



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

HELAINÉ CAJADO ALVES

**AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROÇÃO DE
DENTINA RADICULAR**

FORTALEZA

2019

HELAINÉ CAJADO ALVES

AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROÇÃO DE
DENTINA RADICULAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vanara Florêncio Passos.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A479a Alves, Helaine Cajado.
Avaliação in situ da eficácia de um gel contendo catequina e nanopartículas de sílica mesoporosa na proteção da erosão de dentina radicular / Helaine Cajado Alves. – 2019.
47 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.
Coorientação: Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos.
1. Erosão dentária. 2. Catequina. 3. Sistemas de liberação de medicamentos. 4. Inibidores teciduais de metaloproteinases. 5. Dentina. I. Título.

CDD 617.8

HELAINÉ CAJADO ALVES

AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E
NANOPARTÍCULA DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROSÃO DE
DENTINA RADICULAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Giovane Rabelo Neri
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acolher e confortar nos momentos mais difíceis e angustiantes desse mestrado, em quem encontrei forças para me reerguer e concluir essa jornada.

Aos meus pais, Otávio Alves da Silva Filho e Maria Helena Cajado Alves, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem nos momentos mais difíceis. Por terem me educado e me incentivado a sempre estudar, pois diziam que o estudo e a educação são heranças que ninguém jamais poderia me tomar. E a minha mãe, especificamente, por diversos finais de semana ficar com minhas filhas enquanto eu me ocupava do desenvolvimento dessa dissertação.

As minhas irmãs, Cyra Nara Cajado Alves, por ter me ajudado durante esse mestrado, sendo voluntária da minha pesquisa; e Aline Cajado Alves, por me ajudar nos assuntos de informática, acalmando-me, ensinando-me e me ajudando na formatação dessa dissertação.

As minhas filhas, Lara Alves Enéas, a primogênita, por muitas vezes compreender minha ausência, dizendo sempre que “a mamãe tá trabalhando ou estudando” e ajudando no cuidado com sua irmã mais nova; e Letícia Alves Enéas, que foi concebida durante esse mestrado, sendo uma menina linda, amável e carinhosa. Amo muito vocês!

À Maria de Fátima Juvêncio da Silva, que sempre cuidou das minhas filhas e de mim, principalmente nesse período, quando muitas vezes estive ausente na minha função de mãe, bem como ao seu esposo, José Airton da Silva Leite, por também ajudar com as minhas filhas, ser compreensivo nas ausências de sua esposa em casa enquanto ela me auxiliava nessa etapa.

Ao meu esposo, Roberto Araújo Enéas, por ter me apoiado e acompanhado durante essa jornada e muitas vezes me ajudado na realização dessa pesquisa, pela paciência que essa jornada exigiu dele com meus momentos de estresse e de dedicação à dissertação e pelo maior cuidado com nossas filhas em meu período de ausência.

À Dra. Antonia Flávia Justino Uchoa, a qual conheci durante essa jornada e que teve muita paciência e disponibilidade, sempre me passando seus conhecimentos e que me ajudou a tornar possível a realização dessa pesquisa e a

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago, pela credibilidade e confiança, por me apoiar e me dar suporte. Um homem inteligente e compreensível que com sua experiência conduziu da melhor maneira possível essa pesquisa;

A minha querida coorientadora, Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos, uma mulher humana e com um grande coração e que sempre esteve disposta a me ajudar, sempre me dando suporte. Um exemplo de dedicação e competência. Agradeço o acolhimento e os ensinamentos.

À banca da pré-defesa, nas pessoas da Profa. Dra. Maria Denise Rodrigues de Moraes Bezerra e da Profa. Dra. Juliana Paiva Marques Lima Rolim e da defesa Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça e Prof. Dr. Jiovanne Rabelo Neri, por terem aceitado o convite e pelas considerações que certamente contribuirão para o engrandecimento do trabalho realizado.

Ao David Queiroz, amigo e ex-técnico de laboratório pela sua ajuda e disponibilidade constantes e por trazer leveza aos dias de trabalho no laboratório.

Aos colegas da minha turma de pós-graduação, que dividiram momentos difíceis e de conquista e alegria ao longo desses dois anos, com muitos dos quais pude conviver mais tempo no laboratório de pesquisa do PPGO, dentre eles Tayara Marques e Breno Martins.

Aos voluntários e amigos da etapa *in situ*: Bianca Palhano Toscano Leite, Breno Cavalcante Martins, Cecília Atem Gonçalves de Araújo Costa, Cyra Nara Cajado Alves, Raisia Maria Peixoto de Moraes Vasconcelos, Fernanda Maria Calado Guerreiro, Gabriela Araújo Lourenço, Luiza Maria Dias Firmeza, Paula Candice Alves de Assis Pereira, Thais Rocha Fleury Curado e Maria Tayara Marques de Freitas.

À Universidade Federal do Ceará, por meio do seu Magnífico Reitor Henry de Holanda Campos e do vice-reitor Custódio Luís Silva de Almeida.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua diretoria Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage e vice-diretora Profa. Dra. Ana Karine Bezerra Pinheiro.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará, Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia, e sua vice-coordenadora Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Profa. Dra. Ana Karine Macedo Teixeira, e sua vice-coordenadora Profa. Dra. Alynne Vieira de Menezes.

Aos funcionários da coordenação do PPGO, Joana Karla de Assis Pinheiro e Rafael Maia Reis, pela dedicação e disponibilidade em auxiliar no que foi preciso.

A todos os funcionários e servidores do Curso de Odontologia da UFC, por sempre estarem dispostos a ajudar.

A todos que contribuíram para a concretização dessa dissertação de maneira direta ou indireta.

RESUMO

A erosão dentária é uma condição clínica de alta prevalência na população mundial. Em virtude do envelhecimento da população, do estilo de vida e hábitos alimentares, essa condição tem uma tendência a aumentar com o passar dos anos e representa uma queixa comum entre os pacientes. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ* o efeito antierosivo de géis contendo epigallocatequina-3-galato (EGCG) isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa (EGCG/NSM) no desgaste e na dureza da dentina radicular humana. Blocos de dentina foram selecionados de acordo com a dureza de superfície inicial e aleatoriamente distribuídos em um dos quatro grupos (n=11): placebo (controle), fluoreto estanhoso - SnF₂ (0,05%-controle positivo), EGCG (0,1%) e EGCG/NSM (0,093%). Onze voluntários participaram desse estudo randomizado, controlado, cruzado, com 4 fases de 5 dias cada e usaram um dispositivo palatino de acrílico contendo 2 blocos de dentina que foram tratados com um dos géis. Durante cada fase experimental, os espécimes foram submetidos à erosão por imersão em ácido cítrico (0,05M; pH 3,75) por 60 s, 4 vezes ao dia, seguido de tratamento com o gel predeterminado por 60 s. As alterações dentinárias foram determinadas pela porcentagem perda de dureza de superfície (%PDS) e análise perfilométrica. Os dados foram analisados por ANOVA a um fator, seguido de pós-teste de Tukey. Em relação à %PDS, não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,067). Quanto ao desgaste da superfície, foram obtidos os seguintes resultados em micrômetros: 0,66 (±0,38); 0,57 (±0,11); 0,48 (±0,05); e 0,32 (±0,08) para os grupos placebo, EGCG, EGCG/NSM e SnF₂, respectivamente. Foi observada diferença significativa somente para o grupo do SnF₂ quando comparado ao placebo e à EGCG (p=0,003 e p=0,046). Porém, não houve diferença estatística entre o SnF₂ e a NSM/EGCG (p=0,306). Portanto, os achados sugerem que o uso da EGCG/NSM é uma medida protetiva promissora na redução do desgaste dentinário sob condições erosivas.

Palavras-chave: Erosão Dentária. Dentina. Inibidores Teciduais de Metaloproteinases. Catequina. Sistemas de Liberação de Medicamentos.

ABSTRACT

Dental erosion is a clinical condition of high prevalence in the world population. Due to aging population, lifestyle and eating habits, this condition has a tendency to increase over the years and represents a common complaint among patients. The aim of this study was to evaluate *in situ* the anti-erosive effect of gels containing epigallocatechin-3-gallate (EGCG) isolated and adsorbed on mesoporous silica nanoparticles (EGCG / NSM) on the wear and hardness of human root dentin. Dentin blocks were selected according to the initial surface hardness and randomly distributed in one of four groups (n = 11): placebo (control), SnF₂ (0,05% -positive control), EGCG (0,1%) and NSM / EGCG (0,093%). Eleven volunteers participated in this randomized, controlled, cross-over study with 4 phases of 5 days each. They wore an acrylic palatal device containing 2 blocks of dentin that were treated with one of the gels. During each experimental phase, the specimens were subjected to erosion by immersion in citric acid (0,05M; pH 3,75) for 60s, 4 times a day, followed by treatment with the predetermined gel for 60s. The dentin alterations were determined by the percentage of surface hardness loss (% SHL) and profilometry analysis. Data were analyzed by ANOVA at one factor, followed by Tukey's post-test. About the % PDS, there was no statistical difference between the groups (p = 0,067). As for surface wear, the following results were obtained in micrometers: 0,66 (± 0,38); 0,57 (± 0,11); 0,48 (± 0,05) and 0,32 (± 0,08) for the placebo, EGCG, EGCG/NSM and SnF₂ groups, respectively. Significant difference was observed only for the SnF₂ group when compared to placebo and EGCG (p = 0,003 and p = 0,046). However, there was no significant difference between SnF₂ and EGCG/NSM (p = 0,306). Therefore, the findings suggest that the use of EGCG/NSM is a promising protective measure in reducing dentin wear under erosive conditions.

Keywords: Dental Erosion. Dentin. Tissue Metalloproteinase Inhibitors, Catechin. Drug Release System.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 CAPÍTULO	16
4 CONCLUSÃO GERAL.....	35
REFERÊNCIAS GERAIS	36
ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	41
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	44
APÊNDICE B - INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS.....	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

A erosão dentária é definida como a perda irreversível de tecido mineralizado que é causada pela ação de ácidos de origem não bacteriana, sendo uma das causas da hipersensibilidade dentinária. Clinicamente apresenta-se em superfícies lisas como cavidades pouco profundas coronalmente à junção cimento-esmalte e, nas superfícies oclusais, observa-se um aspecto de chanfrado distinto e cúspides arredondadas (MAGALHÃES *et al.*, 2009a), podendo levar à perda da anatomia dentária e conseqüentemente da dimensão vertical (LUSSI *et al.*, 2011). Em estágio mais avançado pode levar ao envolvimento endodôntico do elemento dentário (IMFELD, 1996; VERED *et al.*, 2014).

A erosão de origem intrínseca é o resultado da ação de ácidos produzidos pelo próprio organismo que entram em contato com a cavidade oral em processos de vômitos, causados por anorexia ou bulimia, regurgitação do conteúdo gástrico e refluxos recorrentes (RYTÖMAA *et al.*, 1998; SCHEUTZEL, 1996). Já a de origem extrínseca ocorre por meio de ácidos exógenos, incluindo substâncias ácidas, bebidas e alimentos, como refrigerantes e vitamina C (HASSELKVIST; JOHANSSON; JOHANSSON, 2016; LI; ZOU; DING, 2012).

Estudos de prevalência verificaram uma variação de 7,3 a 33,8% (BARTLETT *et al.*, 2013; CHRYSANTHAKPOULOS, 2012; VARGAS-FERREIRA, PRAETZEL; ARDENGHI, 2011), apresentando o sexo feminino como o mais acometido. Além disso, o hábito de segurar bebida na boca antes de engolir, a ingestão de bebidas ácidas na hora de dormir, o consumo de bebidas carbonatadas, frutas frescas e sucos são fatores de risco associados com maior prevalência dos casos de desgaste dentário (BARTLETT *et al.*, 2013; CHRYSANTHAKPOULOS, 2012).

De acordo com Duffey *et al.* (2012), adolescentes consomem em média 360 ml de bebidas ácidas por dia, o que indica um alto nível de ingestão de produtos contendo ácido. Segundo Jaeggi e Lussi (2014), há uma tendência de aumento na prevalência da erosão na faixa etária mais jovem devido a seus hábitos nutricionais e estilo de vida.

O controle de ataques de agentes erosivos em tecidos dentários é um dos principais desafios na prevenção e terapia de erosão dentária na prática clínica odontológica (GAMBON; BRAND; VEERMAN, 2012). Apesar da saliva e de alimentos

remineralizantes terem mostrado diminuir a erosão do esmalte (AMAECCHI; HIGHAM, 2005; CHEAIB; LUSSI, 2011; HARA *et al.*, 2006), medidas para reduzir o desgaste dentário vem sendo investigadas, especialmente aquelas que podem fornecer maior resistência aos ácidos ou remineralização das superfícies dentárias (ALGARNI; LIPPERT; HARA, 2015; DE MORAES *et al.*, 2016; DIAMANTI; KOLETSI-KOUNARI; MAMAI-HOMATA, 2016; JORDÃO *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2015).

O substrato dentinário é exposto quando ocorre uma recessão gengival e/ou desmineralização dos cristais de esmalte, sendo a dentina um tecido mineralizado, formado por uma fase mineral (70% em peso), uma matriz orgânica (20% em peso) contendo colágeno (90%) e proteínas não colágenas (10%) e água (10% em peso); sua erosão é um processo complexo, que se caracteriza inicialmente com a dissolução do mineral, expondo a matriz orgânica à degradação por enzimas existentes na própria dentina, como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Essas MMPs são colagenases que também estão envolvidas no processo de organização, mineralização e maturação da dentina. Elas são secretadas como precursores inativos requerendo um baixo pH para a sua ativação e conseqüente degradação dos componentes da matriz extracelular da dentina (BUZALAF; KATO; HANNAS, 2012; CHAUSSAIN-MILLER *et al.*, 2006). A remoção enzimática da matriz orgânica desmineralizada (MOD) por colagenases aumenta significativamente o processo de erosão, pois essa matriz limita a difusão iônica no interior da superfície dentinária desmineralizada, dificultando a perda de minerais da camada mais interna desse substrato (KLETER *et al.*, 1994; KLONT; TEN CATE, 1991). Algumas MMPs foram identificadas na matriz dentinária, dentre elas a MMP-3 (estromelina-1) (BOUKPESSI *et al.*, 2008), a MMP-7 (MAZZONI *et al.*, 2018), a MMP-8, identificada como a principal colagenase da dentina humana (SULKALA *et al.*, 2007); e as MMPs 2 e 9, conhecidas como gelatinases A e B, respectivamente, também foram detectadas tanto em dentina coronária como em radicular (SANTOS *et al.*, 2009).

Os tratamentos mais tradicionais da erosão dentária baseiam-se na ação do flúor que se caracteriza pela formação de CaF_2 na superfície dentária (no caso do fluoreto de amônio e do fluoreto de sódio), mas que são facilmente solúveis em ácido, ou na formação de precipitados ricos em metal (no caso do tetrafluoreto de titânio e de produtos fluoretados que contenham estanho) (MAGALHÃES *et al.*, 2011). A terapia com laser associada ou não a diversos tipos de fluoreto, objetivando um

sinergismo nos efeitos dos tratamentos, também vem sendo estudada para combater a erosão (JOÃO-SOUZA *et al.*, 2015; PASSOS *et al.*, 2014; WIEGAND *et al.*, 2010).

Dentre os diversos tipos de fluoretos estudados com efeitos antierosivos em dentina, aqueles que contem estanho, um cátion metálico polivalente, tem se destacado como agente antierosivo eficaz (GANSS *et al.*, 2010a; PASSOS *et al.*, 2014; PASSOS *et al.*, 2015; SCHLUETER *et al.*, 2010; SCHLUETER; KLIMEK; GANSS 2011). O fluoreto estanhoso forma uma barreira na superfície dentinária devido ao estanho ter uma forte afinidade ao tecido dental mineralizado (GANSS *et al.*, 2010b), além de agir como inibidor das MMPs 2 e 9 (CVIKL *et al.*, 2018). Contudo, o fluoreto estanhoso pode causar alguns efeitos indesejáveis, como uma sensação desagradável na superfície dos dentes e adstringente na mucosa bucal, além de poder ocasionar manchamento nos dentes (MAGALHÃES *et al.*, 2011; SCHLUETER; KLIMEK; GANSS, 2009, 2011).

Portanto, torna-se necessária a busca por substâncias que não provoquem tais reações adversas para minimizar os efeitos da erosão. O uso de inibidores de MMPs vem se firmando como uma nova abordagem no tratamento dessa condição. A ação desses inibidores permite que ocorra a manutenção da MOD da dentina, limitando a difusão iônica no interior da superfície desmineralizada, dificultando, assim, a progressão da erosão (KLETER *et al.*, 1994; KLONT; TEN CATE, 1991).

A epigallocatequina-3-galato (EGCG), uma das principais catequinas presente no chá verde, enquadra-se nessa categoria de tratamento e possui baixa toxicidade nas células da polpa dental (DEMEULE *et al.*, 2000; NAKANISHI *et al.*, 2010; VIDAL *et al.*, 2014). Além disso, possui propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011). O chá verde e a EGCG vem sendo aplicados no tratamento da erosão e têm promovido a redução significativa do desgaste da dentina após desafios erosivos e erosivos/abrasivos (DE MORAES *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2009b; WANG *et al.*, 2018). Essas substâncias também atuam como agentes de ligação cruzada da matriz extracelular da dentina, estabilizando o colágeno, o que dificulta a degradação proteolítica e melhora as propriedades mecânicas da dentina (VIDAL *et al.*, 2014). Acredita-se que a inibição das MMPs pela EGCG ocorre através da sua ligação ao sítio catalítico ou ao sítio alostérico dessas enzimas, mudando sua conformação; além de produzir um efeito quelante com o zinco (VIDAL *et al.*, 2014), pois estas enzimas são, em sua maioria, sintetizadas em formas

zimógenas latentes e exigem a ligação de um íon de zinco no sítio catalítico e a clivagem de um domínio propeptídeo para se tornar cataliticamente competentes (VISSE; NAGASSE, 2003).

O uso de nanocarreadores de drogas e nanopartículas funcionais vem sendo bastante explorados na Medicina para o tratamento de doenças como o câncer, por exemplo. A nanopartícula de sílica mesoporosa (NSM) é um tipo de nanocarreador e tem sido utilizada em função de sua estabilidade, da sua ampla área de superfície e de sua excelente performance térmica e química (CHEN; CHEN; SHI, 2013; HAO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; TANG; LI; CHEN, 2012). Na Odontologia já foi empregada com nanohidroxiapatita (nHAp), EGCG, óxido de cálcio e carbonato de cálcio associados ou não ao ácido fosfórico. Nesses casos, a NSM funciona como um “carreador” dessas substâncias para os túbulos dentinários (CHIANG *et al.*, 2010; CHIANG *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016, 2017).

Devido a problemas em conduzir estudos erosivos *in vivo*, modelos *in situ* e *in vitro* têm sido utilizados para analisar desafios erosivos no tecido dental. Estudos *in situ* são mais realistas, pois permitem avaliar o efeito dos agentes erosivos e de substâncias protetoras do tecido dental no ambiente bucal (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011).

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in situ* o efeito da epigallocatequina-3-galato isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa na dentina humana erosivamente desmineralizada.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar o efeito da epigallocatequina-3-galato isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa sobre o percentual de perda de dureza da superfície dentinária promovida pelo desafio erosivo com ácido cítrico.

Avaliar o efeito da epigallocatequina-3-galato isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa no desgaste da superfície dentinária após erosão com ácido cítrico.

3 CAPÍTULO

Essa dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado, conforme o parecer consubstanciado nº 2.704.870 de 11 de junho de 2018 (ANEXO A). Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo um artigo científico que será submetido ao periódico *Archives of Oral Biology* conforme descrito abaixo:

***IN SITU* EVALUATION OF CATECHIN-ENCAPSULATED MESOPOROUS SILICA GEL IN THE PROTECTION OF ROOT DENTIN EROSION**

ALVES, H.C.; UCHOA, A. F. J.; RICARDO, N. M. P. S.; PASSOS, V. F.;
SANTIAGO, S. L.

AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROÇÃO DE DENTINA RADICULAR

Helaine Cajado Alves^a, Antonia Flavia Justino Uchoa^b, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^b, Vanara Florêncio Passos^a, Sergio Lima Santiago^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia Restauradora, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. Rua Monsenhor Furtado s/n, 60430-655, Fortaleza, Ceará, Brasil.

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. Avenida Humberto Monte s/n, Campus do Pici, 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Autor correspondente:

Dr. Sérgio Lima Santiago

Rua Monsenhor Furtado s/n, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-355, Fortaleza, CE- Brasil

Tel.: +55 (85) 3366 8030; +55 (85) 98824 2704

E-mail: sergiosantiago@ufc.br

RESUMO

Objetivo: avaliar *in situ* o efeito da epigallocatequina-3-galato (EGCG) isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs) em gel na erosão por ácido cítrico em dentina radicular humana.

Delineamento: blocos de dentina foram selecionados de acordo com a dureza de superfície e aleatoriamente distribuídos em quatro grupos (n=11): placebo, SnF₂ 0,05% (controle positivo), EGCG 0,1% e EGCG/NSM 0.093%. Onze voluntários participaram desse estudo randomizado, cruzado, controlado com 4 fases de 5 dias cada. Eles usaram um dispositivo palatino contendo 2 blocos de dentina que foram tratados com um dos géis anteriormente citados. Durante cada fase experimental, os espécimes foram submetidos à erosão em ácido cítrico (0,05M, pH 3,75) por 60 s, 4 vezes ao dia, seguido de 60 s de tratamento com o gel predeterminado. As alterações dentinárias foram determinadas pela porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e análise perfilométrica. Os dados foram analisados por ANOVA a um fator, seguido de pós-teste de Tukey (p<0,05).

Resultados: em relação à %PDS, não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,067). Quanto ao desgaste, foram obtidos os seguintes resultados em micrômetros: 0,66 (±0,38); 0,57 (±0,11); 0,48 (±0,05) e 0,32 (±0,08) para os grupos placebo, EGCG, EGCG/NSM e SnF₂, respectivamente. Foi observada diferença significativa somente para o grupo do SnF₂ quando comparado ao placebo e à EGCG (p=0,003 e p=0,046). Porém, não houve diferença significativa entre o SnF₂ e a NSM/EGCG (p=0,306).

Conclusão: o uso da EGCG/NSM é uma medida protetiva promissora na redução do desgaste dentário sob condições erosivas.

Palavras-chave: Erosão Dentária. Dentina. Catequina. Inibidores Teciduais de Metaloproteinases. Sistemas de Liberação de Medicamentos.

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é uma condição complexa que afeta diferentes faixas etárias da população mundial (Jaeggi & Lussi, 2014). O aumento global da sua prevalência vem ocorrendo devido a mudanças no estilo de vida e hábitos nutricionais, como o

aumento do consumo de comidas e bebidas ácidas (Lussi & Carvalho, 2014). Estudos de prevalência verificaram uma variação de 7,3 a 33,8% (Bartlett *et al.*, 2013; Chrysanthakpoulos, 2012; Vargas-Ferreira, Praetzel, & Ardenghi, 2011), apresentando o sexo feminino como o mais acometido. Além disso, o hábito de segurar bebida na boca antes de engolir, a ingestão de bebidas ácidas na hora de dormir e o consumo de bebidas carbonatadas, frutas frescas e sucos são fatores de risco associados com maior prevalência dos casos de desgaste dentário (Bartlett *et al.*, 2013; Chrysanthakpoulos, 2012).

Os tratamentos mais tradicionais da erosão dentária baseiam-se na ação do flúor, que se caracteriza pela formação de fluoreto de cálcio na superfície dos dentes, mas que são facilmente solúveis em ácido, ou na formação de precipitados ricos em metal (no caso do tetrafluoreto de titânio e de produtos fluoretados que contenham estanho) (Magalhães, Wiegand, Rios, Buzalaf, & Lussi, 2011).

Dentre os fluoretos estudados com efeitos antierosivos em dentina, aqueles que contêm estanho, um cátion metálico polivalente, tem se destacado como agente antierosivo eficaz (Ganss, Lussi, Sommer, Klimek, & Schlueter, 2010; Schlueter, Neutard, Hinckeldey, Klimek, & Ganss, 2010; Schlueter, Klimek, & Ganss, 2011; Passos *et al.*, 2014; Passos *et al.*, 2015). O fluoreto estanhoso forma uma barreira protetora na superfície dentinária devido ao estanho ter uma forte afinidade ao tecido dental mineralizado (Ganss *et al.*, 2010), além de agir como inibidor das MMPs 2 e 9 (Cvikl, Lussi, Saads, Moritz, & Gruber, 2018). Contudo, pode causar alguns efeitos indesejáveis, como uma sensação desagradável na superfície dos dentes e adstringente na mucosa bucal, além de poder ocasionar manchamento nos dentes (Magalhães *et al.*, 2011; Schlueter, Klimek, & Ganss, 2009, Schlueter, Klimek, & Ganss, 2011).

O uso de inibidores de MMPs vem se firmando como uma nova abordagem no tratamento dessa condição (Kato, Leite, Hannas & Buzalaf, 2010; Wang, Chang, Chiang, Lu, & Lin, 2018). A ação desses inibidores permite que ocorra a manutenção da matriz orgânica desmineralizada (MOD) da dentina, limitando a difusão iônica no seu interior, dificultando, assim, a progressão da erosão (Kleter, Damen, Everts, Niehof, & Cate., 1994; Klont & Ten Cate, 1991).

O chá verde e a epigallocatequina-3-galato (EGCG), uma de suas principais catequinas, enquadram-se nessa categoria de tratamento e possuem baixa toxicidade nas células da polpa dental (Demeule, Brossard, Pagé, Gingras, & Béliveau, 2000;

Nakanishi *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2014). Eles têm promovido a redução significativa do desgaste da dentina após desafios erosivos e erosivos/abrasivos (De Moraes, Carneiro, Passos & Santiago, 2016; Kato *et al.*, 2009; Kato, Leite, Hannas & Buzalaf, 2010; Magalhães *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Além de agirem como inibidores de MMPs, eles também atuam como agentes de ligação cruzada das fibrilas colágenas, estabilizando o colágeno, o que melhora propriedades mecânicas da dentina e dificulta a degradação proteolítica da MOD (Vidal *et al.*, 2014).

Na Medicina, o uso de nanocarreadores de drogas e de nanopartículas funcionais vem sendo bastante explorado no tratamento de doenças como o câncer. A nanopartícula de sílica mesoporosa (NSM) é um tipo de nanocarreador que vem sendo utilizada em função de sua estabilidade, da sua ampla área de superfície e de sua excelente performance térmica e química (Chen, Chen & Shi, 2013; Hao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Tang, Li, & Chen, 2012). Na Odontologia já foi empregada com nanohidroxiapatita (nHAp), EGCG, óxido de cálcio e carbonato de cálcio associados ou não ao ácido fosfórico. Nesses casos, as NSMs funcionam como um “carreador” dessas substâncias para os túbulos dentinários (Chiang *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2016, 2017).

Devido a problemas em conduzir estudos erosivos *in vivo*, modelos *in situ* e *in vitro* têm sido utilizados para analisar desafios erosivos no tecido dental. Estudos *in situ* são mais realistas, pois permitem avaliar o efeito dos agentes erosivos e de substâncias protetoras do tecido dental no ambiente bucal (West, Davies, & Amaechi, 2011). O presente estudo *in situ* tem como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de gel contendo inibidores de MMPs, EGCG isolada e adsorvida em nanopartículas de sílica mesoporosa (EGCG/NSM), na erosão extrínseca pelo ácido cítrico, usando um placebo e o SnF₂ como controles.

2 METODOLOGIA

2.1 Delineamento Experimental

O presente estudo *in situ*, randomizado, controlado e cruzado avaliou os efeitos da aplicação de gel contendo inibidores de MMPs, EGCG 0,1% e EGCG/NSM 0,093%, na erosão extrínseca pelo ácido cítrico, usando um placebo como controle

negativo e o SnF₂ 0,05% como controle positivo. O experimento foi realizado em 4 fases de 5 dias cada, havendo um intervalo de 2 dias entre as fases. Os voluntários usaram um dispositivo palatino com 2 blocos de dentina, que foi imerso 4 vezes ao dia em uma solução de 50 mL de ácido cítrico (0,05 M e pH 3,75) à temperatura ambiente por 60 s. Após o desafio erosivo, o tratamento predeterminado foi aplicado por 60 s. Ao final de cada fase, os blocos de dentina foram removidos do dispositivo para realizar as seguintes análises quantitativas: teste de dureza e perfilometria e novos blocos foram colocados no aparelho, dando início a uma nova fase com uma nova substância.

2.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes EGCG: brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB), hidróxido de amônio (NH₄OH), tetraetilortosilicato (TEOS) e nitrato de amônio (NH₄NO₃), SnF₂, copolímero tribloco PLURONIC F127[®] adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Todos os reagentes citados são de grau analítico e utilizados sem prévia purificação.

2.3 Síntese das Nanopartículas de Sílica Mesoporosa (NSMs)

As NSMs foram preparadas de acordo com a literatura prévia com algumas modificações (Zou *et al.*, 2017). Foram dissolvidos em 280 mL de água deionizada 5,73 g de CTAB sob agitação mecânica a 40 °C nos 15 min iniciais e, posteriormente, à temperatura ambiente por uma noite. Após esse período, foi acrescentado ao sistema 0,5 mL de NH₄OH e 80 mL de etanol, permanecendo este em agitação por mais 1h. Aumentou-se, então, a temperatura da mistura para 70 °C e, em seguida, adicionou-se gota a gota 14,6 mL de TEOS. Esse sistema permaneceu sob agitação por 2 h. Posteriormente, o sólido foi coletado por centrifugação, lavado com etanol e colocado para secar a 100 °C por 5 horas. A extração do surfactante foi realizada através de uma mistura NH₄NO₃/etanol (133 mg/50mL) a 60 °C, com agitação magnética contínua por 40 minutos. Finalmente, o sólido foi coletado por centrifugação, lavado três vezes com água deionizada, seco a 100 °C por uma noite, obtendo-se, assim, as NSMs.

2.4 Síntese da Epigallocatequina-3-galato Adsorvida em Nanopartículas de Sílica Mesoporosa (EGCG/NSM)

A síntese da EGCG encapsulada em NSMs (EGCG/NSM) foi realizada conforme as técnicas reportadas em estudo prévio de Yu *et al.* (2017) com algumas modificações. Foi dispersado em solução aquosa de EGCG (1,25 mg/mL) 100 mg de NSM seco através de agitação horizontal vigorosa por 72 h no escuro. Esse processo permite que as moléculas de EGCG se infiltrem no interior dos poros das NSMs para alcançar a carga máxima. A mistura foi então centrifugada, lavada três vezes com água deionizada e etanol e seca a vácuo por 48h para se obter EGCG/NSM, sendo armazenada no escuro a 4 °C até o uso.

Uma curva de calibração foi usada para quantificar o fármaco a partir de uma série de soluções de referência cujas concentrações variaram entre 0,1 a 30 ppm, obtendo-se uma relação linear entre o pico de maior absorbância e a concentração do fármaco. Um espectrofotômetro UV Vis (DU® 730; Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) foi usado para avaliar e confirmar o pico de absorbância do EGCG em 274 nm. A eficiência de encapsulação foi calculada em 93%.

2.5 Síntese do Gel

O gel foi preparado em uma concentração de 20% PLURONIC F127®/água. Foram dissolvidas 6 g de PLURONIC F127® em 30 mL de água deionizada em baixa temperatura (aproximadamente 4 °C) sob agitação magnética até completa homogeneização do F127. Após a completa dissolução, submeteu-se a mistura a um aumento de temperatura, até 30 °C para a obtenção do gel.

Para a preparação da composição em gel com os fármacos ativos foram utilizadas as seguintes porcentagens em massa: 0,05% de SnF₂; 0,1% de EGCG; e 25% de EGCG/NSM.

2.6 Aspectos Éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local através do parecer de número 2.704.870 (ANEXO-A) e realizado em conformidade com a Declaração de Helsinque. Os voluntários que participaram da pesquisa assinaram previamente um

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNCICE A) e receberam instruções verbal e por escrito de como realizar os procedimentos da pesquisa (APÊNCICE B).

2.7 Seleção dos Voluntários

Foram recrutados 20 voluntários, mas apenas 11 (1 homem e 10 mulheres, entre 22 e 41 anos) estavam aptos a participar da pesquisa. Eles apresentavam boa higiene oral, ausência de atividade de cárie e de doença periodontal, ausência de lesão de erosão, além de possuir fluxo salivar estimulado > 1 mL/min. Pessoas com distúrbios gastroesofágicos, grávidas, lactantes ou que faziam uso de placa miorelaxante, aparelho ortodôntico fixo ou removível na arcada superior ou de medicamentos que alterassem o fluxo salivar não foram incluídas na pesquisa. Foram excluídos da amostra 4 pessoas com distúrbio gastroesofágico, 2 que usavam placa miorelaxante, 2 com aparelho ortodôntico e 1 que fazia uso de medicamento que alterava o fluxo salivar. O tamanho da amostra foi calculado com base nos dados da variação de porcentagem de perda de dureza de superfície de um estudo piloto. A amostra de 7 voluntários foi necessária para fornecer um erro- α de 5% e um poder de 80% e uma diferença relevante de 10% entre os grupos (www.openepi.com/menu/oe_menu.htm). Foram incluídos em cada grupo 11 voluntários devido a possíveis perdas inerentes aos estudos *in situ*.

2.8 Preparo dos espécimes de dentina

Foram utilizados nesse estudo terceiros molares humanos livres de cárie previamente armazenados em solução de timol a 0,1% a 4 °C. Duzentos blocos de dentina radicular humana foram cortados na dimensão 4x4x2 mm, planificados e polidos. Para confeccionar os espécimes foi usado um disco de corte diamantado de dupla face acoplado a uma máquina de corte sob refrigeração abundante (Struers, Minitom, Copenhagen, Dinamarca). Posteriormente, os blocos de dentina foram colocados em um dispositivo acrílico, planificados usando-se lixas abrasivas de óxido de alumínio de granulação P1200, P2500 e P4000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), acopladas em politriz automática (Buehler, Automet 250, Lake Bluff, IL, EUA) sob irrigação constante de água e polidos posteriormente com disco de feltro e pasta

diamantada de 1 μm (Erios, São Paulo, Brasil). Os espécimes foram colocados em cuba ultrassônica entre o uso das lixas e ao final do polimento, para remover os resíduos decorrentes desses procedimentos.

Com o objetivo de padronizar os espécimes, a dureza de superfície inicial foi determinada. Cinco indentações com distância de 100 μm entre elas foram feitas no centro dos espécimes utilizando um microdurômetro com penetrador Knoop e sistema de medição automático (Future Tech Corp, FM-ARS 9000 e FM 100, Tokyo, Japan), utilizando-se uma carga de 10 g aplicada por 5 s (De Moraes *et al.*, 2016). Oitenta e oito espécimes de dentina, que apresentaram uma média de dureza $54,53 \pm 5,4$ Kg/mm², foram selecionados, empacotados e identificados para esterilização em óxido de etileno. Depois os espécimes foram cobertos com uma fita adesiva ácido-resistente deixando uma área exposta de 4 x 2 mm, que se submeteu à erosão e ao tratamento durante o experimento. A área coberta foi utilizada como referência para a análise perfilométrica.

2.9 Preparo do dispositivo palatino

Um dispositivo palatino em resina acrílica foi confeccionado para cada voluntário e duas cavidades nas dimensões de 5x5x3 mm foram confeccionadas nele, uma no lado direito e a outra no esquerdo. Os espécimes foram aleatoriamente ordenados usando uma lista gerada pelo computador (Microsoft Excel 2007), fixados com cera pegajosa e cuidadosamente adaptados 1 mm aquém do nível da superfície do dispositivo para evitar a abrasão da língua.

2.10 Fase intraoral

Nos dois dias que precederam o início da pesquisa, os voluntários usaram um dentífrico fluoretado padrão (Colgate® -1450 ppm de flúor) que lhes fora entregue e continuaram seu uso até o final do experimento. Antes de cada fase experimental, o dispositivo palatino foi usado por 12 h para permitir o equilíbrio com a saliva e a formação e maturação da película adquirida. O desafio erosivo foi realizado extraoralmente 4 vezes ao dia às 7 h, 12 h, 17 h e 21 h durante o experimento de 5 dias (Passos; Gerage & Santiago, 2017). Os participantes da pesquisa removeram o

dispositivo da boca e o colocaram em um recipiente com 50 mL de solução de ácido cítrico (0,05 M, pH 3,75) por 60 s à temperatura ambiente, caracterizando a erosão (De Moraes *et al.*, 2016). Depois lavaram em água corrente por 10 s e o excesso de água foi removido com papel absorvente. Após o desafio ácido, os voluntários aplicaram uma fina camada do gel, o qual permaneceu em contato com o espécime por 60 s e depois removeram o excesso cuidadosamente com papel absorvente. Em seguida, o dispositivo foi reinserido na boca.

Os voluntários foram instruídos a evitar comer, beber (exceto água) e escovar os dentes enquanto estivessem usando o dispositivo, que foi utilizado continuamente, incluindo à noite, sendo removido apenas para as refeições e higiene oral e, nessas ocasiões, foi mantido envolto em gaze umedecida em água de abastecimento em um estojo plástico. Foi permitido aos voluntários realizar a higiene do dispositivo com escova de dentes e pasta, com o cuidado de não escovarem os espécimes.

Depois de cada fase, na manhã do sexto dia, os espécimes foram removidos do dispositivo, armazenados em umidade sob refrigeração até o momento das análises. Os blocos de dentina avaliados em relação à porcentagem de perda de dureza de superfície e ao desgaste da superfície dentinária. Novos espécimes foram inseridos no dispositivo, os quais se submeteram a uma nova fase do experimento.

2.11 Avaliação da dureza de superfície final

A dureza de superfície final de cada espécime foi medida utilizando-se o mesmo protocolo da dureza de superfície inicial. Cinco indentações com distância de 100 µm entre elas foram realizadas em cada espécime no centro da área erosivamente desmineralizada. A média das indentações (dureza final) foi utilizada para avaliar a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%PDS = [(dureza\ inicial - dureza\ final) \times 100 / dureza\ inicial]$$

2.12 Avaliação do desgaste da dentina

O nível de desgaste da dentina foi determinado em relação à área de referência com um perfilômetro (Hommel Tester, T1000, Hommelwerke GmbH, Germany). A fita

adesiva foi cuidadosamente removida de cada bloco de dentina para expor a área de referência. Foram realizados em cada espécime três traçados com comprimento de 1,5 mm cada, movendo a caneta do perfilômetro de ponta 1,8 μm da superfície de referência para a superfície experimental. Para cada espécime, o valor médio obtido dos três traçados foi calculado.

2.13 Análise Estatística

Os testes preliminares de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foram realizados, e a partir da homogeneidade apresentada pelos dados avaliados, as análises foram realizadas através do teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), um fator, seguida do teste de Tukey para os dados de desgaste, com nível de significância de 5%. Os dados de média e desvio padrão do desgaste e perda de dureza foram analisados utilizando o *software* SPSS 20.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL, EUA).

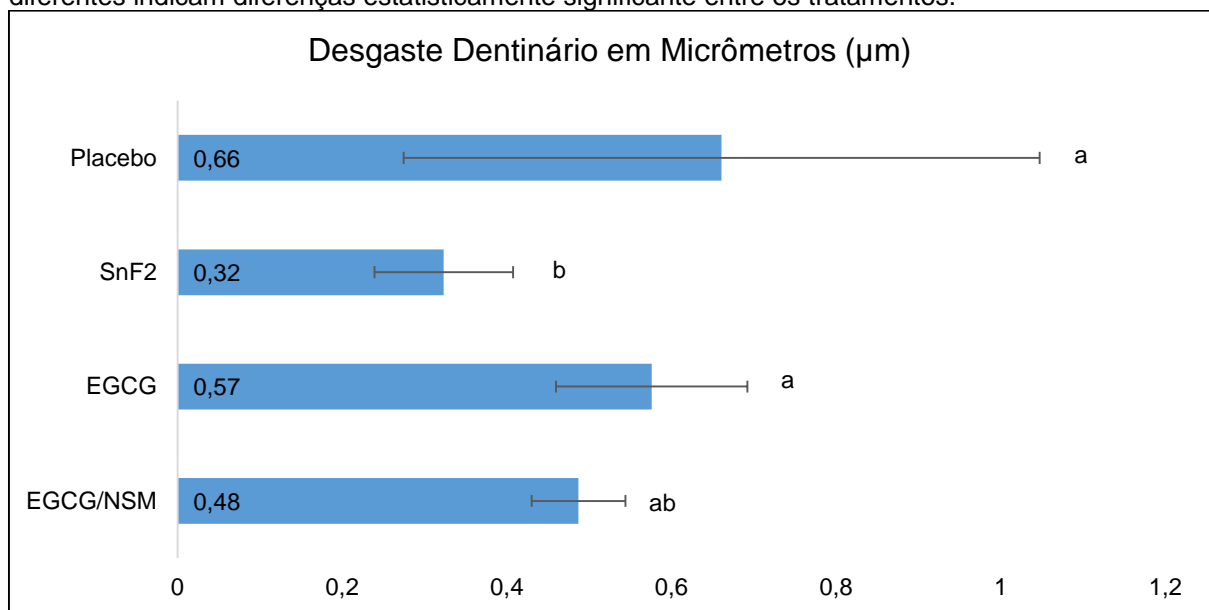
3 RESULTADOS

Os valores das médias e desvio padrão da dureza da superfície dentinária antes (inicial) e depois (final) do desafio erosivo/tratamento e porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) estão descritos na Tabela 1. Os resultados da análise da %PDS mostraram não haver diferença estatística ($p=0,067$) entre os grupos. Já os valores de desgaste dentinário (μm) analisados por ANOVA, revelaram diferença estatística entre os tratamentos ($p=0,005$). O pós-teste de Tukey demonstrou haver diferença significativa somente para o SnF_2 quando comparado ao placebo e à EGCG ($p=0,003$ e $p=0,046$). Em relação à EGCG/NSM, também não foi constatada diferença significativa entre esse grupo e o SnF_2 (controle positivo) ($p=0,306$), conforme mostra a Figura 1.

Tabela 1. Médias e desvios padrão da dureza da superfície dentinária antes (inicial) e depois (final) do desafio erosivo/tratamento e porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS)

GRUPOS	Dureza da Superfície Dentinária		
	Inicial	Final	%PDS
Placebo	56,17	39,22	29,54 ($\pm 16,24$) ^a
SnF ₂	56,14	43,15	23,07 ($\pm 6,52$) ^a
EGCG	56,09	41,25	26,12 ($\pm 8,53$) ^a
EGCG/NSM	55,28	45,87	17,2 ($\pm 8,86$) ^a

Figura 1. Média e desvios padrão do desgaste dentinário (μm) dos grupos tratados com placebo; SnF₂ 0,05% (controle positivo); EGCG 0,1% e EGCG/NSM 0,093% após erosão com ácido cítrico. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significante entre os tratamentos.



4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de gel contendo inibidores de MMPs (EGCG, EGCG/NSM), o placebo e o controle positivo (SnF₂) na proteção da erosão de dentina radicular humana realizada com ácido cítrico. O modelo *in situ* do experimento foi idealizado com o objetivo de simular o mais próximo possível as condições clínicas como a utilização de substrato dentinário

humano, a formação natural da película adquirida e o fluxo salivar fisiológico (West, Davies & Amaechi, 2011).

Os métodos selecionados para analisar as modificações da superfície dentinária após os desafios erosivos foram a medição da dureza de superfície e a análise perfilométrica. A dureza geralmente é utilizada como análise para avaliar as mudanças na superfície do esmalte nos estágios iniciais da erosão (Shellis, Ganss, Ren, Zero, & Lussi, 2011), mas optou-se por utilizar esse método no atual estudo, pois a erosão foi realizada com ácido cítrico (0,05M e pH 3,75), que possui menor potencial erosivo quando comparado à coca-cola (pH 2,6), que também é utilizada nos estudos como agente de erosão extrínseca (Kato, Leite, Hannas & Buzalaf, 2010; Magalhães *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). De acordo com Schlueter, Hara, Shellis e Ganss (2011), uma limitação desse método de avaliação é que em substratos dentários bastante erodidos os limites da indentação não são claramente definidos, de modo que as medições são imprecisas ou impossíveis, o que pode justificar essa ausência de diferença estatística entre os grupos. Portanto, a análise perfilométrica foi realizada também nesse estudo, já que é um método comprovadamente eficaz e bastante utilizado para avaliar o desgaste dentinário após desafios erosivos (Algarni *et al.*, 2015; Kato, Leite, *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2018; Schlueter, Klimek, & Ganss, 2011; Shellis, Ganss, Ren, Zero & Lussi, 2011).

Com o objetivo de aumentar o tempo de contato com a dentina, melhorando a substantividade do princípio ativo, além de tornar mais prático o uso clínico, selecionou-se o gel como veículo das substâncias experimentais. Em estudos de Kato, Leite, Hannas e Buzalaf (2010) e de Kato, Leite, Hannas, Oliveira *et al.* (2010) comprovou-se que géis são mais eficazes na entrega de inibidores das MMPs (EGCG e FeSO₄), quando comparados a soluções (Sn/AmF, clorexidina e extrato de chá verde), pois uma simples aplicação do gel foi mais efetiva que múltiplos bochechos em protocolos de desafios erosivos semelhantes (Kato *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2009).

Outra estratégia para aumentar o tempo de contato do princípio ativo ao substrato dentinário foi realizar o encapsulamento da EGCG em NSMs, permitindo uma liberação contínua do fármaco e, conseqüentemente, intensificando a proteção da dentina em detrimento aos efeitos da erosão. O encapsulamento de fármacos em NSMs vem sendo utilizado em Odontologia e bons resultados estão sendo obtidos, seja como uma estratégia na oclusão de túbulos dentinários, seja para introdução da

clorexidina em cimento de ionômero de vidro (Yan, Yang, Li, Yu, & Huang, 2017; Yu *et al.*, 2017). De acordo com os conhecimentos dos autores, não há estudos que avaliem o uso da EGCG/NSM para proteção da erosão dentinária.

O uso de inibidores de MMPs, como as catequinas presentes no chá verde e dentre elas a EGCG, vem se mostrando como uma estratégia eficaz na manutenção da MOD (Kato *et al.*, 2012). A EGCG foi identificada como inibidor das MMPs 2 e 9, apresentando como valor de concentração inibitória mínima de 6 e 0,8 μM respectivamente (Demeule *et al.*, 2000). Portanto, a concentração utilizada no atual estudo de 0,1% ou 2.181 μM foi suficiente para inibir essas collagenases.

Kato, Leite, Hannas e Buzalaf (2010) e Kato, Leite, Hannas, Oliveira *et al.* (2010) verificaram que a EGCG e o extrato de chá verde reduziram significativamente o desgaste dentinário quando comparados ao controle negativo. Esses resultados não corroboraram com os obtidos na atual pesquisa, na qual a EGCG 0,1% não diferiu estatisticamente do placebo. Isso pode ser explicado devido ao fato de que, antes do início do estudo *in situ*, os espécimes foram submetidos a 12h para formação da película adquirida a qual funciona como uma proteção natural contra os efeitos da erosão, apesar de ser mais eficaz no esmalte que na dentina (Wiegand, Bliggenstorfer, Magalhães, Sener & Attin, 2008).

De Moraes *et al.* (2016) e Passos *et al.* (2018), relataram que o chá verde e a EGCG reduziram o desgaste dentinário *in vitro*, diferindo do controle negativo, mas em ambos os estudos os tratamentos foram realizados por 5 min e o atual estudo foi aplicado apenas por 1 min, justificando-se a ausência de diferença estatística entre a catequina e o placebo, devido ao menor tempo de tratamento utilizado.

Acredita-se que o tratamento com EGCG/NSM foi equivalente ao SnF₂ em relação ao desgaste dentinário devido à característica das NSMs serem resistentes ao desafio ácido (Li, Liu, & Sun, 2011) e também por possuírem a capacidade de promover a liberação contínua do fármaco (Yan *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017), permitindo um maior tempo de contato da catequina com a dentina, além de proteger a EGCG das condições adversas do meio bucal.

O efeito antierosivo do estanho foi comprovado em diversos estudos (Algarni *et al.*, 2015; Schlueter, Klimek & Ganss 2009, Schlueter, Klimek, & Ganss, 2011) e o SnF₂ (controle positivo), além de ter sido identificado recentemente como inibidor das MMPs 2 e 9 (Cvikl *et al.*, 2018), age também se incorporando ao tecido mineralizado quando há preservação da MOD (Ganss *et al.*, 2010). O SnF₂ reage com a

hidroxiapatita e forma precipitados complexos contendo Sn_2OHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$ e CaF_2 (Babcock, King, & Jordan, 1978). O sinergismo desses mecanismos de ação explica o melhor resultado dessa substância com relação ao desgaste dentinário. Magalhães *et al.* (2009) avaliaram a ação de soluções de SnF_2/AmF , clorexidina e extrato de chá verde após erosão/abrasão de 5 min com coca-cola e todos os tratamento reduziram significativamente o desgaste da dentina quando comparados ao controle (água destilada), mas não diferiram entre si. Nesse caso, o extrato de chá verde foi utilizado em concentração de 0,61% e a concentração da catequina presente na solução (0,18%) era quase o dobro da utilizada no presente estudo, o que justifica seu desempenho na redução do desgaste dentinário. Nesse estudo não foi especificada a concentração do estanho na solução, apenas foi descrito que havia 250 ppm de flúor.

Um aspecto que parece influenciar a ação dos inibidores de MMPs é o momento da aplicação do tratamento. Estudos *in situ* realizados por Kato, Leite, Hannas e Buzalaf (2010) e Kato, Leite, Hannas, Oliveira *et al.* (2010) constataram que a aplicação de inibidores de proteases realizada antes do desafio erosivo inibiu quase totalmente o desgaste dentinário (por volta de 0,05 μm). Na atual pesquisa, a aplicação foi realizada por um mesmo período de tempo e após a erosão, o desgaste da dentina foi 0,57 μm para EGCG e 0,48 μm para EGCG/NSM. Kato *et al.* (2009) obtiveram desgaste dentinário semelhante ao presente estudo (0,59 μm) ao aplicarem EGCG 400 μM também por 1 min após erosão. Supõe-se, então, que aplicação de inibidores de MMPs previamente à erosão apresente melhores resultados, talvez pelo fato de eles já interagirem com as collagenases inativas existentes na dentina, impedindo a ocorrência da sua ativação numa futura diminuição do pH, ou seja, no momento do desafio erosivo, pois as MMPs necessitam de um pH baixo para serem ativadas, seguido de neutralização do meio, para só então começarem a degradar a MOD (Buzalaf, Kato, & Hannas, 2012; Chaussain-Miller, Fioretti, Goldberg & Menashi, 2006).

A impossibilidade de avaliar os efeitos dos inibidores de proteases nas MMPs salivares e avaliar conjuntamente a erosão e a abrasão foram as limitações desse estudo. Vale ressaltar que o protocolo empregado nessa pesquisa não avaliou diretamente o efeito da EGCG como inibidor das MMPs. Especula-se que a redução do desgaste dentinário promovido pela EGCG/NSM foi devido à ação inibitória da catequina sobre as proteases dentinárias, somando-se às características das NSMs

de serem resistentes ao desafio erosivo (Li, Liu, & Sun, 2011) e de possuírem a capacidade de promover a liberação contínua do fármaco (Yan *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Contudo, são necessários mais estudos para confirmar a ação inibitória desse fármaco adsorvido em NSMs nas MMPs presentes em dentina erosivamente desmineralizada.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que, dentro das limitações do presente estudo, o uso da EGCG/NSM é uma medida protetiva promissora na redução da erosão dentinária.

REFERÊNCIAS

- Algarni, A., A., Lippert, F., & Hara, A., T. (2015). Efficacy of stannous , fluoride and their their combination in dentin erosion prevention *in vitro*. *Braz Oral Res [online]* 29(1), 1-5.
- Babcock, F. D., King, J. C., & Jordan, T. H. (1978). The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J. Dent. Res.*, 57(9-10), 933-938.
- Bartlett, D. W., Lussi, A., West, N. X., Bouchard, P., Sanz, M. & Bourgeois, D. (2013). Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *Journal of Dentistry*, 41, 1007-1013.
- Buzalaf, M. A., Kato, M. T., & Hannas, A. R. (2012). The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Advances in Dental Research*, 24(2), 72–76.
- Chaussain-Miller, C., Fioretti, F., Goldberg, M., & Menashi, S. (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J. Dent. Res.*, 85(1), 22-32.
- Chen, Y., Chen, H., & Shi, J. (2013). *In vivo* bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Advanced Materials*, 25(23), 3144-3176.
- Chiang, Y. -C., Chen, H. -J., Liu, H. -C., Kang, S. -H., Lee, B. -S., Lin, F. -H., Lin, H. P., & Lin, C. -P. (2010). A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivity. *Journal of Dental Research*, 89(3), 236-40.
- Chiang, Y. C., Lin, H. P., Chang, H. H., Cheng, Y. W., Tang, H. Y., Yen, W. C., Lin, P. Y., Chang, K. W., & Lin, C. P. (2014). A mesoporous silica biomaterial for dental biomimetic crystallization. *ACS Nano*, 8(12), 12502–12513.
- Chrysanthakopoulos, N. A. (2012). Prevalence of tooth erosion and associated factors in 13-16-year old adolescents in Greece. *J. Clin. Exp. Den*, 4(3), 160-166.
- Cvikl, B., Lussi, A., Saads, T., Moritz, A., & Gruber, R. (2018). Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases. *Journal of Dentistry*,

78(August), 51–58.

- De Moraes, M. D. R., Carneiro, J. R. M., Passos, V. F., & Santiago, S. L. (2016). Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. *Brazilian Oral Research*, 30(1), 1-6.
- Demeule, M., Brossard, M., Pagé, M., Gingras, D., & Béliveau, R. (2000). Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1478(1), 51-60.
- Ganss, C., Hardt, M., Lussi, A., Cocks, A., Klimek, J., & Schlueter, N. (2010). Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine – an *in vitro* tin-uptake , tissue loss , and scanning electron microscopy study. *European Journal of Oral Sciences*, 118, 376-384.
- Ganss, C., Lussi, A., Sommer, N., Klimek, J., & Schlueter, N. (2010). Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Research*, 44(3), 248-252.
- Hao, X., Hu, X., Zhang, C., Chen, S., Li, Z., Yang, X., Liu, H., Jia, G., Liu, D., Ge, K., Liang, X., & Zhang, J. (2015). Hybrid mesoporous silica-based drug carrier nanostructures with improved degradability by hydroxyapatite. *ACS Nano*, 9(10), 9614-9625.
- Jaeggi, T., & Lussi, A. (2014). Prevalence , incidence and distribution of Erosion. *Monogr. Oral Sci*, 25, 55-73.
- Kato, M. T., Leite, A. L., Hannas, A. R., & Buzalaf, M. A. R. (2010). Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. *Journal of Dental Research*, 89(5), 468-472.
- Kato, M. T., Leite, A. L., Hannas, A. R., Calabria, M. P., Magalhães, A. C., Pereira, J. C., & Buzalaf, M. A. R. (2012). Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J. Den. Res.*, 91(12), 1119-1123.
- Kato, M. T., Leite, A. L., Hannas, A. R., Oliveira, R. C., Pereira, J. C., Tjäderhane, L., & Buzalaf, M. A. R. (2010). Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Research*, 44, 309-316.
- Kato, M. T., Magalhães, A. C., Rios, D., Hannas, A. R., Attin, T., & Buzalaf, M. A. R. (2009). Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 17(6), 560-564.
- Kleter, G. A., Damen, J. J. M., Everts, V., Niehof, J., & Tencate, J. M. (1994). The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin *in-Vitro*. *J. Dent. Res.*, 73(9), 1523-1529.
- Klont, B., & Ten Cate, J. M. (1991). Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after *in vitro* lesion formation. *Caries Research*, 25, 46-50.
- Li, Y., Li, N., Pan, W., Yu, Z., Yang, L., & Tang, B. (2017). Hollow mesoporous silica nanoparticles with tunable structures for controlled drug delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(3), 2123-2129.
- Li, S., Liu, M., & Sun, L. (2011). Preparation of acid-resisting ultramarine blue by novel two-step silica coating process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 7326-7331.

- Luciano, L., C., O., Ferreira, M., C., & Paschoal, M., A. (2017). Prevalence and factors associated with dental erosion in individuals aged 12 – 30 years in a northeastern brazilian city. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 9, 85-91.
- Lussi, A., & Carvalho, T. S. (2014). Erosive tooth wear : a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr. Oral Sci*, 25, 1-15.
- Magalhães, A., C., Wiegand, A., Rios, D., Buzalaf, M., A., R., & Lussi, A. (2011). Fluoride in Dental Erosion. *Monogr Oral Sci*, 22, 158-170.
- Magalhães, A. C., Wiegand, A., Rios, D., Hannas, A., Attin, T., & Buzalaf, M. A. R. (2009). Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *Journal of Dentistry*, 37(12), 994-998.
- Nakanishi, T., Mukai, K., Yumoto, H., Hirao, K., Hosokawa, Y., & Anti-, M. T. (2010). Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *European Journal of Oral Sciences*, 118, 145-150.
- Passos, V. F., De Vasconcellos, A. A., Pequeno, J. H. P., Rodrigues, L. K. A., & Santiago, S. L. (2015). Effect of commercial fluoride dentifrices against hydrochloric acid in an erosion-abrasion model. *Clinical Oral Investigations*, 19(1), 71-76.
- Passos, V. F., Gerage, L. K. A. R., & Santiago, S. L. (2017). Magnesium hydroxyde-based dentifrice as an anti-erosive agent in an *in situ* intrinsic erosion model. *American Journal of Dentistry*, 30(3), 137-141.
- Passos, V. F., Melo, M. A. S, Lima, J. P. M., Marçal, F. F., Costa, C. A. G. A., Rodrigues, L. K. A., & Santiago, S. L. (2018). Active compounds and derivatives of *camellia sinensis* responding to erosive attacks on dentin. *Braz. Oral Res.*, 32, 1-10.
- Passos, V. F., Melo, M. A. S., Silva, F. F. C., Rodrigues, L. K. A., & Santiago, S. L. (2014). Effects of diode laser therapy and stannous fluoride on dentin resistance under different erosive acid attacks. *Photomedicine and Laser Surgery*, 32(3), 146-151.
- Schlueter, N., Hara, A., Shellis, R. P., & Ganss, C. (2011). Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Research*, 45(suppl 1), 13-23.
- Schlueter, N., Klimek, J., & Ganss, C. (2009). Efficacy of an experimental Tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. *Caries Research*, 43, 415-421.
- Schlueter, N., Klimek, J., & Ganss, C. (2011). Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. *Clin Oral Invest*, 15, 361-367.
- Schlueter, N., Neutard, L., Hinckeldey, J. V., Klimek, J., & Ganss, C. (2010). Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine *in vitro*. *Acta Odontologica Scandinavica*, 68, 180-184.
- 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.
- Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis,

- biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*, 24(12), 1504-1534.
- Vargas-ferreira, F., Praetzel, J. R., & Ardenghi, T. M. (2011). Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. *Journal of Public Health Dentistry*, 71, 6-12.
- Vidal, C. M. P., Aguiar, T. R., Phansalkar, R., Mcalpine, J. B., Napolitano, J. G., Chen, S., Araújo, L. S. N., Pauli, G. F., & Bedran-Russo, A. (2014). Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomaterialia*, 10(7), 3288-3294.
- 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., Davies, M., & Amaechi, B. T. (2011). *In vitro* and *in situ* erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Research*, 45(SUPPL. 1), 43-52.
- Wiegand, A., Bliggenstorfer, S., Magalhães, A. C., Sener, B., & Attin, T. (2008). Impact of the *in situ* formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66, 225-230.
- Yan, H., Yang, H., Li, K., Yu, J., & Huang, C. (2017). Effects of chlorhexidine-encapsulated mesoporous silica nanoparticles on the anti-biofilm and mechanical properties of glass ionomer cement. *Molecules*, 22(1125), 1-14.
- Yu, J., Yang, H., Li, K., Lei, J., Zhou, L., & Huang, C. (2016). A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: An *in vitro* study. *Journal of Dentistry*, 50, 21-29.
- Yu, J., Yang, H., Li, K., Ren, H., Lei, J., & Huang, C. (2017). Development of epigallocatechin-3-gallate-encapsulated nanohydroxyapatite/mesoporous silica for therapeutic management of dentin surface. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(31), 25796-25807.
- Zou, R., Gong, S., Shi, J., Jiao, J., Wong, K., Zhang, H., Wang, J., & Su, Q. (2017). Magnetic-NIR persistent luminescent dual-modal ZGOCS @ MSNs @ Gd₂O₃ core – shell nanoprobe for *in vivo* imaging. *Chemistry of Materials*, 29, 3938-3946.

4 CONCLUSÃO GERAL

O uso da EGCG adsorvida em NSMs comprovou ser tão eficaz na redução do desgaste dentinário quanto o SnF₂, sendo uma medida protetiva promissora na redução dos efeitos da erosão, apesar da avaliação da %PDS não ter ocorrido diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, a EGCG isolada foi menos eficaz que o SnF₂.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALGARNI, A., A.; LIPPERT, F.; HARA, A., T. Efficacy of stannous , fluoride and their their combination in dentin erosion prevention *in vitro*. **Braz Oral Res** [online], v. 29, n. 1, pp. 1-5, 2015.
- AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M. Dental erosion: Possible approaches to prevention and control. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 3 SPEC. ISS., pp. 243-252, 2005.
- BARTLETT D. W. *et al.* Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. **Journal of Dentistry**, v. 41, pp. 1007-1013, 2013.
- BOUKPESSI, T. *et al.* The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. **Biomaterials**, v. 29, pp. 4367-4373, 2008.
- BUZALAF, M. A.; KATO, M. T.; HANNAS, A. R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. **Advances in dental research**, v. 24, n. 2, pp. 72-76, 2012.
- CHAUSSAIN-MILLER, C. *et al.* The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 1, pp. 22-32, 2006.
- CHEAIB, Z.; LUSSI, A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. **Caries Research**, v. 45, n. 2, pp. 107-112, 2011.
- CHEN, Y.; CHEN, H.; SHI, J. In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 25, n. 23, pp. 3144-3176, 2013.
- CHIANG, Y. -C.; CHEN, H. -J.; LIU, H. -C.; KANG, S. -H.; LEE, B. -S.; LIN, F. -H. *et al.* A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivit **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, pp. 236-40, 2010.
- CHIANG, Y. -C.; LIN, H. -P.; CHANG, H. -H.; CHENG, Y. -W.; TANG, H. -Y.; YEN, W. -C. *et al.* A mesoporous silica biomaterial for dental biomimetic crystallization. **ACS Nano**, v. 8, n. 12, pp. 12502-12513, 2014.
- CHRYSANTHAKOPOULOS, N. A. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 13-16-year old adolescents in Greece. **J. Clin. Exp. Den**, v. 4, n. 3, pp. 160-166, 2012.
- CVIKL, B. *et al.* Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases. **Journal of Dentistry**, v. 78, pp. 51-58, 2018.
- DEMEULE, M. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1478, n. 1, pp. 51-60, 2000.
- DE MORAES, M. D. R. *et al.* Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, pp. 1-6,

2016.

DIAMANTI, I.; KOLETZI-KOUNARI, H.; MAMAI-HOMATA, E. Effect of toothpastes containing different NaF concentrations or a SnF₂/NaF combination on root dentine erosive lesions, *in vitro*. **J Clin Exp Den.**, v. 8, n. 5, pp. 577-583, 2016.

DUFFEY, K. J. *et al.* Beverage consumption among European adolescents in the HELENA study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 2, pp. 244-252, 2012.

GAMBON, D. L.; BRAND, H. S.; VEERMAN, E. C. I. Dental erosion in the 21st century: What is happening to nutritional habits and lifestyle in our society? **British Dental Journal**, v. 213, n. 2, p. 55-57, 2012.

GANSS, C.; LUSSI, A.; SOMMER, N.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. **Caries Research**, v. 44, p. 248-252, 2010a.

GANSS, C.; HARDT, M.; LUSSI, A.; COCKS, A. K.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine – an *in vitro* tin-uptake , tissue loss , and scanning electron microscopy study. **European Journal of Oral Science**, v. 118, p. 376-384, 2010b.

HAO, X. *et al.* Hybrid Mesoporous Silica-Based Drug Carrier Nanostructures with Improved Degradability by Hydroxyapatite. **ACS Nano**, v. 9, n. 10, pp. 9614-9625, 2015.

HARA, A. T. *et al.* Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges *in situ*. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 7, pp. 612-616, 2006.

HASSELKVIST, A.; JOHANSSON, A.; JOHANSSON, A. A 4 year prospective longitudinal study of progression of dental erosion associated to lifestyle in 13-14 year-old Swedish adolescents. **Journal of Dentistry**, v. 47, pp. 55-62, 2016.

IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2 (Pt 2), pp. 151-155, 1996.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence , incidence and distribution of Erosion. **Monogr. Oral Sci**, v. 25, pp. 55-73, 2014.

JOÃO-SOUZA, S. H. *et al.* Effect of Nd : YAG laser irradiation and fluoride application in the progression of dentin erosion *in vitro*. **Lasers Med Sci**, v. 30, pp. 2273-2279, 2015.

JORDÃO, M. C. *et al.* *In situ* Effect of Chewing Gum with and without CPP-ACP on Enamel Surface Hardness Subsequent to ex vivo Acid Challenge. **Caries Research**, v. 50, n. 3, pp. 325-330, 2016.

KATO, M. T.; MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D.; HANNAS, A. R.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. **Journal of**

applied oral science : revista FOB, v. 17, n. 6, pp. 560-564, 2009.

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; BUZALAF, M. A. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 5, pp. 468-472, 2010.

KLETER, G. A. *et al.* The Influence of the Organic Matrix on Demineralization of Bovine Root Dentin *in-Vitro*. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. 9, pp. 1523-1529, 1994.

KLONT, B.; TEN CATE, J. M. Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after *in vitro* lesion formation. **Caries Research**, v. 25, pp. 46-50, 1991.

LI, H.; ZOU, Y.; DING, G. Dietary Factors Associated with Dental Erosion: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, pp. 1-7, 2012.

LI, Y. *et al.* Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles with Tunable Structures for Controlled Drug Delivery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 3, pp. 2123-2129, 2017.

LUCIANO, L. C. O.; FERREIRA, M. C.. PASCHOAL, M. A. Prevalence and factors associated with dental erosion in individuals aged 12-30 years in a northeastern brazilian city. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 9, pp. 85-91, 2017.

LUSSI, A. *et al.* Dental erosion - An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Research**, v. 45, n. SUPPL. 1, pp. 2-12, 2011.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; BUZALAF, M. A. R. Insights into preventive measures for dental erosion. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 2, pp. 75-86, 2009a.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HANNAS, A.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. R. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 12, pp. 994-998, 2009b.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; BUZALAF, M. A. R.; LUSSI, A. Fluoride in Dental Erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 22, pp. 158-170, 2011.

MAZZONI, A. *et al.* Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin. **Journal of Dentistry**, v. 79, pp. 90-95, 2018.

NAKANISHI, T. *et al.* Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, pp. 145-150, 2010.

PASSOS, V. F.; MELO, M. A.; SILVA, F. F.; RODRIGUES, L. K.; SANTIAGO, S. L. Effects of Diode Laser Therapy and Stannous Fluoride on Dentin Resistance Under Different Erosive Acid Attacks. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 3, pp. 146-151, 2014.

- PASSOS, V. F.; DE VASCONCELLOS, A. A.; PEQUENO, J. H.; RODRIGUES, L. K.; SANTIAGO, S. L. Effect of commercial fluoride dentifrices against hydrochloric acid in an erosion-abrasion model. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 1, pp. 71-76, 2015.
- RYTÖMAA, I. *et al.* Bulimia and tooth erosion. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 56, n. 1, pp. 36-40, 1998.
- SANTOS, J. *et al.* Determination of Matrix Metalloproteinases in Human Radicular Dentin. **JOE**, v. 35, n. 5, pp. 686-689, 2009.
- SCHEUTZEL, P. Etiology of dental erosion-intrinsic factors. **European Journal of Oral Science**, v. 104, pp. 178-190, 1996.
- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Efficacy of an experimental Tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. **Caries Research**, v. 43, pp. 415-421, 2009.
- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. **Clin Oral Invest**, v. 15, pp. 361-367, 2011.
- SCHLUETER, N.; NEUTARD, L.; VON HINCKELDEY, J.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine *in vitro*. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 68, pp. 180-184, 2010.
- SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, pp. 1807-1821, 2011.
- SULKALA, M. *et al.* Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. **Archives of Oral Biology**, v. 52, pp. 121-127, 2007.
- TANG, F.; LI, L.; CHEN, D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. **Advanced Materials**, v. 24, n. 12, pp. 1504-1534, 2012.
- VARGAS-FERREIRA, F.; PRAETZEL, J. R.; ARDENGHI, T. M. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 71, pp. 6-12, 2011.
- VERED, Y. *et al.* Dental erosive wear assessment among adolescents and adults utilizing the basic erosive wear examination (BEWE) scoring system. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 8, p. 1985-1990, 2014.
- VIDAL, C. M. P. *et al.* Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 7, pp. 3288-3294, 2014.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of

Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, n. 92, pp. 827-839, 2003.

WANG, Y. L. *et al.* Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 4, pp. 276-282, 2018.

WEST, N. X.; DAVIES, M.; AMAECHI, B. T. *In vitro* and *in situ* erosion models for evaluating tooth substance loss. **Caries Research**, v. 45, n. SUPPL. 1, pp. 43-52, 2011.

WIEGAND, A. *et al.* Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, pp. 219-226, 2010.

YU, J.; YANG, H.; LI, K.; LEI, J.; ZHOU, L.; HUANG, C. A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: An *in vitro* study. **Journal of Dentistry**, v. 50, pp. 21-29, 2016.

YU, J.; YANG, H.; LI, K.; REN, H.; LEI, J.; HUANG, C. Development of epigallocatechin-3-gallate-encapsulated nanohydroxyapatite/mesoporous silica for therapeutic management of dentin surface. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, pp. 25796-25807, 2017.

ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN SITU DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E NANOHIDROXIAPATITA NA EROÇÃO DENTINÁRIA

Pesquisador: HELAINE CAJADO ALVES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 90854518.2.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.704.870

Apresentação do Projeto:

Estudo randomizado, cruzado e cego, onde 20 voluntários saudáveis (sem doença cárie ou periodontal) usarão um dispositivo palatino de acrílico contendo 2 blocos de dentina. O estudo terá 4 fases de 5 dias cada. Durante cada fase experimental, os espécimes de dentina serão submetidos à erosão por imersão em ácido cítrico (0,05M, pH 3,75) por 60 segundos, 4 vezes ao dia, seguido de 60 segundos de tratamento com a substância objeto de investigação em forma de gel. As mudanças da dentina serão determinadas pela porcentagem da perda de dureza da superfície (%PDS) e análise perfilométrica, além da análise qualitativa através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar in situ o efeito isolado e em conjunto da nanohidroxiapatita e da epigallocatequina-3-galato adsorvidas em nanopartículas de sílica mesoporosa na dentina humana erosivamente desmineralizada.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.704.870

- Analisar o efeito das substâncias experimentais sobre o percentual de perda de dureza dentinária promovida pelo desafio erosivo com ácido cítrico.
- Mensurar o efeito das substâncias experimentais no desgaste da superfície dentinária após erosão extrínseca com ácido cítrico.
- Verificar através de microscopia eletrônica de varredura alterações na superfície dentinária após aplicação das substâncias experimentais subsequente ao desafio erosivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

os voluntários poderão apresentar discreta halitose apenas durante o período experimental, o que poderá ser resolvido com adequada higiene dental. Mesmo com remotas possibilidades, caso esta halitose persista após o período experimental, será realizada uma profilaxia dentária, bem como lhe será fornecido enxaguatório bucal com clorexidina até que o problema seja resolvido. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto na fonética, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da sua saúde bucal.

Benefícios:

O benefício será um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto e o conhecimento que vocês adquirirão sobre a prevenção contra erosão. Este conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população alto risco de erosão dentária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante que busca desenvolver uma substância que possa prevenir a erosão dentinária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.704.870

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1142548.pdf	04/06/2018 14:56:23		Aceito
Outros	INSTRUcoes_AOS_VOLUNTARIOS.docx	04/06/2018 14:55:13	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_pesquisa.pdf	04/06/2018 14:51:10	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostoplataforma_brasil.pdf	04/06/2018 14:50:12	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pos_qualificacao_corrigido.docx	03/06/2018 20:11:17	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Outros	solicitacao_ao_cep.pdf	03/06/2018 20:00:44	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Outros	declaracao_de_concordancia.pdf	03/06/2018 19:59:34	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Outros	TERMO_DE_DOACAO_DE_DENTES_HUMANOS.docx	29/05/2018 19:03:22	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	29/05/2018 18:55:09	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Orçamento	orcamento2.pdf	29/05/2018 18:51:12	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	29/05/2018 18:49:55	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	29/05/2018 18:43:57	HELAINÉ CAJADO ALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 11 de Junho de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado pela pesquisadora Helaine Cajado Alves como participante da pesquisa intitulada “**AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROSÃO DE DENTINA RADICULAR**”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE UM GEL CONTENDO CATEQUINA E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA PROTEÇÃO DA EROSÃO DE DENTINA RADICULAR.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo deste trabalho, *in situ*, será avaliar o efeito das substâncias SnF₂, EGCG/NSM e EGCG sobre dentina humana erosivamente desmineralizada.

A população tem recebido maiores informações sobre a doença cárie e tem-se observado a manutenção da dentição natural de inúmeros pacientes por mais tempo na cavidade bucal. Tal fato enfatiza a necessidade de se aperfeiçoar métodos preventivos já existentes, com a introdução de técnicas inovadoras que possam agir como coadjuvantes na proteção e controle da erosão dental.

Desta forma, novos materiais são frequentemente lançados no mercado odontológico com o apelo de conseguirem controlar, ainda que de uma forma localizada, o aparecimento de novas lesões de erosão.

Entretanto, devido a razões éticas e às vantagens de um melhor controle experimental das variáveis, além de maior custo na efetividade, parece desejável a utilização de modelos *in situ* para testar materiais, técnicas e sua capacidade de interferir no desgaste dental promovido pela erosão antes mesmo da realização de extensos e dispendiosos estudos clínicos.

Procedimentos: Será realizado um estudo do tipo cruzado que compreenderá 4 tratamentos, sendo quatro fases de 5 dias, durante as quais você utilizará um dispositivo intraoral palatino contendo blocos de dentina humana previamente esterilizados. Os 4 tratamentos serão:

Grupo 1: Placebo-controle em gel

Grupo 2: EGCG em gel

Grupo 3: EGCG/NSM em gel

Grupo 4: SnF₂ em gel

Em um período anterior ao início das fases do experimento (2 dias), você deverá fazer uso do dentífrico pré-determinado, a fim de padronizar as concentrações de flúor na saliva.

Instruções:

- a) Fase clínica: durante os cinco dias de tratamento, será realizado um procedimento erosivo quatro vezes ao dia (7h; 12h; 17h; 21h) utilizando ácido cítrico (fornecido pelo pesquisador) em temperatura ambiente. Para isso, os dispositivos serão imersos em 50 mL por 60 s. A seguir, o voluntário deve remover o dispositivo e lavar em água corrente por 10 s com pouca pressão, remover o excesso de umidade com papel absorvente e aplicar os produtos fornecidos pelo pesquisador em cada quadrado do dispositivo logo após ter realizado o desafio ácido;
- b) Utilizar o dispositivo intraoral palatino diariamente, inclusive para dormir;
- c) Remover o dispositivo intraoral somente durante as refeições ou ingestão de qualquer bebida ácida. Durante este período, este deve ser conservado no estojo fornecido e envolto com gaze molhada em água com o objetivo de manter umidade;
- d) Fazer uso do dentífrico padronizado três vezes ao dia durante a escovação. Durante a escovação, o dispositivo deverá ser removido e os voluntários deverão limpar seus dispositivos cuidadosamente, sem escovar por cima dos blocos para evitar realizar abrasão sobre os blocos. O tempo de escovação do dispositivo e dos dentes não deve exceder a 3 minutos;
- e) Fazer uso de água fluoretada de abastecimento de Fortaleza (0,7 ppm F).

Desconfortos e Riscos: Vocês poderão apresentar discreta halitose apenas durante o período experimental, o que poderá ser resolvido com adequada higiene dental. Mesmo com remotas possibilidades, caso esta halitose persista após o período experimental, será realizada uma profilaxia dentária, bem como lhe será fornecido enxaguatório bucal com clorexidina até que o problema seja resolvido. O dispositivo intraoral pode causar um leve desconforto na fonética, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados para verificar as

condições do aparelho e da sua saúde bucal. Cabe ressaltar que não haverá consumo direto da substância, pois esta será aplicada sobre os blocos.

Benefícios: você terá um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto, e o conhecimento que adquirirão sobre a prevenção contra a erosão. Este conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população de alto risco de erosão dentária.

Forma de acompanhamento e assistência: os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição de vocês para ajuste no aparelho intraoral, a fim de minimizar qualquer desconforto.

Garantia de esclarecimento: você tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intraoral, por favor, comunicar-nos com a maior brevidade possível pelo telefone 85 98849.5999 (Helaine Cajado Alves).

Formas de ressarcimento: você será ressarcido de despesas com o transporte-alimentação para a retirada das amostras contidas nos dispositivos.

Formas de indenização: não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Garantia de sigilo: os pesquisadores asseguram a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa: o participante poderá recusar-se a continuar participando da pesquisa e também poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA TAL EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvidas, realizar contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da UFC**.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC. Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, telefone: 3366-8344 (Horário: 08h às 12h).

O CEP/UFC/PROPEAQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo os seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____ de _____ de 2018.

Assinatura do voluntário

Assinatura do Profissional que aplicou o TCLE

Assinatura do Responsável pelo estudo

Universidade Federal do Ceará – Departamento de Odontologia Restauradora
Rua Cap. Francisco Pedro s/n. – Rodolfo Teófilo. CEP: 60.430-170. Fone: 85
3366.8410/3366.8426.

APÊNDICE B – INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. Todos os materiais utilizados não acarretarão em custo ao voluntário.
2. Durante o experimento, os voluntários deverão escovar seus dentes com o dentífrico fornecido pelo pesquisador.
3. A pesquisa será composta por 4 etapas, com duração de 5 dias cada uma e com um intervalo de 2 dias entre estes.
4. Os voluntários utilizarão um dispositivo intraoral, que possui 2 cavidades, contendo cada uma delas um bloco de dentina humana previamente esterilizada para a pesquisa. O dispositivo deverá ser instalado um dia antes do início da fase experimental (domingo), à noite, após a última higiene, idealmente às 19h.
5. Os voluntários deverão utilizar o dispositivo e só o removerá para as principais refeições (café da manhã, almoço e jantar), ocasião em que o dispositivo ficará envolvido em gaze encharcada por água de abastecimento.
6. Durante o uso do dispositivo, nenhum tipo de alimento ou bebida poderão ser ingeridos, exceto água.
7. Deve-se evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a refeição (máximo 1 hora).
8. A higiene bucal deve ser realizada três vezes ao dia, utilizando o dentífrico dado pelo autor.
9. Durante os cinco dias de tratamento, o procedimento erosivo deverá ser realizado quatro vezes ao dia (7h; 12h; 17h; 21h) utilizando ácido cítrico (fornecido pelo pesquisador) em temperatura ambiente. Para isso, os dispositivos serão imersos em 50 mL por 60 s.
10. A seguir, o voluntário deve remover o dispositivo e lavar em água corrente com pouca pressão, remover o excesso de umidade com papel absorvente e aplicar os produtos fornecidos pelo pesquisador em cada quadradinho do dispositivo, deixando-os agir por 60 s. Os excessos serão removidos com papel absorvente e em seguida inserir na boca.
11. Os voluntários deverão retornar à clínica, logo acabe o período de experimento, para a troca dos dispositivos.
12. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com o pesquisador para que este seja repostado.

13. Qualquer dúvida, entrar em contato com o pesquisador responsável do trabalho, no telefone: 85 98849.5999 (Helaine).

Obs.: Favor observar todos os dias se os quadradinhos encontram-se na mesma posição e, caso desloquem-se de lugar, entrar imediatamente em contato com o pesquisador.