ANGELA MAYUMI SHIMAOKA

**Potencial remineralizador de dentifrícios com compostos bioativos
no esmalte dental submetido a desafios erosivos
de diferentes severidades**

São Paulo

2010

ANGELA MAYUMI SHIMAOKA

**Potencial remineralizador de dentifrícios com compostos bioativos
no esmalte dental submetido a desafios erosivos
de diferentes severidades**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Rubens Côrte Real de Carvalho

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Shimaoka AM. Potencial remineralizador de dentifrícios com compostos bioativos no esmalte dental submetido a desafios erosivos de diferentes severidades. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais *Berenise* e *Osvaldo* e meus queridos irmãos *Rita* e *Gabriel*. Família guerreira e batalhadora. Alicerce da minha formação pessoal e do meu caráter. Fazer parte desta família fez de mim uma pessoa melhor e mais forte.

**“A verdadeira viagem do descobrimento
não consiste em buscar novas terras,
mas sim em ter novos olhos.”
(Marcel Proust)**

Ao meu orientador, mestre e amigo *Prof. Dr. Rubens Côrte Real de Carvalho*. Dignidade, honradez, sensatez, inteligência, honestidade e sinceridade são apenas algumas de suas inúmeras qualidades. Dizem que um dia só vale a pena quando aprendemos algo novo. Conviver com você é um aprendizado constante. Não houve um dia ao seu lado em que não tenha aprendido. Obrigada por todo apoio, incentivo e confiança.

À minha melhor amiga *Alessandra Pereira de Andrade*. A combinação de sensibilidade, doçura, inteligência, dedicação, garra, determinação, paixão e trabalho árduo fazem de você a pessoa mais competente que já conheci. Você é realmente uma pessoa iluminada. Merecedora de tudo o que de bom esse mundo possa te oferecer. Seu apoio e companheirismo diários foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Tenho muito orgulho em ser sua amiga. Muito obrigada pela oportunidade de exercer diariamente minha amizade.

Nenhuma palavra que eu pudesse escrever seria capaz de expressar minha gratidão e a importância de vocês em minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado abrindo meus olhos e reciclando meu modo de ver o mundo.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Minha segunda casa, berço de toda minha formação acadêmica.

À CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo durante o meu curso de doutorado.

À Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística da FOU SP, exemplo de que sensibilidade e competência podem andar juntas. Obrigada pela disponibilidade, pelo apoio e confiança nesses últimos anos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Dentística da FOU SP por todos os ensinamentos.

À Soninha, técnica do Laboratório de Pesquisa Aplicada do Departamento de Dentística, sempre solícita, disposta e carinhosa.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, David, Ana Maria, Selma, Arnaldo e Aldo e às secretárias da Pós-Graduação, Alessandra, Cátia, Donata e Nair pelo indispensável suporte durante todo o curso de Pós-Graduação.

Aos alunos do Curso de Pós-Graduação em Dentística pelas experiências compartilhadas.

À bibliotecária Glauci pela normalização das referências e revisão da formatação deste trabalho.

À Dra. Anna Lúcia F. G. Richetti, representando a GC do Brasil pela doação dos Dentifrícios MI Paste™ e MI Paste Plus™ para a realização deste estudo.

À Profa. Suzana C. Orsini Machado de Sousa e à ffo-FUNDECTO pela oportunidade e confiança em mim depositadas no trabalho junto à RPG - Revista da Pós-Graduação da FOUSP.

Ao meu grande amigo Marcio Vivan Cardoso. Disciplinado, competente, íntegro. Mas, acima de tudo, dono de um coração enorme. Um verdadeiro amigo com quem se pode contar. Realmente "um menino de ouro cravejado de brilhantes". Amiguinho, felicidades.

Ao querido amigo Flávio Merichello. Pessoa honrada e sensível, profissional exemplar e dedicado. Senhor do seu destino.

À minha querida amiga Ivani. Não somente por todo apoio e suporte, mas, principalmente por seu carinho. Muito obrigada por tudo.

À minha mais que querida Larissa. Um anjo com quem tenho a oportunidade de conviver. Obrigada por ter aberto seu coração para mim. Você certamente mora no meu.

RESUMO

Shimaoka AM. Potencial remineralizador de dentifrícios com compostos bioativos no esmalte dental submetido a desafios erosivos de diferentes severidades [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Frente ao aumento da prevalência da erosão dental e das dificuldades de controle de seus possíveis fatores etiológicos (químicos, biológicos e comportamentais) é de fundamental importância o estabelecimento de medidas no sentido de diminuir o progresso ou evitar a instalação da erosão dental ou ainda reverter lesões de erosão já estabelecidas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o potencial remineralizador de dentifrícios com compostos bioativos no esmalte dental submetido a desafios erosivos de diferentes severidades. A variável de resposta, alteração mineral, foi avaliada quantitativamente pelo método de mensuração de fluorescência do substrato dental (QLF™). Os tratamentos remineralizadores avaliados foram: saliva (controle) e 5 dentifrícios (Flúor, Recaldent™, Recaldent™+F, Novamin®, Novamin®+F) em três condições experimentais relacionadas à severidade do desafio erosivo (1h, 4h e 8 h e diferentes momentos de análise (baseline, desafio erosivo, 1ºdia, 7ºdia, 14ºdia). As unidades experimentais foram compostas de 180 fragmentos dentais de incisivos bovinos com dimensões 4 x 4 x 3 mm. As amostras foram distribuídas entre os grupos experimentais sendo n=10. Para a realização dos desafios erosivos os espécimes foram imersos em suco de laranja de acordo com os tempos experimentais. A análise estatística confirmou que os tempos de imersão utilizados, 1 hora, 4 horas e 8 horas, causaram diferentes graus de erosão no esmalte dental: suave, moderado e severo respectivamente. A aplicação dos diferentes tratamentos remineralizadores foi realizada diariamente por meio da imersão dos espécimes em recipientes contendo suspensão de

dentifrícios. O grupo controle permaneceu imerso em saliva artificial que era substituída diariamente. Foram realizadas mensurações referentes ao processo remineralizador pelo método QLF™ nos momentos experimentais baseline, erosão, 1ºdia, 7ºdia e 14ºdia. Foram realizadas análises estatísticas distintas para cada severidade de desafio erosivo (suave, moderado e severo). Nenhum dos tratamentos propostos foi capaz de remineralizar totalmente as lesões erosivas independentemente da severidade, sendo que o a associação dos compostos bioativos Recaldent™ e Flúor apresentou maior potencial remineralizador.

Palavras-chave: Dentifrícios. Erosão Dentária. Esmalte Dentário. Desmineralização. Remineralização.

ABSTRACT

Shimaoka AM. Remineralizing potential of toothpastes with different bioactive compounds on different enamel erosion severities [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The increasing prevalence of dental erosion besides the difficulty of controlling its etiological factors (chemical, biological and behavioral) indicate the fundamental importance for the establishment of measures to slow the progression, prevent the installation of dental erosion or even reverse the process. Thus, the purpose of this study was to evaluate the remineralizing potential of bioactive compounds in dentifrices with enamel subjected to erosive challenges of different severities. The mineral changes were evaluated by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF™). The remineralizing treatments consisted in saliva (control) and 5 toothpaste (Fluoride, Recaldent™, Recaldent™+F, Novamin®, Novamin®+F) in three experimental conditions according to the severity of erosive challenge (1h, 4h and 8 h) and different analysis periods (baseline, erosive challenge, 1th day, 7th day and 14th day). The experimental units consisted of 180 bovine incisors fragments with dimensions 4 x 4 x 3 mm. The samples were distributed among the experimental groups (n = 10). Erosive challenges were performed by samples immersing in orange juice according to the experimental times. Different immersion times, 1 hour, 4 hours and 8 hours, promoted different erosion severities on dental enamel: mild, moderate and severe respectively confirmed by statistical analysis. Application of different remineralizing treatments was performed daily by immersing the specimens in vials containing toothpastes suspensions. Control group remained immersed in artificial saliva which was daily replaced. QLF™ measurements concerning remineralizing process were performed at experimental times, baseline, erosion, 1th, 7th and 14th days. Statistics analyses were performed for each erosive challenge severity separately (mild, moderate and severe). None of

the treatments proposed were capable of fully remineralizing regardless erosive lesions severity. Recaldent™ and Fluoride association presented the highest remineralizing potential among bioactive compounds.

Keywords: Dentifrices. Tooth Erosion. Dental Enamel. Demineralization. Remineralization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial associado a medidas preventivas ocasionaram o declínio da perda de elementos dentais por afecções bucais como a cárie dental e doenças periodontais. Esse aumento no período de permanência dos elementos dentais na cavidade bucal possibilita uma maior incidência clínica de efeitos deletérios decorrentes do desgaste dental.

O desgaste dental é um processo fisiológico natural e tem sido atribuído à tríade erosão, abrasão e atrição. Entretanto, em determinadas circunstâncias e, em alguns indivíduos, o desgaste dental pode se apresentar excessivo e portanto patológico. Essa perda patológica de tecido dental mineralizado tem se tornado um problema crescente, não só na população mais idosa, devido ao aumento da longevidade e da permanência do elemento dental na cavidade bucal, como também entre adultos e jovens.

O consumo excessivo de comidas e bebidas ácidas é um dos fatores extrínsecos mais comumente relacionados à causa da erosão dental.

Os dentes são diariamente expostos ao consumo de bebidas com baixo pH, podendo haver dano à superfície dental. O crescente aumento do consumo de bebidas ácidas como refrigerantes e bebidas esportivas tornou-se uma questão preocupante. Associado à composição química, o modo e a frequência de ingestão das bebidas podem interferir no processo erosivo pois o aumento no tempo de exposição aos desafios ácidos pode resultar em lesões erosivas de maior agressividade.

Apesar do desgaste dental geralmente apresentar uma etiologia multifatorial, a erosão tem contribuído de forma crescente para o aumento da incidência desta patologia.

Erosão dental é definida como a dissolução superficial por ácidos dos tecidos dentais mineralizados sem envolvimento bacteriano. Os ácidos responsáveis pela erosão podem estar relacionados a fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem desordens crônicas como o refluxo

gastroesofageal e os transtornos alimentares como bulimia nos quais há o contato recorrente da superfície dental com ácidos gástricos durante vômito, regurgitação ou ruminação. Os fatores extrínsecos incluem substâncias ácidas provenientes da dieta alimentar, de medicações e da exposição ambiental a vapores ácidos.

Tradicionalmente protocolos clínicos para prevenção ou tratamento de erosão dental envolvem a combinação da restrição do contato com agentes erosivos e a utilização de produtos que contenham flúor em sua composição.

Os dentifrícios são considerados produtos acessíveis e de utilização generalizada tornando-se assim um veículo efetivo na tentativa de aumentar a resistência do esmalte a desafios erosivos.

Novos produtos têm sido introduzidos no mercado com a proposta de reduzir os efeitos desmineralizadores dos desafios erosivos, aumentar a remineralização do esmalte dental e atuar como agente dessensibilizante. Dentre eles estão os dentifrícios que contêm compostos como fosfato de cálcio amorfo e fosfopeptídeo de caseína (CPP-ACP - Recaldent™), vidro bioativo (Novamin®), nitrato de potássio e dióxido de titânio podendo ainda apresentarem-se associados a altos níveis de flúor. Entretanto poucos estudos avaliaram estas características e os resultados são contraditórios.

Muitas metodologias têm sido descritas para o estudo da erosão dental, incluindo perfilometria, análises químicas, microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia de força atômica (AFM) microdureza superficial, microradiografia transversal e quantificação de fluorescência induzida por luz (QLF™). A maioria destes métodos é destrutiva, o que limita sua utilização aos ensaios laboratoriais, dificulta a mensuração longitudinal de lesões além de, somente, proverem informações sobre os efeitos superficiais não considerando uma possível perda mineral subsuperficial.

Frente à evidência do aumento da prevalência da erosão dental e, das dificuldades de controle dos possíveis fatores etiológicos (químicos, biológicos e comportamentais) é de fundamental importância o

estabelecimento de medidas no sentido de diminuir o progresso ou até mesmo evitar a estabelecimento da erosão dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O desgaste dental é um quadro multifatorial que causa a perda de tecido dental mineralizado. Historicamente o desgaste dental pode ser classificado em atrição, abrasão e erosão. Atrição é definida como o desgaste dental fisiológico pelo contato dos dentes durante mastigação. Abrasão é definida como desgaste patológico dos dentes por um processo mecânico pela interação entre os dentes e outros materiais. Já a erosão dental é definida como a perda de tecido dental mineralizado devido a um processo químico sem o envolvimento de microrganismos (1; 2).

Os termos abrasão, atrição e erosão foram adaptados e seus significados no contexto odontológico podem divergir daqueles empregados em outras áreas do conhecimento, particularmente na tribologia, a ciência do desgaste, fricção e lubrificação (3).

A tribologia reconhece uma variedade de mecanismos pelos quais o desgaste pode ocorrer. No desgaste a dois corpos o desgaste ocorre pela quebra de asperidades produzida pelo contato direto entre duas superfícies em movimento. No desgaste a três corpos duas superfícies em movimento são intermediadas por uma solução com partículas abrasivas que remove material de ambas as superfícies. No desgaste triboquímico ou corrosão a superfície do material é enfraquecida pela ação de um agente químico havendo, conseqüentemente, maior susceptibilidade à ação de forças mecânicas. Erosão seria a perda progressiva de material de uma superfície sólida devido à interação mecânica entre a superfície e um fluido. Esse fenômeno pode ser exemplificado pela ação da arrebentação na costa marítima ou pela ação da correnteza de um rio nas estruturas de sustentação de pontes. Não há, na cavidade bucal, fluxo de fluidos desta magnitude que possa afetar os dentes dessa maneira. Portanto, a definição de erosão, como descrita para outras áreas da ciência não tem aplicação significativa em relação aos dentes. Desta forma, em termos tribológicos a

atrição seria reclassificada segundo o termo abrasão e erosão seria descrita como uma forma de desgaste triboquímico, a corrosão(3-5).

Tentativas no sentido de alteração da nomenclatura empregada em Odontologia parecem não ter alcançado sucesso (4), visto que os termos atrição, abrasão e erosão tem seu significado estabelecido na comunidade odontológica e devem persistir apesar de suas limitações.

Os processos de desgaste dental, em algumas circunstâncias podem ocorrer isoladamente, contudo, o desgaste dental é geralmente resultado da combinação de atrição, abrasão e erosão, mesmo que um dos três processos seja predominante. (2; 6; 7)

Alguns estudos apontam a erosão como sendo o componente mais importante no processo de desgaste dental (1; 2; 4; 5; 8-15) , ainda que os estudos de prevalência ainda sejam escassos.

O termo clínico erosão dental é empregado para descrever o resultado físico da perda patológica, crônica, localizada e indolor de tecido mineralizado da superfície dental sem que haja envolvimento bacteriano. (1)

Os ácidos responsáveis pela erosão dental podem ser de origem intrínseca ou extrínseca.

Erosão intrínseca é causada pelo contato do ácido gástrico com a superfície dos dentes. As causas mais comuns para a migração de ácido gástrico para a cavidade bucal incluem vômito recorrente causado por distúrbios alimentares como bulimia nervosa, alcoolismo, refluxo gastroesofágico e regurgitação (14). Os agentes extrínsecos podem ser provenientes de contaminantes do ambiente de trabalho como a inalação de vapores ácidos durante processos industriais ou a água de piscina. Há também relatos de erosão extrínseca causado pela administração crônica de medicamentos, entretanto os ácidos provenientes da dieta alimentar são a principal fonte extrínseca de ácidos que podem causar erosão ácida (16). Alimentos e bebidas frequentemente consumidos como frutas ácidas, suco de frutas, bebidas carbonatadas, refrigerantes, isotônicos, energéticos e bebidas alcoólicas saborizadas (16;17) têm sido identificados como causa significativa de erosão extrínseca (18).

O consumo de bebidas com potencial erosivo tem aumentado mundialmente, especialmente entre a população jovem. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior mercado de refrigerantes do mundo com um consumo médio anual é de 71,4 litros de refrigerantes por pessoa, atrás somente dos Estados Unidos e México (19).

A capacidade erosiva de ácidos como o cítrico, maléico e fosfórico constituintes de alimentos e bebidas, tem sido demonstrada em diversos estudos (20-22). Entretanto ressalta-se que o potencial erosivo de uma bebida ácida não é dependente exclusivamente do pH sendo também dependente do conteúdo de ácido titulável presente, ou seja, da capacidade de tamponamento assim como, das propriedades de quelação do cálcio apresentadas pela substância. Quanto maior for a capacidade de tamponamento de uma bebida maior será o tempo necessário para que a saliva seja capaz de neutralizá-la (23).

Sugere-se que a forma como os agentes erosivos são ingeridos seria mais importante do que a quantidade total de ácido ingerida. A utilização de canudos, atitudes como sorver ou ingerir grandes goles alteram o contato dos dentes com o desafio erosivo e possivelmente o padrão de depuração. Hábitos como bochechar, manter bebidas ou alimentos ácidos por um tempo na cavidade bucal antes de engolir podem ser prejudiciais por prolongarem o tempo de exposição dos dentes aos agentes ácidos (11; 16; 24).

Outro fator de risco associado a dieta alimentar é a frequência de consumo de agentes acídicos. Os ácidos provenientes da dieta causam uma queda imediata do pH bucal e, então haverá a ação de neutralização da saliva por alguns minutos para que haja o retorno ao pH fisiológico. Assim o consumo de pequenas quantidades diárias de ácidos pode se tornar mais prejudicial do que uma grande quantidade, dependendo da frequência desse consumo (11; 12).

A erosão por ácidos ocorre em episódios discretos e essa é uma das razões pelas quais os hábitos de ingestão podem ser extremamente danosos. A superfície dental muda continuamente com a dissolução parcial da

camada mais externa de esmalte ou dentina tornando-se mais suscetível à abrasão e à atrição (3; 6; 12; 25).

Os eventos químicos que levam à erosão são complexos. Quando uma solução entra em contato com a superfície dental, é necessário que primeiramente haja sua difusão através da película adquirida que recobre a superfície dental. Somente então poderá haver interação com a fase mineral do elemento dental. Porém, uma película adquirida recém formada dificilmente será uma barreira para um agente erosivo. Somente quando a película se apresenta madura e já atingiu certa espessura ela é capaz de diminuir o processo de difusão de agentes erosivos (26).

Uma vez em contato com o esmalte dental, os ácidos, devido aos íons hidrogênio ou à sua capacidade de quelação, iniciarão a dissolução dos cristais de hidroxiapatita. A forma não-ionizada do ácido irá então permear as regiões interprismáticas e dissolver a subsuperfície. Esse processo acarretará na difusão de íons cálcio e fosfato a partir do mineral do esmalte dental levando a um subsequente aumento de pH local na estrutura próxima ao esmalte dental. Esse processo cessará a partir do momento em que não haja mais a presença de substâncias ácidas e/ou quelantes. Um aumento na agitação, isto é quando o paciente bochecha uma bebida na boca, pode potencializar o processo de dissolução pois, a solução sobre a superfície de esmalte dental estará sendo prontamente renovada. Além disso, a quantidade de bebida na cavidade bucal em relação à quantidade de saliva presente também afeta o processo de dissolução (23).

Erosão dental é uma condição multifatorial dependente da interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais, ou seja, fatores intrínsecos que podem variar entre diferentes indivíduos são capazes de interferir na patogênese da erosão dental (13).

Dentre os fatores modificadores biológicos que podem afetar o processo de erosão dental estão a composição da saliva, fluxo salivar, estrutura e anatomia dental, anatomia dos tecidos moles e sua relação com os dentes, além de aspectos fisiológicos como a movimentos de deglutição (24).

A saliva desempenha papel importante durante um desafio ácido devido a propriedades como diluição, neutralização e depuração dos ácidos. Atua, ainda, na manutenção do estado de supersaturação fornecendo íons cálcio e fosfato e possivelmente flúor, necessários durante o processo constante de remineralização e na formação da película adquirida(27). A contribuição da saliva no processo de desmineralização-remineralização demonstra a importância do monitoramento do fluxo salivar, especialmente em pacientes expostos a fatores que possam interferir no fluxo ou na composição da saliva, como por exemplo, doenças sistêmicas, uso de medicamentos ou tratamentos radioterápicos (28).

A superfície de esmalte acometida por erosão dental em estágio inicial apresenta-se lisa, brilhante, com aspecto vítreo e ausência de periquimatas. Em estágios mais avançados ocorrem alterações morfológicas resultantes do aplainamento da superfície ou do desenvolvimento de concavidades no esmalte dental. Outra característica típica é a presença de uma borda intacta de esmalte ao longo da margem gengival. A preservação dessa região do esmalte dental pode ser devida à presença do fluido sulcular ou ainda devido a algum remanescente de biofilme que atuaria como uma barreira de difusão aos ácidos. A progressão da erosão oclusal leva ao arredondamento de cúspides, surgimento de reentrâncias nas cúspides e bordas incisais além de desnível entre a borda das restaurações e a superfície dental adjacente acarretando em uma aparente extrusão do material restaurador. Em casos severos pode haver a perda total da morfologia oclusal (24; 29).

O esmalte submetido a desafio erosivo apresenta superfície com padrão de desmineralização irregular, sendo a região ao redor dos prismas atingida primeiramente. Em desafios erosivos prolongados as alterações atingem a região intrerprismática. Normalmente a cabeça dos prismas é mais afetada do que a região interprismática com um padrão irregular de fendas e reentrâncias causando aumento na porosidade da superfície de esmalte (30; 31).

O reconhecimento das mudanças clínicas na aparência dos dentes acometidos por erosão é de grande importância para a avaliação da atividade da patologia. Superfícies lisas e limpas sugerem um processo ativo, pois a superfície dental de uma lesão ativa está em constante mudança, expondo uma superfície limpa e sem manchas. Por outro lado superfícies dentais manchadas podem sugerir inatividade devido ao tempo necessário para o estabelecimento de manchas superficiais nos dentes (12).

O surgimento de poucos sinais e sintomas torna difícil o diagnóstico precoce da erosão dental tanto por parte do paciente como cirurgião-dentista, entretanto o profissional deve estar atento e proceder a um exame clínico minucioso com a superfície dental seca e bem iluminada a fim de que seja possível a percepção de alterações morfológicas sutis (13).

Estudos conduzidos em países europeus sugerem maior prevalência de erosão em indivíduos do sexo masculino (9). Em crianças e adolescentes há maior prevalência de lesões na superfície oclusal de molares superiores, seguida pelos incisivos superiores, provavelmente devido ao período de erupção e ao seu posicionamento em área de grande contato com dieta ácida (32). Os incisivos inferiores não seriam afetados na mesma intensidade devido à proteção da língua e ao potencial de neutralização da saliva excretada pelas glândulas salivares submandibular e sublingual (33). Na dentição permanente as lesões erosivas atingem principalmente as superfícies palatinas de incisivos e caninos superiores, seguida das superfícies oclusais de pré-molares e molares superiores (34).

A maioria dos estudos de prevalência está concentrada no continente europeu, mas parece haver uma crescente conscientização mundial sobre erosão dental e um aumento nos relatos de dados sobre erosão em países não europeus. No Brasil não existem dados relativos à prevalência da erosão dental em âmbito nacional, apenas alguns estudos com relatos de dados regionais (35; 36).

Medidas preventivas e terapêuticas devem ser empregadas para a diminuição da incidência da erosão dental e da progressão de lesões já existentes.

Pacientes que apresentam risco elevado a erosão dental devem ser conscientizados e orientados sobre a restrição do contato com agentes erosivos, mudanças comportamentais na dieta alimentar e nos hábitos de higiene, assim como a utilização de produtos capazes de proteger o esmalte dental frente a desafios ácidos em sua composição (15; 37-39).

Uma abordagem que vem sendo proposta é a adição suplementar de íons como cálcio, fosfato e fluoretos em bebidas como sucos e isotônicos na tentativa de minimizar seu potencial erosivo (40).

Uma categoria de produtos a ser considerada com potencial preventivo, de diminuição da progressão da erosão dental e até mesmo de reversão de lesões erosivas estabelecidas seria a dos dentifrícios, produtos acessíveis e de ampla utilização podendo portanto atuar como um veículo efetivo na tentativa de aumentar a resistência do esmalte a desafios erosivos (37-39).

Diversas formas de apresentação dos fluoretos, como gel, verniz, enxaguatórios e dentifrícios, têm sido tradicionalmente empregadas na tentativa de minimizar os efeitos deletérios da erosão dental, apresentando, contudo resultados controversos (6; 37-39; 41). A capacidade dos fluoretos em potencializar o processo de remineralização e reduzir a desmineralização do esmalte dental é reconhecida (42; 43). O efeito protetor do flúor no esmalte dental submetido a desafios ácidos é creditado à formação de uma camada semelhante ao fluoreto de cálcio na superfície de esmalte (44; 45).

Novos produtos têm sido introduzidos no mercado com a proposta de reduzir os efeitos desmineralizadores dos desafios erosivos, aumentar a remineralização do esmalte dental e atuar como agente dessensibilizante. Dentre eles estão os dentifrícios que contêm compostos bioativos como fosfato de cálcio amorfo e fosfopeptídeo de caseína ou CPP-ACP (Recaldent™), vidro bioativo contendo fosfosilicato de cálcio e sódio (Novamin®), nitrato de potássio e dióxido de titânio. Existem ainda formulações nas quais esses compostos se apresentam associados a fluoretos (46; 47). Poucos estudos avaliaram o potencial desses compostos, especialmente no que se refere a erosão dental (7; 46; 48-55).

Acredita-se que os fosfopeptídeos de caseína podem aumentar o nível de íons cálcio e fosfato inorgânico na superfície dental permitindo assim uma imediata remineralização da superfície de esmalte dental (51; 56; 57). Produtos a base de fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo CPP-ACP, composto patenteado sob a marca comercial Recaldent™, têm sido aplicados a superfície dental na forma de goma de mascar, pastilhas e enxaguatórios bucais e dentifrícios (58).

Novamin® é a marca comercial de um vidro biotivo de fosfosilicato de sódio e cálcio altamente biocompatível originalmente desenvolvido como material regenerador ósseo, tendo sido introduzido no âmbito odontológico para o tratamento da hipersensibilidade dentinária atuando por oclusão física de túbulos dentinários (59). Estudos recentes demonstraram a potencialidade deste material em prevenir desmineralização ou auxiliar na remineralização de superfícies dentais mineralizadas (46; 59).

O mecanismo de ação desse material é resultante da interação com soluções aquosas, liberando íons sódio, cálcio e fosfato que teriam a capacidade de interagir com os fluidos bucais para a formação de uma camada de apatita hidroxicarbonatada cristalina, química e estruturalmente semelhante ao mineral natural dos dentes. Essa potencialidade pode ser explorada para o tratamento e prevenção da erosão dental (46).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a análise da perda de substância dental mineralizada ocasionada pela erosão, algumas dessas técnicas já se apresentam bem estabelecidas na literatura científica, enquanto outras ainda têm sido exploradas quanto ao seu potencial.

Inicialmente o processo erosivo envolve a dissolução do esmalte dental e está associada ao amolecimento da superfície devido ao enfraquecimento da estrutura de esmalte (60). Assim, metodologias que empregam indentação têm sido extensivamente utilizadas em pesquisas relacionadas à erosão dental para a avaliação da dureza do esmalte e dentina, apresentando-se como métodos simples para a observação de estágios iniciais de erosão dental in vitro. Como exemplos dessas metodologias encontram-se microindentação e a nanoindentação. A

dureza superficial ou microindentação é o método mais tradicional e estabelecido, mas por outro lado a nanoindentação ou ultramicroindentação tem se apresentado como uma técnica recente aplicável em estudos sobre erosão dental. Uma das principais diferenças entre essas metodologias está no fato de a microindentação determinar a dureza superficial pela mensuração das dimensões das marcas produzidas pelo indentador na superfície do esmalte, obtendo-se informações referentes somente a deformações plásticas, enquanto na nanoindentação há um monitoramento contínuo durante a aplicação da carga pela ponta do equipamento e a consequente determinação da deformação plástica e elástica da superfície analisada (10).

Comparativamente à microindentação, a nanoindentação é uma metodologia recente, entretanto esta metodologia tem se mostrado extremamente sensível a mudanças nas propriedades mecânicas da superfície do esmalte dental (61; 62).

Perfilometria também tem sido utilizada em estudos sobre erosão dental. Para essa avaliação o esmalte dental é protegido com verniz ácido resistente de forma que haja a exposição ao agente erosivo de apenas uma área delimitada. As amostras são então escaneadas para mensuração da perda de substrato dental mineralizado por meio da comparação entre a região intacta e a área exposta ao desafio erosivo. Como é realizada a mensuração da perda de material ao invés do amolecimento da superfície, a perfilometria é mais indicada para a mensuração de lesões de erosão mais avançadas em relação às técnicas de indentação. A perfilometria é uma metodologia relativamente simples e rápida para avaliação de alterações superficiais no esmalte dental, entretanto assim como no caso da micro e nanoindentação é necessária a planificação dos espécimes previamente, o que leva a perda de esmalte superficial (63; 64).

Apesar de a microradiografia ser predominantemente empregada em estudos sobre cárie dental alguns estudos têm utilizado essa metodologia para a avaliação do potencial erosivo de bebidas ácidas (63; 65), devido à possibilidade de observação da perda de estrutura dental assim como o

amolecimento da superfície de esmalte, pois o espécime a ser analisado é irradiado com um feixe de raios-X e um contador de fótons é responsável pelo registro da radiação penetrante. Assim, a densidade de fótons associada a uma amostra de calibração fornece um mapa da densidade mineral do esmalte estudado (66).

As análises químicas também têm sua aplicação em estudos sobre alterações no conteúdo mineral do esmalte dental, principalmente por meio da mensuração das concentrações de cálcio e fosfato liberados nas soluções ácidas durante desafios erosivos (63). As análises químicas mais comumente utilizadas são espectroscopia de emissão atômica para a análise de íons cálcio e a espectrofotometria para a mensuração da concentração de íons fosfato (10). Além disso, ainda há a possibilidade da mensuração de mudanças no pH das soluções analisadas, pois a imersão de uma amostra de esmalte em uma solução ácida provoca a dissolução da hidroxiapatita e consequentemente há a liberação de íons OH^- que neutralizam os íons H^+ levando a um aumento do pH da solução. Assim por meio da mensuração de pH é possível determinar a taxa de liberação de íons OH^- e a partir disto a taxa de dissolução da hidroxiapatita do esmalte pode ser calculada (34).

Apesar das análises químicas serem técnicas estabelecidas, sensíveis e precisas e apresentarem como vantagem a possibilidade de utilização de superfícies de esmalte sem desgaste pelo fato de não requerer o polimento das mesmas, elas fornecem apenas informações relativas à liberação de íons, sendo necessárias técnicas adicionais para a visualização das alterações das superfícies cristalinas e de possíveis deposições ou enucleações de novos materiais (18)

Recentemente, estudos têm relatado que o método de quantificação de perda mineral, chamado Quantificação de Fluorescência induzida por Luz (QLF™ - Quantitative Light-induced Fluorescence), oferece a oportunidade de se diagnosticar pequenas alterações no conteúdo mineral dental, além de registrar o padrão e o tempo do processo de remineralização (67-69). Tem como vantagens ser um método não destrutivo,

alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade inter e intra-examinadores, facilidade de utilização, além de poder ser utilizado tanto em estudos laboratoriais como em pesquisas clínicas (70; 71).

A desmineralização do esmalte dental resulta na diminuição de sua fluorescência intrínseca. QLF™ é uma metodologia que foi desenvolvida para a detecção precoce de desmineralização em lesões de cárie (72). Essencialmente, a técnica mensura a perda da autofluorescência do esmalte na presença de desmineralização (73).

Além de sua capacidade de detectar a profundidade de uma lesão de esmalte, QLF™ também é capaz de realizar análise quantitativa da mesma lesão em diferentes períodos de desmineralização (66; 74) tanto in vivo quanto in vitro. Diversas técnicas têm sido descritas para a avaliação de lesões erosivas, sendo que a maioria apresenta desvantagens inerentes. Contrariamente, as características descritas denotam que o método QLF™ se apresenta como uma metodologia indicada para aplicação em estudos de erosão dental (17; 64; 66; 75-77) sendo capaz de promover mensurações acuradas das alterações do esmalte dental.

Frente as considerações realizadas anteriormente percebe-se que existem indagações em relação ao tema erosão dental e sua interação com diferentes compostos bioativos disponibilizados na forma de dentifrícios e seus possíveis benefícios remineralizadores. Assim este estudo será conduzido com a intenção de agregar maior conhecimento ao assunto.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo geral avaliar o potencial remineralizador de dentifrícios com diferentes composições químicas no esmalte dental submetido a desafios erosivos e, mais especificamente, responder os seguintes questionamentos:

1. Diferentes tempos de exposição do esmalte dental ao agente erosivo são capazes de promover lesões erosivas de severidades distintas?
2. Os tratamentos propostos, baseados na aplicação diária de dentifrícios contendo os compostos bioativos Flúor, Recaldent™, Recaldent™+F, Novamin® e Novamin®+F, são capazes de promover remineralização total das lesões erosivas de diferentes severidades?
3. Qual, dentre os tratamentos propostos, é mais efetivo para a remineralização de lesões erosivas no esmalte dental?

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

A variável de resposta, alteração mineral, foi avaliada quantitativamente pelo método de mensuração de fluorescência do substrato dental (QLF™), sendo dois fatores em estudo, o tratamento remineralizador (controle - saliva e 5 dentifrícios – Flúor, Recaldent™, Recaldent™+F, Novamin®, Novamin®+F) e o momento da análise (baseline, desafio erosivo, 1ºdia, 7ºdia, 14ºdia) Os dois fatores de variação foram analisados em três condições experimentais relacionadas à severidade do desafio erosivo (1h, 4h e 8 h). As unidades experimentais foram compostas de 180 fragmentos de esmalte dental obtidos a partir de incisivos bovinos. As amostras foram distribuídas entre os grupos experimentais sendo n=10.

4.2 Obtenção da amostra

Para a obtenção dos espécimes foram selecionados 45 incisivos bovinos que após profilaxia foram selecionados segundo 2 critérios:

- Defeitos estruturais - observados em um microscópio digital em aumento de 50 vezes (MiView USB Digital Microscope, Chinavasion Wholesale, Guangdong, CN) com o objetivo de verificar a ausência de defeitos, trincas e/ou imperfeições no esmalte (Figura 4.4 A).
- Mineralização - todos os elementos dentais também foram analisados pelo método de fluorescência do substrato dental (QLF™ System, Inspektor Reserch Systems BV, Amsterdam, NL – Auxílio Pesquisa Regular FAPESP,

processo 2006/01177-8); o método será detalhadamente descrito no item referente à quantificação do conteúdo mineral do substrato dental. Esta análise teve por objetivo verificar se algum dos 45 elementos dentais apresentava, na face vestibular, alguma área de desmineralização previamente ao início do estudo. (Figura 4.4 A).

Elementos dentais que apresentassem algum tipo de imperfeição ou áreas de desmineralização prévias eram descartados e substituídos.

Os dentes permaneceram armazenados em água deionizada em geladeira a 5°C até o início da fase experimental.

4.3 Obtenção dos espécimes

Os dentes receberam cortes no sentido transversal no limite amelo-cementário para a separação da porção coronária utilizando-se um disco diamantado (Extec, Enfield, CT, USA) com auxílio de uma cortadeira metalográfica (Labcut, modelo 1010, Extec, Enfield, CT, USA).

As coroas foram fixadas em um dispositivo de metal acoplado à cortadeira metalográfica e receberam cortes seriados a fim de se obter 4 fragmentos de esmalte/dentina, da região média da face vestibular, em formato quadrangular com dimensões 4 mm de altura, 4 mm de comprimento e 3 mm de espessura (Figura 4.4 B).

Os fragmentos dentais foram incluídos em resina acrílica quimicamente ativada. Na porção central das faces de esmalte dos 180 espécimes foi posicionado um fragmento de fita adesiva de dimensões de 2 X 2. Após este posicionamento foi aplicada uma camada de verniz ácido-resistente (esmalte cosmético incolor, Maybelline Colorama, São Paulo, SP, BR) em toda face de esmalte do espécime. Após a secagem do verniz, a fita adesiva era removida expondo uma área de esmalte de 4 mm² onde os desafios erosivos e os tratamentos remineralizadores foram realizados (Figura 4.4 B). Os 180 espécimes foram analisados em relação ao conteúdo mineral

pelo método QLF™ e divididos aleatoriamente entre três grupos de acordo com a condição experimental de severidade erosiva (n=60). Este momento de análise foi denominado baseline.

4.4 Desafios erosivos

Para a realização dos desafios erosivos os espécimes foram imersos individualmente em recipientes plásticos contendo 6 ml de suco fresco de laranja à temperatura ambiente de acordo com os tempos determinados para cada grupo experimental (1h, 4h e 8h). Após este período os espécimes eram removidos da solução erosiva e lavados com água deionizada (Figura 4.4 C).

Uma amostra do suco de laranja foi destinada à realização de mensurações relativas ao seu pH (pHmetro digital, mod. Phcol, Coleman Equipamentos para Laboratórios Comércio e importação Ltda, SP. BR). A solução utilizada para todos os espécimes apresentava um pH=3,2.

4.5 – Quantificações de conteúdo mineral pelo método de fluorescência do substrato dental - QLF™

Após os desafios erosivos todos os espécimes foram avaliados em relação ao conteúdo mineral por meio do método de fluorescência do tecido dental com o auxílio do equipamento QLF™ System, sendo esta mensuração denominada momento de análise erosão.

O método de quantificação mineral por fluorescência do tecido dental baseia-se em diferenças ópticas entre esmalte sadio e esmalte desmineralizado. Um feixe de luz azul-violeta produzido por uma fonte de radiação lâmpada de xenon, $\lambda=404\text{ nm}$, $10\text{-}20\text{ mW cm}^{-2}$) é conduzido à área

de avaliação através de uma fibra óptica, produzindo uma fluorescência amarela no tecido dental mineralizado irradiado. Quando iluminado por luz azul, o esmalte hígido aparece fluorescente devido a dentina subjacente; o esmalte desmineralizado, por sua vez, aparece escuro, como resultado do espalhamento da luz (Figuras 4.1 e 4.2). Uma micro-câmera, contendo um filtro laranja ($\lambda \geq 520\text{nm}$) é responsável por eliminar a luz espalhada no tecido, captando a fluorescência produzida no tecido iluminado, produzindo imagens do substrato dental. O aplicativo do equipamento processa esta imagem e a área escura da lesão de desmineralização é reconstruída de forma que a intensidade de desmineralização seja visualizada em um degrade de cor que varia de uma cor azul-escura e amarelo de acordo com o ΔF e ΔQ (Figura 4.3)

Figura 4.1 - Sistema QLF. **A** Monitor; **B** Sistema de vídeo e saída de luz para captação de imagens; **C** Computador com aplicativo para análise; **D** Peça-de-mão com ponta plástica descartável; **E** Fibra óptica; **F** Área de emissão da luz proveniente da fonte de xenon; **G** Área da câmera e filtro para captura de imagens

Figura 4.2 – Imagem da área de desmineralização do esmalte dental humano capturada e processada pelo sistema QLF™

Para a obtenção das imagens dos fragmentos de esmalte/dentina os espécimes foram secos com jato de ar comprimido (Compressed Air Cleaner 300ml, Athens, AL, USA) por 30 segundos para padronização do grau de desidratação do esmalte desmineralizado.

A peça de mão do equipamento foi posicionada no suporte para estudos laboratoriais (QLF™ in vitro, Inspektor Dental Care, Amsterdam, NL - Auxílio Pesquisa Regular FAPESP, processo 2006/01177-8). Este suporte possibilita que o espécime analisado e a peça de mão permaneçam dispostos paralelamente entre si permitindo que a distância entre eles possa ser ajustada a fim de propiciar uma condição de foco ideal e para a manutenção da distância entre o espécime analisado e a peça de mão durante todas as mensurações (Figura 4.2).

As imagens foram capturadas em câmara escura, armazenadas no disco rígido da unidade principal do equipamento QLF™. As imagens obtidas foram analisadas, por meio do aplicativo do equipamento (Inspektor™PRO, Inspektor Dental Care, Amsterdam, NL, Auxílio Pesquisa Regular FAPESP, processo 2006/01177-8), quanto à área da lesão (mm²), profundidade da lesão expressa em percentual de perda de fluorescência do tecido (ΔF em

%). O volume da lesão (ΔQ em $\text{mm}^2 \%$) é o índice final relativo ao valor de perda mineral do substrato analisado e o valor numérico utilizado para as análises estatísticas. O equipamento realiza suas mensurações baseada na comparação entre a área de análise e a área circundante intacta (figura 4.3).

Figura 4.3– Análise quantitativa do conteúdo mineral realizado pelo equipamento QLFT™

Após a análise mineral dos espécimes submetidos aos três diferentes tempos de ação da solução erosiva (1h, 4h e 8h) uma análise estatística foi realizada para a verificação de diferenças entre os 3 tempos de ação (item 5.1). A partir do momento em que estas diferenças foram observadas as severidades de erosão realizadas foram denominadas como suave (1 hora), moderada (4 horas) e severa (8 horas). Os 60 fragmentos de cada desafio erosivo foram divididos entre os 6 tratamentos remineralizadores estudados (n=10)

4.6 Tratamento remineralizador

Foram selecionados para avaliação dentifrícios que apresentam diferentes compostos como principal ingrediente ativo em sua composição: Flúor, Recaldent™, Recaldent™ e Flúor, Novamin®, Novamin® e Flúor. As especificações técnicas como, marca comercial e composição química dos agentes remineralizadores podem ser observadas no quadro 4.1.

Após a etapa do desafio erosivo cada fragmento de esmalte, com exceção àqueles destinados aos grupos controle, foi imerso, diariamente, em um recipiente contendo 6 ml de suspensão de dentifrício, durante 5 minutos a 37°C sob agitação constante, por um período de 14 dias. Foram preparadas suspensões de dentifrícios a partir de uma mistura de dentifrício e água deionizada em uma proporção de 3:1 em peso (44).

Durante o período restante do dia cada fragmento de esmalte permaneceu armazenado recipiente plástico, imerso em 6 ml de saliva artificial a 37°C. Cada recipiente era lavado com água deionizada e o conteúdo de saliva substituído diariamente.

Os espécimes do grupo controle permaneceram imersos em 6 ml saliva durante todo o período experimental após a realização dos desafios erosivos. A saliva do grupo controle também foi substituída diariamente.

Durante o período de 14 dias de tratamento remineralizador, os momentos de análise 1ºdia, 7ºdia e 14ºdia, após o período diário de exposição ao tratamento remineralizador os fragmentos foram lavados com água deionizada e foi realizada a quantificação das alterações de conteúdo mineral pelo método QLF™ como descrito anteriormente no momento de análise denominado erosão.

Quadro 4.1 - Especificações técnicas dos grupos experimentais: marca comercial e composição

GRUPOS EXPERIMENTAIS		MARCA COMERCIAL	COMPOSIÇÃO
Saliva	Saliform (F&A Laboratório Farmacêutico Ltda., SP, Brasil)	Fluoreto de sódio (2ppm), cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato de potássio, tiocianato de potássio, metilparabeno, mentol, água deionizada	
Fluór	Close up (Unilever Brasil Higiene Pessoal e Limpeza Ltda, PE, Brasil)	NaF 0,32% p/p (1 500 ppm F), sorbitol, água, sílica, PEG 32, lauril sulfato de sódio, aroma, goma de celulose, sacarina sódica, fenoxietanol, PEG 40	
Recaldent	MI Paste™ (GC Corporation, Tokio, Japan)	Água pura, glicerol, CPP-ACP (Recaldent™), D-Sorbitol, CMC-Na, propilenoglicol, dióxido de silicone, dióxido de titânio, xilitol, ácido fosfórico, saborizante, óxido de zinco, sacarina sódica,etil p-hidroxibenzoato, óxido de magnésio, goma guar, propil p-hidroxibenzoato, butil-hidroxibenzoato	
Recaldent+F	MI Paste Plus™ (GC Corporation, Tokio, Japan)	Água pura, glicerol, CPP-ACP (Recaldent™), D-Sorbitol, CMC-Na, propilenoglicol, dióxido de silicone, dióxido de titânio, xilitol, ácido fosfórico, saborizante, óxido de zinco, sacarina sódica,etil p-hidroxibenzoato, óxido de magnésio, goma guar, propil p-hidroxibenzoato, butil-hidroxibenzoato, fluoreto de sódio 0,2 p/p (900ppm F)	
Novamin	Nanosensitive® hca (Hager e Werken, Germany)	Glicerina, PEG-8, sílica, fosfosilicado de cálcio e sódio (Novamin®), Lauril sulfato de sódio, dióxido de titânio, carbômero, acessulfame de potássio	
Novamin+F	Odonis-Rx (Laboratório Dautt Oliveira Ltda, RJ, Brasil)	Glicerina, sílica, PEG 400, fosfosilicado de cálcio e sódio (Novamin®), Lauril sulfato de sódio, dióxido de titânio, carbômero, acessulfame de potássio, monofluorofosfato de sódio (1 100 ppm)	

A figura 4.4 é uma representação esquemática do delineamento experimental adotado neste estudo.

Figura 4.4 – Ilustração do delineamento experimental

4.7 Tratamento estatístico das amostras de dados

Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística com auxílio do aplicativo Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Inicialmente foi realizado teste para verificação da normalidade e homocedasticidade da amostra. A partir desta análise foi selecionado o teste estatístico mais adequado para a comparação entre os grupos experimentais, considerando-se a dependência dos dados da amostra quando da análise longitudinal dos tratamentos remineralizadores.

5 RESULTADOS

5.1 Severidade do desafio erosivo

Após a realização dos três desafios erosivos, segundo os tempos de imersão em solução erosiva, foi realizada uma análise estatística entre os diferentes tempos de imersão em suco de laranja para certificação da existência de diferenças estatísticas entre os tempos utilizados.

Os dados obtidos por meio do método de quantificação de conteúdo mineral pelo método de fluorescência do substrato dental ($\Delta Q \text{ mm}^2 \%$) após 1 hora, 4 horas e 8 horas de imersão foram submetidos à análise estatística por meio do teste de teste Kolmogorov-Smirnov, para avaliação de suposição de normalidade e homocedasticidade ($\alpha=0,05$).

A amostra dos dados revelou não aderência à curva de normalidade. Assim para avaliação de diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de múltiplas comparações de Dunn (Quadro 5.1).

Teste estatístico de Kruskal-Wallis		
valor de p	p<0.0001	
As medianas variam significativamente? (p < 0.05)	sim	
Número de grupos	3	
Estatística de Kruskal-Wallis	159,1	
Teste de múltiplas comparações de Dunn		
Comparação entre tempos de imersão	Diferença entre soma dos quadrados	Significância (p < 0,05)
1h vs 4h	60.0	Sim
1h vs 8h	120.0	Sim
4h vs 8h	60.0	Sim
Médias dos valores de ΔQ em mm² % (erro-padrão/desvio-padrão) dos grupos experimentais (n=60)		
1 hora	4 horas	8 horas
-0,98 (0,09/0,73)	-20,99 (0,71/5,52)	-61,84 (1,76/13,66)

Quadro 5.1 – Sumário do estudo estatístico realizada para a análise entre os diferentes tempos de imersão em solução erosiva

A análise estatística confirmou que os três tempos de imersão utilizados, 1 hora, 4 horas e 8 horas, causaram diferentes graus de erosão no esmalte dental, denominados neste estudo, suave, moderado e severo respectivamente (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Representação gráfica das diferenças estatísticas entre os tempos de imersão dos espécimes em solução erosiva. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos analisados

A figura 5.1 ilustra os diferentes padrões de lesões erosivas obtidas a partir da imersão dos espécimes nos tempos 1 hora, 4 horas e 8 horas.

Figura 5.1 – Diferenças no conteúdo mineral do esmalte dental submetido a diferentes severidades de erosão dental

5.2 – Potencial remineralizador dos dentifrícios

Foram realizadas três análises estatísticas distintas, sendo uma para cada severidade de desafio erosivo (suave, moderado e severo).

Esta opção de análise foi eleita por se entender que cada severidade de desafio erosivo constitui uma condição experimental distinta.

Os dados obtidos por meio do método de quantificação de conteúdo mineral pelo método de fluorescência do substrato dental ($\Delta Q \text{ mm}^2 \%$) foram submetidos à análise estatística por meio do teste de teste Kolmogorov-Smirnov, para avaliação de suposição de normalidade e homocedasticidade ($\alpha=0,05$).

O teste ANOVA 2 fatores para mensurações repetidas foi selecionado por considerar como desenho experimental um estudo com dois fatores de variação (tratamento e momento de análise) e a vinculação dos dados, posto que foram realizados dez mensurações em cada uma das 60 unidades experimentais em cada desafio erosivo realizado.

O teste estatístico ANOVA 2 fatores de variação para mensurações repetidas e o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram utilizados nas três análises admitindo-se nível de significância estatística de 5%.

A. Desafio erosivo suave (1 hora)

A análise de variância demonstrou haver diferenças estatísticas para os dois fatores de variação: momento de análise ($p<0.0001$) e tratamento ($p=0,0296$) assim como na interação entre estes dois fatores ($p=0,0462$).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos momentos de análise baseline e erosão.

Os tratamentos Flúor, Recaldent, Recaldent+F e Novamin+F não apresentaram diferenças estatísticas entre si nos momentos de mensuração 1º dia, 7º dia e 14º dia, porém diferiram dos grupos saliva (controle) e Novamin, que por sua vez também não apresentaram diferenças estatísticas entre si nos mesmos momentos de análise.

Considerando-se o desempenho remineralizador de cada tratamento separadamente, os tratamentos Saliva, Flúor, Novamin e Novamin+F exibiram comportamento semelhantes, apresentando capacidade remineralizadora estatisticamente significativa em relação ao momento erosão apenas no 7º dia de análise, não apresentando aumento de remineralização no 14º dia.

O tratamento Recaldent apresentou aumento nos valores de mineralização do substrato no momento de análise 1º dia em relação ao momento erosão. Entre o momento de análise 1º dia e 7º dia não foi observada diferença estatística. No 14º dia de análise foi observado aumento de mineralização em relação ao 7º dia.

O tratamento Recaldent+F apresentou diferenças estatisticamente significantes entre todos os momentos de análise, revelando um aumento gradativo nos níveis de remineralização do esmalte submetido ao desafio erosivo suave.

Uma representação gráfica da análise longitudinal realizada para esta condição experimental pode ser observada no gráfico 5.2.

As diferenças estatísticas estabelecidas pelo teste de comparações múltiplas com nível de significância de 5% podem ser observadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Valores médios ($\pm$ desvio-padrão) de ΔQ em $\text{mm}^2\%$ obtidos para os grupos experimentais para o desafio erosivo suave (1 hora)

	baseline	erosão	1º dia	7º dia	14º dia
Saliva	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-1,08 ($\pm$ 0,08) ^{aB}	-0,96 ($\pm$ 0,07) ^{aB}	-0,70 ($\pm$ 0,09) ^{aBC}	-0,50 ($\pm$ 0,07) ^{aC}
Flúor	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-0,84 ($\pm$ 0,06) ^{aB}	-0,67 ($\pm$ 0,15) ^{bB}	-0,42 ($\pm$ 0,09) ^{bB}	-0,20 ($\pm$ 0,07) ^{bC}
Recaldent	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-1,11 ($\pm$ 0,18) ^{aB}	-0,49 ($\pm$ 0,08) ^{bC}	-0,38 ($\pm$ 0,04) ^{bC}	-0,15 ($\pm$ 0,03) ^{bD}
Recaldent+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-1,15 ($\pm$ 0,06) ^{aB}	-0,61 ($\pm$ 0,09) ^{bC}	-0,35 ($\pm$ 0,07) ^{bD}	-0,05 ($\pm$ 0,01) ^{cE}
Novamin	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-1,00 ($\pm$ 0,07) ^{aB}	-1,26 ($\pm$ 0,20) ^{aB}	-0,82 ($\pm$ 0,04) ^{aBC}	-0,65 ($\pm$ 0,10) ^{aC}
Novamin+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-0,83 ($\pm$ 0,20) ^{aB}	-0,61 ($\pm$ 0,06) ^{bB}	-0,30 ($\pm$ 0,06) ^{bC}	-0,18 ($\pm$ 0,09) ^{bC}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo momento de análise. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre diferentes momentos de análise para um mesmo grupo experimental ($p > 0.05$)

Gráfico 5.2 – Representação da análise longitudinal do potencial remineralizador dos dentífricos na condição experimental desafio erosivo suave

B. Desafio erosivo moderado (4 horas)

A análise de variância demonstrou haver diferenças estatísticas para os dois fatores de variação: momento de análise ($p < 0.0001$) e tratamento ($p = 0,0237$) assim como na interação entre estes dois fatores ($p = 0,0192$).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos momentos de análise baseline e erosão.

No 1º dia de análise o tratamento Recaldent+F apresentou melhor desempenho remineralizador, mostrando valores de ΔQ superiores estatisticamente em relação aos demais grupos experimentais.

No momento de mensuração 7º dia os tratamentos Saliva e Novamin+F não apresentaram diferença estatística entre si, diferindo dos demais tratamentos que também não mostraram diferença estatística entre si.

No 14º dia os tratamentos Flúor e Recaldent não apresentaram diferenças em seus valores médios, assim como os tratamentos Novamin+F e Novamin.

O tratamento Recaldent+F apresentou diferenças estatísticas em relação aos demais tratamentos com os maiores valores de ΔQ . O tratamento saliva, com os menores valores de ΔQ , apresentou desempenho remineralizador inferior estatisticamente aos demais grupos experimentais.

As diferenças estatísticas estabelecidas pelo teste de comparações múltiplas com nível de significância de 5% podem ser observadas na tabela 5.2.

Uma representação gráfica da análise longitudinal realizada para esta condição experimental pode ser observada no gráfico 5.3

Tabela 5.2 – Valores médios ($\pm$ desvio-padrão) de ΔQ em $\text{mm}^2\%$ obtidos para os grupos experimentais para o desafio erosivo moderado (4 horas)

	baseline	erosão	1º dia	7º dia	14º dia
Saliva	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-22,49 ($\pm$ 1,58) ^{aB}	-19,23 ($\pm$ 1,35) ^{aBC}	-15,18 ($\pm$ 1,16) ^{aBCD}	-11,55 ($\pm$ 1,17) ^{aD}
Flúor	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-20,99 ($\pm$ 1,46) ^{aB}	-16,06 ($\pm$ 1,29) ^{aB}	-7,85 ($\pm$ 2,31) ^{bcC}	-3,94 ($\pm$ 1,42) ^{beC}
Recaldent	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-22,35 ($\pm$ 1,36) ^{aB}	-15,58 ($\pm$ 1,43) ^{aC}	-7,18 ($\pm$ 0,86) ^{bcD}	-2,03 ($\pm$ 0,37) ^{bE}
Recaldent+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-19,39 ($\pm$ 1,43) ^{aB}	-8,47 ($\pm$ 1,95) ^{bc}	-6,23 ($\pm$ 0,98) ^{bcC}	-0,78 ($\pm$ 0,17) ^{cd}
Novamin	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-20,63 ($\pm$ 2,66) ^{aB}	-16,00 ($\pm$ 1,84) ^{aB}	-9,12 ($\pm$ 1,10) ^{bcC}	-6,96 ($\pm$ 0,67) ^{dC}
Novamin+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-20,08 ($\pm$ 1,86) ^{aB}	-15,24 ($\pm$ 2,78) ^{aB}	-12,03 ($\pm$ 1,74) ^{aB}	-6,63 ($\pm$ 0,94) ^{deC}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo momento de análise. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre diferentes momentos de análise para um mesmo grupo experimental ($p > 0,05$)

Gráfico 5.3 – Representação da análise longitudinal do potencial remineralizador dos dentífrícios na condição experimental desafio erosivo moderado

C. Desafio erosivo severo (8 horas)

A análise de variância demonstrou haver diferenças estatísticas para os dois fatores de variação: momento de análise ($p < 0.0001$) e tratamento ($p = 0,0002$) assim como na interação entre estes dois fatores ($p = 0,0257$).

À semelhança das condições experimentais anteriormente descritas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos momentos de análise baseline e erosão.

Nos momentos de análise 1º dia, 7º dia e 14º dia o tratamento Recaldent+F revelou diferenças estatísticas aos demais grupos experimentais, apresentando os maiores níveis de remineralização do esmalte submetido ao desafio erosivo severo.

No momento de mensuração 1º dia os tratamentos Recaldent+F e Novamin apresentaram os maiores valores de mineralização, sendo o tratamento Recaldent+F estatisticamente superior ao Novamin. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

No 7º dia de análise os menores valores de ΔQ foram observados nos tratamentos Saliva e Flúor e os maiores valores nos tratamentos Recaldent+F e Novamin.

No 14º dia os tratamentos Flúor, Novamin e Novamin+F não mostram diferença estatística entre si, apresentando valores de ΔQ estatisticamente maiores que tratamento Saliva e menores que o tratamento Recaldent+F. O tratamento Recaldent foi semelhante estatisticamente aos tratamentos Novamin e Novamin+F.

As diferenças estatísticas estabelecidas pelo teste de comparações múltiplas com nível de significância de 5% podem ser observadas na tabela 5.3.

Uma representação gráfica da análise longitudinal realizada para esta condição experimental pode ser observada no gráfico 5.4.

Tabela 5.3 – Valores médios ($\pm$ desvio-padrão) de ΔQ em $\text{mm}^2\%$ obtidos para os grupos experimentais para o desafio erosivo severo (8 horas)

	baseline	erosão	1º dia	7º dia	14º dia
Saliva	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-81,84 ($\pm$ 3,96) ^{aB}	-72,96 ($\pm$ 3,47) ^{aB}	-59,13 ($\pm$ 3,38) ^{aC}	-51,52 ($\pm$ 2,67) ^{aC}
Flúor	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-81,47 ($\pm$ 4,17) ^{aB}	-67,45 ($\pm$ 4,06) ^{abC}	-50,95 ($\pm$ 4,44) ^{abCD}	-41,40 ($\pm$ 2,84) ^{bD}
Recaldent	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-81,61 ($\pm$ 4,66) ^{aB}	-62,15 ($\pm$ 3,87) ^{abC}	-43,89 ($\pm$ 4,29) ^{beD}	-25,29 ($\pm$ 2,93) ^{cE}
Recaldent+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-78,61 ($\pm$ 3,22) ^{aB}	-37,87 ($\pm$ 3,12) ^{cC}	-26,91 ($\pm$ 2,50) ^{cC}	-12,33 ($\pm$ 3,00) ^{dD}
Novamin	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-66,71 ($\pm$ 4,89) ^{aB}	-56,93 ($\pm$ 1,96) ^{bB}	-35,17 ($\pm$ 2,28) ^{ceC}	-31,91 ($\pm$ 3,47) ^{bcC}
Novamin+F	0,00 ($\pm$ 0,00) ^{aA}	-83,66 ($\pm$ 4,07) ^{aB}	-68,95 ($\pm$ 3,79) ^{abC}	-44,09 ($\pm$ 3,35) ^{bD}	-31,02 ($\pm$ 3,18) ^{bcD}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo momento de análise. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre diferentes momentos de análise para um mesmo grupo experimental ($p > 0.05$)

Gráfico 5.4 – Representação da análise longitudinal do potencial remineralizador dos dentífricos na condição experimental desafio erosivo moderado

Imagens obtidas a partir do equipamento QLF™ ilustram a capacidade de remineralização dos diferentes tratamentos avaliados (Figura 5.2).

Figura 5.2 – **A.** Espécimes submetidos ao desafio erosivo severo (8 horas) e submetidos ao tratamento saliva. **B.** Espécimes submetidos ao desafio erosivo severo (8 horas) e submetidos ao tratamento Recaldent+F. **C.** Espécimes submetidos ao desafio erosivo moderado (4 horas) e submetidos ao tratamento Novamin. **D.** Espécimes submetidos ao desafio erosivo suave (1 hora) e submetidos ao tratamento Recaldent

6 DISCUSSÃO

A erosão dental tem sido definida como a dissolução química dos tecidos dentais mineralizados por ácidos de origem não bacteriana e se apresenta como uma condição multifatorial dependente da interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais (1; 11; 78).

Fatores biológicos como, saliva, película adquirida, estrutura dental e posicionamento em relação aos tecidos moles e à língua estão relacionados com a sua patogênese. Além disso, fatores comportamentais, incluindo hábitos alimentares, exercícios regulares com desidratação e diminuição do fluxo salivar, higiene bucal excessiva e alcoolismo são fatores predisponentes para a erosão dental (13).

Dentre os fatores biológicos capazes de influenciar na susceptibilidade do esmalte à erosão dental, pode-se citar o padrão estrutural de mineralização. A desmineralização e a consequente lesão formada são associadas a densidade da porção prismática e ao volume da fração interprismática do esmalte dental (60-62). Assim, o fato de a composição e estrutura do esmalte ser heterogênea e dependente do desenvolvimento biológico torna o processo de desmineralização complexo e individualizado. Fato que pode ser observado nos resultados deste estudo. Os fragmentos dentais, apesar de submetidos aos mesmos desafios erosivos, geraram valores absolutos de ΔQ particulares, evidenciando as características individuais da formação cristalina durante o desenvolvimento dos elementos dentais que deram origem aos fragmentos.

Um desafio ácido pode resultar na perda irreversível da superfície de esmalte dental além da desmineralização da subsuperfície de esmalte, podendo, contudo, apresentar-se ainda com possibilidade de remineralização (3).

A duração da queda no pH na superfície dental após uma única ingestão de bebidas ou alimentos ácidos parece ser bastante curta e dificilmente seria capaz de produzir amolecimento do esmalte. Entretanto, a

ingestão repetitiva de bebidas erosivas pode favorecer uma desmineralização avançada mais consistente com perda total de tecido mineralizado. Desta forma fatores biológicos e comportamentais podem influenciar quando uma estrutura dental amolecida é subsequentemente perdida ou ainda é passível de remineralização (29).

O aumento contínuo no consumo de bebidas potencialmente erosivas como refrigerantes, sucos de fruta, energéticos e isotônicos (19) sugerem um provável aumento na incidência de erosão dental (9; 32; 33; 35; 36) refletindo a necessidade da implementação de terapias e medidas preventivas para contra-atacar esse avanço.

In vivo a erosão envolve dois tipos de desgaste do esmalte: a remoção direta de tecido mineralizado por dissolução completa e a criação de uma camada superficial amolecida vulnerável a um subsequente desgaste mecânico. A exposição do esmalte dental a um desafio ácido causa uma perda mineral superficial que se estende por aproximadamente 3 a 5 micrometros abaixo da superfície ocasionando um processo denominado amolecimento (3). Com a progressão do amolecimento a dissolução do esmalte superficial atingirá um ponto em que esta camada será completamente perdida (8).

Uma abordagem preventiva/reparadora de uso doméstico que possa ser incorporada à rotina diária seria uma solução ideal (79). Nesse sentido os dentífricos se apresentam como uma alternativa por serem um produto acessível, amplamente utilizado e com potencial para aumentar a resistência do esmalte dental a desafios erosivos.

A perda de tecido dental submetido a desafios erosivos pode ser aumentada pela atuação sinérgica de processos abrasivos ou atrição, pois o esmalte dental encontra-se mais suscetível do que o esmalte intacto (2-5; 24; 40). No presente estudo, optou-se pela realização de metodologia que não empregasse escovação, utilizando-se apenas suspensão de dentífrico. Desta forma foi possível isolar somente os fatores desmineralização e remineralização sem que houvesse a influência de outros agentes físicos que

pudessem alterar a superfície de esmalte estudada e assim fosse possível inferir o efeito dos tratamentos propostos.

Os resultados do presente estudo refletem o efeito da aplicação longitudinal, durante um período de 14 dias, dos dentifrícios estudados. Diferentemente de outros estudos (39; 49) que avaliaram o efeito de apenas uma aplicação das soluções de dentifrício. O fato de grande parte dos relatos da literatura empregarem a aplicação única dos tratamentos propostos se deve provavelmente à dificuldade e ao tempo dedicados a um estudo que avalie longitudinalmente aplicações diárias dos tratamentos propostos.

Alimentos e bebidas ácidas podem causar a desmineralização e amolecimento dos tecidos dentais mineralizados (16). A atividade erosiva dos ácidos como cítrico, maléico e fosfórico presentes em bebidas e alimentos ácidos tem sido demonstrada em estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* (17; 18; 20-22; 24; 29; 34; 40; 48). Entretanto há indicação de que o potencial erosivo de uma bebida acídica não é totalmente dependente de seu pH, mas é também fortemente afetado pela quantidade de ácido titulável (capacidade de tamponamento) e pela capacidade de ligação com os íons cálcio disponibilizados (quelação)(61; 62).

Estão descritas na literatura metodologias que empregam diferentes substâncias como ácido láctico, ácido cítrico, refrigerantes, sucos de frutas ácidas e bebidas alcoólicas, para a formação de lesões erosiva *in vitro* (10). A seleção do suco de laranja como agente erosivo foi pautada nas características intrínsecas dessa substância como agente erosivo, tais como, baixo pH (entre 3 e 4), a presença de ácido cítrico, capacidade de tamponamento (capacidade em resistir a mudança de pH) e ação de quelação, além de ser uma bebida amplamente consumida.

O ácido cítrico em água constitui-se de uma mistura de íons hidrogênio (H^+) e ânions ácidos (citrato) e moléculas ácidas não-dissociadas. Os íons H^+ atuam diretamente na superfície cristalina, além disso, os ânions citrato interagem com o cálcio promovendo sua remoção da superfície de

esmalte. Consequentemente o ácido cítrico possui dupla ação sobre o esmalte sendo fortemente prejudicial à superfície dental (60).

A exposição do esmalte dental a ácidos é um método rápido para a criação de lesões erosivas in vitro no qual a profundidade da lesão está diretamente relacionada ao tempo de exposição ao ácido (26). A exposição a uma solução erosiva por um curto período de tempo produz rugosidade superficial em superfícies de esmalte previamente polido enquanto a exposição prolongada pode provocar alterações profundas apresentando estrutura típica das superfícies de esmalte erodidas (49).

Desta forma, para a obtenção de lesões erosivas de diferentes severidades os espécimes foram submetidos aos tempos de exposição ao suco de laranja de 1h, 4h e 8h resultando em lesões com diferenças estatisticamente significantes, denominadas de lesões de severidade suave, moderada e agressiva respectivamente.

QLF™ foi desenvolvido como um método de diagnóstico não destrutivo para avaliação longitudinal de lesões precoces de cárie (69; 73). O método consiste na iluminação do dente por uma lâmpada de gás xenon azul-violeta responsável por provocar a fluorescência natural do dente. Essa fluorescência natural é atribuída aos fluoróforos localizados predominantemente na junção amelodentinária e dentina. A presença de lesões no esmalte dental provoca um maior espalhamento da luz incidente e uma menor quantidade de luz excitatória atinge a junção amelodentinária e a dentina subjacente e, consequentemente, menor fluorescência proveniente da junção amelodentinária é refletida e capturada pela câmera do equipamento. Desta forma a lesão aparecerá escura em contraste com a área intacta circundante fluorescente. As alterações na intensidade da fluorescência são mensuradas e indicam as alterações minerais no esmalte dental (68; 70; 72; 74).

Andrade (2009) (67) em um estudo sobre os efeitos adversos do clareamento dental comprovou a eficácia do método QLF™ em avaliar desmineralizações discretas em esmalte dental não relacionadas a lesões de cárie. A literatura científica apresenta alguns relatos (17; 64; 66; 75-77) da

utilização da metodologia QLF™ para a avaliação de lesões erosiva. Um estudo sobre erosão dental empregando o método de QLF™ em comparação a microradiografia transversal (TMR) concluiu ser aquele um método efetivo para a quantificação de lesões erosivas (76).

Uma limitação da maioria dos estudos in vitro é a utilização de amostras de esmalte planificadas e polidas nas quais a camada mais superficial do esmalte, normalmente mais mineralizada em relação à subsuperfície, é removida. Isso ocorre pelo fato de metodologias como perfilometria, microdureza ou microidentação exigirem que o preparo da amostra seja realizado desta forma (63; 65).

Dentre as vantagens da utilização da metodologia QLF™ pode-se citar a possibilidade de utilização de amostras de esmalte dental sem a necessidade de planificação e polimento superficial preservando-se assim as características superficiais do substrato. Além disso, esse é um método não destrutivo o que permite a realização de estudos longitudinais com monitoramento das lesões ao longo do tempo, havendo a possibilidade de avaliação de alterações sutis no conteúdo mineral dental, além do registro do padrão do processo de remineralização ao longo do tempo (67; 69; 71).

Exposição à saliva tem demonstrado ser efetiva na remineralização do esmalte dental erodido (27). O mecanismo pelo qual a remineralização ocorre é provavelmente pela deposição dos íons cálcio e fosfato provenientes da saliva sobre a superfície de dental. Após um desafio ácido a saliva pode desempenhar papel reparador, fornecendo material orgânico e mineral para preencher defeitos microscópicos criados durante o processo de erosão (28). Assim que o agente erosivo é neutralizado e/ou depurado da superfície dental a deposição de cálcio e fosfato provenientes da saliva podem promover a remineralização de parte do tecido amolecido que fora desmineralizado (29; 42).

Estudos sobre erosão dental relataram efeito remineralizador da saliva em lesões de erosão no esmalte (37). Resultados concordantes com os achados deste estudo. Por outro lado, apesar de ter demonstrado capacidade remineralizadora, a saliva não foi capaz de promover

remineralização total das lesões independentemente da severidade. Além disso, a saliva demonstrou maior efetividade nas lesões erosivas denominadas suave, denotando potencial remineralizador limitado mesmo durante longos períodos de exposição (27).

Dentifrícios fluoretados são capazes de potencializar a remineralização do esmalte erodido e reduzir a suscetibilidade a novos desafios erosivos (6; 79). Maior remineralização é conseguida com dentifrícios com formulações que fornecem maior disponibilidade de fluoretos (80). Os íons flúor são capazes promover a remineralização do esmalte dental previamente desmineralizado, caso haja disponibilidade adequada de íons cálcio e fosfato quando da aplicação do flúor. Para cada dois íons de flúor são necessários dez íons cálcio e 6 íons fosfato para a formação de uma unidade de fluorapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ (44; 81). Consequentemente, durante a aplicação tópica de flúor, a disponibilidade de íons cálcio e fosfato podem ser um fator limitador para a ocorrência do processo de remineralização, ou seja, o mecanismo de remineralização do flúor é cálcio e fosfato dependente (81).

Os resultados do presente estudo indicam a ação positiva dos fluoretos na remineralização de lesões de erosão quando comparado ao grupo controle (saliva), não somente no dentifrício que apresenta o fluoreto como princípio bioativo mas também naqueles em que o fluoreto tem ação coadjuvante a outros agentes bioativos como Recaldent™ e Novamin®. Entretanto, comparativamente ao Recaldent™, associado ou não do flúor, o dentifrício contendo apenas flúor como composto bioativo apresentou potencial remineralizador inferior no esmalte dental com lesões de erosão moderadas e severas.

O dentifrício contendo o flúor como princípio bioativo utilizado neste estudo apresenta em sua composição fluoreto de sódio a 1500 ppm, o que segundo alguns estudos (41; 45; 81) não seria uma concentração que promoveria a biodisponibilidade de íons flúor necessária para se obter remineralização do esmalte dental erodido. Apesar de o flúor apresentar-se

cl clinicamente efetivo na redução de lesões de cárie, parece ter potencial insuficiente para suplantar desmineralizações de maior intensidade.

A tecnologia de nanocomplexos de fosfopeptídeos de caseína e fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), patenteada sob a marca comercial Recaldent™ é baseada na estabilização do fosfato de cálcio amorfo (ACP) pelo fosfopeptídeo de caseína (CPP). O CPP, composto pelo grupamento sequencial Ser(P)- Ser(P)- Ser(P)-Glu-Glu estabiliza o ACP em uma solução metaestável, ou seja, uma solução supersaturada com tendência a abandonar o estado de supersaturação e atingir o estado de saturação. Por meio do grupamento sequencial o CPP se liga formando nanoaglomerados de ACP impedindo seu crescimento ao tamanho crítico necessário para transformação de fase e nucleação e precipitação na solução. O CPP atua como um veículo de entrega para co-localizar na superfície dental o cálcio e fosfato disponíveis (57).

O nanocomplexo CPP-ACP demonstrou atividade anticariogênica, assim como capacidade remineralizadora de lesões subsuperficiais e lesões erosivas em esmalte dental em estudos in vitro, in situ (7; 25; 50; 51; 53; 54; 56; 58), corroborando com os resultados obtidos neste estudo no qual os grupos experimentais em que foram aplicados dentifrícios contendo CPP-ACP como principio bioativo demonstraram aumento do ΔQ , ou seja, houve processo de remineralização ao longo do tempo. Ademais, o grupo em que o dentifrício aplicado continha associação de CPP-ACP com fluoreto demonstrou maior capacidade remineralizadora após 14 dias de aplicação nos grupos com lesão erosiva de agressividade moderada e severa.

O mecanismo de formação de fluorapatita necessita da presença de íons cálcio e fosfato juntamente com os íons flúor (43). O CPP-ACP é capaz de interagir com íons flúor e produzir nanoaglomerados de íons de cálcio, flúor e fosfato (CPP-ACP/F) e co-localizá-los como ions biodisponíveis na razão molar correta para a formação de fluorapatita (81). Esse aumento na concentração de íons cálcio, fosfato e flúor na superfície dental pode gerar maior difusão desses íons em direção ao esmalte desmineralizado, resultando em maiores níveis de remineralização e incorporação de flúor na fase

mineral do esmalte dental. Tal mecanismo explicaria o fato da associação CPP-ACP e flúor apresentar maior potencial remineralizador, assim com em outros estudos (52; 54; 81)

O fosfosilicato de cálcio e sódio ou Novamin® é um vidro bioativo altamente biocompatível tendo sido empregado na regeneração óssea. Esse material é reativo quando exposto aos fluidos corpóreos podendo haver depósito de apatita hidroxicarbonatada (HCA), um mineral quimicamente similar à hidroxiapatita (46). Quando incorporado a um dentifrício as partículas de Novamin® podem se depositar na superfície dentinária e promover a oclusão mecânica de túbulos dentinários (41; 59). Assim dentifrícios contendo Novamin® estariam indicados como agentes com ação potencialmente protetora e remineralizadora do esmalte dental humano. Ressalta-se que a revista da literatura promovida para a execução deste estudo não foi capaz de localizar estudos referentes à aplicação do fosfosilicato de sódio e cálcio em erosão dental.

Um estudo (59), ao avaliar o potencial remineralizador de dentifrícios contendo Novamin® em lesões cariosas em dentina radicular concluiu que este composto, isoladamente ou associado ao flúor, é capaz de promover a remineralização do tecido dental, contrariamente aos dentifrícios que continham apenas flúor (1000 ppm e 5000 ppm). Entretanto em um estudo independente utilizando suspensões de dentifrícios contendo diferentes concentrações de flúor (sem flúor, 1450 ppm, 2800 ppm e 5000 ppm) comparados a um dentifrício contendo Novamin® (7,5%) afirmaram que os dentifrícios com maior concentração de fluoretos apresentaram maior capacidade remineralizadora comparados ao dentifrício com o componente Novamin®, sendo o comportamento deste estatisticamente similar ao grupo controle (não fluoretado) (41). Pesquisadores (55), ao avaliarem o efeito de dentifrícios com diferentes compostos bioativos em lesões de cárie in vitro demonstraram que potencial protetor e remineralizador do composto Novamin® são similar ao flúor e que o Recaldent™ e o Recaldent™ +F apresentaram potencial superior.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o composto Novamin® apresentou certo potencial remineralizador, que oscilou conforme o momento de análise aliado a severidade erosiva.

Os dentifrícios contendo esse composto apresentaram comportamento estatisticamente semelhante ao grupo controle que permaneceu imerso em saliva, para as lesões de agressividade suave. Em relação às lesões de agressividade moderada, o composto Novamin® demonstrou potencial remineralizador semelhante à saliva apresentando, porém, potencial estatisticamente superior a partir da mensuração 7º dia. Quando aplicado em lesões severas de erosão o Novamin®, isoladamente ou em associação com o flúor demonstrou melhora em sua capacidade remineralizadora. Houve capacidade estatisticamente superior ao grupo Saliva e similar ao grupo Flúor. Entretanto o grupo Recaldent+F demonstrou o melhor desempenho quando comparado aos grupos Novamin e Novamin+F.

A associação do composto fosfosilicato de sódio e cálcio ao flúor apresentou potencial remineralizador similar ao flúor, Recaldent e Recaldent+F em lesões erosivas suaves, sendo que a associação do fosfato de cálcio amorfo ao flúor apresentou remineralização praticamente total para essa severidade de erosão. Isso deve-se provavelmente ao menor grau de desmineralização observado nas lesões suaves, o que permitiu remineralização considerável por todos com exceção da saliva e do composto Novamin® isoladamente. Desta forma parece que a remineralização obtida pela associação Novamin+F se deve ao potencial remineralizador do próprio flúor.

Os fosfatos de cálcio insolúveis não são capazes de se permanecer efetivamente na superfície dental, necessitando da presença de ácidos para sua solubilização e produção de íons capazes de se difundirem em lesões de esmalte. Por outro lado, íons cálcio e fosfato solúveis só podem ser empregados em pequenas concentrações, devido à insolubilidade intrínseca dos fosfatos de cálcio, principalmente os fosfatos de cálcio e flúor. Assim não há localização de íons cálcio e fosfato solúveis na superfície dental, suficiente para produzir gradiente de concentração efetivo em

direção ao esmalte desmineralizado (82). Diferentemente do composto Recaldent™, o Novamin® não apresenta mecanismo capaz de estabilizar os íons cálcio e fosfato liberados pelo fosfosilicato de cálcio e sódio quando em solução aquosa, o que provavelmente explicaria o pior desempenho dos dentifrícios contendo o composto Novamin® quando comparado aos que contém Recaldent™.

Ultraestruturalmete a exposição do esmalte dental a substâncias erosivas causa a dissolução dos cristais de hidroxiapatita gerando uma superfície irregular e porosa, sendo essa irregularidade diretamente proporcional ao tempo de exposição do esmalte aos agentes erosivos (30; 31). Portanto é possível que a melhora no desempenho apresentada pelo composto Novamin® quando aplicado para a remineralização de lesões severas se deva às características superfícies que proporcionaria uma maior possibilidade de precipitação do composto sobre o esmalte dental.

Apesar de todos os tratamentos propostos terem demonstrado algum potencial de remineralizador, nenhum deles foi capaz de promover remineralização total, independentemente da severidade das lesões erosivas.

Erosão é um processo insidioso que o paciente não tem consciência até que tenha atingido um estágio avançado, portanto a detecção clínica pelo profissional é de extrema importância para que haja tempo hábil para reversão deste processo. Claramente a forma mais efetiva para prevenção da erosão é a eliminação dos fatores etiológicos, sejam eles intrínsecos ou extrínsecos (14; 15; 23). A primeira linha de atuação preventiva seria a educação e conscientização dos pacientes, pois muitos desconhecem a ocorrência da erosão e como seus hábitos podem contribuir para essa perda de tecido dental mineralizado.

A eliminação das causas do desgaste dental nem sempre é um processo facilmente aplicável, assim é desejável o desenvolvimento de estratégias preventivas de fácil aderência por parte dos pacientes.

A possibilidade da utilização de dentifrícios que possuam efeito protetor e/ou remineralizador seria uma medida viável para a redução dos

efeitos deletérios dos desafios ácidos do cotidiano. Entretanto é imperioso que sejam realizados de estudos futuros em relação à longevidade da remineralização proporcionada pelos diferentes agentes remineralizadores.

7 CONCLUSÕES

Frente à metodologia empregada e os resultados obtidos foi possível inferir que dentifrícios com diferentes compostos bioativos apresentam potenciais distintos de remineralização do esmalte submetido ao processo de erosão e responder aos questionamentos propostos da seguinte forma:

1. Diferentes tempos de exposição do esmalte dental ao agente erosivo suco de laranja foram capazes de promover lesões erosivas de severidades distintas, sendo que, o prolongamento do tempo de exposição ao agente erosivo acarreta em maior a severidade da lesão erosiva no esmalte dental.

2. Nenhum tratamento proposto foi capaz de promover remineralização total das lesões erosivas, independentemente da agressividade da lesão e do tempo de exposição ao agente remineralizador.

3. O tratamento proposto que demonstrou maior potencial remineralizador no esmalte dental erodido foi a aplicação do dentifrício contendo a associação Recaldent™ e Flúor.

REFERÊNCIAS¹

- 1 Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):151-5.
- 2 Abrahamsen TC. The worn dentition--pathognomonic patterns of abrasion and erosion. *Int Dent J.* 2005 Jan;55(4 Suppl 1):268-76.
- 3 Addy M, Shellis RP. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006 Jan;2017-31.
- 4 Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc.* 2004 Aug;135(8):1109.
- 5 Addy M, Bristol U. Tooth brushing, tooth wear and dentine hypersensitivity-are they associated?. *Int Dent J.* 2005;55:261-7.
- 6 Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of Different Fluoride Concentrations of Experimental Dentifrices on Enamel Erosion and Abrasion. *Caries Res.* 2010 Apr;44(2):135-40.
- 7 Ranjitkar S, Narayana T, Kaidonis JA, Hughes TE, Richards LC, Townsend GC. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive dentine wear. *Aust Dent J.* 2009 Jun;54(2):101-7.
- 8 Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):191-8.
- 9 Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr ;104(2 (Pt 2)):156-61.
- 10 Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent.* 2004 Nov;32(8):591-602.
- 11 Bartlett D. Etiology and prevention of acid erosion. *Comp Cont Educ Dent.* 2009 Nov-Dec;30(9):616-20.
- 12 Bartlett DW. The role of erosion in tooth wear: aetiology, prevention and management. *Int Dent J.* 2005 Jan;55(4 Suppl 1):277-84.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

- 13 Lussi A, Hellwig E, Ganss C, Jaeggi T. Dental Erosion. *Oper Dent*. 2009 May;34(3):251-62.
- 14 Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):178-90.
- 15 Shaw L, Smith AJ. Dental erosion--the problem and some practical solutions. *Br Dent J*. 1999 Feb;186(3):115-8.
- 16 Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):162-77.
- 17 Ablal MA, Kaur JS, Cooper L, Jarad FD, Milosevic A, Higham SM, et al. The erosive potential of some alcopops using bovine enamel: an in vitro study. *J Dent*. 2009 Nov;37(11):835-9.
- 18 Jager DHJ, Vieira AM, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Influence of beverage composition on the results of erosive potential measurement by different measurement techniques. *Caries Res*. 2008 Jan;42(2):98-104.
- 19 ABIR - Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas [homepage]. Brasília: Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas; 2010 [citado 17 nov. 2010]. Disponível em: <http://www.abir.org.br/>
- 20 Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res*. 2008 May;28(5):299-303.
- 21 Murrell S, Marshall TA, Moynihan PJ, Qian F, Wefel JS. Comparison of in vitro erosion potentials between beverages available in the United Kingdom and the United States. *J Dent*. 2010 Apr ;38(4):284-9.
- 22 Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow a. Immediate Erosive Potential of Cola Drinks and Orange Juices. *J Dent Res*. 2006 Mar;85(3):226-30.
- 23 Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J*. 2005 Jan;55(4 Suppl 1):285-90.
- 24 Meurman J, Ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 1996 ;199-206.
- 25 Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis J a, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent*. 2009 Apr;37(4):250-4.

- 26 Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. *Clin Oral Invest*. 2001 Jun;5(2):108-11.
- 27 Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent*. 2001 Jul;29(5):371-6.
- 28 Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prost Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9.
- 29 Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res*. 2004 Jan;38 Suppl 1 (suppl 1):34-44.
- 30 Meurman JH, Frank RM. Progression and Surface Ultrastructure of in vitro Caused Erosive Lesions in Human and Bovine Enamel. *Caries Res*. 1991 Jan;25(2):81-87.
- 31 Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res*. 2000 Jan;38(1):67-74.
- 32 Truin GJ, Rijkom HM van, Mulder J, van't Hof MA. Caries trends 1996-2002 among 6- and 12-year-old children and erosive wear prevalence among 12-year-old children in The Hague. *Caries Res*. 2004 Jan;39(1):2-8.
- 33 Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006 Jan;2044-65.
- 34 Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci*. 2008 Feb;116(1):60-5.
- 35 Murakami C. Indicadores de risco associados à prevalência de erosão dentária em pré-escolares no Município de Diadema [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.
- 36 Auad SM, Waterhouse PJ, Nunn JH, Steen N, Moynihan PJ. Dental erosion amongst 13- and 14-year-old Brazilian schoolchildren. *Int Dent J*. 2007 Jun;57(3):161-7.
- 37 Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. [Internet]. *Caries Res*. 2008 Jan;42(1):62-7.
- 38 Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, et al. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res*. 2009 Jan;43(1):57-63.
- 39 Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR. Preventive Effect of Commercial Desensitizing Toothpastes on Bovine Enamel Erosion in vitro. *Caries Res*. 2010 Feb;44(2):85-89.

- 40 Sauro S, Mannocci F, Piemontese M, Mongiorgi R. In situ enamel morphology evaluation after acidic soft drink consumption: protection factor of contemporary toothpaste. *Int J Dent Hyg*. 2008 Aug;6(3):188-92.
- 41 Diamanti I, Koletsi-Kounari H, Mamai-Homata E, Vougiouklakis G. Effect of fluoride and of calcium sodium phosphosilicate toothpastes on pre-softened dentin demineralization and remineralization in vitro. *J Dent*. 2010 Aug;38(8):671-7.
- 42 Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(2):25S-34S.
- 43 Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991 Jan;2(3):283-96.
- 44 Ten Cate JM, Exterkate RAM, Buijs MJ. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. [Internet]. *Caries Research*. 2006 Jan ;40(2):136-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508271>
- 45 Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions--a comparison of calcium and profilometric analyses. *Arch Oral Biol*. 2010 Mar;55(3):229-34.
- 46 Wefel JS. NovaMin: likely clinical success. *Adv Dent Res*. 2009 Jan;21(1):40-3.
- 47 Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence?. *Aust Dent J*. 2008 Sep;53(3):268-73.
- 48 Piekarz C, Ranjitkar S, Hunt D, McIntyre J. An in vitro assessment of the role of Tooth Mousse in preventing wine erosion. *Aust Dent J* 2008 Mar;53(1):22-5.
- 49 Willershausen B, Schulz-Dobrick B, Gleissner C. In vitro evaluation of enamel remineralisation by a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste. *Oral Health Prev Dent*. 2009 Jan;7(1):13-21.
- 50 Rees J, Loyn T, Chadwick B. Pronamel and tooth mousse: an initial assessment of erosion prevention in vitro. *J Dent*. 2007 Apr;35(4):355-7.
- 51 Tantbirojn D, Huang A, Ericson M, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *J Dent*. 2008 Jan ;36(1):74-9.
- 52 Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent*. 2006 Mar;34(3):230-6.

- 53 Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. *J Dent.* 2009 Dec ;37(12):949-54.
- 54 Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. *Arch Oral Biol.* 2010 Jun ;55(7):541-4.
- 55 Neto FCR, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent.* 2009 Oct;37:786-90.
- 56 Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, Inage H, Watanabe T, Irokawa A, et al. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *J Oral Sci.* 2007 Jun ;49(2):115-20.
- 57 Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res.* 2009 Jan ;21(1):25-9.
- 58 Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res.* 2004 Nov-Dec;38(6):551-6.
- 59 Burwell AK, Litkowski LJ, Greenspan DC. Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin): remineralization potential. *Adv Dent Res.* 2009 Jan;21(1):35-9.
- 60 Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006 Jan;20:66-76.
- 61 Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct ;111(5):428-33.
- 62 Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range 2.30< or =pH< or =6.30--a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci.* 2003 Jun ;111(3):258-62.
- 63 Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res.* 2009 Jan ;43(6):422-9.
- 64 Elton V, Cooper L, Higham SM, Pender N. Validation of enamel erosion in vitro. *J Dent.* 2009 May;37(5):336-41.

- 65 Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res.* 2005 May-Jun;39(3):178-84.
- 66 Nakata K, Nikaido T, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Relationship between fluorescence loss of QLF and depth of demineralization in an enamel erosion model. *Dent Mater J.* 2009 Sep;28(5):523-9.
- 67 Andrade AP. Monitoramento do processo de desmineralização e remineralizaçãodo esmalte dental humanodurante e após o clareamento dental [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.
- 68 Kühnisch J, Tranæus S, Stöber L. Quantitative light-induced fluorescence measurement—a future method for the dentist?. *Quintessenz.* 2002 ;53(2):131–41.
- 69 Al-Khateeb S, Oliveby A, Josselin de Jong E de, Angmar-Månsson B. Laser fluorescence quantification of remineralisation in situ of incipient enamel lesions: influence of fluoride supplements. *Caries Res.* 1997 Jan;31(2):132-40.
- 70 Al-Khateeb S, Ten Cate JM, Angmar-Mansson B, De Josselin De Jong E, Sundstrom G, Exterkate R a M, et al. Quantification of Formation and Remineralization of Artificial Enamel Lesions with a New Portable Fluorescence Device *Adv Dent Res.* 1997 Nov;11(4):502-6.
- 71 Tranæus S, Shi X-Q, Lindgren L-E, Trollsås K, Angmar-Månsson B. In vivo repeatability and reproducibility of the quantitative light-induced fluorescence method. *Caries Res.* 2002 Jan-Feb;36(1):3-9.
- 72 Heinrich-Weltzien R, Kühnisch J, Der Veen M van, Josselin De Jong E de, Stösser L. Quantitative light-induced fluorescence (QLF)—a potential method for the dental practitioner. *Quintessence international Int.* 2003 Mar;34(3):181-8.
- 73 Meller C, Heyduck C, Tranæus S, Splieth C. A new in vivo method for measuring caries activity using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res.* 2006 Jan;40(2):90-6.
- 74 Gmür R, Giertsen E, Der Veen MH van, Josselin De Jong E de, Cate JM ten, Guggenheim B. In vitro quantitative light-induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization. *Clin Oral Invest.* 2006 Sep;10(3):187-95.
- 75 Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). *J Dent.* 2003 Jul ;31(5):313-9.

- 76 Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The validation of quantitative light-induced fluorescence to quantify acid erosion of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2004 Apr;49(4):285-94.
- 77 Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of bleaching on enamel susceptibility to acid erosion and demineralisation. *Br Dent J.* 2005 Mar;198(5):285-90;
- 78 Bartlett D. A proposed system for screening tooth wear. *Br Dent J.* 2010 Mar;208(5):207-9.
- 79 Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent.* 2007 Jun;35(6):476-81.
- 80 Hara AT, González-Cabezas C, Creeth J, Parmar M, Eckert GJ, Zero DT. Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion-abrasion. *J Dent.* 2009 Oct;37(10):781-5.
- 81 Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008 Apr;87(4):344-8.
- 82 Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence?. *Aust Dent J.* 2008 Sep;53(3):268-73.