243. doi: 10.1007/s40368-013-0107-7.

Hove LH, Stenhagen KR, Mulic A, Holme B, Tveit AB. May caries-preventive fluoride have an effect on dental erosive wear? An in situ study. *Acta Odontol Scand.* 2015; 73: 114–120. doi: 10.3109/00016357.2014.956146.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. 2011. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride containing toothpaste. *Carie Res.* 45(6):518-23. doi: 10.1007/s40368-013-0107-7.

Jain A, Gulbake A, Shilpi S, Jain A, Hurkat P, Jain SK. A new horizons in modifications of chitosan: syntheses and applications. *Crit Rev Ther Drug Syst.* 2013; 30(2): 91-181.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monograph 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. *Carie Res.* 2011; 45:532-537. doi: 10.1159/000331938.

Jager DHJ, Vissink A, Timmer CJ, Bronkhorst E, Vieira AM, Huysmans MCDNJM. Reduction of erosion by protein-containing toothpastes. *Carie Res.* 2013; 47: 135-140. doi: 10.1159/000344016.

Järvinen VK, Rytömaa JI, Leinonen OP. 1991. Risk factor in dental erosion. *J Dent Res.* 70(6):942-947.

Jensdottir T, Buchwald C, Nauntofte B, Hansen HS, Bardow A. Saliva in relation to dental erosion before and after radiotherapy. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71: 1008-1013. doi: 10.3109/00016357.2012.741704.

Jham BC, da AR SF. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006; 72(5): 704-708.

Jham BC, Reis PM, Miranda EL, Lopes RC, Carvalho AL, Schper MA, Freire AR. Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. *Clin Oral Invest.* 2008; 12: 19-24.

Keegan GM, Smart JD, Ingram MJ, Barnes LM, Burnett GR, Rees GD. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. *J Dent* 2012; 40: 229-240. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.012.

Kampf N, Raviv U, Klein J. Normal and shear forces between adsorbed and gelled layers of chitosan, a naturally occurring cationic polyelectrolyte. *Macromolec.* 2004;37:1134–1142.

Khambe D, Eversole SL, Mills T, Faller RV. Protective effects of SnF<sub>2</sub> – Part II. Deposition and retention on pellicle-coated enamel. *Int Dent J.* 2014 Suppl 1: 11-15. doi: 10.1111/idj.12097

Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci,* 2012; 385:235-243. doi: 10.1016/j.jcis.2012.06.074.

Lieshout HFJ, Bots CP. 2014. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. *Clin Oral Investig*. 18(1):17-24.

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

Lussi A, Jaeggi T. Erosion-diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest*. 2008; 12 Suppl 1: 5-13.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganns C. Dental erosion – an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res*. 2011; 42: 2-12. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01112.x.

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

Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Carie Res*. 2015; 49 Suppl 1: 18-29. doi: 10.1159/000380886.

Magalhães AC, Rios D, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Machado MAAM. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Carie Res*. 2007; 41: 77-79.

Magalhães AC, Rios D, Marthinho CCR, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Machado MAAM. The influence of residual salivary fluoride from dentifrice on enamel erosion: an in situ study. *Braz Oral Res*. 2008; 22(1):67-71.

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.

Magalhães AC, Wiegand A, Young A, Schlueter N. Dental Erosion. *Int J Dent*. 2012; 2012: 356021. doi: 10.1155/2012/356021.

Meurman JH, ten Cate HM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104: 199-206.

Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Carie Res.* 2010; 44: 135-140. doi: 10.1159/000302902.

Mühlemann HR, Schmid H. Orale Kompositionen mit stabilisierten Zinnsalzen. *EuropPat* 1985; NR. 0 026 539:-.

Ramsay DS, Rothen M, Scott JA, Cunha-Cruz J. Tooth wear and the role of salivary measures in general practice patients. *Clin Oral Invest.* 2014; 19(1): 85-95. doi: 10.1007/s00784-014-1223-4.

Ravi Kumar MNV, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004; 104: 6017-6084.

Rinaudo M, Auzely R, Vallin C, Mullagaliev I. Specific interactions in modified chitosan systems. *Biomacromolec.* 2005;6:2396–2407.

Rios D, Magalhães AC, Braga RO, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 1652-1656.

Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Frank NE, Hara AT. Sodium fluoride effect on erosion-abrasion under hyposalivatory simulating conditions. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1457-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.06.004.

Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Frank NE, Zero DT. In vitro effect of calcium-containing prescription-strength fluoride toothpastes on bovine enamel erosion under hyposalivation-simulating conditions. *Am J Dent.* 2015; 28(1): 18-22.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J and 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: 427-434. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00647.x.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2010; 68:180-4. doi: 10.3109/00016350903555395.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. *Clin Oral Invest.* 2011; 15: 361-367. doi: 10.1007/s00784-010-0386-x.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is Dental Erosion Really a Problem? *Adv Dent Res.* 2012; 24(2): 67-71. doi: 10.1177/0022034512449836.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Carie Res.* 2013; 47: 574-581. doi: 10.1159/000351654.

Schluter N, Tveit AB. Prevalence of erosive tooth wear in risk groups. *Monograph Oral Sci.* 2014; 25: 74-98. doi: 10.1159/000359938

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn<sup>2+</sup>-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy – a controlled randomized in situ trial. *Clin Oral Invest.* 2014; 18(1): 107-115. doi: 10.1007/s00784-013-0941-3.

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. *Carie Res.* 2013; 47: 601-611. doi: 10.1159/000351641.

Shellis RP, Fearhorne JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monograph Oral Sci.* 2014; 25: 163-179. doi: 10.1159/000359943.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1110-8. doi: 10.1177/0022034512462578.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. *Carie Res.* 2013; 47(1): 2-8. doi: 10.1159/000342619.

Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Comm Dent and Oral Epidemi.* 1997; 25(1):82-6.

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

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira W. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2014; 59: 631-638. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.002.

West NX, Seong J, Hellin N, Eynon H, Barker ML, He T. 2015. A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice to a sodium fluoride/triclosan dentifrice. *Int J Dent Hyg.* In press. doi: 10.1111/idh.12159.

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Attin T. Effect of  $TiF_4$ ,  $ZrF_4$ ,  $HfF_4$  and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(3): 223-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.007.

Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res.* 2012; 98: 150-159. doi: 10.1002/jbm.b.31844.

Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rølla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 180-183.



## APÊNDICE – Metodologia Ilustrada

### **Capítulo 1: Effect of anti-erosive agents under normal and hyposalivatory conditions**

#### **Delineamento experimental**

Estudo *in situ* do tipo cruzado, cego para o pesquisador e o voluntário, envolvendo um único centro de pesquisa.

Unidades experimentais: 320 blocos de esmalte, obtidos de incisivos bovinos.

Fatores em estudo:

- Dentifrícios em 4 níveis, com base no seu princípio ativo:

→ Placebo (Grupo Controle);

→ NaF (1450 ppm F);

→ SnF<sub>2</sub> (1100 ppm F) e NaF (350 ppmF);

→ NaF (1450 ppmF), Sn<sup>2</sup> (3500 ppm SnCl<sub>2</sub>) e Chitosan (0,5%).

\*NaF – fluoreto de sódio; SnF<sub>2</sub> – fluoreto de estanho, SnCl<sub>2</sub> – cloreto de estanho e Chitosan – Sigma Aldrich, St Louis, USA.

- Fluxo salivar em 2 níveis:

→ Fluxo salivar normal (saliva estimulada > 0,8 mm/min – n=10);

→ Fluxo salivar reduzido (saliva estimulada < 0,8 mm/min – n=10).

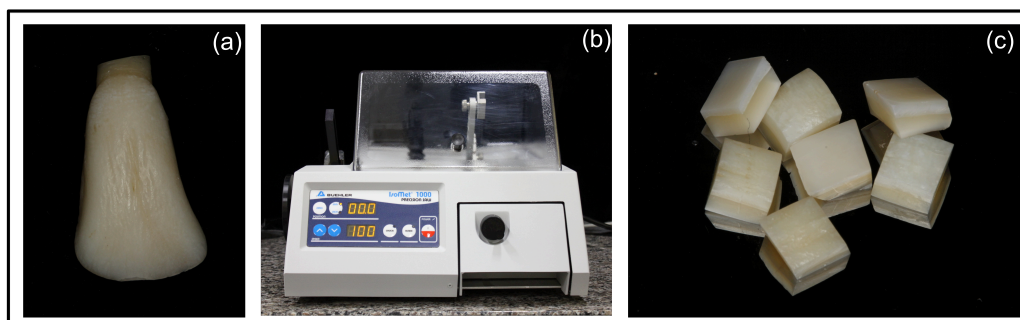
Variável de resposta: Dureza de Knoop pelo Teste de Microdureza: %SMH (porcentagem de perda de dureza superficial); %SMR (porcentagem de recobrimento de dureza de superfície) e %RER (resistência relativa a erosão).

\* Cada voluntário utilizou um dispositivo intrabucal contendo 4 espécimes de esmalte, em cada fase experimental. Para cada variável de resposta, foi utilizado a média dos valores obtidos para os espécimes de cada voluntário, sendo que cada um foi analisado como uma unidade experimental.

Análise estatística: Teste de Kolmogorov-Smirnov para análise de normalidade, Análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas pelo teste de Tamhane. Nível de significância de 5%.

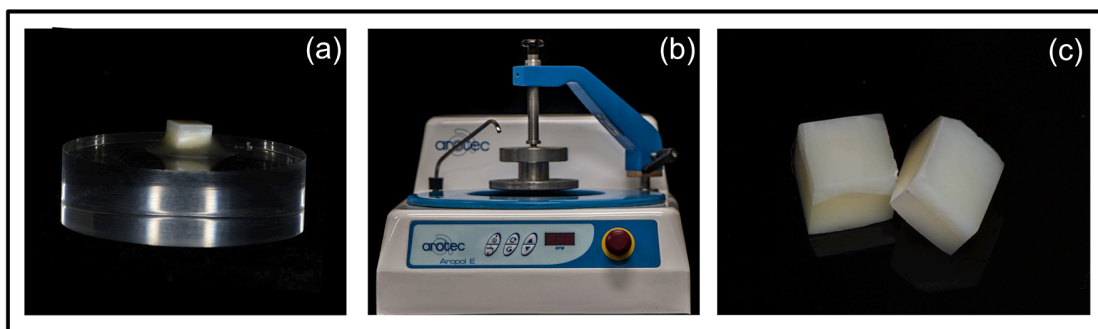
## 1. Obtenção e preparo dos espécimes

Nesse estudo, foram utilizados incisivos bovinos que, após a coleta, foram armazenados em solução aquosa de timol a 0,1 % (Dinâmica, Piracicaba, SP, Brasil). A desinfecção dos dentes foi realizada com raspagem manual utilizando cureta periodontal para remoção de debris orgânicos e profilaxia com taças de borracha e pasta de pedra-pomes (SS White Ltda; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água. Após separação da porção coronária da radicular com um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda., Barueri, SP, Brasil) acoplado a conta ângulo de baixa rotação, as coroas foram seccionadas em uma cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, LakeBluf, IL, EUA) para obtenção dos blocos de esmalte (4 x 4 mm) (Figura 1).



**Figura 1.** Obtenção dos espécimes: (a) coroa de incisivo bovino; (b) cortadeira metalográfica de precisão; (c) blocos de esmalte.

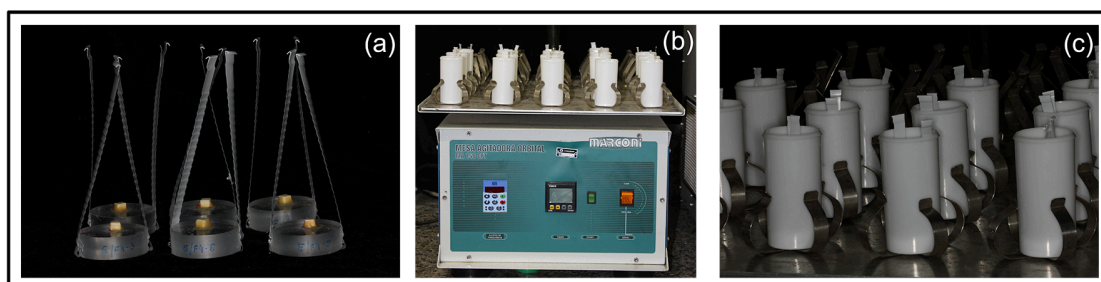
Os blocos de esmalte obtidos foram polidos em politriz metalográfica (Aropol E, Arotec, Cotia; São Paulo, SP, Brasil) para obtenção de uma superfície de esmalte plana, regular e lisa. Para tal procedimento, os espécimes foram fixados em discos planos de acrílico de modo que a superfície do esmalte ficasse paralela à base do disco, e assim, permitisse o posicionamento do conjunto (espécime e disco de acrílico) paralelamente a superfície da lixa ou feltro utilizado. Para isso, foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação decrescente (#600, #1200 e #4000 – Buehler, LakeBluf, IL, EUA) e feltro associado a suspensão de diamante (1  $\mu\text{m}$  – Buehler, LakeBluf, IL, EUA) (Figura 2). Entre cada etapa de planificação e polimento, e ao final, as amostras foram lavadas com água destilada em cuba ultrassônica (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) para que fossem removidos quaisquer debris presentes na superfície de esmalte.



**Figura 2.** Procedimento de polimento superficial: (a) posicionamento do espécime no disco de acrílico; (b) politriz metalográfica utilizada; (c) espécimes ao final dessa etapa.

## 2. Desafio erosivo

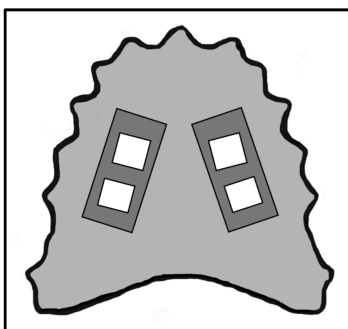
Para a realização do desafio erosivo, os espécimes foram mantidos posicionados nos discos de acrílico com cera pegajosa e, em cada disco, duas “alças” foram fixadas para facilitar a inserção e remoção de cada espécime da solução erosiva (ácido cítrico 1% - pH 3,5). Cada espécime foi individualmente inserido em um recipiente contendo 40 mL dessa solução, posicionado em mesa agitadora orbital (100 rpm – Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), por 20 minutos. Após o desafio erosivo, os espécimes foram lavados em água corrente por 1 minuto. Esse desafio foi realizado em 2 momentos: Inicial (Demin1 – d1), após a análise de microdureza “baseline” e após o período de exposição “in situ” (Demin 2 – d2) (Figura 3).



**Figura 3.** Desafio erosivo: (a) posicionamento dos espécimes nos discos de acrílicos com alças laterais; (b e c) posicionamento dos recipientes contendo ácido cítrico e os espécimes na mesa agitadora.

### 3. Dispositivos intrabucais utilizados

Nesse estudo, foram utilizados dispositivos intrabucais palatinos confeccionados em resina acrílica autopolimerizável (VIPIFlash. VIPI Indústria, Comércio e Exportação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil) e grampos metálicos, quando necessário. Para isso, cada voluntário foi moldado com para obtenção dos modelos de estudo em gesso (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil), sobre os quais os dispositivos foram confeccionados. Cada dispositivo continha 4 lojas com dimensões de 4 x 4 mm para acomodação de 4 espécimes de esmalte em cada fase experimental, conforme delineado (Figura 4).

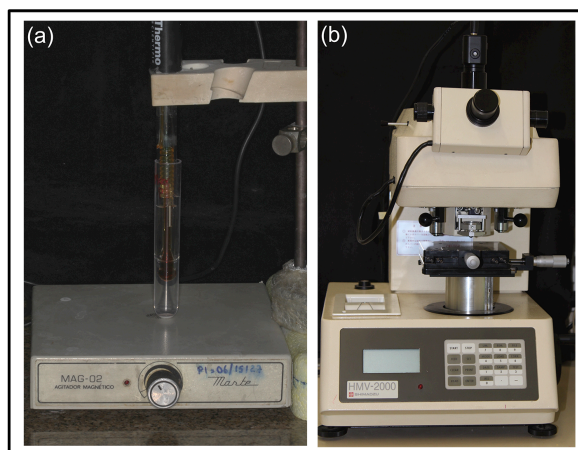


**Figura 4.** Esquema ilustrativo de um dispositivo intrabucal contendo 4 cavidades para acomodação de 4 espécimes de esmalte.

### 4. Análises

As análises de pH e capacidade tampão da saliva foram realizadas em um peagômetro (Orion 290A+, SP, Brasil) (Figura 5-a) calibrado para os padrões de pH 7,0 e 4,0. Para a análise de capacidade tampão da saliva, 0,5 mL de saliva estimulada foi adicionada a 1,5 mL de HCl 0,005 M em um tubo plástico, que após misturados, foram mantidos em repouso por 5 minutos para a liberação de CO<sub>2</sub> oriundo da reação do tampão de bicarbonato da saliva com o ácido. Feito isso, o pH dessa mistura foi determinado.

A microdureza superficial do esmalte foi analisada utilizando indentador Knoop com carga de 50 g por 5 s, em um microdurômetro (HMV-2000 Shimadzu, Tokyo, Japão) (Figura 5-b). Para a realização dessa análise, os espécimes eram sempre fixados nos discos de acrílico para garantir o correto posicionamento do mesmo. As leituras foram realizadas em 4 momentos: Inicial (“baseline”), após Demin1, após a exposição salivar (período *in situ*) e após Demin2.



**Figura 5.** Equipamentos utilizados para a obtenção das variáveis em estudo: (a) phmetro; (b) microdurômetro.

## **Capítulo 2: *In vitro* efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel**

### **Delineamento Experimental**

Unidades experimentais: 192 blocos de esmalte, obtidos a partir de terceiros molares humanos

Fatores em estudo:

- Tratamento com soluções em 6 níveis, com base no seu princípio ativo:

- Chitosan peso molecular 50 + AmF + Sn<sup>2</sup>
- Chitosan peso molecular 500 + AmF + Sn<sup>2</sup>
- Chitosan peso molecular 1000 + AmF + Sn<sup>2</sup>
- Chitosan peso molecular 2000 + AmF + Sn<sup>2</sup>
- Controle positivo: AmF + Sn<sup>2</sup>
- Controle negativo: sem tratamento com soluções

\*AmF – Fluoreto de amerício – 500 ppm (RonaCare® OlaFlur – Merck. Darmstadt, Alemanha) + Sn<sup>2</sup> a partir de SnCl<sub>2</sub> – 800 ppm (Merck KGaA. Darmstadt, Alemanha)

- Desafio abrasivo em dois níveis:

- Sem escovação (Experimento 1)
- Escovação simulada com dentífrício não fluoretado (Experimento 2)

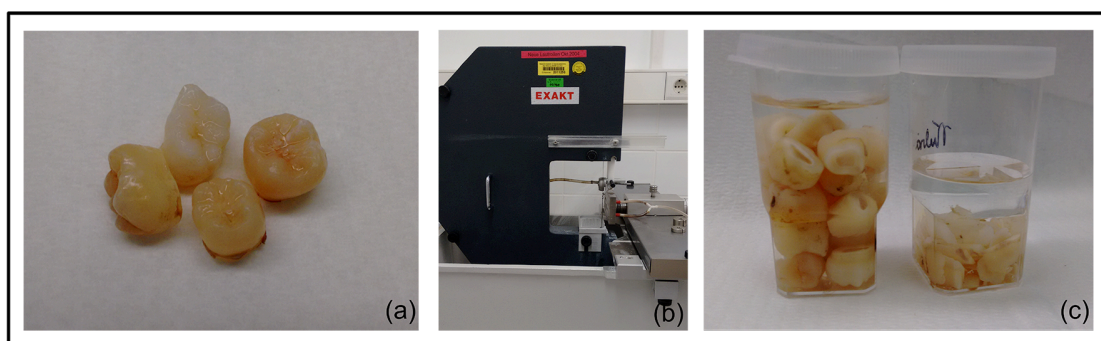
Variável de resposta: Análise de Perfilometria (n=16) e Espectroscopia por Energia Dispersiva por Raio-X (EDX – n=10).

Análise estatística: Teste de Kolmogorov-Smirnov para análise de normalidade, Análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas pelo teste de Tamhane e

Teste T para a comparação entre os dois experimentos (dados referentes ao EDX).  
Nível de significância de 5%.

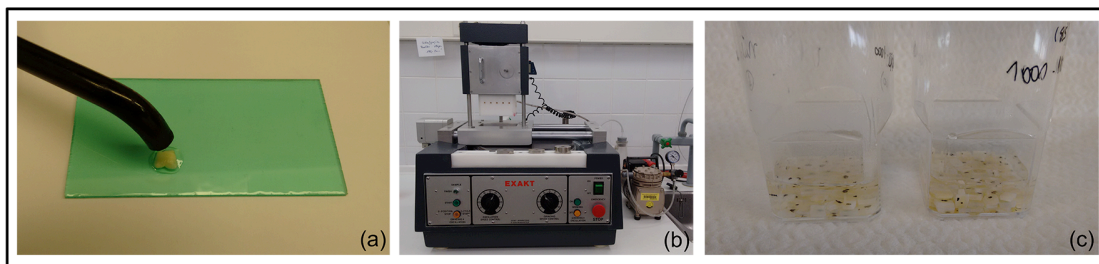
### 1. Obtenção e preparo dos espécimes

Nesse estudo, foram utilizados terceiros molares humanos, hígidos, impactados, que, após extraídos, foram armazenados em solução aquosa de timol a 0,1 % (Merck. Darmstadt, Alemanha). Após limpeza e desinfecção, a coroa foi separada da raiz para sua utilização. A partir da porção coronária, foram obtidas fatias (aproximadamente 1,2 mm) das faces que permitissem a obtenção de um espécime com área superficial de 2 x 3 mm. Para esses cortes, foi utilizado uma cortadeira metalográfica (Exakt Abrasive Cutting System - Exakt-Appaeatebau, Norderstedt, Alemanha) (Figura 6).



**Figura 6.** Obtenção das fatias de esmalte: (a) Coroas de terceiros molares; (b) cortadeira utilizada e (c) fatias de esmalte obtidas.

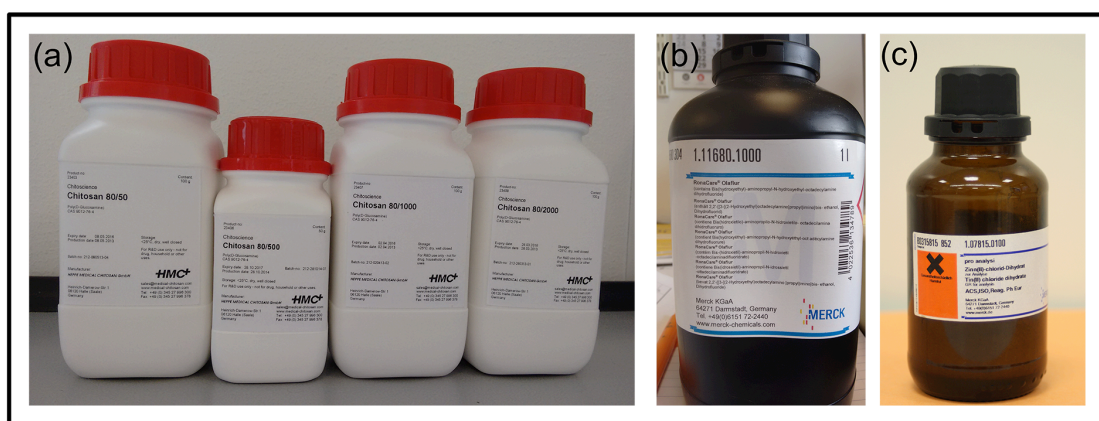
A fatias obtidas foram submetidas a procedimentos de planificação e polimento para obtenção de uma área lisa e plana com área de 2 x 3 mm. Para isso, cada fatia foi fixada em uma lâmina de vidro com resina acrílica fotopolimerizável (Technovit 7230 VLC, Kulzer-Exakt, Wehrheim, Alemanha). O polimento foi realizado em uma politriz metalográfica com discos de lixa granulação decrescente (Exakt Abrasive Cutting System and Exakt Mikrogrinder, Exakt-Appaeatebau, Norderstedt, Alemanha; discos abrasivos - P800, P2400 and P4000, Leco, St. Joseph, EUA). Após esse procedimento, as fatias foram submetidas a cortes com disco diamantado acoplado a uma peça de mão para obtenção dos espécimes com dimensões de: 2 mm de altura, 3 mm de largura e 1mm de espessura (Figura 7).



**Figura 7.** Polimentos e obtenção dos espécimes: (a) fixação das fatias de esmalte em lâminas de vidro que eram individualmente posicionadas na politriz; (b) politriz metalográfica utilizada e (c) espécimes obtidos.

## 2. Produtos utilizados

As soluções em estudo foram manipuladas em laboratório, utilizando os produtos específicos em sua composição. Para as soluções com os diferentes tipos de quitosana (0,5% - Heppe Medical Chitosan GmbH. Halle, Alemanha), as diferentes moléculas eram inicialmente dissolvidas em solução de ácido acético 0,5%, sob agitação constante por 30 minutos. Paralelamente, as soluções contendo AmF (RonaCare® OlaFlur – Merck KGaA. Darmstadt, Alemanha) e SnCl<sub>2</sub> (Merck. Darmstadt, Alemanha) eram preparadas em água destilada e depois, adicionadas às soluções de quitosana, nas quantidades previamente determinadas (Figura 8).



**Figura 8.** Produtos utilizados para a manipulação das soluções utilizadas no estudo: (a) Chitosan em diferentes moleculares; (b) AmF – OlaFlur e (c) Cloreto de estanho

A escovação simulada foi realizada com dentifrícios não fluoretado (Lavera Neutral Zahngel – Laverana GmbH & Co. Wennigsen, Alemanha) e escovas dentais (Com referência pela ADA - American Dental Association) (Figura 9).

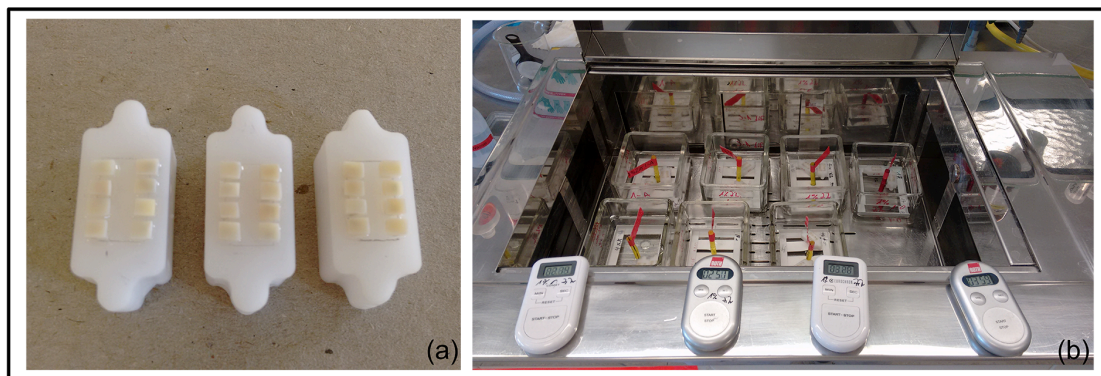


**Figura 9.** Produtos utilizados para a escovação simulada: (a) Dentifrício não fluoretado; (b) Escovas dentais.

## 2. Tratamentos

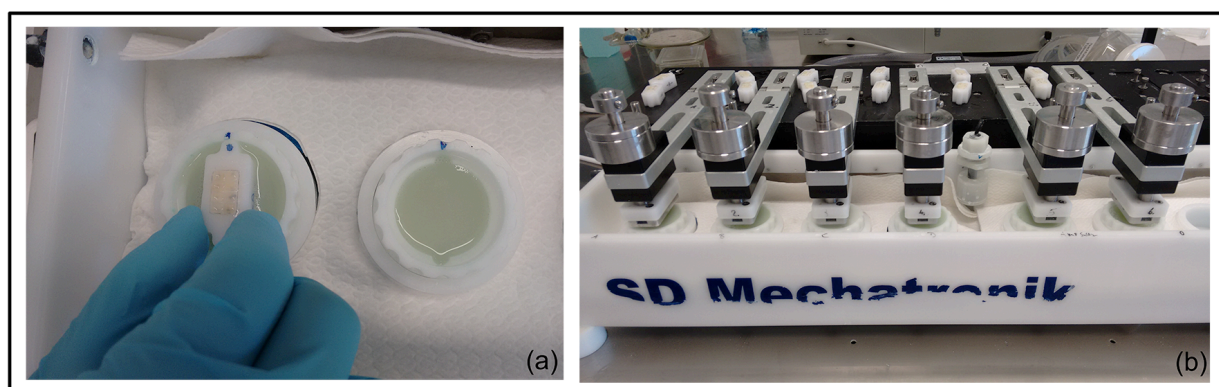
Os espécimes foram montados em *holders* específicos (8 espécimes por *holder* – 2 *holders* por grupo) para os tratamentos de erosão, escovação ou não, e com as soluções em estudo. Cada amostra teve sua metade mais externa protegida com resina fotopolimerizável (Technovit 7230 VLC, Kulzer-Exakt, Wehrheim, Alemanha), delimitando assim a área de referência (área protegida) e a área teste, que sofreria os tratamentos. Os *holders* dos grupos tratados com a mesma solução eram posicionados em dispositivos que facilitavam a transferência da solução erosiva, para a remineralizante e para as soluções teste. O tratamento de erosão foi realizado com 6 desafios erosivos diários, alternando com armazenamento em solução remineralizadora, por 10 dias. Os desafios foram realizados com solução de ácido cítrico 0,5% por 2 minutos, em cuba agitadora com agitação (35 rpm) e temperatura (25°) constantes (Model 1083, GLF GmbH, Burgwedel, Alemanha). Previamente e após cada desafio, as amostras eram lavadas em água corrente por 30 segundos (Figura 10).





**Figura 10.** Desafio erosivo: (a) *holders* com os espécimes; (b) posicionamento dos *holders* em containers com soluções erosiva ou desmineralizante.

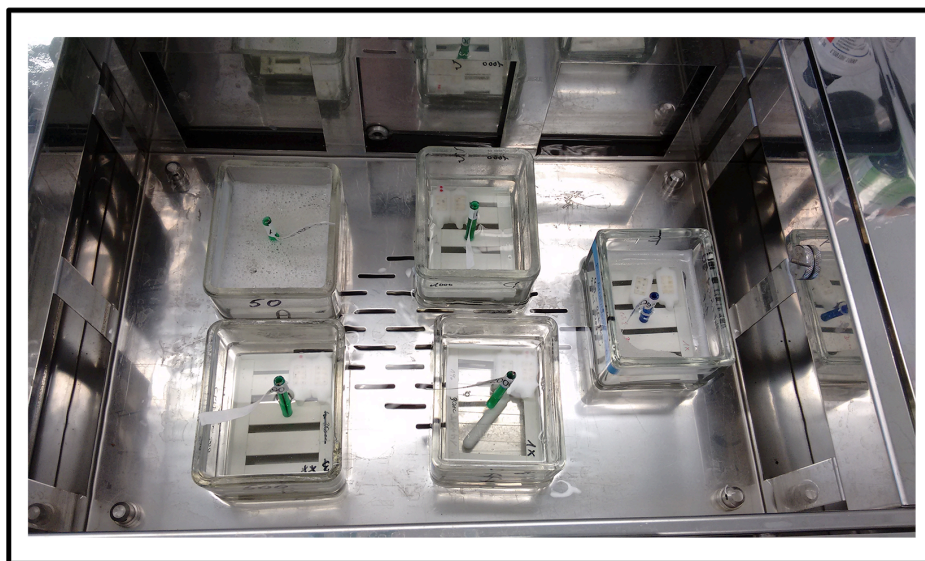
Após o primeiro e último desafio erosivo diário, as amostras eram submetidas aos tratamentos de escovação, no caso do Experimento 2, e ao tratamento com soluções. Para a escovação (Experimento 2), cada *holder* era posicionado nos containers da maquina de escovação simulada (SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen-Westerham, Alemanha) com 20 ml de *slurry*, preparado com dentífrício e água destilada (1:3). Sobre cada *holder*, um dispositivo individual contendo a escova dental e com carga padronizada de 200 g era posicionado. A escovação foi realizada por 15 segundos (Figura 11).



**Figura 11.** Escovação simulada: (a) posicionamento dos espécimes sobre o *slurry*; (b) posicionamento da escova sobre os espécimes.

Após o tratamento de erosão (Experimento 1) ou de escovação (Experimento 2), os *holders* eram transferidos para os containers com as soluções em estudo. O tratamento com essas soluções era realizado por 2 minutos, sob as

mesmas condições de agitação e temperatura previamente descritas. Após esse tratamento, as amostras eram lavadas em água corrente por 1 minuto (Figura 12).



**Figura 12.** Tratamento com as soluções em estudo.

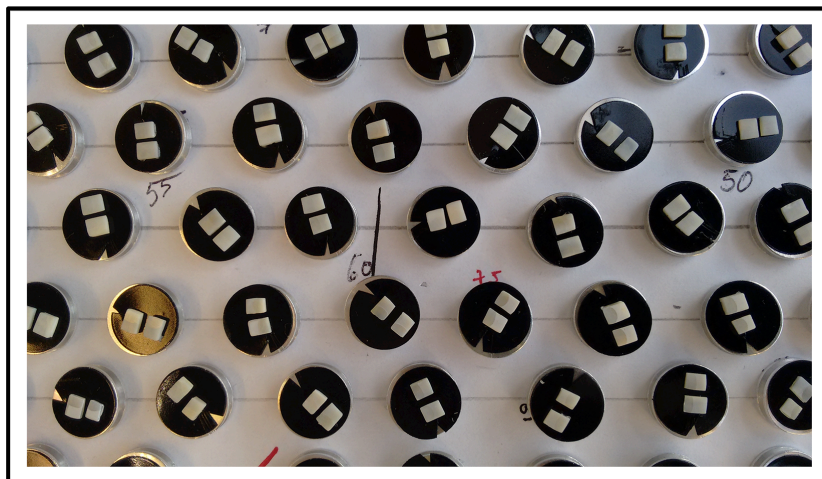
### 3. Análises

Após o fim do período experimental, as coberturas de resina fotopolimerizável de cada amostra foram removidas e o desgaste da superfície do esmalte, da área teste em relação a área de referência foi analisado por um Perfilômetro Óptico (MicroProf; Fries Research & Technology GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemanha) (Figura 13).



**Figura 13.** Perfilômetro utilizado.

Após a análise de perfilometria, os espécimes foram removidos do *holder* previamente utilizado e alocados em *holders* metálicos para serem analisados no Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM 6510 – JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Dez espécimes de cada grupo foram analisados por EDX e os demais foram utilizados para análise superficial por imagens obtidas no mesmo microscópio (Figura 14).



**Figura 14.** Espécimes montados em *holders* metálicos.

## Anexo 1 – Termo de aprovação no Comitê de Ética referente ao estudo realizado no Capítulo 1

Comitê de Ética em Pesquisa – Certificado

22/04/14 13:35



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"EFEITO DE DIFERENTES DENTIFRÍCIOS FRENTE AOS DESAFIOS EROSIVO/ABRASIVO EM PACIENTES COM FLUXO SALIVAR NORMAL E REDUZIDO: ESTUDOS IN SITU"**, protocolo nº 010/2014, dos pesquisadores Débora Alves Nunes Leite Lima, Alan Roger dos Santos Silva, José Roberto Lovadino e Núbia Inocencya Pavesi Pini, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/04/2014.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"Effect of different toothpaste in case of erosive/abrasive challenges and for patients with normal or reduced salivary flow: In situ studies"**, register number 010/2014, of Débora Alves Nunes Leite Lima, Alan Roger dos Santos Silva, José Roberto Lovadino and Núbia Inocencya Pavesi Pini, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Apr 02, 2014.

**Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta**  
Coordenadora  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

## Anexo 2 - Termo de aprovação no Comitê de Ética referente ao estudo realizado no Capítulo 2



JUSTUS-LIEBIG

UNIVERSITÄT  
GIESSEN

FACHBEREICH 11



MEDIZIN

Ethik-Kommission, Gaffkyst. 11c, D-35385 Giessen

Frau  
Prof. Dr. Ganß  
Zahnklinik  
Schlangenzahl 14  
35385 Giessen

**ETHIK-KOMMISSION**  
**am Fachbereich Medizin**  
**Vorsitz: Prof. Dr. K.L. Schmidt**

Gaffkyst. 11c  
D-35385 Giessen  
Tel.: (0641)99-42470 / 47660  
ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de

Giessen, 16. Oktober 2009  
Dr. Kr./

AZ.: 143/09

**Titel:** *Verwendung extrahierter Weisheitszähne für Forschungszwecke.*

**Sitzung am 01.10.2009**

Sehr geehrte(r) Antragsteller/Antragstellerin,

*Kristin Ganß*

wir bedanken uns für die Vorstellung Ihres Forschungsprojektes. Im Folgenden erhalten Sie das Votum der Giessener Ethik-Kommission zur oben genannten Studie:

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)

Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung

Eingesandte Unterlagen:

Formalisierter Antrag vom 23.09.09

Beschreibung des Vorhabens (email vom 13.07.09)

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt.

Sie stimmt dem Vorhaben zu.

Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).

Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).

Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr bis ..... ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem (roten) Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

**Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 01.10.2009:**

Frau Dr. Schlüter trägt vor. Frau Prof. Ganß hat der Ethik-Kommission bereits vor einiger Zeit vorgetragen, dass sie auch in Zukunft für Forschungen an der Zahnhartsubstanz menschliche Zähne (extrahierte, retinierte und verlagerte Weisheitszähne), die bisher aus zahnärztlichen Praxen gesammelt wurden, benötige; wäre dies in Zukunft nicht mehr möglich, wäre die Forschung an menschlicher Zahnhartsubstanz akut gefährdet. Dieses Anliegen von Frau Prof. Ganß hat K.L. Schmidt bereits in einem Brief an den Prodekan, Prof. Kaps, zum Ausdruck gebracht. Frau Dr. Schlüter trägt den Sachverhalt noch einmal vor und legt dar, dass es für die geplanten Forschungen an der Zahnhartsubstanz des Menschen außer von Menschen gewonnenen Zähnen keine Alternativen gäbe, da diese (z.B. Apatitverbindungen, tierische Zähne etc.) alle erhebliche Nachteile aufwiesen. Die Forderung, dass die niedergelassenen Zahnärzte eine schriftliche Einverständniserklärung von den Patienten zur wissenschaftlichen Verwertung ihrer extrahierten Zähne verlangen sollten, hält sie für absolut nicht realisierbar. Sie zitiert Verlautbarungen des zentralen Ethikrates, die ihrer Meinung nach durchaus so zu interpretieren seien, dass man in besonderen Fällen auf eine solche Einverständniserklärung verzichten könne.

PD Dr. Gödicke nimmt zu diesem Problem ausführlich Stellung und hält zunächst fest, dass es zu dem angesprochenen Problem gegenwärtig keinen herrschenden juristischen Standpunkt gebe, was auch die Verlautbarungen des zentralen Ethikrates relativiere: Juristisch bewege man sich in jedem Fall „auf Glatteis“. Er hält die Einholung eines schriftlichen Einverständnisses für durchaus machbar.

Fazit: Eine Einverständniserklärung des „Zahnspenders“ ist unabdingbar - diese kann freilich auch mündlich eingeholt werden!

Wir wünschen Ihnen für Ihr Forschungsprojekt viel Erfolg.



Prof. Dr. K. L. Schmidt  
Vorsitzender

**Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind durch Unterstreichung hervorgehoben.**

**Mitglieder:** Frau Dr. Blütters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Bödeker (Informatik); Herr Brunhard (Pharmazie); Prof. D. Dr. Dettmeyer (Rechtsmedizin), PD Dr. Gödicke (Bürgerliches Recht); Prof. Linn (Innere Medizin), Dr. Repp (Pharmakologie), Prof. Schmidt, Vorsitzender, (Rheumatologie), Prof. Schwemmlé, stv. Vorsitzender (Chirurgie);

**Vertreter:** Prof. Dreyer (Pharmakologie), Prof. Dudeck (Informatik); Prof. Federlin, (Innere Medizin), Prof. Schapp (Bürgerliches Recht); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Prof. Lasch (Innere Medizin); Prof. Riße (Rechtsmedizin).