



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PLANEAMENTO DE UM ESTUDO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DO
TECIDO DE ESMALTE, NUM ESTADO DE EXPOSIÇÃO A UM
AGENTE EROSIVO**

Trabalho submetido por
Sofia Pinto Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PLANEAMENTO DE UM ESTUDO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DO
TECIDO DE ESMALTE, NUM ESTADO DE EXPOSIÇÃO A UM
AGENTE EROSIVO**

Trabalho submetido por
Sofia Pinto Ribeiro
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso

E coorientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso e Prof. Doutora Alzira Cavacas

Setembro de 2019

RESUMO

A erosão dentária é uma patologia que leva à perda irreversível da estrutura dentária, podendo levar a alterações tanto a nível funcional como estético, impactando no conforto do dia-a-dia dos indivíduos. Visto que o consumo de bebidas erosivas, como os refrigerantes, tem vindo a aumentar exponencialmente com o passar dos anos, o estudo da erosão passou a ser um tópico de extremo interesse. Contudo, a grande variedade de métodos disponíveis para investigação leva a que os resultados de diferentes investigações sejam contraditórios e, portanto, ainda muitos temas sejam assunto de debate.

Através da revisão da literatura científica e com base nessa observação, o objetivo do presente trabalho aplicar uma diferente metodologia no estudo da erosão que ainda não foi abordada: a microscopia ótica. Enquanto os diversos estudos existentes sobre a erosão usam essencialmente a microscopia eletrónica, este projeto terá como foco a convencional microscopia ótica, de modo a se perceber se será uma nova metodologia viável no estudo deste tema e economicamente mais acessível.

Palavras-chave: Erosão, escovagem dentária, refrigerantes, microscopia ótica, histologia

ABSTRACT

Dental erosion is a pathology that leads to an irreversible loss of the dental structure, which can lead to changes in both functional and aesthetic levels, impacting on the daily comfort of individuals. Since the consumption of erosive beverages, such as soft drinks, has been increasing exponentially over the years, the study of erosion has become a topic of extreme interest. However, the wide variety of methods available for research mean that the results of different investigations are contradictory and therefore many topics are still subject to debate.

Through the review of the scientific literature and based on this observation, the objective of this paper is to apply a different methodology in the study of erosion that has not yet been addressed: optical microscopy. While the various existing erosion studies primarily use electron microscopy, this project will focus on conventional optical microscopy, to see if it will be a viable new method for studying this subject and economically more accessible.

Keywords: Tooth erosion, brushing, soft drinks, optical microscopy, histology

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
I – INTRODUÇÃO	9
1. Esmalte: componentes, propriedades e histologia.....	9
2. Erosão dentária	12
2.1. Definição e química da erosão.....	12
2.2. Suscetibilidade dos dentes à erosão.....	15
2.3. Aparência clínica da erosão	17
2.4. Prevalência/incidência da erosão e fatores de risco.....	19
2.5. Bebidas erosivas	21
2.6. Prevenção da erosão	27
3. Saliva	27
3.1. Funções da saliva.....	27
3.2. Película adquirida	29
3.3. Remineralização	34
3.4. Variações na eficácia da proteção salivar.....	35
4. Escovagem e abrasão.....	37
5. Pastas dentífricas	40
5.1. Pastas fluoretadas	40
5.2. Pastas dentífricas com clorhexidina	44
5.3. Abrasivos	45
II. DESENVOLVIMENTO	47
1. Objetivo do estudo.....	47
2. Construção do projeto.....	47
3. Considerações éticas.....	48
4. Amostragem.....	48
5. Seleção de materiais e técnicas.....	53
5.1. Ciclos erosivos.....	53
5.2. Saliva artificial.....	53
5.3. Escovagem das amostras	54
6. Análise das amostras ao microscópio ótico	54
6.1. Fixação das amostras	55
6.2. Descalcificação.....	55
6.3. Desidratação	56
6.4. Limpeza	56

6.5. Impregnação	56
6.6. Incorporação	57
6.7. Observação ao microscópio ótico	57
III. CONCLUSÃO.....	58
IV. BIBLIOGRAFIA.....	61

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1 – Corte seccional dos prismas de esmalte, evidenciando o padrão em fechadura

Figura 2 – Bandas de Hunter-Schreger

LISTA DE ABREVIATURAS

JAD – Junção amelo-dentinária

ETW – Desgaste dentário erosivo

REA – Abrasividade relativa do esmalte

I. INTRODUÇÃO

1. Esmalte: componentes, propriedades e histologia

Os dentes humanos são projetados para durar uma vida inteira, tendo um revestimento externo do tecido mais duro no corpo humano e sendo rodeados por um ambiente oral que ajuda à estabilidade e proteção dos dentes. Esta combinação geralmente ajuda a preservar a sua função natural ao longo da vida. No entanto, existe uma variedade de outros fatores que causam a perda dos minerais do tecido dentário, como a erosão (West & Joiner, 2014).

O esmalte é o tecido mais mineralizado e duro dos tecidos humanos, que se torna único devido ao facto de ser acelular e por ser o resultado de ambas as atividades de secreção e reabsorção das células epiteliais (Avery, 2002). É formado pelos ameloblastos, que desaparecem assim que o esmalte termina a sua formação: assim, quando este tecido é destruído não se consegue regenerar (Chandra et al., 2010).

É composto, em volume, por 96% de mineral (matéria inorgânica), 3% de água e 1% de proteínas (matéria orgânica) (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015; Chandra, 2010). A distribuição destes componentes não é homogénea, estando relacionada principalmente com a morfologia específica do dente (West & Joiner, 2014). O conteúdo inorgânico é constituído principalmente pelos cristais de hidroxiapatite e o orgânico por amelogenina, proteínas não-amelogeninas e água. No esmalte existem dois principais grupos de proteínas: amelogenina (90%) e não-amelogeninas (10%). Durante a maturação do esmalte, as amelogeninas desaparecem (Chandra et al., 2010).

O seu conteúdo mineral é composto quase totalmente por cristais de hidroxiapatite, cujas células unitárias dos cristais têm a fórmula de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Avery, 2002). A hidroxiapatite forma cristais longos e finos, com uma secção transversal aproximadamente hexagonal e uma espessura média de 26 nm de espessura e 68 nm de largura; na sua secção seccional têm a forma de fechadura (Fig.1) (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015; Chandra et al., 2010). Os espaços entre os cristais têm entre 1 a 2 nm de largura e são preenchidos por uma matriz orgânica. Aproximadamente 10 000 a 40 000 destes cristais

formam um prisma (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015). Os cristais estão organizados de acordo com os seus longos eixos, paralelos aos longos eixos dos prismas: na periferia de cada prisma, os cristais desviam-se dessa orientação e produzem uma interface entre os prismas, onde tende a haver um espaço mais cristalino (West & Joiner, 2014): forma-se, assim, uma estrutura em forma de bastão que se estende desde a junção amelo-dentinária (JAD) à superfície externa do dente (Carvalho & Lussi, 2015). A nível de microscopia é possível observarem-se estrias escuras ao longo dos prismas, devido ao facto da matriz do esmalte ser formada de uma forma rítmica e segmentar os prismas (Chandra et al., 2010).

Estes prismas estão, então, dispostos de uma forma colunar e são parcialmente revestidos por uma fina camada de matriz orgânica denominada de bainha do prisma; assim, apesar de perfazer apenas 1% do peso do esmalte, a matriz orgânica está intercalada por toda a estrutura do esmalte (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015), permitindo a passagem de moléculas (West & Joiner, 2014).



Figura 1 - Microscopia eletrónica de corte seccional do esmalte, mostrando o padrão de fechadura dos prismas (Chandra et al., 2010)

Em termos microscópicos outras estruturas também são passíveis de ser observadas, e são de grande importância para tomar em conta como linha de referência de forma a poder-se tirar medidas padrão para comparar antes e depois da erosão. As bandas de *Hunter-*

Schreger (Fig.2), que são bandas escuras alternadas com mais claras, são um fenómeno ótico que aparece devido às alterações da direção dos prismas (Chandra et al., 2010)



Figura 2 - Bandas de Hunter-Schreger (Chandra et al., 2010)

Outra estrutura que se observa são as linhas incrementais de *Retzius*, que ilustram a aposição sucessiva rítmica das camadas do esmalte durante a formação da coroa. A periquimata são estrias transversais em forma de onda, que aparecem como manifestação externa destas linhas incrementais (Chandra et al., 2010), e representam a parte superficial das estrias de Retzius. Estas linhas são mais acentuadas quanto mais próximas estão do colo do dente. Com o desgaste funcional da superfície do esmalte, as periquimácias tendem a desaparecer (Katchburian e Arana, 2017).

Até certo ponto, a composição química e as propriedades físicas do esmalte mudam com a profundidade: a densidade e a dureza tendem a diminuir com o aumento da distância da superfície, e aumenta a sua solubilidade; o conteúdo mineral atinge um máximo em áreas onde o esmalte é mais espesso e diminui para a região cervical (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

A dentina é diferente do esmalte. O seu conteúdo mineral é muito menor, enquanto o conteúdo orgânico é muito maior, sendo os seus cristais de hidroxiapatite 300x menores do que os do esmalte (Chandra, 2010, p. 54). A sua porção orgânica consiste principalmente em colagénio tipo I, que constitui cerca de 90% desta porção; os outros componentes são fosfoproteínas e glicoproteínas não colagénicas, bem como proteoglicanos e lípidos. A dentina tem uma composição mais aquosa e tem uma dureza muito menor que a do esmalte. A dentina peritubular é mais dura do que as áreas intertubulares: os túbulos são circundados por dentina peritubular, que representa a porção mais mineralizada da dentina, com conteúdo orgânico mínimo. Já a dentina intertubular consiste principalmente em colagénio calcificado com cristais minerais localizados dentro e entre as fibras colagénicas (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

Histologicamente, a composição mineral do esmalte pode diferir de indivíduo para indivíduo, da anatomia do dente, da superfície do dente em questão e até mesmo da localização do mesmo. Dentes diferentes diferem nos seus períodos de formação, tanto anatomicamente como histologicamente, não sendo, então, surpreendente que apresentem uma suscetibilidade diferente à erosão. Da mesma forma, quando um dente é formado, a amelogénese ocorre a partir da superfície oclusal/incisal em direção à região cervical, num processo que dura entre 3 a 6 anos, dependendo do dente. Assim, a qualquer momento da amelogénese, o mineral do esmalte será formado quase simultaneamente nas superfícies proximais, vestibular e lingual do dente, o que implica que as superfícies tenham provavelmente uma composição de esmalte muito semelhante e não haja diferenças significativas de suscetibilidade à erosão entre elas (Carvalho & Lussi, 2015).

2. Erosão dentária

2.1. Definição e química da erosão

A erosão dentária é definida como a dissolução irreversível dos minerais do tecido dentário por ácidos de origem não bacteriana, que geralmente é progressiva. Do ponto de bioquímico, esta dissolução é explicada por frequentes episódios de exposição a ácidos intrínsecos e/ou extrínsecos, que promovem a troca de componentes sólidos da hidroxiapatite (Santos et al., 2019).

A erosão começa no esmalte (Baumann, Kozik, Lussi & Carvalho, 2016), o substrato mais comumente associado a esta patologia. No entanto, a dentina coronária e radicular também podem ser afetadas se expostas ao ambiente oral. A erosão da dentina pode levar à hipersensibilidade dentinária, aparência estética inadequada, problemas de função e eventual exposição pulpar em estadios avançados (Algarni, Lippert & Hara, 2015).

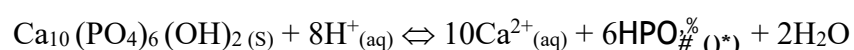
A erosão inicial do esmalte ocorre tanto na interface esmalte/ácido quanto na camada parcialmente desmineralizada e amolecida do esmalte, num processo chamado de “desmineralização quase superficial” (Carvalho, Baumann & Lussi, 2016). Quimicamente, envolve iões de hidrogénio, derivados de ácidos fracos e fortes, que se ligam aos iões de carbonato e fosfato e removem-nos dos cristais de hidroxiapatite (Derceli, Faraoni, Pereira da Silva & Palma-Dibb, 2016). O ácido é geralmente

encontrado num estado de equilíbrio, onde ambas as formas de moléculas de ácido dissociadas e não dissociadas estão presentes na solução (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015). Os iões de H^+ atacam primeiro a superfície do esmalte, iniciando o processo de erosão e formando pequenos poros na superfície do esmalte. Estes poros dão acesso à forma não dissociada do ácido para penetrar no tecido do esmalte, que então se dissocia dentro do próprio esmalte, servindo como um portador de prótons. Isto induz a desmineralização na camada mais próxima da superfície do esmalte o que leva, por sua vez, ao amolecimento da superfície (Baumann, Carvalho & Lussi, 2015).

Esta dissolução parcial do mineral causa um aumento na rugosidade da superfície, deixando a superfície do esmalte com uma dureza diminuída (amolecimento) e um padrão típico de favo de mel. Este esmalte é mais vulnerável a forças mecânicas, como a escovagem, e estas forças abrasivas removem parcialmente a camada de esmalte macia, produzindo superfícies ligeiramente mais lisas (Carvalho, Baumann & Lussi, 2017).

A perda de substância pela erosão é um processo cíclico e dinâmico com períodos de desmineralização e remineralização (Colombo et al., 2017). Nas lesões de cárie e *white spots* a desmineralização ocorre abaixo da superfície e a lesão tem uma zona superficial visualmente intacta, que pode ser remineralizada devido à lesão subsuperficial que contém uma matriz adequada para o crescimento de cristais. No caso da erosão, o esmalte é exposto a uma solução pouco saturada relativamente à hidroxiapatite, sendo dissolvido sem a formação de qualquer mineral à superfície e sem nenhuma camada superficial que cubra a lesão, sendo o esmalte dissolvido camada por camada sem remineralização adequada pois não tem uma matriz subsuperficial adequada (Voronets & Lussi, 2010). Assim, uma vez que a perda de superfície ocorra, o mineral não pode ser substituído, sendo, portanto, um processo irreversível (Baumann, Kozik, Lussi & Carvalho, 2016).

A taxa de dissolução da hidroxiapatite aumenta com a diminuição do pH e também é uma função das concentrações de Ca^{2+} , PO_4^{3-} (e OH^-) em solução, que é evidente a partir da seguinte equação de equilíbrio simplificada:



O grau de saturação em relação à hidroxiapatite (DS_{HA}) é definido como a razão entre o produto da atividade iónica para a HAP e a sua constante de solubilidade (K_{HA}):

$$DS_{HA} = [(Ca^{2+})^5 (OH^-) (PO_4^{3-})^3 / K_{HA}]^{1/9}$$

Assim, um valor de DS_{HA} inferior a 1 indica uma solução que está subsaturada em relação à hidroxiapatite, o que significa que tem força motriz para a sua dissolução, enquanto um valor superior a 1 indica que a solução está supersaturada e provoca precipitação da hidroxiapatite. Esta equação mostra que à medida que o pH cai, as concentrações de OH^- e PO_4^{3-} são reduzidas e, portanto, o grau de saturação é reduzido. À medida que o pH cai num pH crítico, definido como o pH no qual uma solução é apenas saturada em relação a um determinado mineral, o esmalte estará em equilíbrio e não haverá dissolução nem precipitação mineral. No entanto, abaixo do pH crítico, o sistema torna-se insaturado e existe o potencial de dissolução do esmalte. O valor para o pH crítico do esmalte é frequentemente citado como 5,5; no entanto, não há valor crítico de pH para a erosão como existe para a cárie dentária, como vai ser visto mais à frente (West & Joiner, 2014).

O pH crítico depende tanto da solubilidade do sólido de interesse como das concentrações dos constituintes minerais relevantes da solução (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

A desmineralização aumenta gradualmente com o tempo de exposição: um aumento acentuado da área de superfície dá-se nos primeiros 20 s de exposição ao ácido e, após esse período, a taxa de aumento da área de superfície diminui. Esta tendência deve-se, possivelmente, ao grande número de cristais de hidroxiapatite com pequenos diâmetros, o que proporciona uma maior área de superfície e desmineralização mais rápida. À medida que os cristais menores são removidos, os diâmetros relativamente grandes dos cristais restantes e os espaços maiores entre os mesmos fazem com que a desmineralização e a taxa de área de superfície diminuam. Os cristais expostos maiores são mais resistentes ao ácido, o que afeta o processo de desenvolvimento da erosão, uma vez que o esmalte apresenta áreas que são mais facilmente desmineralizadas, devido a heterogeneidade da estrutura cristalina da apatite. Isto sugere, então, que o padrão de desmineralização é cíclico: a taxa inicial de desmineralização é alta e depois diminui à medida que a desmineralização avança. No entanto, após a eliminação de cristais de hidroxiapatite maiores e a exposição de cristais menores, a taxa de desmineralização aumenta novamente (Derceli, Faraoni, Pereira da Silva & Palma-Dibb, 2016).

2.2. Suscetibilidade dos dentes à erosão

Diferentes tipos de dentes têm uma influência significativa na suscetibilidade do esmalte à dissolução erosiva inicial, no entanto não existe nenhuma diferença significativa entre as superfícies vestibulares e linguais do mesmo dente. Mesmo no próprio dente existem variações, já que o conteúdo mineral e, consequentemente, a concentração de cálcio e a densidade do esmalte diminuem em direção à JAD, enquanto as concentrações de carbonato e magnésio aumentam; já as concentrações de fluor são consideravelmente mais altas na camada mais externa do esmalte o que explica o aumento da solubilidade mineral da superfície até à JAD (Carvalho & Lussi, 2015).

No que toca à diferença de suscetibilidade entre crianças e adultos a erosão em dentes decíduos não deve ser considerada um processo fisiológico de curto prazo, mas sim um indicador preditivo de desgaste futuro na dentição permanente (Assunção, Lussi, Rodrigues & Carvalho, 2019). Sabe-se que os minerais dos dentes decíduos e permanentes diferem histologicamente. O esmalte decíduo tem prismas menores e mais difundidos, com limites mais completos, sugerindo que o esmalte decíduo é mais poroso que o esmalte permanente. Para além disto, o esmalte decíduo tem maior variação no seu conteúdo orgânico, é menos mineralizado e tem maior teor de carbonato do que o esmalte permanente. Estas diferenças histológicas explicam, provavelmente, o motivo pelo qual o esmalte decíduo é significativamente menos duro do que o esmalte permanente e, por sua vez, é mais suscetível à desmineralização causada por cárie (Carvalho, Schmid, Baumann & Lussi, 2017). É também um facto que o esmalte dos dentes decíduos é menos espesso do que os dentes permanentes, o que significa que o processo erosivo atinge a dentina mais rapidamente, levando a lesões severas avançadas mais facilmente. Contudo, as diferenças na suscetibilidade ao desgaste dentário erosivo entre crianças e adultos parecem ser pequenas (Jaeggi & Lussi, 2014) e, portanto, na erosão ainda não se demonstraram diferenças na desmineralização entre o esmalte decíduo e permanente após exposição de 2 ou 4 min: apenas se observou desmineralização maior nos decíduos comparativamente aos permanentes quando expostos mais de 4 min a sumo de laranja (Carvalho, Schmid, Baumann & Lussi, 2017). Sabe-se, no entanto, que os dentes decíduos são mais propensos à perda de superfície do que os dentes permanentes (Assunção, Lussi, Rodrigues & Carvalho, 2019). Também, os dentes com sinais clínicos de erosão apresentam diferentes padrões de desmineralização do que os dentes sãos, após um

desafio erosivo, assim como são mais propensos a uma nova desmineralização ácida. Os dentes erodidos já perderam a sua periquimata e, portanto, a sua camada mais externa de esmalte já está desgastada; os dentes são, por outro lado, têm a sua periquimata ainda intacta, e não se dissolvem tão prontamente como o esmalte prismático. Para além disto, como dito anteriormente, as diferentes profundidades do esmalte têm diferentes solubilidades à erosão. Assim, uma vez que se atinja o esmalte prismático, a progressão da erosão será mais rápida (Carvalho, Baumann & Lussi, 2017).

As superfícies naturais do esmalte são menos suscetíveis a desafios erosivos do que as superfícies do esmalte subjacente, o que pode estar relacionado com a aquisição de fluor pela camada mais externa durante a maturação do esmalte, tornando-se mais resistente à desmineralização (Carvalho & Lussi, 2015). A hidroxiapatite não é um composto estável e sofre alterações devido a interações químicas, como a substituição do ião de cálcio por iões de sódio, magnésio e potássio, em que o ião de sódio é o mais frequentemente substituído. A principal mudança ocorre quando o fosfato (PO_4) é substituído por carbonato (CO_3), pois esta substituição aumenta a solubilidade do esmalte. Também, alguns iões hidroxilo (OH^-) da hidroxiapatite são substituídos por fluor (F^-), que criam a fluorapatite, composto mais resistente a ácidos (Derceli, Faraoni, Pereira da Silva & Palma-Dibb, 2016). Estas substituições podem ter um efeito profundo no comportamento da hidroxiapatite, especialmente no que diz respeito à solubilidade e baixo pH. Nas regiões do cristal com deficiência de cálcio e rico em carbonato, particularmente, são suscetíveis à desmineralização, enquanto a substituição do hidroxilo pelo fluor pode aumentar a resistência, como dito (West & Joiner, 2014).

2.3. Aparência clínica da erosão

Na prática dentária clínica, ainda falta uma ferramenta específica para diagnosticar a erosão dentária e a sua progressão. Assim, a aparência clínica continua a ser a característica mais importante para diagnosticar a erosão, sendo particularmente difícil diagnosticar a erosão nos seus estadios iniciais (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011). A aparência clínica característica do desgaste erosivo é o esmalte liso, de aspeto sedoso e vítreo, com desaparecimento da periquimata e presença de esmalte íntegro ao longo da margem gengival, produzindo-se um defeito local descrito como escavação ou ranhura das superfícies oclusais, visto como característica patognomónica da erosão. Estas lesões características aparecem como um efeito combinado da desmineralização da superfície do dente por um agente erosivo e a abrasão da superfície desmineralizada por

tecidos moles orais circundantes, mastigação e escovagem (Ruben, Roeters, Truin, Loomans & Huysmans, 2019), tornando-se em lesões largas e rasas sem ângulos agudos (Derceli, Faraoni, Pereira da Silva & Palma-Dibb, 2016). Ao início, as características da erosão são as mesmas para as superfícies oclusais e incisais. A progressão adicional da erosão oclusal leva a um arredondamento das cúspides e, em casos graves, toda a morfologia oclusal desaparece (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011). Nos dentes restaurados, as restaurações tornam-se proeminentes, projetando-se acima da superfície do dente (Derceli, Faraoni, Pereira da Silva & Palma-Dibb, 2016).

A erosão deve ser diferenciada da atrição – desgaste dentário induzido pelo contacto dente com dente – e da abrasão – desgaste dentário causado pela interação entre os dentes e outros materiais. Nem sempre é fácil diferenciar estas lesões de desgaste na medida em que ocorrem frequentemente em simultâneo com diferentes efeitos proporcionais. Também, à medida que a camada de esmalte desmineraliza, torna-se mais suscetível à abrasão e atrição (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011). Destes três processos individuais de desgaste – atrição, abrasão e erosão – estudos epidemiológicos mostram que a erosão é a ameaça mais comum à perda de superfície dentária (Addy & Shellis, 2006).

2.4. Prevalência/incidência da erosão e fatores de risco

Ao contrário da cárie dentária, cuja prevalência tem vindo a diminuir, a erosão dentária está cada vez mais a aumentar, tendo sido relatada como um problema do século XXI (Nehme et al., 2016). A prevalência aumentada de erosão ao longo dos anos tem sido frequentemente atribuída aos fatores nutricionais, como o consumo regular de sumos de fruta e refrigerantes (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018), assim como mudanças significativas no estilo de vida e comportamentos (Santos et al., 2019). O refrigerante tem uma especial relevância devido ao crescente aumento do seu consumo desde os anos 80 até aos 2000 (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018). Contudo, a prevalência mundial de erosão permanece incerta, pois há uma variabilidade que pode ser explicada pelos diferentes índices utilizados, diferenças no diagnóstico, tipo de dentes examinados, tamanho da amostra, idade e fatores geográficos (Salas, Nascimento, Huysmans & Demarco, 2015).

Segundo uma revisão sistemática sobre estudos epidemiológicos muito recentes, a dentição decídua apresenta uma prevalência global de erosão entre os 30 e os 50%, com maior prevalência na Grécia e Suíça, ocorrendo mais frequentemente nos incisivos superiores e nas superfícies oclusais dos molares inferiores. No que diz respeito à dentição em crianças e adolescentes, a maior prevalência encontra-se no Médio Oriente e África (41%), sendo as lesões de erosão localizadas principalmente nas superfícies oclusais dos primeiros molares inferiores e nas superfícies palatinas dos dentes anteriores superiores. Relativamente ao género, nenhuma afirmação pode ser feita de qual o mais prevalente em crianças e adolescentes, embora estudos tenham revelado que há mais tendência para o sexo masculino ser afetado pela erosão nestas idades (Schlueter & Luka, 2018).

No que toca aos adultos, a prevalência de erosão global está entre os 20 e os 45%, com maior prevalência na Malásia e Suécia; os defeitos erosivos encontram-se principalmente localizados nas superfícies oclusais dos molares e nas superfícies palatinas dos dentes anteriores superiores, com uma prevalência ligeiramente maior nos homens (Schlueter & Luka, 2018).

Enquanto a erosão dentária inclui apenas os casos de amolecimento e perda de superfície causada pela exposição prolongada apenas aos ácidos (processo químico), o desgaste dentário erosivo (ETW) é um processo químico-mecânico que resulta na perda cumulativa de tecido duro dentário, em que a progressão das lesões é impulsionada por uma interação complexa entre os fatores nutricionais e os relacionados com o paciente (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018). Assim, a etiologia da erosão é multifatorial, e os ácidos envolvidos no processo de erosão são categorizados em duas fontes principais, ou seja, intrínseca e extrínseca (West & Joiner, 2014).

A erosão extrínseca é causada pelo consumo de alimentos ácidos – como citrinos, refrigerantes, vinho e temperos de saladas –, medicamentos ácidos – ácido acetilsalicílico, suplementos de ferro e suplementos de vitamina C – assim como pela exposição ocupacional – como vapores de ácidos de fábricas de baterias (devido ao ácido sulfúrico) e líquidos ácidos como os enólogos e nadadores profissionais (Kanzow, Wegehaupt & Attin, 2016). Hoje em dia sabe-se que os ácidos dietéticos afetam o segmento mais amplo da população (West & Joiner, 2014). Para além disto, outros medicamentos podem

aumentar indiretamente o risco de erosão dentária, pois reduzem a taxa de fluxo salivar e/ou a capacidade tampão da saliva, como ansiolíticos, antieméticos e anti-parkinsonianos.

Também, verificou-se que as bebidas desportivas são erosivas *in vitro* e quando consumidas durante atividades intensas, quando a pessoa está em estado de desidratação, os seus possíveis efeitos destrutivos podem ser aumentados ainda mais (Barbour & Lussi, 2014).

Já a erosão intrínseca ocorre devido ao contacto entre o fluido gástrico ácido e a cavidade oral, em pacientes que sofrem de bulimia, doença de refluxo gastro-esofágico ou alcoolismo. Os pacientes bulímicos, comparativamente aos pacientes anoréticos ou com outros distúrbios alimentares, são os mais frequentemente afetados pela erosão devido ao vômito frequente. Devido ao facto de o pH gástrico ser de aproximadamente 1 e ter uma grande quantidade de ácido livre, o seu potencial erosivo é mais alto do que o dos ácidos extrínsecos. Para além disto, os pacientes com distúrbios alimentares manifestam frequentemente uma taxa salivar reduzida como resultado de desidratação geral, o que pode aumentar ainda mais o risco de desenvolver lesões erosivas. Também os pacientes que sofrem de refluxo gastro-esofágico são frequentemente afetados pela erosão, na medida em que uma disfunção do esfíncter esofágico permite a passagem do ácido gástrico para a orofaringe, podendo alterar as condições da saliva ao alcançar a cavidade oral, entrando em contacto com a mesma (Kanzow, Wegehaupt & Attin, 2016).

O abuso crónico do álcool está frequentemente associado a vômitos e pode causar refluxo gastro-esofágico; também, os alcoólicos consomem bebidas potencialmente erosivas regularmente, levando tudo isto a potenciais lesões de erosão (Kanzow, Wegehaupt & Attin, 2016).

Dietas especiais, especialmente aquelas ricas em frutas e outros alimentos ácidos, podem aumentar o risco de erosão dentária. Uma dieta vegetariana ou vegan pode aumentar o risco de erosão, mas apenas dois estudos mostraram aumento da prevalência da erosão (Schlueter & Luka, 2018).

Apesar das novas tendências dietéticas referirem a frequente adição de soja aos produtos alimentares, verificou-se o potencial erosivo das bebidas com soja é menor do que as que não têm soja, pelo seu alto teor em cálcio e fosfato (Santos et al., 2019)

2.5. Bebidas erosivas

A erosão dentária é causada principalmente pelo consumo excessivo de refrigerantes erosivos (Wang et al., 2014); o consumo de bebidas energéticas, como o RedBull®, também é alto entre os adolescentes (Lussi & Carvalho, 2015). Os ácidos mais comumente encontrados em alimentos e bebidas são os ácidos fosfórico, cítrico, láctico, tartárico, acético, ascórbico e maleico (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018), em que o ácido cítrico (constituente de muitos refrigerantes e sumos de fruta) é o principal ácido envolvido na erosão (Colombo et al., 2017). Estes ácidos são ácidos fracos, responsáveis pelo baixo pH das bebidas e a sua alta capacidade tampão. Apesar de já terem sido realizados vários estudos para tentar apurar qual o ácido com maior potencial erosivo, é difícil isolar apenas um fator químico e prever o potencial dos diferentes ácidos (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018). Sabe-se que o potencial erosivo de uma bebida ácida não é exclusivamente dependente do seu valor de pH, mas é também fortemente influenciado pelo seu conteúdo mineral e uma série de fatores como o tipo de ácido, a concentração, a acidez titulável, capacidade tampão, concentração ácida não dissociada e a presença de potenciais inibidores de erosão (Barbour & Lussi, 2014).

Os teores de iões de cálcio e fosfato de um alimento ou bebida são fatores importantes para o potencial erosivo, pois influenciam o gradiente de concentração dentro do ambiente local da superfície do dente (Barbour & Lussi, 2014). Normalmente, estas concentrações são baixas, o que faz com que as bebidas sejam insaturadas em relação à apatite dentária: tal como referido anteriormente, o grau de saturação determina a força motriz para a dissolução dos dentes: soluções supersaturadas não induzem desmineralização, enquanto soluções não saturadas/subsaturadas em relação à apatite provocam desmineralização na superfície (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Assim, o potencial erosivo pode ser calculado com base no grau de saturação em relação à hidroxiapatite e fluorapatite, determinando o pH e teor de cálcio, fosfato e fluor de uma bebida (Barbour & Lussi, 2014). Por exemplo, há uma relação entre a presença de menos desgaste erosivo e o maior consumo de leite: o leite tem uma alta concentração de cálcio, fosfato e caseína, que protegem a superfície dentária contra a dissolução da hidroxiapatite; para além disto, o seu conteúdo lipídico e proteico adere à superfície dentária, atuando como uma barreira contra os ácidos (Assunção, Lussi, Rodrigues & Carvalho, 2019).

Em termos práticos, o grau de saturação de uma substância específica em relação ao esmalte mineral ($((pK-pl)_{HAP})$ e $((pK-pl)_{FAP})$) é um bom preditor da força motriz da dissolução do esmalte. Valores positivos, ou seja, $((pK-pl)_{HAP}) > 0$ indicam soluções supersaturadas, que tendem a causar precipitação mineral, enquanto valores negativos denotam soluções subsaturadas, que tendem a induzir a desmineralização erosiva do esmalte (Carvalho, Schmid, Baumann & Lussi, 2017).

Ao serem considerados ácidos fracos, significa que têm a capacidade de libertar prótons à medida que o dente se dissolve, favorecendo a dissolução do dente ao longo do tempo. Quanto mais grupos que libertam iões tiver, mais pode ser dissociado e, um ácido não dissociado não tem carga e pode facilmente difundir-se no tecido e sofrer dissolução no esmalte próximo da superfície, o que pode contribuir ainda mais para o seu potencial erosivo. Por outras palavras, estes ácidos fracos têm uma alta capacidade tampão a um pH específico e podem manter a dissolução dos dentes durante longos períodos de contacto (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Quando há excesso de um agente erosivo e é aplicada agitação da solução, o pH é o fator mais decisivo na determinação das taxas relativas de erosão das diferentes soluções (Barbour & Lussi, 2014). O efeito da capacidade tampão parece ser dependente do pH: quando o pH da solução é igual ao pKa do ácido, o ácido tem maior capacidade tampão e, portanto, é mais resistente ao efeito neutralizante da saliva. O método mais comum para conhecer a capacidade do tampão é a acidez titulável. Um dos fatores mais significativos na etiologia da erosão é o valor do pH das soluções que estão em contacto com os dentes. Como referido anteriormente, é importante ter em conta que não há valor crítico de pH para a erosão como existe para a cárie dentária: o valor crítico do pH depende da solubilidade do tecido dentário e das concentrações de cálcio e fosfato na solução que envolve o dente. O iogurte é um bom exemplo de alimento que tem um pH baixo (por volta dos 4,0) mas não é erosivo porque tem uma alta concentração de cálcio. Foi demonstrado que os valores críticos do pH variam entre 3,9 e 6,5, dependendo do alimento ou bebida analisados. Quando o pH da solução é inferior a 3,9, é altamente erosivo, independentemente da sua concentração de cálcio e fosfato: por exemplo, a Coca-Cola® tem um valor de pH de 2,5 mas o seu pH crítico é de 5,1, o que significa que é muito erosiva pois o seu pH é inferior ao pH crítico. Está comprovado que a taxa de dissolução do tecido dentário aumenta quando o pH diminui, com um efeito mais acentuado no esmalte; na dentina ainda são necessários mais estudos (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Uma outra medida relacionada com a capacidade tampão é a concentração de ácido dissociado. Tem sido sugerido que a forma dissociada de um ácido fraco pode ser importante como uma fonte móvel de tampão na dissolução subsuperficial, uma vez que se difunde nos poros do tecido dentário melhor do que a forma ionizada. Devido à sua falta de carga, atuam como transportadores móveis de H^+ para os locais de desmineralização, mantendo assim a taxa de dissolução: a dissolução não ocorre apenas na interface entre a solução e o esmalte, mas também dentro da camada fina e parcialmente desmineralizada e amolecida, o que pode ser descrito como desmineralização próxima da superfície. Assim, a desmineralização quase superficial depende principalmente da concentração da forma molecular do ácido dentro dos poros do esmalte, estando menos relacionada com as propriedades tampão da solução. Contudo, do ponto de vista da previsão do potencial erosivo, a concentração de ácido dissociado não é praticamente útil porque requer que as concentrações de ácidos individuais, bem como o pH, sejam determinados (Shellis, Barbour, Jesani & Lussi, 2013). Sugere-se até, que a concentração de ácido não dissociado, em vez da capacidade tampão *per se*, é um fator major no controlo das bebidas erosivas, devido à importância do ácido não dissociado como fonte facilmente difusível de iões H^+ na manutenção da dissolução próxima da superfície, na camada amolecida de esmalte (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

A temperatura também se torna um fator importante para o potencial erosivo de uma bebida se outros fatores forem iguais; a erosão progredirá mais rapidamente numa solução a uma temperatura elevada. Assim, as bebidas ácidas servidas quentes são mais erosivas do que as mesmas bebidas à temperatura ambiente ou do frigorífico, explicando assim o porquê de alguns chás de ervas poderem ser agentes erosivos agressivos (Barbour & Lussi, 2014).

O movimento físico da solução também deve ser tido em conta: num sistema não agitado ou estático, onde uma quantidade pequena de ácido é aplicada, a dissolução resulta num aumento local do pH e do conteúdo mineral na camada superficial da solução. Esta camada fica então saturada em relação ao esmalte e o tecido não desmineraliza mais. Este tipo de abordagens experimentais não abordam adequadamente a realidade clínica e terão, assim, pouca relevância clínica (Barbour & Lussi, 2014).

As propriedades físicas do meio erosivo também são fatores a serem considerados no processo erosivo: parece haver diferenças na capacidade das bebidas em aderir ao esmalte com base nas suas propriedades termodinâmicas, ou seja, o trabalho termodinâmico de adesão. Quanto maior a adesão de uma substância ácida, maior o tempo provável de contacto com a superfície do dente, o que pode resultar num desafio erosivo mais sustentado. Parece ser mais difícil a saliva deslocar um filme de refrigerante do que o filme de refrigerante deslocar a saliva (Barbour & Lussi, 2014).

Outro fator físico das bebidas que influencia a erosão é o fluxo de líquido sob a superfície do dente. Sabe-se que não se deve manter bebidas na boca e, ao invés, deve-se usar palhinha, já que a posição normal da mesma é em palatino dos incisivos superiores, o que tende a direcionar o líquido para longe das superfícies dos dentes (Shellis, Finke, Eisenburger, Parker & Addy, 2005).

A taxa de erosão é dependente da velocidade do líquido – baixas velocidades causam mais erosão – bem como do tempo de exposição e volume total da solução (Shellis, Finke, Eisenburger, Parker & Addy, 2005).

A viscosidade contribui para o efeito da camada de Nerst, uma camada fina de solução próxima da superfície do esmalte, que é relativamente estável (Jager, Vieira, Ruben & Huysmans, 2012). Em substâncias mais viscosas esta camada tende a ser mais estática, levando a uma taxa de depuração geralmente mais baixa que, por sua vez, torna as taxas de trocas iônicas mais lentas, entre o mineral do dente e a substância erosiva; a camada de Nerst tende a ter uma maior concentração de iões e torna-se menos subsaturada em relação ao esmalte, levando a uma menor desmineralização (Carvalho, Schmid, Baumann & Lussi, 2017). Assim, um aumento da viscosidade causa menor erosão, na medida em que há uma diminuição das trocas iônicas devido à camada formada (Aykut-Yetkiner et al., 2014; Carvalho, Schmid, Baumann & Lussi, 2017).

O potencial erosivo de uma solução, como já dito anteriormente, pode ser calculado com base no seu grau de saturação em relação à apatite dentária, que é determinado não apenas pelo seu pH, mas também pela sua concentração de cálcio e fosfato. Com base neste facto, vários estudos foram realizados de forma a testar o efeito da suplementação de cálcio e/ou fosfato sob o potencial erosivo de diferentes bebidas, chegando-se à conclusão de que a suplementação de cálcio na forma de glicerofosfato de cálcio (refrigerante) ou de

lactato de cálcio combinado com polifosfato linear de sódio (sumo de laranja) mostrou reduzir a erosão do esmalte. Para além disto, a combinação de cálcio e fosfato também reduziu o desenvolvimento da erosão dentinária. A suplementação com CPC-ACP (0,2%) e nano hidroxiapatite (0,25%) também demonstrou reduzir a erosão do esmalte quando adicionado a bebidas. De um modo geral, o cálcio tem se mostrado mais eficaz como suplemento do que o fosfato, provavelmente devido à sua maior proporção relativamente à apatite (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018) e é a abordagem mais amplamente testada, tendo mostrado reduzir a erosão por várias bebidas desportivas, em alguns casos com um aumento no pH (Barbour & Lussi, 2014).

Teoricamente, o fluor pode oferecer algum efeito protetor numa bebida com pH maior do que o indicado pela curva de saturação da fluorapatite em concentrações de Ca e PO₄. De facto, a adição de fluor (como o CaF₂) a refrigerantes reduz a erosão, mas apenas para aqueles com pH maior que 3 e com altas concentrações de fluor. Assim, é improvável que a suplementação de fluor seja uma estratégia útil, porque o desafio erosivo é agressivo e a concentração de fluor que pode ser incluída num produto para consumo é baixa (Barbour & Lussi, 2014).

Nos últimos anos, outros aditivos para as bebidas potencialmente redutores da erosão foram investigados. Há alguma evidência de que a suplementação de soluções ácidas com polímeros alimentares como a xantana e a carboximetilcelulose possa conferir uma redução modesta na dissolução da hidroxiapatite em ácido cítrico. Também, os fosfatos condensados, ao contrário do monofosfato, têm sido investigados e parecem oferecer maiores efeitos de redução da erosão quando adicionados aos ácidos, tanto *in vitro* quanto *in situ*. Moléculas maiores, como certas proteínas, podem ser benéficas quando adicionadas, como a ovalbumina de proteína de ovo e a proteína do leite caseína. No entanto, dados clínicos sobre a eficácia destes potenciais redutores da erosão ainda não estão disponíveis (Barbour & Lussi, 2014).

A quelação do cálcio por certos iões, particularmente o citrato, tem sido amplamente discutida na literatura da erosão. O ião citrato é capaz de quelar iões metálicos, incluindo o cálcio, e este facto tem sido frequentemente descrito como um mecanismo pelo qual as bebidas que contêm citrato poderiam erodir os dentes: assim, o ácido cítrico é particularmente prejudicial para os dentes, já que o anião citrato é capaz de quelar o

cálcio para além do efeito erosivo dos seus protões libertados (Wang et al., 2014). Em soluções de pH 3 a proporção de iões citrato apropriados para quelar é inferior a 3%; em valores de pH mais altos, como pH 6, a proporção de iões citrato aumenta para 93%. No entanto, a erosão deste pH devido à dissolução mediada por ácido é muito lenta e estas soluções raramente são consideradas um risco clínico significativo de erosão (Barbour & Lussi, 2014).

2.6. Prevenção da erosão

Apesar de todos os benefícios da suplementação iónica de bebidas falados anteriormente, pode causar alterações no paladar que podem não ser aceitáveis para o consumidor e para a estabilidade da solução, o que pode alterar o prazo de validade do produto (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Para alcançar a prevenção da erosão adequada, a redução da frequência de consumo e tempo de contacto de alimentos e bebidas potencialmente erosivos é desejável. Os pacientes devem evitar a retenção de bebidas erosivas na boca, evitando beber durante um período prolongado de tempo. O uso de palhinhas posicionadas na parte posterior da cavidade oral também é recomendado, para garantir que o fluxo não entra em contacto com as superfícies dos dentes. Por fim, a ingestão de lacticínios no final das refeições e à noite pode ser introduzido nos hábitos alimentares.

Nos pacientes com refluxo gastro-esofágico, deve-se aconselhar a que devam evitar alimentos que provoquem refluxo, como o vinho, citrinos, vinagre, gorduras, tomates, café, chá, refrigerantes e chocolate; devem também evitar refeições antes de irem dormir, diminuir o consumo de álcool e usar pastilha elástica, para aumentar a taxa de fluxo salivar.

Nos pacientes que têm bulimia, imediatamente após o vómito não devem escovar os dentes mas devem sim enxaguar a boca com água, leite, solução de bicarbonato de sódio ou, preferencialmente, colutório com fluor.

A gestão da prevenção depende do reconhecimento precoce dos primeiros sinais de lesão, para garantir que as estratégias apropriadas para fazer face aos fatores de risco sejam implementadas em tempo útil (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

3. Saliva

3.1. Funções da saliva

A saliva tem sido considerada como o fator biológico mais importante na prevenção da erosão dentária devido à sua capacidade de: (1) atuar diretamente sob o agente erosivo diluindo, eliminando, neutralizando e tamponando os seus ácidos; (2) desempenhar um papel na formação de uma camada protetora que cobre a superfície do dente, a película adquirida; e (3) reduzir a taxa de desmineralização e melhorar a remineralização ao fornecer iões como o cálcio, fosfato e fluor ao esmalte e dentina erodidos. Talvez o melhor indicador clínico das propriedades protetoras da saliva seja a taxa de fluxo, uma vez que praticamente todos os parâmetros salivares acima dependem da mesma (Hara & Zero, 2014). A taxa de fluxo salivar média não estimulada é de aproximadamente 0,35 ml/min, enquanto a estimulada é de 2 ml/min. No entanto, deve-se ter em conta que os parâmetros salivares da saliva não estimulada diferem da estimulada: a primeira tem uma menor concentração de cálcio do que a segunda, mas apresenta um maior teor proteico (Baumann, Bereiter, Lussi & Carvalho, 2017).

A saliva inicia o seu efeito protetor contra a erosão antes do desafio erosivo começar, através do aumento da taxa de fluxo como resposta a estímulos extra-orais, como o odor ou a visão. O alimento amargo, por exemplo, tem uma forte influência no fluxo salivar antecipatório; a hipersalivação também ocorre antes do vômito como resposta ao centro de vômito do cérebro, ação frequentemente observada em pacientes com bulimia e alcoolismo crónico. Por outro lado, pacientes com doença de refluxo gastro-esofágico não beneficiam desta proteção na medida em que a regurgitação é uma resposta involuntária não coordenada pelo sistema nervoso autónomo.

A maior taxa de fluxo salivar cria um cenário favorável para a prevenção ou minimização do ataque erosivo inicial devido ao aumento dos constituintes orgânicos e inorgânicos da saliva. Os constituintes com interesse principal no processo da erosão são o ácido carbónico (H_2CO_3)/carbonato de hidrogénio (HCO_3^-), di-hidrogenofosfato (H_2PO_4^-)/fosfato de hidrogénio (HPO_4^{2-}), cálcio (Ca^{2+}) e fluor (F^-). Estes iões estão associados ao aumento da capacidade tampão da saliva e à manutenção da integridade dos dentes, sendo o carbonato de hidrogénio o principal tampão de sódio. Quando o ácido atinge a cavidade oral, vários mecanismos salivares entram em ação para proteger os dentes.

Os estímulos intraorais do fluxo salivar devem-se principalmente à estimulação química e mecânica. Assim, dependendo dos estímulos, diferentes glândulas salivares podem ser afetadas, levando à variação no fluxo salivar e na composição e, portanto, influenciando o nível de proteção salivar.

Pode-se sugerir que fatores como a consistência dos alimentos e os locais da boca afetam o padrão de eliminação do ácido. Sítios pouco/mal banhados por saliva ou principalmente banhados por saliva mucosa são mais prováveis de apresentar erosão em comparação com sítios protegidos por saliva serosa. Segundo os estudos mais recentes, o tempo necessário para a saliva neutralizar e/ou eliminar o ácido da superfície do dente pode variar entre os 2 e 5 minutos (Hara & Zero, 2014).

3.2. Película adquirida

Uma das muitas funções de proteção que a saliva apresenta é a formação da película de esmalte adquirida, uma fina camada à base de proteínas dinamicamente formadas na superfície dentária após a sua escovagem com pasta dentífrica, dissolução química ou profilaxia (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019), devido às interações iônicas e hidrofóbicas, bem como às forças Van der Waals (Baumann, Kozik, Lussi & Carvalho, 2016). Esta película protege contra a erosão, impedindo o contacto direto entre os ácidos e a superfície do dente, e as proteínas constituintes podem também atuar como tampão. Este efeito protetor vai depender da composição, espessura e tempo de maturação da película (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019) e é limitado pela agressividade do desafio erosivo (Hara & Zero, 2014) – existem alguns estudos que avaliam o impacto do tipo de ácido sob o efeito e características da película, mas ainda não há comparação entre o ácido cítrico e o ácido clorídrico (Alencar et al., 2016).

A película atua, assim, como uma membrana semipermeável que regula e modifica o processo de desmineralização na superfície do dente; no entanto, não inibe completamente as alterações relacionadas com o ácido na superfície do esmalte, pois estas ocorrem apenas em contacto direto com o agente ácido e a superfície (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019). A redução da perda de cálcio causada pela película de esmalte atinge cerca de 60% mas não consegue proteger a superfície do dente contra desafios erosivos severos (Hannig & Hannig, 2014).

A taxa de clearance/depuração dos agentes erosivos pode ser influenciada pela anatomia dos dentes e tecidos moles, assim como pelo movimento da língua, mucosa vestibular e padrão de deglutição (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

Todos os dentes expostos ao meio oral são revestidos pela película adquirida, sendo constituída por componentes macromoleculares da saliva, fluido crevicular gengival, sangue, bactérias, mucosa e componentes da dieta.

A película salivar começa a formar-se assim que o esmalte entra em contacto com a saliva (Carvalho, Baumann & Lussi, 2016). Primeiro, as proteínas salivares adsorvem-se na superfície do esmalte devido às interações eletrostáticas entre as macromoléculas e os iões fosfato e cálcio da apatite hidróxido do esmalte. A formação subsequente da película é caracterizada por interações proteína-proteína e adsorção de proteínas únicas, aglomerados proteicos e outras biomacromoléculas, principalmente da saliva (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019); forma-se em cerca de 1 minuto, com uma espessura de 10 a 20 nm (Baumann, Bereiter, Lussi & Carvalho, 2017). A película formada consiste em 2 camadas numa estrutura de “malha”: uma camada basal densamente compactada de proteínas inicialmente adsorvidas, com proteínas e péptidos de ligação ao fosfato e ao cálcio (especialmente estaterinas, histatinas e proteínas ácidas ricas em prolina), sob a qual é depositada (de maneira dependente do tempo e do local) uma camada globular mais complexa e heterogénea, composta por agregados proteicos heterotípicos (mais de 360 proteínas) (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019). Em geral, a formação da película é considerada um processo seletivo, uma vez que apenas um número limitado de proteínas detetadas na saliva é encontrado na película. Existem três grupos principais de proteínas na película, consoante a sua função: proteínas que possuem capacidade de se ligar a iões de cálcio (como proteínas ricas em prolina, estaterinas e histatinas), proteínas que revelam alta tendência para se ligarem a iões fosfato, e proteínas que são relevantes para a interação com outras proteínas (interações proteína-proteína). Há uma tendência para as proteínas salivares com alta afinidade para o cálcio ou fosfato serem mais abundantes nas fases iniciais (5-10 min) de formação de película, enquanto as proteínas mais relevantes para a interação proteína-proteína estão mais presentes numa fase tardia (2 h) (Hannig & Hannig, 2014). Entre as proteínas identificadas, 14,4% derivam de glândulas salivares, 67,8% de células e 17,8% originam-se de soro, oriundo do fluido crevicular (Buzalaf, Hannas & Kato, 2012).

Durante um ataque ácido, a película é dissolvida das suas camadas externas para a camada basal, mais densa, que tem maior estabilidade contra a dissolução ácida (Carvalho, Baumann & Lussi, 2016). A camada exterior revela uma solubilidade comparativamente alta aos ácidos enquanto a camada basal densamente arranjada fornece uma alta estabilidade contra a dissolução pelos ácidos (Hannig & Hannig, 2014). De acordo com o local da cavidade oral, forças mecânicas distintas e diferentes glândulas salivares influenciam a composição e espessura da película adquirida (Alencar et al., 2016). Um estudo mostra que o consumo de refrigerante por apenas 20 segundos leva a uma diminuição da microdureza da superfície, embora as estruturas da película tenham sobrevivido na superfície do dente (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

Os péptidos de ligação ao cálcio presentes na camada basal da película podem ligar-se a iões de cálcio livres da saliva circundante e agir como um reservatório de cálcio na película, permitindo assim a homeostase mineral na superfície do esmalte. Para além disso, o cálcio pode-se difundir facilmente através da película, sendo esta troca de cálcio entre a saliva e a superfície do dente importante para o processo de remineralização (Baumann, Bereiter, Lussi & Carvalho, 2017).

Diferentes fatores podem influenciar a formação da película adquirida, como o conteúdo proteico da saliva e o tipo de substrato do esmalte presente na boca do indivíduo – esmalte decíduo ou permanente. O conteúdo proteico da saliva difere consoante a idade: existem concentrações significativamente mais baixas de proteína em crianças mais jovens (6 a 9 anos) do que em crianças mais velhas e adultos, tendo-se demonstrado também um aumento significativo na concentração total de proteína amilase e de imunoglobulina A salivar com a idade. Também, as películas formadas nos dentes decíduos são consideravelmente mais finas e possuem teores proteicos diferentes dos dentes permanentes; como o esmalte decíduo difere do permanente tanto nos arranjos cristalinos como na composição mineral e orgânica, leva a adsorção de proteínas salivares diferentes, com uma adsorção mais lenta, por parte da película (apenas tem 42% de proteínas em comum com a dentição permanente). É importante ter em conta também que a concentração de cálcio na saliva adulta é significativamente maior do que na saliva de crianças (Carvalho, Baumann & Lussi, 2016).

Assim, estas diferenças podem levar a diferentes conteúdos proteicos nas películas adquiridas de crianças e adultos que, por sua vez, levam a efeitos protetores diferentes:

ambas as películas conferem proteção eficaz contra a erosão, mas a película adulta confere melhor proteção no esmalte permanente e a película infantil no esmalte decíduo (Carvalho, Baumann & Lussi, 2016).

A eficiência protetora da película contra a erosão também é dependente das suas propriedades físicas, como a sua espessura e o tempo de maturação. A espessura varia amplamente em toda a cavidade oral: é mais espessa nas superfícies linguais dos dentes inferiores, uma vez que essa região é constantemente banhada por saliva das glândulas submandibulares e sublingual. Já as superfícies palatinas dos dentes superiores são expostas a forças de cisalhamento por parte da língua e também não são tão banhadas em saliva, resultando numa camada mais fina. Assim, uma película mais grossa apresenta efeitos protetores mais fortes contra a erosão e as superfícies dentárias mais afetadas são as que apresentam as películas mais finas (Vukosavljevic, Custodio, Buzalaf, Hara & Siqueira, 2014; Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Também, devido às composições distintas do esmalte e da dentina, pode-se supor que as películas formadas nestes tecidos dentários possam ser diferentes. Estudos *in vitro* e *in situ* indicam que a película oferece melhor proteção contra a erosão do esmalte do que da dentina: acredita-se que a maior porosidade e solubilidade da dentina leva a uma desmineralização mais rápida, o que pode impedir que a película funcione como uma barreira protetora. No entanto, mais estudos são necessários para verificar estas diferenças (Vukosavljevic, Custodio, Buzalaf, Hara & Siqueira, 2014).

Diversas abordagens têm sido feitas para alterar a constituição da película, de modo a torná-la mais resistente a desafios ácidos: as proteínas que possuem propriedades anti erosivas incluem as proteínas salivares, dietéticas e sinteticamente formuladas. De modo a controlar de forma eficaz os processos de desmineralização/remineralização é fundamental compreender como modificar a composição da película para favorecer as propriedades anti erosivas, o que pode ser conseguido através da incorporação de proteínas em colutórios, pastas dentífricas ou até mesmo bebidas desportivas (Vukosavljevic, Custodio, Buzalaf, Hara & Siqueira, 2014).

Um estudo recente mostrou que a película de esmalte pode de facto ser modificada com a caseína, mas confere ainda mais proteção contra a erosão com a combinação de caseína com mucina: a mucina sozinha dificilmente se liga à película, mas quando forma um

complexo com a caseína, a ligação à película e o efeito protetor são aumentados.

A caseína contém cerca de 80% das proteínas do leite de vaca e é uma família de 4 fosfoproteínas relacionadas que têm a capacidade de se ligar diretamente ao esmalte, formando uma barreira de dissolução na superfície. Já as mucinas são proteínas formadoras de muco encontradas em variados organismos que podem interagir com as proteínas salivares e trocá-las na película devido às interações proteína-proteínas entre elas, o que aumenta a sua capacidade de se ligarem à película.

Assim, modificação da película com a combinação de caseína e mucina mostra reduzir efetivamente a erosão do esmalte *in vitro*, para além de diminuir também o número de bactérias cariogénicas aderentes ao esmalte. Estudos prévios sobre este tema estudaram a mesma concentração de caseína e mucina; porém, um estudo recente estudou diferentes concentrações, apurando que um aumento geral na concentração de ambas as proteínas – 3,0% de caseína e 0,81% de mucina – aumentou ainda mais o efeito de anti erosão conferido à película (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019).

A ovalbumina, proteína da clara de ovo, também pode reduzir a erosão da hidroxiapatite em soluções ácidas, uma vez adsorvida na superfície da hidroxiapatite na forma de película. Também alguns polímeros alimentares, como o hexametáfosfato de sódio e a xantana possuem propriedades anti-erosivas (Vukosavljevic, Custodio, Buzalaf, Hara & Siqueira, 2014).

3.3. Remineralização

O complexo equilíbrio entre a indução da remineralização pela supersaturação da saliva, a inibição da formação de apatite e a inibição da dissolução dentária pelas proteínas da película adquirida são fatores importantes na modulação da desmineralização e remineralização dentária (Sieber, Schmidt, Baumann, Lussi & Carvalho, 2019). Nas lesões iniciais de cárie, a remineralização da estrutura subsuperficial do esmalte restante pode ocorrer. No caso da erosão, como já visto atrás, o ganho mineral ocorre no esmalte superficial parcialmente desmineralizado, pelo que a remineralização deve ser reconsiderada no contexto a erosão (Lussi, Schluter, Rakhmatullina & Ganss, 2011).

Quando o agente erosivo é neutralizado ou removido da superfície do dente, o cálcio e o fosfato salivares podem remineralizar o esmalte erodido (Hara & Zero, 2014). Os processos de remineralização e reendurecimento do esmalte ocorrem numa escala de tempo significativamente longa, e curtos tempos de remineralização parecem fornecer apenas um reendurecimento parcial do esmalte amolecido. Os períodos de remineralização variam de 1 a 4 horas no período diurno e de 6 a 8 horas durante a noite; no entanto, durante a noite, o fluxo salivar é reduzido pelo que a remineralização apresenta uma capacidade limitada. O aumento do tempo de exposição salivar ao esmalte erodido promove um aumento progressivo dos valores de dureza superficial do esmalte: períodos de apenas 30 minutos a 1 hora permitem um ganho de dureza superficial, sugerindo, assim, que a remineralização ocorre. Contudo, após 2 horas de ação superficial, a dureza aumenta novamente, mas não difere estaticamente do período de 12 horas (devido à falta de fluxo salivar noturno) (Alencar et al., 2016), ou até de 24 horas a 7 dias (Mendonça et al., 2017). Pode-se assim concluir que 30 minutos, 1 e 2 horas de exposição salivar diferem na capacidade de endurecimento do esmalte amolecido pelo ácido, e que 2 horas de exposição parecem ser apropriadas para o reendurecimento parcial, mas não total, da superfície do esmalte erodido (Alencar et al., 2016). No entanto, a resistência ácida da própria camada da película parece ser dependente do tempo de formação, uma vez que a película de 2 h se dissolve mais rapidamente na superfície do esmalte do que as películas de 6, 12 e 24 h (Buzalaf, Hannas & Kato, 2012).

Também, relativamente ao grau de proteção conferido pelas películas formadas em diferentes tempos, as películas formadas ao longo de 24 horas ou 7 dias não apresentam uma diferença significativa na capacidade de proteção contra a erosão, e o grau de proteção fornecido pelas películas formadas in situ em 3 min ou 2 horas é semelhante: isto significa que a maior proteção contra a erosão parece ser fornecida pela camada basal da película (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018).

Embora seja importante, a proteção da saliva (antes, durante e após a exposição ao ácido) pode não ser suficiente para prevenir a erosão dentária; os seus fatores de proteção biológica são mais eficazes quando ocorrem episódios ocasionais ou leves de ataque ácido na cavidade oral. Assim, a erosão dentária pode ser drasticamente aumentada por desafios altamente erosivos e/ou por disfunção salivar (Hara & Zero, 2014).

3.4. Variações na eficácia da proteção salivar

A saliva representa a expressão biológica da suscetibilidade de um indivíduo à erosão dentária, conforme observado em vários estudos, onde se relatou que a saliva de diferentes doadores oferece diferentes níveis de proteção contra a erosão do esmalte e da dentina.

Uma taxa de fluxo mais baixa diminui a capacidade da saliva em neutralizar e tamponar os ácidos, aumentando as hipóteses de desenvolvimento da erosão. A hipossalivação pode ser definida como a diminuição das taxas de fluxo salivar não estimulado e estimulado para menos de 0,1 e 0,7 ml/min, respetivamente. Esta hipofunção da glândula é causada principalmente pelo efeito colateral de medicação, síndrome de Sjögren, radioterapia da cabeça e do pescoço e padrões específicos de dieta e de exercício. Associado aos seus sinais clínicos comuns está a presença de cáries rápidas e severas e a erosão dentária. A estimulação mecânica e química salivar, bem como o uso de substitutos de saliva, têm sido sugeridos para compensar a falta de saliva; também foram considerados produtos de cuidado oral altamente fluoretados e com cálcio. No entanto, ainda são necessários estudos clínicos para verificar melhor o potencial das pastas altamente fluoretadas para evitar a erosão em pacientes hipossalivadores (Hara & Zero, 2014).

A composição da saliva pode variar inter e intraindividualmente, bem como durante o dia e de acordo com o tipo e a duração da estimulação e do tempo. Para além disso, fatores salivares individuais como o conteúdo de mucina, a composição proteica e a viscosidade também determinam o seu efeito protetor (Steiger-Ronay et al., 2019). O nível de proteção salivar contra a desmineralização depende da glândula pela qual a saliva é secretada. A glândula submandibular é o principal contribuinte para o fluxo salivar não estimulado, produzindo saliva com altas concentrações de mucina; apesar das glândulas sublinguais serem predominante mucosas, contribuem com apenas 5% da saliva secretada, o que faz com que a maior fonte de mucinas seja proveniente das glândulas submandibulares, daí a importância do estudo da saliva não estimulada em repouso. Recentemente, mucinas – MUC7 e MUC5B – foram identificadas em alta quantidade na película adquirida de esmalte tratado com fluor e estanho, o que levou a uma melhor proteção contra a erosão; desta forma, as mucinas são consideradas constituintes estruturais importantes da película, como já visto atrás, com a MUC5B presente na sua camada basal. Um estudo mostrou que 1 hora de película submandibular e sublingual promoveram proteção completa da superfície do esmalte, enquanto a película originada das glândulas parótidas produz apenas 20%

de proteção; para além disso, apenas se detetaram mucinas (MG2) na película de 1 hora na face lingual dos incisivos inferiores, mas não na face vestibular dos pré-molares superiores. No entanto, isto não pareceu afetar significativamente o grau de desmineralização erosiva do esmalte, ao contrário de alguns estudos que afirmam que a película lingual promove maior resistência à erosão em comparação com a película vestibular. Assim, mais estudos são necessários para verificar a ação da película adquirida nas diferentes localizações da cavidade oral. Deve-se ter em conta que numa situação clínica, e não em experiências laboratoriais, as glândulas parótidas são as principais contribuintes para a taxa de fluxo salivar, e o seu papel principal está relacionado com a capacidade tampão, através do aumento de bicarbonato (Mendonça et al., 2017); também, a saliva da parótida é caracterizada por altas quantidades de amilase e proteínas ricas em prolina, sendo esta glândula major a única com secreção exclusivamente serosa (Hannig & Balz, 2001).

As proteínas salivares podem influenciar a desmineralização e remineralização dentária, como as proteínas ricas em prolina, histatinas e cistatinas, que demonstram ter uma alta afinidade à superfície do esmalte, fornecendo uma proteção contra o ataque ácido.

Também, as proteínas adquiridas da película do esmalte como a albumina, mucina, proteínas ácidas ricas em prolina e cistatinas, têm sido importantes contribuintes para a proteção do esmalte contra a erosão (Hara & Zero, 2014).

Estudos anteriores mostraram que, em contraste com indivíduos saudáveis, pacientes com desmineralização erosiva apresentam uma menor queda do pH após um ataque erosivo e menor capacidade de atingir as condições iniciais do pH, estando relacionado com a menor capacidade tampão da saliva dos pacientes com desgaste erosivo. Assim, concluiu-se que as películas salivares de pacientes com desgaste erosivo são diferentes das películas de pacientes saudáveis, sendo que estas últimas conferem um melhor efeito protetor para o esmalte: as películas de pacientes com desgaste apresentam uma menor quantidade de proteína total, menor quantidade de estaterina e menor quantidade de cálcio (Baumann, Bereiter, Lussi & Carvalho, 2017).

4. Escovagem e abrasão

É de consenso geral que a escovagem não causa desgaste significativo do esmalte e da dentina ao longo da vida. No entanto, tanto as pastas dentífricas como as escovas demonstram desempenhar um papel crucial na manifestação do desgaste erosivo (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017). Como já visto atrás, quando o tecido dentário duro sofre um ataque erosivo, a perda mineral forma uma camada superficial amolecida, entre 0,2 a 3 µm de profundidade, com dureza superficial reduzida, tornando o tecido mais suscetível a efeitos deletérios como a escovagem (Lussi, Lussi, Carvalho & Cvikl, 2014). Também, em estudos anteriores se demonstrou que a língua exerce um efeito abrasivo sob o esmalte erodido, removendo parcialmente a camada amolecida (Alencar et al., 2016).

Há uma série de fatores que podem potencialmente afetar a gravidade do desgaste abrasivo dos tecidos duros dentários, como: o tipo de abrasivo e a sua concentração, a viscosidade da pasta, a força de escovagem, a frequência e a duração, o tipo de escova de dentes e a sua geometria, a rigidez do filamento e, por fim, a condição do substrato modificado pela severidade, duração e tempo da fase do desafio ácido e remineralização. Com base nestes dados e tendo em conta todos os fatores, postula-se que a abrasividade das pastas dentífricas continua a ser o parâmetro mais importante que afeta o processo de abrasão dos tecidos duros dentários (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017), cujo efeito afeta muito mais a dentina do que o esmalte (Addy & Shellis, 2006) sendo a rigidez dos filamentos da escova um parâmetro secundário (Wiegand et al., 2008). Sabe-se também que a escovagem sem pasta dentífrica não é capaz de remover o esmalte amolecido (Voronets & Lussi, 2010).

No que toca ao tipo de escova de dentes, as escovas de nylon, por si só, não têm efeitos significativos sob os tecidos duros dentários, mas podem influenciar indiretamente o processo de abrasão ao modular a ação dos abrasivos da pasta dentífrica. Isto acontece porque os diferentes tipos de escovas diferem na sua capacidade de transportar os abrasivos da pasta para a superfície: a rigidez dos filamentos, a densidade da escova e a área da cabeça da escova coberta por filamentos mostram modular este processo (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017).

As escovas suaves, médias e duras de uma mesma marca variam na rigidez dos seus filamentos e no número de filamentos por tufo, mas não no diâmetro do tufo.

No entanto, a área de contacto efetiva do filamento em cada tufo com a superfície do dente varia conforme os filamentos são mais compactados em escovas suaves do que em escovas duras. Estas diferenças afetam a forma como as partículas abrasivas são transportadas pela superfície: os filamentos mais compactados têm a capacidade de transportar mais partículas abrasivas (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017). A abrasão provou-se ser maior nas escovas de dentes macias devido ao facto de as cerdas macias terem maior flexão, levando ao aumento da duração e da área de contacto das cerdas com a superfície escovada, transportando uma maior quantidade de pasta dentífrica (Wiegand et al., 2008).

A desmineralização erosiva do esmalte resulta num amolecimento da superfície, responsável pelo aumento da suscetibilidade ao desgaste mecânico. Na dentina, por outro lado, há alguns estudos que mostram que a camada superficial de desmineralização com matriz colagénica é resistente a forças de escovagem clinicamente relevantes; foi demonstrado que o impacto da escovagem na dentina erodida é menos pronunciado do que no esmalte porque o colagénio exposto pode atuar como barreira contra os impactos mecânicos.

Vários estudos mostram que o aumento dos períodos de espera da escovagem após os desafios erosivos provavelmente aumentam a resistência à abrasão do esmalte, devido à remineralização da superfície; no entanto, este tópico é ainda uma questão de debate (Buzalaf, Magalhães & Rios, 2018). Verifica-se que há pouco aumento da perda de estrutura do esmalte com o aumento da duração da escovagem. O esmalte previamente erodido, no entanto, aumenta a sua perda com o tempo de escovagem, embora não de forma linear. Existe uma certa discrepância entre os estudos no que toca à perda de estrutura e a abrasividade relativa do esmalte (REA). Alguns estudos não encontram correlação entre estes dois fatores, mas encontram direccionalidade, o que significa que o esmalte superficial amolecido se pode comportar mais como a dentina do que como o próprio esmalte; outros concluem que ambos os fatores estão relacionados positivamente e que a rigidez do filamento desempenha um papel menor no desgaste (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017).

O tempo de espera de escovagem após um desafio erosivo tem sido amplamente estudado, e depende do efeito da saliva para permitir tempo suficiente de remineralização da superfície do esmalte amolecido, antes de aplicar forças abrasivas de uma escova de dentes. A escovagem imediata dos dentes (após 0 min do ataque erosivo) resulta numa perda de esmalte significativamente maior comparativamente a outros tempos de espera – apesar de ser observado uma maior perda de mineral na superfície, a escovagem tem pouco efeito na superfície do dente são subjacente. No entanto, mesmo após 60 min de espera, a perda de substância é muito maior do que a não escovagem de todo, e a recuperação do esmalte não se mostra completa após esse tempo: como observado noutros estudos, mesmo após 2 h de espera, não parece existir um efeito protetor contra a abrasão do esmalte. De facto, há um reendurecimento da superfície do esmalte previamente amolecida; no entanto, não há uma recuperação completa, mas sim um ganho mineral e redução de 20 a 70% da profundidade de desmineralização (Tsuda, Kitasako, Sadr, Nakashima & Tagami, 2016). De facto, com a exposição de esmalte amolecido à saliva durante 2 horas resulta em menor abrasão por parte da escova de dentes, mas continua a haver uma perda irreversível do esmalte, independentemente do tempo de exposição à saliva. Assim, ainda há alguma controvérsia sobre o intervalo de tempo ideal entre o consumo de alimentos/bebidas ácidas e a subsequente escovagem (Steiger-Ronay et al., 2019).

Deve-se ter em conta que os refrigerantes são, por norma, bebidas açucaradas e que, adiar a escovagem pode prevenir a perda de tecido duro na escala dos nm ou μm , mas a perda causada por cárie pode ser maior. Assim, adiar a escovagem após o consumo de bebidas açucaradas não é recomendado para os pacientes do ponto de vista da prevenção da cárie, mas sim apenas para pacientes de alto risco que já apresentam desgaste dentário erosivo (Tsuda, Kitasako, Sadr, Nakashima & Tagami, 2016).

5. Pastas dentífricas

5.1. Pastas fluoretadas

Como a saliva é limitada no seu potencial de remineralização, foram desenvolvidos auxiliares de remineralização para aumentá-la oralmente, de forma a tratar e ajudar a prevenir tanto a erosão como a cárie dentária (Fernando et al., 2019). Deste ponto de vista, as pastas dentífricas têm sido consideradas veículos eficazes e acessíveis para melhorar a

resistência do esmalte aos ataques erosivos (Colombo et al., 2017).

O fluor, geralmente na forma de fluoreto de sódio (NaF), é um agente remineralizador bem reconhecido que promove a remineralização das lesões de erosão quando libertado na saliva (Fernando et al., 2019). Nas pastas dentífricas, o fluor leva à formação de CaF_2 na superfície do esmalte erodido, reduzindo parcialmente a erosão do esmalte após os ciclos erosivos (Danelon et al., 2018), dependendo do conjunto de iões de cálcio e fosfato da saliva disponíveis para formar fluorapatite (Fernando et al., 2019). Os aglomerados de CaF_2 agem como uma barreira física inibindo o contacto do ácido com o esmalte e também atuam nos processos de endurecimento (Danelon et al., 2018). As pastas dentífricas convencionais com NaF são capazes de reduzir a perda de tecido mesmo em condições erosivas severas, mas têm eficácia limitada em relação à abrasão da escovagem (Assunção, Lussi, Rodrigues & Carvalho, 2019).

Contudo, mesmo nos indivíduos com um fluxo salivar normal, os níveis de cálcio e de fosfato da saliva disponíveis podem-se tornar limitativos para a remineralização, o que resultou em novas tecnologias para aumentar a eficácia das pastas dentífricas na remineralização (Fernando et al., 2019). Quando comparadas com as pastas dentífricas sem fluor, as que contêm fluor têm melhores efeitos preventivos contra a erosão. No entanto, a fim de desenvolver dentífricos que promovam a formação de precipitados mais resistentes aos ácidos, outras formulações foram testadas, usando compostos de fluoreto de amina ou estanho, bem como fosfatos ou aditivos de biopolímeros (Assunção, Lussi, Rodrigues & Carvalho, 2019).

O estanho associado ao fluor tornou-se conhecido pela sua notável eficácia em inibir o processo de desmineralização (Da Silva, Ramos-Oliveira, Mantilla & Freitas, 2017). O estanho pode adsorver-se na sílica, reduzindo assim a quantidade de iões Sn livres na suspensão, podendo a boa eficácia das pastas dentífricas de Sn livres de partículas ser atribuída à boa disponibilidade de iões Sn (Ganss, Marten, Hara & Schlueter, 2016). O mecanismo de ação dos produtos de SnF está menos relacionado com a precipitação de sais de CaF_2 e mais na reação entre os iões de estanho e o tecido duro dentário, que pode levar à formação de sais de Sn_2OHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$. Estes sais formam uma camada estável que é relativamente resistente a ácidos: quando confrontados com um processo de desmineralização-remineralização, os iões são incorporados na superfície do esmalte, resultando assim numa maior resistência aos ácidos

(Da Silva, Ramos-Oliveira, Mantilla & Freitas, 2017). Para além de precipitar a formação e incorporação no esmalte, o estanho também interage com as proteínas da película, aumentando o seu efeito protetor contra a erosão ácida (Algarni, Lippert & Hara, 2015).

O estanho sozinho tem uma capacidade semelhante à do fluoreto, que tem um efeito protetor limitado contra a desmineralização erosiva. No entanto, quando se combina SnF_2 e AmF/SnCl_2 , eles são significativamente mais eficientes na inibição da perda mineral dentária (Da Silva, Ramos-Oliveira, Mantilla & Freitas, 2017).

Na dentina, o F reduz a perda de superfície, o que pode ser devido à retenção de fluor na dentina intertubular e peritubular. No entanto, apesar de sozinho o NaF ser melhor que o SnCl_2 , a sua combinação é melhor. Assim, soluções com Sn podem ser recomendadas para indivíduos com alto risco de erosão dentinária (Algarni, Lippert & Hara, 2015). A manutenção da matriz orgânica desmineralizada até que ocorra a remineralização reduz a quantidade de perda tecidual na dentina. No entanto, mesmo que a desmineralização do esmalte e da dentina pelos ácidos tenha cessado, a desorganização da malha de colagénio da dentina pode ocorrer como resultado de collagenases endógenas, incluindo as metaloproteinases de matriz (MMPs), que na dentina as mais comuns são as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (Cvikl, Lussi, Carvalho, Moritz & Gruber, 2018).

As MMPs são enzimas dependentes de zinco e cálcio que regulam o metabolismo fisiológico e patológico de tecidos à base de colagénio. São secretadas como proenzimas inativas e são ativadas no tecido: na dentina ou na saliva são ativadas por um pH baixo de 4,5; no entanto, não são capazes de degradar a matriz orgânica da dentina em pH ácido. Assim que o pH retorna aos níveis normais, as MMPs são ativadas e degradam a matriz orgânica rica em colagénio desmineralizado que permaneceu na dentina após o desafio erosivo. Diversos inibidores das MMPs já foram investigados, como a epigallocatequina-galato do chá verde, o sulfato ferroso e a clorhexidina, que apresentam um efeito protetor contra a erosão. Também o estanho, que fica parcialmente retido na matriz orgânica, pode inibir diretamente as MMP-2 e MMP-9, na forma de SnCl_2 e SnF_2 , devido ao ião Sn^{2+} , já que o NaCl e o NaF não mostram ter nenhum efeito inibitório direto sob as MMPs. Assim, uma aplicação diária, por exemplo, na forma de um colutório, pasta dentífrica ou verniz deve ser testada quanto ao efeito e segurança de forma a poder passar-se a usar estes compostos para prevenção da erosão (Cvikl, Lussi, Carvalho, Moritz & Gruber, 2018).

Sabe-se que os fosfopéptidos de caseína (CPP) estabilizam os iões de cálcio, fosfato e fluor, permitindo uma grande supersaturação dos iões solúveis na saliva para remineralização da estrutura dentária. O motivo de ligação do CPP, semelhante ao da proteína salivar de estaterina, atrai iões de cálcio e, conseqüentemente, fluor e fosfato, para formar nanocomplexos solúveis de iões amorfos, conhecidos como CPP-ACP (fosfato de cálcio amorfo) (Fernando et al., 2019). Assim, o mecanismo de ação das pastas alcalinas de fosfopéptido amorfo de fosfato de cálcio (CPP-ACP) baseia-se na capacidade do ACP se ligar à superfície do dente num desafio ácido. A ligação entre o fosfopéptido de caseína (CPP) e o ACP é dependente do ácido e reduz à medida que o pH cai. Assim, sob condições ácidas, o CPP-ACP local tampona os iões livres de cálcio e fosfato, aumentando o nível de fosfato de cálcio na placa e mantendo um estado de supersaturação que inibe a desmineralização e aumenta a remineralização, prevenindo episódios de erosão dentária.

Sabe-se também que pastas que as recentes pastas dentífricas que contêm 5% de nitrato de potássio e 0,32% de fluoreto de sódio como ingredientes ativos aumentam os valores de dureza do esmalte e inibem o amolecimento subsequente após um ataque erosivo. Segundo estudos recentes, ambas as formulações destas pastas dentífricas aumentam a resistência da superfície do esmalte ao ataque ácido erosivo, em dentes primários e permanentes, sendo recomendadas para prevenir a erosão dentária. No entanto, a pasta com CPP-ACP fornece melhor proteção e é mais eficaz contra ataques ácidos desmineralizantes (Zawaideh, Owais & Mushtaha, 2017).

Mais recentemente demonstrou-se que a adição de SnF_2 ao CPP-ACP aumenta a estabilidade do complexo, a capacidade de ligação a iões e a distribuição de iões na superfície do dente para remineralização, pelo que a combinação destes dois compostos faz com que a eficácia na remineralização seja melhor do que quando atuam sozinhos (Fernando et al., 2019).

Diversos estudos foram realizados para tentar aumentar os efeitos de produtos com F aplicados topicamente contra a erosão, entre os quais o uso de fosfatos inorgânicos, que mostram produzir efeitos protetores adicionais quando adicionados a pastas dentífricas. A adição de trimetafosfato de sódio (TMP) em partículas micrométricas às pastas de F mostra-se significativamente mais eficaz contra a erosão do esmalte quando comparada com as

suas contrapartes sem TMP, levando a um reendurecimento do esmalte comparativamente com as pastas convencionais (1100 ppm de F). A adição de TMP nanométrico aumenta significativamente o efeito protetor contra a erosão do esmalte, atingindo níveis semelhantes aos promovidos pelas pastas de 5000 ppm de F. Uma maior formação de CaF_2 ocorre quando o F está associado ao TMP; para além disto, a adsorção de TMP no esmalte é capaz de bloquear a difusão de ácido, minimizando o amolecimento do esmalte numa profundidade de 10 mm. O efeito sinérgico do F e TMP é mais pronunciado quando o TMP é adicionado como partículas nanométricas pois os materiais nanométricos tem uma alta proporção entre a área de superfície e o volume, bem como uma alta percentagem de átomos à superfície em comparação com partículas maiores, o que os torna mais reativos quando comparados com partículas micrométricas. Concentrações mais elevadas de F reduzem a adsorção de TMP no esmalte devido à maior resistência de ligação química de F, resultando num efeito antagónico entre os agentes.

Assim, o menor tamanho da partícula promove maior reatividade com a superfície do esmalte e, portanto, reduz a erosão (Danelon et al., 2018).

Outros estudos têm sido desenvolvidos para a aplicação de pastas dentífricas sem fluor: mostrou-se que formulações livres de fluor com quitosana são notavelmente eficazes. Este biopolímero é capaz de se adsorver no esmalte e sobreviver aos desafios de pH podendo, assim, fornecer uma camada protetora. A quitosana pode-se adsorver na mucina e protege-la contra a remoção por meio de surfactantes (Ganss, Marten, Hara & Schlueter, 2016).

Também uma nova pasta dentífrica *gel to foam* (“gel para espuma”) foi desenvolvida com isopentano (2% p/p) para criar um grande volume de espuma microfina durante a escovagem, de forma a aprimorar o sabor das pastas e as suas propriedades organoléticas, incentivando a adesão à escovagem duas vezes ao dia. O isopentano destas pastas evapora na boca, aumentando assim o volume de espuma comparativamente à pasta dentífrica padrão e, portanto, facilita a distribuição intraoral.

Em termos de erosão, as pastas *gel to foam* proporcionam um maior reendurecimento da superfície do esmalte e maior resistência à erosão, comparativamente às pastas dentífricas convencionais.

Contudo, não existe uma diferença estatisticamente significativa em termos de eficácia: isto sugere que o aumento da distribuição intraoral não aumenta a sua eficácia na remineralização das lesões erosivas e, portanto, não há diferença entre as pastas dentífricas convencionais e estas, em termos de reendurecimento do esmalte (Nehme et al., 2016).

5.2. Pastas dentífricas com clorhexidina

Quando a clorhexidina é adsorvida na película, a adsorção dos componentes salivares anteriormente mencionados é intensificada. Assim, este composto parece ser capaz de aumentar o papel protetor da película adquirida contra os ataques erosivos. Foi também relatado que os géis de clorhexidina são capazes de prevenir completamente a erosão da dentina (De Souza-e-Silva, da Silva Ventura, De Pau, de Lima Leite & Buzalaf, 2017).

Uma característica interessante dos compostos com CHX é que existem proteínas específicas que são expressas aquando da sua aplicação: devido à sua natureza catiónica, a CHX liga-se a proteínas aniónicas da película e novas proteínas salivares são capazes de se adsorver. Uma dessas proteínas únicas é a PRRC2C, uma PRP. Como já visto atrás, estas proteínas, juntamente com a estaterina, ajudam a controlar a erosão ao modularem as concentrações de fosfato e cálcio na cavidade oral (De Souza-e-Silva, da Silva Ventura, De Pau, de Lima Leite & Buzalaf, 2017).

5.3. Abrasivos

As lesões erosivas são fenómenos de superfície localizados em áreas expostas a muitos impactos químicos e físicos, e os desafios ácidos levam a uma superfície de esmalte parcialmente desmineralizada, mais propensa à abrasão. Assim, não apenas o ingrediente ativo da pasta dentífrica se torna importante, mas também a sua abrasividade. Produtos que contêm o mesmo composto e concentração de fluor fornecem graus de proteção diferentes: a razão para isto pode ser variada, mas também é conhecido que a fração particulada da pasta, frequentemente referida como abrasivo, seja um importante fator de eficácia. Estas partículas são normalmente sílica, de vários tamanhos e formas e com diferentes propriedades. Além da limpeza e do polimento, uma outra função da sílica é o espessamento da pasta (Ganss, Marten, Hara & Schlueter, 2016).

As partículas podem afetar a eficácia da pasta dentífrica de várias formas: pode ser a sua ação física, que provoca a perda de superfície através de fenómenos simples de abrasão, ou devido a perturbar a interação dos agentes ativos com o esmalte, impedindo o desenvolvimento de estruturas resistentes aos ácidos. Para além disto, a fração particulada também pode interagir com os agentes ativos da pasta como, por exemplo, a interação entre o Sn e os iões.

A abrasividade em termos de RDA ou REA pode ser um determinante para a perda de tecido: há uma certa associação entre a abrasividade e a perda, mas essa associação não parece ser linear. Formulações com maior abrasividade podem remover o esmalte desmineralizado até um certo grau, mas podem não afetar o tecido subjacente, enquanto formulações muito abrasivas podem causar também perda em camadas mais profundas do esmalte não afetadas pelos desafios erosivos (Ganss, Marten, Hara & Schlueter, 2016).

A quantidade de partículas parece ter um impacto na perda de tecido. As partículas tendem a aglomerar-se com concentrações mais altas ou podem causar uma estrutura mais densa dentro dos sulcos da superfície do esmalte erodido, impedindo a sua ação, causando menos desgaste, o que leva a uma relação entre a quantidade de partículas e a abrasividade nem sempre linear (Ganss, Marten, Hara & Schlueter, 2016).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Objetivo do estudo

O objetivo deste trabalho final é o planeamento de um futuro projeto de investigação sem a sua conceção. É desenvolvido o tema da erosão com um levantamento do estado da arte bem como da sua problemática atual, fazendo-se uma investigação sobre um tema ainda controverso na literatura – o “timing” da escovagem após um desafio erosivo com RedBull® focando-se nas lesões da erosão em análise de microscopia ótica, ao invés da habitual microscopia eletrónica. Esta investigação terá então como objetivo a análise sistemática do aspeto histológico do estado do esmalte humano, interpretando as características estruturais e biológicas do tecido de esmalte num estado de saúde e num estado erosivo, *ex-vivo*, quando:

- O mesmo é escovado com uma escova elétrica e com uma pasta dentífrica fluoretada ou uma pasta com clorhexidina, 0 min, 30 min, 120 min e 240 min após a exposição a um agente erosivo, relacionando assim o tipo de pasta dentífrica com o tempo de espera para escovagem após o desafio erosivo
- Comparar as características estruturais dos dois grupos de estudo entre si
- Comparar as características estruturais dos dois grupos de estudo com o grupo controlo, caracterizando qualitativamente o padrão de superfície do esmalte erodido a nível de microscopia ótica

No geral, a erosão deve ser estudada consoante um dos principais problemas clínicos: exposição a um refrigerante erosivo ou refluxo gástrico, tendo-se optado pelo refrigerante.

2. Construção do projeto

O futuro projeto será um estudo observacional, analítico, em 33 molares humanos, que serão obtidos de sujeitos anónimos através do banco de dentes da Clínica Dentária Egas Moniz. O estudo será submetido à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz, para obter esta autorização.

Os estudos observacionais fazem inferências sob o efeito de uma exposição ou intervenção em sujeitos ou amostras, nos quais a atribuição de amostras a grupos é observada e não manipulada (por exemplo, por meio de randomização) pelo investigador. A investigação observacional envolve a observação direta das amostras e, como tal, quais são expostas à intervenção é determinado por critérios de inclusão e exclusão, pelo que é preciso fazer uma pesquisa bibliográfica de forma a definir quais os padrões adequados para o estudo: os dados recolhidos da pesquisa são assim utilizados para examinar uma nova questão científica (Carlson & Morrison, 2009).

3. Considerações éticas

Terá de ser obtido o Consentimento Informado para a realização do futuro projeto, através da Direção Clínica da Clínica Universitária Egas Moniz (para o banco de dentes) e o estudo será submetido à Comissão de Trabalho Científica, assim como à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz. Assim, a primeira tarefa será a aprovação da proposta de trabalho científico pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética (Anexo 1) do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM). Neste consentimento é necessário desenvolver e explicar o objetivo do futuro projeto de investigação.

4. Amostragem

Após a aprovação do projeto pela comissão científica, a segunda tarefa será a recolha apropriada da amostra que, neste caso, são os 33 molares humanos. Como critérios de inclusão serão considerados: dentes íntegros, não cariados, livres de fraturas e sem alterações de superfície expostas a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos; como critérios de exclusão serão dentes com malformações, não íntegros, que tiverem sido expostos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros) ou eletromagnéticos (radiações a laser). O substrato de tecido duro apropriado para os estudos de erosão pode ser derivado tanto de dentes humanos como de bovinos, mas o de escolha é o de dentes humanos (Shellis, Ganss, Ren, Zero & Lussi, 2011).

Todos os dentes, após extração, terão de ser lavados com água corrente da torneira e curetados com curetas de Gracey (Santos et al., 2019), sendo posteriormente armazenados numa solução de 1% de cloramina-T tri-hidratada, a pH 7,3 (Carvalho & Lussi, 2015). Após uma semana deste armazenamento, os dentes terão de ser colocados em água desionizada a 4°C até ao seu posterior uso.

De seguida, avança-se para a terceira tarefa, que será o corte dos dentes. Primeiramente, a coroa dos dentes deve ser separada da raiz, através de um micrótomo de tecidos duros disponível nas instalações da Universidade, o Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). Após esta separação e antes de se continuar com o resto do corte das amostras, deve-se primeiramente polir as coroas dos dentes seccionados e aplanar as cúspides, através de discos de lixa de granulação 320, 600 e/ou 1200 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com refrigeração na máquina polidora LaboPol-4 (WS Struers 18-B, Dinamarca) a 40 rotações por minuto. Como a superfície do esmalte mostra uma aspereza intrínseca que dificulta a deteção de pequenas alterações causadas por erosão/abrasão, a maioria dos métodos usados para avaliar a erosão precisa de superfícies polidas para uma avaliação precisa dos defeitos erosivos e para criar superfícies de referência (Zawaideh, Owais & Mushtaha, 2017). Os procedimentos de polimento das amostras devem ser padronizados para garantir a remoção de uma camada externa de esmalte consistente, produzindo assim amostras com profundidade padronizada, uma vez que a diferentes profundidades a composição mineral e a solubilidade diferem. Nos vários estudos de erosão o polimento remove a camada mais externa expondo o esmalte subsuperficial, que parece ser mais homogéneo já que é mais suscetível à dissolução (Shellis, Ganss, Ren, Zero & Lussi, 2011; Carvalho & Lussi, 2015).

Após o polimento, dar-se-á início ao resto do corte das amostras em palitos (Fig.X) no micrótomo. Para tal, cada coroa terá de ser colada com cera colante a um suporte de metacrilato (Fig.X) (Carvalho & Lussi, 2015). Primeiro terão de ser feitos os cortes no sentido VL (Fig. X) e posteriormente no sentido MD, até se obterem os palitos de 1mm x 1 mm. Para a correta análise histológica, deve-se pintar a coroa do dente com 3 cores diferentes, de forma a identificar as 3 zonas do dente e a comparação histológica ser equitativa entre amostras: zona mesial, central e distal do dente, devidamente identificadas pelo investigador, mas sem revelar as zonas ao observador histológico, para não incorrer em viés.

Após o corte das amostras, obter-se-ão cerca de 132 palitos dos 33 molares, tendo sido este número de dentes escolhido devido à perda de alguns palitos durante o processamento do corte no micrótomo. A quarta tarefa será a distribuição dos palitos, que terão então de ser distribuídos pelos seguintes 7 grupos, aleatoriamente:

- Grupo 1 (N=12) – sem erosão e sem saliva (grupo controlo – esmalte são)
- Grupo 2 Grupo 2 (N=12) - RedBull® + água desionizada (grupo controlo) - imersão 3 minutos em 50 mL de RedBull® a 4°C num agitador magnético a 75 rpm, 4 vezes por dia, durante 5 dias. As amostras serão lavadas com água desionizada e posteriormente armazenadas em água desionizada a 37°C, entre cada desafio erosivo;
- Grupo 3 (N=12) - RedBull® + saliva artificial (grupo controlo) - imersão 3 minutos em RedBull® a 4°C num agitador magnético a 75 rpm, 4 vezes por dia, durante 5 dias. As amostras serão lavadas com água desionizada e posteriormente armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo;

Nos restantes grupos, todas as amostras serão submetidas a ciclos erosivos com RedBull® a 4°C, durante 3 min, 4 vezes por dia, durante 5 dias, num agitador magnético a 75 rpm. Modificando o “timing” de escovagem e o tipo de pasta (Barbour & Lussi, 2014).

- Grupo 4 (N=24) RedBull® + 0 min de incubação na saliva;
 - Subgrupo 4.1 (N=12) - Imediatamente após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e escovadas com uma pasta dentífrica fluoretada e uma escova elétrica durante 15 segundos. As amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e posteriormente armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.
 - Subgrupo 4.2 (N = 12) - Imediatamente após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e escovadas com uma pasta dentífrica com clorhexidina e uma escova elétrica durante 15 segundos. As amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e posteriormente armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.

- Grupo 5 (N=24) RedBull® + 30 min de incubação na saliva;
 - Subgrupo 5.1 (N=12) - Após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 30 min a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com escova elétrica, e com pasta dentífrica fluoretada durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.
 - Subgrupo 5.2 (N=12) - Após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 30 min a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com uma escova elétrica, e com pasta dentífrica com clorhexidina durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.
- Grupo 6 (N=24) RedBull® + 2 h de incubação na saliva;
 - Subgrupo 6.1 (N=12) - Após o desafio erosivo as amostras foram lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 2 h a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com escova elétrica, e com pasta dentífrica fluoretada durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.
 - Subgrupo 6.2 (N=12) - Após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 2 h a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com uma escova elétrica, e com pasta dentífrica com clorhexidina durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.

- Grupo 7 (N=24) RedBull® + 4 h de incubação na saliva;
 - Subgrupo 7.1 (N=12) - Após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 4 h a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com escova elétrica, e com pasta dentífrica fluoretada durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.
 - Subgrupo 7.2 (N=12) - após o desafio erosivo as amostras serão lavadas com água desionizada e submergidas em saliva artificial durante 4 h a 37°C. De seguida, as amostras serão novamente lavadas com água desionizada e escovadas, com uma escova elétrica, e com pasta dentífrica com clorohexidina durante 15 s. Posteriormente as amostras serão, novamente, lavadas com água desionizada e armazenadas em saliva a 37°C, entre cada desafio erosivo.

Em cada grupo irão submeter-se para preparação 12 amostras para serem observadas em microscopia ótica, sob o ponto de vista de análise qualitativa.

5. Seleção de materiais e técnicas

5.1. Ciclos erosivos

A quinta tarefa será aplicar o desafio erosivo das amostras previamente descritas. O padrão de ciclos de qualquer desafio ácido deve refletir um hábito alimentar ou distúrbio médico de formar a ser clinicamente relevante (Shellis, Ganss, Ren, Zero & Lussi, 2011). Assim, como se trata de um refrigerante, cada amostra terá de ser imersa durante 3 min em 50 ml de RedBull® a 4°C, num agitador magnético (Agimatic-N Selecta) a 75 rpm, 4 vezes por dia, durante 5 dias. Uma solução agitada é uma melhor representação da realidade clínica, como já dito anteriormente na introdução, uma vez que a solução ácida que o paciente consome move-se na cavidade oral, sob as superfícies dos dentes, e será reabastecida enquanto o paciente estiver a beber durante um certo período de tempo. Isto leva a uma dissolução contínua e, por esta razão, é importante que a agitação da

solução ácida em estudos de laboratório seja bem definida e reprodutível (Barbour & Lussi, 2014).

Após cada ciclo erosivo todas as amostras terão de ser lavadas com água desionizada, secas com ar, sem óleo, durante 5 segundos (Carvalho & Lussi, 2015). Depois, as amostras do grupo 2 terão de ser incubadas em água desionizada a 37°C e as dos grupos 3, 4, 5, 6 e em saliva artificial a 37°C, sendo que o tempo de incubação irá depender do grupo a que as amostras pertencem. Antes dos desafios erosivos, o pH do agente erosivo – RedBull® – terá de ser medido com um medidor de pH (pH METER, GLP 22, Crison) (Santos et al., 2019).

5.2. Saliva artificial

Para um meio remineralizador, o uso de saliva artificial em investigações de erosão é na maioria dos casos aceitável (Shellis, Ganss, Ren, Zero & Lussi, 2011). A saliva artificial a ser usada será constituída por: 0,4000g de cloreto de sódio (NaCl), 0,4000g de cloreto de potássio (KCl), 0,2918g de di-hidrogenofosfato de sódio monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$), 0,2000g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,0050g de sulfito de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), 1,000g de ureia, 0,5136g de hidrogenofosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), água destilada ultra pura, até perfazer 1000 ml, com pH 7,0.

5.3. Escovagem das amostras

Após o tempo de incubação, passa-se à sexta tarefa que será a escovagem das amostras. As amostras serão retiradas da estufa e lavadas com água desionizada, sendo posteriormente escovadas com uma escova elétrica e pasta de fluor ou clorhexidina, consoante o grupo a que pertencem, durante 15 s - o tempo de escovagem frequentemente recomendado é de 2 minutos, o que equivale a 15 segundos por superfície (Lippert, Arrageg, Eckert & Hara, 2017) – com as cerdas da escova paralelas à superfície do dente. No fim, lavam-se as amostras com água desionizada até os restos da pasta dentífrica serem eliminados.

A escolha das pastas dentífricas está de acordo com outras investigações realizadas no instituto, de forma a dar continuidade aos resultados. A pasta dentífrica fluoretada a ser utilizada será a Oral-B Pro-Expert – Proteção profissional, Procter & Gamble

UK, Weybridge, Surrey, KT13 OXP, UK – composta por glicerina, sílica hidratada, hexametáfosfato de sódio, propilenoglicol, PEG-6, água, lactato de zinco, lauril sulfato de sódio, aroma, gluconato de sódio, pó de *chondrus crispus*, fosfato trissódico, fluoreto estanhoso (1100 ppm de fluor), sacarina sódica, goma xantana, cera de copernicia cerífera, cinamal, sílica, fluoreto de sódio (350 ppm de fluor), Cl e eugenol.

No que toca à pasta de dentes com clorhexidina, será usada a Elgydium, Proteção gengivas, Pierre Fabre, Boulogne, France. É composta por água, carbonato de cálcio, glicerina, sílica, sílica hidratada, lauril sulfato de sódio, aroma, carragenina, álcool benzílico, goma de celulose, digluconato de clorhexidina, limão, metilparabeno, propilparabeno, sacarina de sódio e dióxido de titânio.

6. Análise das amostras ao microscópio ótico

Apesar da microscopia eletrónica ser a técnica mais utilizada para a avaliação histológica da erosão, pretendeu-se estudar a erosão e otimizar a técnica através da microscopia ótica visto que é uma técnica que ainda não está descrita na literatura em termos de erosão, e será um método diferente de quantificar esta condição clínica.

6.1. Fixação das amostras

A fixação, que será a sétima tarefa a ser realizada, é tipicamente o primeiro passo para preparar o tecido para a análise microscópica. É importante preservar os tecidos evitando alterações como resultado de putrefação ou autólise, daí a importância deste primeiro passo. O fixador tem como função desnaturar proteínas por coagulação, formação de compostos aditivos ou uma combinação de coagulantes e processos aditivos. Para além disto, os fixadores promovem a fixação de corantes a componentes celulares específicos, removem a água de forma a aumentar o índice de refração do tecido para melhorar a diferenciação ótica, e alteram o índice de refração dos tecidos, melhorando o contraste para uma visualização sem manchas (Shields & Heinbockel, 2018).

Não existe um fixador ideal que atenda a todos os requisitos necessários: cada fixador possui propriedades e desvantagens específicas. Os fixadores típicos, dependendo do tipo de tecido e técnica de microscopia pretendida, podem incluir: formalina, fixador de *Zenker*, fixador de *Bouin*, fixador de *Helly*, fixador de *Carnoy*, glutaraldeído, tetróxido

de ósmio, ácido crômico, dicromato de potássio, ácido acético, álcoois (etanol, metanol), cloreto mercúrico e acetona. No estudo a realizar, fixaremos as amostras em formol a 10% durante 24 horas (Shields & Heinbockel, 2018).

6.2. Descalcificação

Como o dente se trata de um tecido calcificado, as amostras têm de ser amolecidas através da descalcificação. Os dentes não podem ser seccionados no micrótomo convencional devido à sua dureza e alto conteúdo em cálcio. Assim, a oitava tarefa será remover o mineral de cálcio do tecido. Conseguem-se melhores secções de tecido dentário quando as amostras são cortadas e embebidas em resinas de celoidina, em vez da técnica convencional de cera de parafina (Chandra, 2010, p. 314).

Antes de se fazer a descalcificação, os tecidos devem ser lavados durante 12 horas em água corrente, após a fixação. O agente descalcificante deve ter um volume de 30 a 50 vezes o tecido. Alguns agentes descalcificantes típicos incluem ácido nítrico, fluido de *Gooding e Stewart*, descalcificador ósseo rápido (RDO) e agentes quelantes. Neste estudo será usado o DC3, composto de ácido nítrico a 10% + EDTA (Shields & Heinbockel, 2018).

6.3. Desidratação

A nona tarefa será a desidratação, em que os tecidos serão colocados em concentrações progressivamente crescentes de um agente desidratante, tipicamente o etanol. As amostras serão submetidas aos seguintes ciclos:

- Álcool a 70% - 24 horas em vácuo
- Álcool a 95% - 24 horas em vácuo
- Álcool a 100% - 72 horas, em que as primeiras 24 horas serão em vácuo

É importante incluir duas etapas de álcool absoluto (ou seja, a 100%) para garantir que toda a água restante seja removida. A etapa de desidratação é crítica, pois a água é imiscível com a maioria dos meios de incorporação (isto é, parafina). Portanto, o tecido deve ser trocado entre agentes polares (por exemplo, água) e não polares (por exemplo, reagentes orgânicos, como o xilol) (Shields & Heinbockel, 2018).

6.4. Limpeza

A “limpeza” do tecido é necessário devido ao tratamento com o agente desidratante. Muitos agentes têm um índice de refração semelhante ao do tecido, deixando o tecido praticamente translúcido. Assim, a décima tarefa será a remoção do agente desidratante do tecido. A etapa de limpeza pode ser mais eficaz com o uso de um sistema de vácuo: assim, após a última etapa com álcool a 100%, o tecido será embebido em xilol durante 24 horas, em vácuo (Shields & Heinbockel, 2018).

6.5. Impregnação

A décima primeira tarefa será a aplicação da solução impregnadora, cuja finalidade será a remoção do agente de limpeza do tecido e permeabilizar o tecido com resina de celoidina. Isto permitirá que o tecido endureça e se produza um bloco a partir do qual podem ser feitos cortes histológicos finos (Shields & Heinbockel, 2018).

6.6. Incorporação

Após o processo de impregnação, é necessário obter um bloco sólido, que será a décima segunda tarefa. O agente impregnador e meio de incorporação mais comum é a parafina. No entanto, devido ao alto conteúdo mineral, optar-se-á pelas resinas de celoidina. Os tecidos deverão ser desidratados e incorporados com soluções de nitrato de celulose dissolvidas numa mistura de álcool / éter. O solvente é deixado evaporar para produzir um bloco de tecido com a consistência necessária. Serão feitas 24 horas em vácuo e posteriormente outras 24 a 48 horas a polimerizar na estufa (Shields & Heinbockel, 2018).

6.7. Observação ao microscópio ótico

Após todos os passos para preparação das amostras e o respetivo corte, as amostras serão observadas ao microscópio. A avaliação da erosão deverá ser feita através da comparação de pontos de referência específicos, para medir a espessura do tecido presente/perdido e comparando essas medidas com os grupos de controlo correspondentes. Assim, em todas as amostras será identificado, por exemplo, a linha amelodentinária, e medir-se-á a espessura do tecido até à superfície, comparando posteriormente com o grupo controlo.

Desta forma, nos diferentes grupos, será possível quantificar a perda de tecido e, portanto, o efeito de cada tempo de desafio erosivo e posterior *timing* de escovagem.

III. CONCLUSÃO

A erosão dentária é uma patologia que leva à perda irreversível da estrutura dentária, podendo levar a alterações tanto a nível funcional como estético, impactando no conforto do dia-a-dia dos indivíduos. Visto que o consumo de bebidas erosivas, como os refrigerantes, tem vindo a aumentar exponencialmente com o passar dos anos, o estudo da erosão passou a ser um tópico de extremo interesse. Contudo, a grande variedade de métodos disponíveis para investigação leva a que os resultados de diferentes investigações sejam contraditórios e, portanto, ainda muitos temas sejam assunto de debate.

O principal objetivo do planeamento deste projeto foi fazer uma revisão da literatura sobre os temas que ainda precisam de ser estudados e, também, aplicar uma diferente metodologia que ainda não foi abordada: a microscopia ótica e a erosão. Enquanto os diversos estudos existentes sobre a erosão usam essencialmente a microscopia eletrónica, este projeto terá como foco a convencional microscopia ótica, de modo a se perceber se será uma nova metodologia viável no estudo deste tema e economicamente mais acessível.

Ao mesmo tempo, foca-se também no potencial erosivo dos refrigerantes, neste caso o RedBull®, pois estudos anteriores têm-se centrado mais nos sumos de laranja e na Coca-Cola®, pelo que a introdução de uma bebida erosiva diferente, cujo consumo tem vindo a aumentar e é muito popular entre jovens.

Também, o tema de maior debate no que toca à erosão na atualidade tem a ver com o tempo de escovagem após um desafio erosivo. Sendo que a erosão se está a tornar cada vez mais frequente no consultório de um Médico-Dentista, o mesmo tem de saber como aconselhar devidamente o seu paciente de forma a prevenir o aparecimento ou uma progressão das lesões de erosão. Visto que ainda não se chegou a um consenso sobre qual o tempo de espera mais adequado, o planeamento deste projeto teve também como objetivo clarificar melhor qual será o tempo ideal.

Ao avaliar o tempo de escovagem, avalia-se também a própria eficácia da pasta dentífrica utilizada no estudo que, neste caso, permitirá testar, mais uma vez, a eficácia

das pastas fluoretadas e também das pastas com clorhexidina, já que as últimas não têm tantos estudos publicados. Espera-se também perceber se será passível de ser observada alguma remineralização a nível da microscopia ótica ou não.

Este trabalho visa, então, facilitar uma futura investigação sobre esta temática, visto que aborda os principais problemas dos clínicos na atualidade com a erosão, e permite que a partir de todo este trabalho se desenvolva não só um apuramento dos conhecimentos à cerca desta patologia, como a extrapolação rápida e fácil para os materiais e métodos de uma investigação futura.

IV. BIBLIOGRAFIA

Addy, M., & Shellis, R. P. (2006). Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. In *Dental Erosion* (Vol. 20, pp. 17-31). Karger Publishers.

Alencar, C. R. B. D., Mendonça, F. L., Guerrini, L. B., Jordão, M. C., Oliveira, G. C. D., Honório, H. M., ... & Rios, D. (2016). Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softened enamel. *Brazilian oral research*, 30(1).

Algarni, A. A., Lippert, F., & Hara, A. T. (2015). Efficacy of stannous, fluoride and their combination in dentin erosion prevention in vitro. *Brazilian oral research*, 29(1), 1-5.

Almeida e Silva, J. S., Baratieri, L. N., Araujo, E., & Widmer, N. (2011). Dental erosion: understanding this pervasive condition. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 23(4), 205-216.

Assunção, C. M., Lussi, A., Rodrigues, J. A., & Carvalho, T. S. (2019). Efficacy of toothpastes in the prevention of erosive tooth wear in permanent and deciduous teeth. *Clinical oral investigations*, 23(1), 273-284.

Avery, J. K., Steele, P. F., & Avery, N. (Eds.). (2002). *Oral development and histology*. New York: Thieme.

Aykut-Yetkiner, A., Wiegand, A., Ronay, V., Attin, R., Becker, K., & Attin, T. (2014). In vitro evaluation of the erosive potential of viscosity-modified soft acidic drinks on enamel. *Clinical oral investigations*, 18(3), 769-773.

Barbour, M. E., & Lussi, A. (2014). Erosion in relation to nutrition and the environment. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 143-154). Karger Publishers.

Baumann, T., Bereiter, R., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2017). The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Scientific reports*, 7(1), 12999.

Baumann, T., Carvalho, T. S., & Lussi, A. (2015). The effect of enamel proteins on erosion. *Scientific reports*, 5, 15194.

Baumann, T., Kozik, J., Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2016). Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Scientific reports*, 6, 34760.

Bliggenstorfer, S. E., & Lussi, A. (2016). Accuracy of Different Methods for Assessing Erosive Tooth Wear. *JDR Clinical & Translational Research*, 1(3), 218-225.

Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5), 493-502.

Buzalaf, M. A. R., Magalhães, A. C., & Rios, D. (2018). Prevention of erosive tooth wear: targeting nutritional and patient-related risks factors. *British dental journal*, 224(5), 371.

Carlson, M. D., & Morrison, R. S. (2009). Study design, precision, and validity in observational studies. *Journal of palliative medicine*, 12(1), 77-82.

Carvalho, T. S., Baumann, T., & Lussi, A. (2017). Does erosion progress differently on teeth already presenting clinical signs of erosive tooth wear than on sound teeth? An in vitro pilot trial. *BMC oral health*, 17(1), 14.

Carvalho, T. S., Baumann, T., & Lussi, A. (2016). In vitro salivary pellicles from adults and children have different protective effects against erosion. *Clinical oral investigations*, 20(8), 1973-1979.

Carvalho, T. S., & Lussi, A. (2015). Susceptibility of enamel to initial erosion in relation to tooth type, tooth surface and enamel depth. *Caries research*, 49(2), 109-115.

Carvalho, T. S., Schmid, T. M., Baumann, T., & Lussi, A. (2017). Erosive effect of different dietary substances on deciduous and permanent teeth. *Clinical oral investigations*, 21(5), 1519-1526.

Chandra, S., Chandra, S., Chandra, M., & Chandra, N. (2010). Textbook of Dental and Oral Histology with Embryology and MCQS. 2/E. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

Colombo, M., Dagna, A., Moroni, G., Chiesa, M., Poggio, C., & Pietrocola, G. (2019). Effect of different protective agents on enamel erosion: An in vitro investigation. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 11(2), e113.

Colombo, M., Mirando, M., Rattalino, D., Beltrami, R., Chiesa, M., & Poggio, C. (2017). Remineralizing effect of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion caused by soft drinks: ultrastructural analysis. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 9(7), e861.

Creeth, J. E., Kelly, S. A., Martinez-Mier, E. A., Hara, A. T., Bosma, M. L., Butler, A., ... & Zero, D. T. (2015). Dose-response effect of fluoride dentifrice on remineralisation and further demineralisation of erosive lesions: A randomised in situ clinical study. *Journal of dentistry*, 43(7), 823-831.

Cvikl, B., Lussi, A., Carvalho, T. S., Moritz, A., & Gruber, R. (2018). Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases. *Journal of dentistry*, 78, 51-58.

Da Silva, C. V., Ramos-Oliveira, T. M., Mantilla, T. F., & de Freitas, P. M. (2017). Frequency of application of AmF/NaF/SnCl₂ solution and its potential in controlling human enamel erosion progression: an in situ study. *Caries research*, 51(2), 141-148.

Danelon, M., Pessan, J. P., Santos, V. R. D., Chiba, E. K., Garcia, L. S. G., de Camargo, E. R., & Delbem, A. C. B. (2018). Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(2), 119-124.

de Souza-e-Silva, C. M., da Silva Ventura, T. M., De Pau, L., de Lima Leite, A., & Buzalaf, M. A. R. (2017). Effect of gels containing chlorhexidine or epigallocatechin-3-

gallate on the protein composition of the acquired enamel pellicle. Archives of Oral Biology, 82, 92-98.

Derceli, J. D. R., Faraoni, J. J., Pereira-da-Silva, M. A., & Palma-Dibb, R. G. (2016). Analysis of the early stages and evolution of dental enamel erosion. Brazilian dental journal, 27(3), 313-317.

Faller, R. V., Eversole, S. L., & Saunders-Burkhardt, K. (2014). Protective benefits of a stabilised stannous-containing fluoride dentifrice against erosive acid damage. International dental journal, 64, 29-34.

Fernando, J. R., Shen, P., Sim, C. P., Chen, Y. Y., Walker, G. D., Yuan, Y., ... & Reynolds, E. C. (2019). Self-assembly of dental surface nanofilaments and remineralisation by SnF₂ and CPP-ACP nanocomplexes. Scientific reports, 9(1), 1285.

Ganss, C., Marten, J., Hara, A. T., & Schlueter, N. (2016). Toothpastes and enamel erosion/abrasion–Impact of active ingredients and the particulate fraction. Journal of dentistry, 54, 62-67.

Ganss, C., Schulze, K., & Schlueter, N. (2013). Toothpaste and erosion. In Toothpastes (Vol. 23, pp. 88-99). Karger Publishers.

González-Cabezas, C., Hara, A. T., Hefferren, J., & Lippert, F. (2013). Abrasivity testing of dentifrices-challenges and current state of the art. In *Toothpastes* (Vol. 23, pp. 100-107). Karger Publishers.

Hannig, M., & Balz, M. (2001). Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries research, 35(2), 142-148.

Hannig, M., & Hannig, C. (2014). The pellicle and erosion. In Erosive Tooth Wear (Vol. 25, pp. 206-214). Karger Publishers.

Hara, A. T., & Zero, D. T. (2014). The potential of saliva in protecting against dental erosion. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 197-205). Karger Publishers.

Jaeggi, T., & Lussi, A. (2014). Prevalence, incidence and distribution of erosion. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 55-73). Karger Publishers.

Jager, D. H. J., Vieira, A. M., Ruben, J. L., & Huysmans, M. C. D. N. J. M. (2012). Estimated erosive potential depends on exposure time. *Journal of dentistry*, 40(12), 1103-1108.

Kallistová, A., Horáček, I., Šlouf, M., Skála, R., & Fridrichová, M. (2017). Mammalian enamel maturation: Crystallographic changes prior to tooth eruption. *PloS one*, 12(2), e0171424.

Kanzow, P., Wegehaupt, F. J., Attin, T., & Wiegand, A. (2016). Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence international*, 47(4).

Laurance-Young, P., Bozec, L., Gracia, L., Rees, G., Lippert, F., Lynch, R. J. M., & Knowles, J. C. (2011). A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *Journal of Dentistry*, 39(4), 266-272.

Lippert, F., Arrageg, M. A., Eckert, G. J., & Hara, A. T. (2017). Interaction between toothpaste abrasivity and toothbrush filament stiffness on the development of erosive/abrasive lesions in vitro. *International dental journal*, 67(6), 344-350.

Lussi, A., Buzalaf, M. A. R., Duangthip, D., Anttonen, V., Ganss, C., João-Souza, S. H., ... & Carvalho, T. S. (2019). The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 1-11.

Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2015). The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries research*, 49(Suppl. 1), 18-29.

Lussi, A., Lussi, J., Carvalho, T. S., & Cvikl, B. (2014). Toothbrushing after an erosive attack: will waiting avoid tooth wear?. *European journal of oral sciences*, 122(5), 353-359.

Lussi, A., Schlüter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011). Dental erosion—an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries research*, 45(Suppl. 1), 2-12.

Mendonça, F. L., Jordão, M. C., Ionta, F. Q., Buzalaf, M. A. R., Honório, H. M., Wang, L., & Rios, D. (2017). In situ effect of enamel salivary exposure time and type of intraoral appliance before an erosive challenge. *Clinical oral investigations*, 21(8), 2465-2471.

Nehme, M., Jeffery, P., Mason, S., Lippert, F., Zero, D. T., & Hara, A. T. (2016). Erosion remineralization efficacy of gel-to-foam fluoride toothpastes in situ: a randomized clinical trial. *Caries research*, 50(1), 62-70.

Pineda, Á. E. G. A., Borges-Yáñez, S. A., Irigoyen-Camacho, M. E., & Lussi, A. (2019). Relationship between erosive tooth wear and beverage consumption among a group of schoolchildren in Mexico City. *Clinical oral investigations*, 23(2), 715-723.

Ruben, J. L., Roeters, F. J. M., Truin, G. J., Loomans, B. A., & Huysmans, M. C. D. (2019). Cup-Shaped Tooth Wear Defects: More than Erosive Challenges?. *Caries research*, 53(4), 468-475.

Salas, M. M. S., Nascimento, G. G., Huysmans, M. C., & Demarco, F. F. (2015). Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *Journal of Dentistry*, 43(1), 42-50.

Santos, E. J. L. D., Meira, I. A., Sousa, E. T. D., Amaechi, B. T., Sampaio, F. C., & Oliveira, A. F. B. D. (2019). Erosive potential of soy-based beverages on dental enamel. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77(5), 340-346.

Schlueter, N., & Luka, B. (2018). Erosive tooth wear—a review on global prevalence and on its prevalence in risk groups. *British dental journal*, 224(5), 364.

Shellis, R. P., Barbour, M. E., Jesani, A., & Lussi, A. (2013). Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. *Caries research*, 47(6), 601-611.

Shellis, R. P., Featherstone, J. D., & Lussi, A. (2014). Understanding the chemistry of dental erosion. In *Erosive Tooth Wear* (Vol. 25, pp. 163-179). Karger Publishers.

Shellis, R. P., Finke, M., Eisenburger, M., Parker, D. M., & Addy, M. (2005). Relationship between enamel erosion and liquid flow rate. *European journal of oral sciences*, 113(3), 232-238.

Shellis, R. P., Ganss, C., Ren, Y., Zero, D. T., & Lussi, A. (2011). Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries research*, 45(Suppl. 1), 69-77.

Shields, V. D., & Heinbockel, T. (2018). Introductory Chapter: Histological Microtechniques. In *Histology*. IntechOpen.

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

Steiger-Ronay, V., Tektas, S., Attin, T., Lussi, A., Becker, K., Wiedemeier, D. B., ... & Carvalho, T. S. (2019). Comparison of profilometric and microindentation analyses for determining the impact of saliva on the abrasion of initially eroded enamel. *Caries research*, 53(1), 33-40.

Tsuda, Y., Kitasako, Y., Sadr, A., Nakashima, S., & Tagami, J. (2016). Effects of brushing timing after erosive challenge on enamel loss in situ: White light interferometer and nanoindentation study. *Dental materials journal*, 35(4), 613-620.

Voronets, J., & Lussi, A. (2010). Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. *Clinical oral investigations*, 14(3), 251-256.

Vukosavljevic, D., Custodio, W., Buzalaf, M. A., Hara, A. T., & Siqueira, W. L. (2014). Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of oral biology*, 59(6), 631-638.

Wang, Y. L., Chang, C. C., Chi, C. W., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Chuang, Y. C., ... & Lin, C. P. (2014). Erosive potential of soft drinks on human enamel: an in vitro study. *Journal of the Formosan Medical Association*, 113(11), 850-856.

Wang, Y. L., Chang, H. H., Chiang, Y. C., Lu, Y. C., & Lin, C. P. (2018). Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(4), 276-282.

West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of dentistry*, 42, S2-S11.

Wiegand, A., Schneider, S., Sener, B., Roos, M., & Attin, T. (2014). Stability against brushing abrasion and the erosion-protective effect of different fluoride compounds. *Caries research*, 48(2), 154-162.

Wiegand, A., Schwerzmann, M., Sener, B., Carolina Magalhães, A., Roos, M., Ziebolz, D., ... & Attin, T. (2008). Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel—an in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(4), 231-235.

Zawaideh, F. I., Owais, A. I., & Mushtaha, S. (2017). Effect of CPP-ACP or apotassium nitrate sodium fluoride dentifrice on enamel erosion prevention. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 41(2), 135-140.