TAÍS SCARAMUCCI

***Avaliação in vitro e in situ* do potencial erosivo do suco de laranja modificado
por cálcio e alguns polímeros alimentares**

Versão Original

São Paulo

2011

TAÍS SCARAMUCCI

Avaliação in vitro e in situ do potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Scaramucci, Taís

Avaliação in vitro e in situ do potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares [versão original]. / Taís Scaramucci; orientador Maria Angela Pita Sobral. -- São Paulo, 2011.

139p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Suco de laranja modificado – Erosão de dente - Avaliação. 2. Cálcio. 3. Polímeros alimentares. 4. Dentística. I. Sobral, Maria Angela Pita Della. II. Título.

Scaramucci T. Avaliação *in vitro* e *in situ* do potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares. 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

A **Deus**, pela saúde e proteção de cada dia, por sempre iluminar o meu caminho e guiar minhas decisões.

Aos meus queridos pais, **José Arnaldo e Maria Helena**, pelo amor incondicional, por todo carinho e incansável dedicação em todos esses anos de minha vida. Deus não poderia ter me dado melhores exemplos de dignidade e honestidade. Não existem palavras que consigam descrever a gratidão que tenho por tudo o que vocês fizeram (e ainda fazem) por mim.

Ao meu irmão **Rafael** e sua esposa **Heloísa**, pela amizade e por sempre me incentivarem a crescer, tanto no plano pessoal quanto no profissional.

Ao meu sobrinho, **Lucas**, que veio ao mundo para iluminar nossos dias e trazer mais alegria a nossa família.

A toda minha **família**, em especial as minhas tias **Rosângela e Rosana**, meus tios **Paulo e Antônio Carlos**, meu primo **Caio** e minhas **primas Letícia e Isabela**, por todo apoio e incentivo, por vibrarem pelas minhas conquistas e por sempre estarem tão ativamente presentes na minha vida.

Aos meus queridos avós, **Leôncio e Rosalva**, exemplos de vida e de dedicação a família, tenho certeza que mesmo longe vocês ainda torcem muito por mim.

Ao meu fiél companheiro e melhor amigo **Marcel**, por todo amor, carinho e paciência. Você teve um papel fundamental nessa conquista, sempre com as palavras certas, nas horas em que mais precisava. Obrigado por estar ao meu lado e apoiar minhas decisões, mesmo que isso significasse ficarmos distantes por um tempo. A verdade é que estamos sempre tão presentes em mente e em coração que para mim, nunca ficamos longe. Agradeço todos os dias a Deus por ter te colocado em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral**, por despertar em mim o interesse científico, por sempre apoiar minhas decisões e me incentivar a crescer profissionalmente. Obrigada por todas as oportunidades, pela paciência, pelos conselhos e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Anderson Takeo Hara**, por cordialmente me receber em seu laboratório e oferecer todos os recursos necessários para a realização desse trabalho. Serei eternamente grata por todas as oportunidades, pelas enriquecedoras discussões, por todo conhecimento transmitido e pelos valiosos conselhos, que certamente contribuíram imensamente para o meu crescimento profissional.

A **Profa. Dra. Idalina Vieira Aoki**, por sua imensa contribuição na compreensão e execução dos fundamentos químicos desse trabalho. Agradeço também por sua ativa participação, sua sempre disponibilidade e paciência ao ensinar.

Ao **Prof. Dr. Domenick Zero**, por suas contribuições a esse trabalho, desde a disponibilização recursos para a sua realização às enriquecedoras discussões sobre o tema.

A **Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas**, pela amizade, pelos conselhos e por ter ajudado a viabilizar o meu estágio no exterior.

A **Profa. Dra. Ana Cecilia Aranha**, pela amizade, pelo constante incentivo e apoio. Fico feliz por ter tido a oportunidade de trabalhar com você, exemplo de profissional competente.

As **Profas. Dras. Adriana Bona Matos e Márcia Martins Marques**, que felizmente tive a oportunidade de trabalhar junto, obrigada por todas as dicas e pelas conversas enriquecedoras.

A **Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, coordenadora da Pós-graduação da Dentística, pelos recursos disponibilizados, pelo incentivo ao crescimento profissional e por me ajudar na compreensão da parte estatística do trabalho.

A todos os **Professores do Departamento de Dentística**, obrigada pela agradável convivência e por todos os ensinamentos.

A todos **meus colegas da pós-graduação**, pelos bons momentos e pelas conversas.

As minhas colegas da Pós-Graduação, **Camila G., Déa, Ellen, Karina, Leila, Taci e Tati**, muito obrigada pelo ombro amigo e pela amizade.

A **Stella**, obrigada por sua imensa contribuição na realização desse trabalho e por todo apoio.

A **Capes**, pela concessão da bolsa de Doutorado e da bolsa de Doutorado-sanduíche (BEX 171909-2), que permitiu a realização do meu estágio no exterior, onde eu tive oportunidade de entrar em contato com diferentes técnicas de avaliação da perda de estrutura dental e diferentes filosofias.

Ao **Programa de Desenvolvimento Profissional da Universidade de Indiana (Indiana University School of Dentistry - Professional Development Program)**, pelo suporte financeiro.

A **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)**, a **Universidade de São Paulo (USP)** e a **Faculdade de Engenharia Química da Poli (USP)**

Ao **Oral Health Research Institute, da Universidade de Indiana.**

A todos os **funcionários da USP** que tiveram participação direta ou indireta na realização desse trabalho, em especial a técnica **Sônia** do Laboratório de Dentística, a técnica **Thereza** do Laboratório de Corrosão de Metais da Engenharia Química da Poli-USP, o secretário da Dentística **Davi** e as **bibliotecárias** que participaram de sua correção.

Aos **técnicos e funcionários do Oral Health Institute, da Universidade de Indiana**, pela contribuição na realização do trabalho, em especial **Adam, Sharon, Susan e Joseph.**

Ao meu primo **Caio César Sotovia**, por ter gentilmente desenhado as ilustrações presentes nesse trabalho.

*“Uma ideia que é desenvolvida e colocada em ação é mais importante
que uma ideia que só existe como uma ideia “*

Príncipe Híndu Gautama Siddharta

RESUMO

Scaramucci T. Avaliação *in vitro* e *in situ* do potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da USP; 2011. Versão Original

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* e *in situ* o potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares. Este estudo foi dividido em quatro fases. Na primeira, as seguintes substâncias: lactato de cálcio (Ca), goma xantana (XG), hexametáfosfato de sódio (HMP), tripolifosfato de sódio (STP), pirofosfato de sódio (PP) e suas combinações, foram adicionadas a um suco de laranja, disponível comercialmente, criando 15 sucos modificados. O suco sem aditivos foi utilizado como controle negativo (C-), e um suco de laranja modificado com cálcio (disponível comercialmente), como controle positivo (C+). Os sucos tiveram o seu potencial erosivo avaliado com o método do pH-stat. A variável resposta foi o volume de titulador necessário para manter o pH dos sucos nos valores iniciais. Após, seis sucos foram selecionados e testados na segunda fase, com um modelo de ciclagem de erosão-remineralização. Na terceira fase, os episódios de erosão e de remineralização foram estudados independentemente. A variável resposta para essas duas fases foi a microdureza de superfície (MDS) para esmalte, e a perfilometria ótica, para esmalte e dentina. Na quarta fase, os sucos Ca, Ca+HMP e HMP, mais os controles, foram testados com um modelo de erosão *in situ*, "crossover", cego, de 5 fases, envolvendo 10 voluntários. Em cada fase, os voluntários inseriam aparelhos palatinos contendo espécimes de esmalte na boca e, após 5min, realizavam os desafios erosivos nos tempos experimentais de 0 (controle), 10, 20 e 30min. Dois espécimes eram aleatoriamente removidos dos aparelhos, após cada tempo. A variável resposta foi a alteração da microdureza de superfície (em %). Antes dos procedimentos clínicos, em cada fase, os voluntários realizaram um teste cego de sabor, onde o suco modificado designado a aquela fase foi comparado cegamente com C-. Na primeira fase, todos os aditivos foram capazes de reduzir o potencial erosivo do suco, com exceção da adição de XG isoladamente. Na segunda fase, não houve perda de estrutura de esmalte detectável quando Ca, HMP e Ca+HMP foram adicionados ao suco; XG, STP e PP apresentaram uma

perda de esmalte similar ao grupo C-. Ca+HMP apresentaram a menor redução da MDS, seguido por Ca; todos os outros grupos apresentaram uma redução da MDS similar ao grupo C-. Para dentina, somente Ca+HMP apresentou uma redução na perda de estrutura. Na terceira fase, Ca, HMP e Ca+HMP protegeram contra erosão e nenhum dos compostos interferiu com o processo de remineralização. Na quarta fase, Ca e Ca+HMP reduziram a erosão, sem diferenças significantes entre esses grupos; o HMP não apresentou efeito protetor. 5/10 voluntários notaram uma diferença no sabor de C+, 4/10 para Ca e 2/10 para C-. Conclui-se que, *in vitro*, tanto o HMP, quanto o Ca, nas concentrações testadas, reduziram a erosão causada pelo suco em esmalte e a combinação desses aditivos aumentou seus efeitos protetores. Para dentina, apenas a combinação Ca+HMP reduziu a erosão. *In situ*, Ca reduziu a erosão provocada pelo suco, porém, alterações no sabor foram notadas por alguns voluntários. HMP não apresentou efeito protetor.

Palavras-chave: Erosão dentária. Prevenção. Controle. Bebidas ácidas. Suco de laranja. Cálcio. Hexametáfosfato de sódio. Tripolifosfato de sódio. Pirofosfáto de sódio. Goma Xantana. Perfilometria ótica. Microdureza de superfície.

ABSTRACT

Scaramucci T. *In vitro* and *in situ* evaluation of the erosive potential of the orange juice modified with calcium and some food-approved polymers [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original

The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in situ* the erosive potential of the orange juice modified with calcium and some food-approved polymers. This study was divided into four phases. In the first, the following substances: calcium lactate (Ca), xanthan gum (XG), sodium hexametaphosphate (HMP), sodium tripoliphosphate (STP), sodium pyrophosphate (PP) and some of their combinations were added to a commercially available orange juice, creating 15 modified juices. The juice without additives was used as a negative control (C-) and a commercially available calcium-modified juice as positive control (C+). These juices were tested for erosive potential using pH-stat. The response variable was the volume of titrant needed to maintain the pH of the juices in their baseline values. After, six selected juices were tested in the second phase with an erosion-remineralization cycling model. In the third phase, the erosion and remineralization episodes were tested independently. The response variable for these phases was surface microhardness for enamel and optical profilometry for enamel and dentin. In the fourth phase, the juices Ca, Ca+HMP and HMP, plus the controls were tested with an erosion *in situ* model, consisting of a 5-phase, single blind crossover clinical trial involving 10 subjects. In each phase, subjects inserted custom-made palatal appliances containing enamel specimens in the mouth and, after 5 min equilibration period, performed erosive challenges for total of 0 (control), 10, 20, and 30 min. Two specimens were randomly removed from the appliances, after each challenge period. The response variable was the percentage of surface microhardness change. Before the procedures, in each phase, the subjects performed a taste test, where the modified juice assigned to that phase was blindly compared to C-. In first phase, all the additives were able to reduce the erosive potential of the juice, except the addition of XG alone. In the second phase, no detectable enamel loss was observed when Ca, HMP and Ca+HMP were added to the juice; XG, STP and PP had enamel loss similar to C-. Ca+HMP showed the lowest reduction in the surface microhardness, followed by Ca;

all the other groups presented a reduction in the surface microhardness similar to C-. For dentin, only Ca+HMP reduced surface loss. In the third phase, Ca, HMP and Ca+HMP protected against erosion; and none of the tested compounds seemed to interfere with the remineralization process. In the fourth phase, Ca and Ca+HMP reduced erosion, with no difference between them. HMP did not show any protective effect. 5/10 subjects noticed a difference in the taste of C+; 4/10 for Ca; and 2 /10 for C-. In conclusion, *in vitro*, HMP and Ca, in the concentrations tested, reduced erosion on enamel and this effect was enhanced by their combination. For dentin, only the combination Ca+HMP caused a significant reduction. *In situ*, Ca reduced the erosion caused by the juice; however, taste changes were noticed by some volunteers. HMP did not show any protective effect.

Keywords: Dental erosion. Prevention & Control. Acid drinks. Calcium. Sodium hexametaphosphate. Sodium triphosphosphate. Sodium pyrophosphate. Xanthan gum. Optical profilometry. Surface Microhardness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Sucos e o eletrodo de pH utilizados no estudo	74
Figura 4.2 - Representação da sequência do método de pH-stat.....	75
Figura 4.3 - Sequência para a obtenção dos fragmentos de esmalte e dentina de 4x4mm	77
Figura 4.4 - Sequência de inclusão em resina acrílica e polimento dos espécimes da segunda fase	78
Figura 4.5 - Microdurômetro utilizado, representação das 3 indentações realizadas no centro do espécime e espécime com a fita adesiva delimitadora	79
Figura 4.6 - Ciclo de erosão-remineralização utilizado na segunda fase	80
Figura 4.7 - Perfilômetro ótico e duas imagens resultantes do seu escaneamento, uma de esmalte (inferior) e a outra de dentina (superior), de espécimes submetidos a um desafio erosivo.....	81
Figura 4.8 - Espécime de esmalte bovino de 5x5x2mm fixado no bloco de acrílico ..	83
Figura 4.9 - Representação esquemática do modelo de erosão.....	84
Figura 4.10-Representação esquemática do modelo de remineralização	85
Figura 4.11-Aparelho palatino de acrílico contendo dois recessos de 5mm de largura x 28mm de comprimento x 2,3mm de altura, para acomodação dos aparatos de plástico que acomodavam os espécimes.....	88
Figura 4.12-Aparatos de plástico que carregavam os espécimes.....	89
Figura 4.13-Aparelho palatino com os aparatos fixos com cera pegajosa	89

Figura 4.14-Sequência do desafio erosivo da quarta fase	93
Figura 5.1 - Médias (desvios-padrão) da MDS dos grupos nos diferentes tempos experimentais do modelo de erosão	100
Figura 5.2 - Médias (desvios-padrão) da PS dos grupos nos diferentes tempos experimentais do modelo de erosão	100
Figura 5.3 - Médias (desvios-padrão) da MDS dos grupos nos tempos: inicial, após a erosão e após a remineralização	102
Figura 5.4 - Médias (+desvios-padrão) da AMD (em %) dos grupos, em cada tempo experimental. Os grupos conectados por barras horizontais não foram significativamente diferentes, em cada tempo ($p>0,05$). As médias com as mesmas letras não apresentaram diferenças significantes, em cada grupo ($p>0,05$)	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Grupos experimentais e seus respectivos códigos, aditivos e as concentrações utilizadas 73

Quadro 4.2 - Composição da saliva artificial 80

Quadro 4.3 - Grupos experimentais, aditivos testados e suas concentrações.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Médias (desvios-padrão) do pH e do volume (em mL) do titulador (HCl 0.1N) obtidas no método do pH-stat.....	96
Tabela 5.2- Médias (desvios-padrão) da PS em esmalte e dentina (μm) e da MDS para esmalte. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p<0,05$), em colunas	97
Tabela 5.3- Médias (desvios-padrão) da MDS obtidas no modelo de erosão nos tempos experimentais de 30, 90 e 150min. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p<0,05$), em colunas	99
Tabela 5.4- Médias (desvios-padrão) da PS obtidas no modelo de erosão nos tempos experimentais de 30, 90 e 150min. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p<0,05$), em colunas	99
Tabela 5.5- Médias (desvios-padrão) da MDS obtidas no modelo de remineralização após 30min de exposição ao ácido e após 24h de remineralização.....	101
Tabela 5.6- Médias (desvios-padrão) da AMD (em %) dos grupos, em cada tempo experimental. Os grupos conectados por barras verticais não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$), em cada tempo (colunas). As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$), em linhas	103
Tabela 5.7- Resultados do teste de sabor, onde os sucos teste foram comparados cegamente com o controle negativo (C-). A terceira coluna mostra o número de voluntários que notaram uma diferença no sabor dos sucos. A quarta coluna mostra a alteração notada e a frequência no qual essa alteração foi citada.....	104

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

C-	controle negativo
C+	controle positivo
Ca^{2+}	íon cálcio
$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	lactato de cálcio pentahidratado
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	hidroxiapatita
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cloreto de cálcio dihidratado
CCM	cálcio-citrato-malato
cm^2	centímetro ao quadrado
CO_2	dióxido de carbono
CPP-ACP	fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	sulfato de cobre pentahidratado
DP	desvio-padrão
FeSO_4	sulfato de ferro
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sulfato de ferro heptahidratado
g	grama
g/L	grama/Litro
g/quarto	grama por quarto
GS	grau de saturação em relação à hidroxiapatita
h	hora
H_2O	água
H_2PO_4	dihidrogênio fosfato
HCl	ácido clorídrico
HMP	hexametafosfato de sódio
KCl	cloreto de potássio
KHN	unidade Knoop
L mol^{-1}	Litro por mol
MDS	microdureza de superfície
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro

mg	miligrama
mg/L	miligrama por Litro
mg/m ²	miligrama por metro ao quadrado
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mm	milímetro
mmol/L	milimol por Litro
N	normal
n ^o	número
Na ₂ PO ₄ .2H ₂ O	ortofosfato dissódico dihidratado
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato monossódico
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	dihidrogenofosfato monossódico dihidratado
NaOH	hidróxido de cálcio
Nd:YAG	óxido de ítrio e alumínio dopado com neodímio
AMD	alteração da microdureza de superfície
PO ₄ ⁻	ortofosfato
PP	pirofosfato de sódio tetrabásico
ppm	partes por milhão
PS	perda de superfície
RPM	rotações por minuto
s	segundos
STP	tripolifosfato de sódio
TPM	trimetafosfato
VHN	unidade Vickers
XG	goma xantana

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
K _o	constante de associação de complexos
<	menor
>	maior
pK _a	cologaritmo da constante de dissociação ácida
%	porcentagem
X	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Aspectos Morfológicos	25
2.2 Agentes Etiológicos	26
2.3 Estratégias de controle e prevenção	27
2.4 Das bebidas ácidas	29
2.5 Das modificações das bebidas ácidas	33
2.5.1 Uso de sais de cálcio e/ou fosfato	34
2.5.2 Uso de polímeros de fosfato e gomas alimentares	47
2.5.3 Uso de outros compostos e métodos	55
2.6 Dos métodos de avaliação da erosão dental	65
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 Delineamento Experimental	70
4.2 Primeira Fase	71
4.2.1 Preparo dos sucos teste	71
4.2.2 Método pH-stat	74
4.2.3 Análise dos dados	75
4.3 Segunda Fase	75
4.3.1 Preparo dos espécimes	76
4.3.2 Mensuração da microdureza de superfície (MDS) inicial nos fragmentos de esmalte	78
4.3.3 Desafio erosivo	79
4.3.4 Determinação da erosão causada pelas bebidas teste	81
4.3.5 Análise estatística	82
4.4 Terceira Fase	82
4.4.1 Preparo dos espécimes	82

4.4.2 Mensuração da microdureza inicial nos fragmentos de esmalte	83
4.4.3 Modelo de erosão.....	84
4.4.4 Modelo remineralização	84
4.4.5 Análise estatística	85
4.5 Quarta fase.....	85
4.5.1 Aspectos éticos	86
4.5.2 Preparo dos espécimes.....	87
4.5.3 Mensuração da MDS inicial.....	87
4.5.4 Preparo dos aparelhos palatinos.....	88
4.5.5 Procedimentos Experimentais.....	90
4.5.6 Teste cego de sabor.....	91
4.5.7 Desafio erosivo.....	91
4.5.8 Determinação da erosão	94
4.5.9 Análise estatística	94
5 RESULTADOS.....	95
5.1 Resultados da Primeira Fase	95
5.1.1 Valores de pH e o volume de titulador (HCl 0.1N) obtidos no método pH-Stat	95
5.2 Resultados da Segunda fase.....	97
5.2.1 Resultados obtidos no modelo de ciclagem erosão-remineralização.....	97
5.3 Resultados da Terceira Fase.....	98
5.3.1 Resultados obtidos no modelo de erosão	98
5.3.2 Modelo de remineralização	101
5.4 Resultados do estudo <i>in situ</i>	102
5.4.1 Alteração da microdureza de superfície (AMD), em porcentagem (%)	102
5.4.2 Teste de sabor	104
6 DISCUSSÃO	105
6.1 Dos aditivos	105
6.2 Da Primeira fase	109
6.3 Da Segunda e Terceira Fases.....	111
6.4 Da Quarta Fase	115

7 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO

O estilo de vida das pessoas tem mudado com o passar dos anos e, nas últimas décadas, tem-se observado um grande aumento no consumo de bebidas ácidas pelas populações (Miller et al., 2001; Bowman, 2002). Assim, além da doença cárie, outro problema tem chamando a atenção dos profissionais de saúde bucal: a erosão dental.

A erosão dental é o resultado físico da perda patológica, crônica e localizada, dos tecidos duros dentais, que é quimicamente removido da superfície dos dentes por ácidos ou por quelação, sem o envolvimento bacteriano (Ten Cate; Imfeld, 1996). Os ácidos causadores da erosão podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Os ácidos de origem intrínseca são aqueles provenientes de vômitos recorrentes e de distúrbios gástricos, como o refluxo (Scheutzel, 1996). Os ácidos de origem extrínseca são principalmente representados pelos alimentos e bebidas ácidas (Zero, 1996).

Mais especificamente em relação às bebidas ácidas, existem aspectos químicos importantes que podem modular a sua capacidade de causar erosão nos dentes, o que inclui o pH (Lussi et al., 1993), o pKa (West et al., 2000), o tipo de ácido (West et al., 2000), a capacidade tampão (Hanning et al., 2005), as propriedades quelantes (Lussi; Jaeggi, 2006) e as concentrações de cálcio, fosfato e flúor (Larsen; Nyvad, 1999). Nesse contexto, sabe-se que alterações específicas nesses parâmetros podem levar a uma redução do seu potencial erosivo.

Uma modificação comumente investigada é o uso de aditivos, geralmente sais contendo cálcio e/ou fosfato (Grenby, 1996). Esses compostos atuam com base no efeito íon comum, onde a dissolução da hidroxiapatita pode ser reduzida pelo estado de saturação da bebida em relação a esses íons (Barbour et al., 2008). No entanto, alguns estudos reportam que a adição de compostos simples de fosfato parece não ser tão efetiva quanto à adição de cálcio (Reussner et al., 1975; Barbour et al., 2003a).

Em relação à suplementação de cálcio, existem, em alguns países, bebidas modificadas com esse íon, que estão disponíveis comercialmente com a finalidade de tratamento de algumas doenças, como a osteoporose. No entanto, apesar dessas bebidas possuírem um potencial erosivo reduzido (Larsen; Nyvad, 1999;

Hara; Zero, 2008; Davis et al., 2007), elas possuem grandes quantidades de cálcio, o que pode causar um ligeiro aumento do seu pH, alterando, assim, o seu sabor e estabilidade (Grenby, 1996). Além disso, o consumo excessivo de cálcio pode causar outras alterações sistêmicas, como a hipercalcemia e o aparecimento de pedras renais (Straub, 2004). Portanto, em termos de prevenção de erosão, seria desejável a adição de uma quantidade de cálcio menor, porém efetiva.

A adição de alguns polímeros alimentares também tem sido investigada. Esses compostos demonstraram ter habilidade de reduzir a erosão devido à sua capacidade de adsorção à superfície dental, levando à formação de uma barreira protetora contra o ataque ácido (Barbour et al., 2005b). O lado negativo do uso dos polímeros alimentares pode estar relacionado à sua possível propriedade inibidora de mineralização (Mcgaughey; Stowell, 1977), o que, supostamente, poderia interferir com a remineralização do tecido dental desmineralizado que não foi removido pelo processo de erosão. Adicionalmente, existe a possibilidade de que a ação desses polímeros possa ser reduzida na presença das proteínas salivares, devido a uma competição por sítios de ligação à superfície dental (Barbour et al., 2005b).

Neste estudo, foi investigada a modificação de um suco de laranja com a adição de sais de cálcio e alguns polímeros alimentares, sejam isolados, ou em combinação. O suco de laranja foi escolhido por ser um suco representativo de bebidas cítricas ácidas e por ter um reconhecido potencial erosivo (West et al., 1998). Além disso, esse suco possui um amplo consumo mundial. Para se entender melhor o mecanismo de ação dos aditivos, eles foram estudados *in vitro* com diferentes modelos de erosão: ciclagem erosão-remineralização, desmineralização somente e remineralização. Em seguida, os aditivos que apresentaram melhor desempenho na diminuição do potencial erosivo do suco de laranja foram testados em um modelo *in situ*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esse capítulo apresentará uma breve revisão sobre os aspectos morfológicos, os agentes etiológicos e as estratégias de controle e prevenção da erosão dental, focando principalmente a erosão causada por fatores extrínsecos. Em seguida, serão abordadas as bebidas ácidas (em especial o suco de laranja) e suas propriedades erosivas, assim como as sugestões de modificação para torná-las menos prejudiciais aos dentes. Para finalizar, serão abordados os métodos mais comumente utilizados para a avaliação das lesões de erosão nos estudos *in vitro* e *in situ*.

2.1 Aspectos morfológicos

De acordo com Ganss e Lussi (2006), inicialmente, a lesão de erosão se apresenta como uma superfície “amolecida” e brilhante e, em estágios mais avançados, as áreas convexas dos dentes se planificam ou então algumas concavidades se tornam presentes, sendo que a largura da lesão geralmente excede a sua profundidade. Na região cervical, principalmente por vestibular, as lesões apresentam a borda gengival intacta, muito provavelmente devido à ação neutralizadora de ácidos do fluido do sulco gengival (Lussi et al., 2004). Nas superfícies oclusais, ocorre um arredondamento das cúspides, sendo que as restaurações nessa região, quando presentes, se tornam elevadas em relação às estruturas dentais adjacentes. Com o progresso da lesão, a morfologia da superfície oclusal pode desaparecer por completo (Ganss; Lussi, 2006). Nas superfícies incisais ocorre irregularidades em suas margens; no entanto, deve-se considerar que essa região também é muito vulnerável a forças de desgaste mecânico, principalmente derivadas da oclusão ou de hábitos parafuncionais como o bruxismo (Ganss, 2008).

Com a perda progressiva do esmalte e, conseqüentemente, a aproximação da região da dentina, essa última responde formando dentina reacional e

reparadoura, além da obliteração dos túbulos dentinários, na tentativa de compensar a perda tecidual. Todavia, quando a intensidade do desafio erosivo excede a capacidade reparativa do complexo dentina-polpa, algumas complicações, como a inflamação pulpar, podem ocorrer (Ganss, 2006).

2.2 Agentes etiológicos

A erosão dental é uma condição multifatorial, onde ocorre uma interação de fatores químicos, biológicos e comportamentais (Lussi et al., 2004). De acordo com Lussi e Jaeggi (2008), essa interação é fundamental para se explicar porque alguns indivíduos apresentam mais erosão do que outros.

Os fatores químicos estão relacionados às propriedades das bebidas, alimentos e outros produtos, que os tornam erosivos para o dente (Lussi; Jaeggi, 2006). Esses fatores podem ser assim descritos: pH, capacidade tampão, tipo de ácido (valores de P_k), adesão a superfície dental, propriedades quelantes e as concentrações de cálcio, fosfato e flúor (Lussi et al., 2004).

Os fatores biológicos estão relacionados às características inerentes do próprio indivíduo que influenciam a etiologia do processo, como a saliva e seus aspectos relativos, tais como: o fluxo, a sua composição, capacidade tampão e capacidade de estimulação; a película adquirida, com suas propriedades limitantes da difusão, a sua composição, maturação e espessura; a estrutura dental (tipo de dente e composição); anatomia dental e oclusão; assim como a anatomia e fisiologia dos tecidos moles circundantes (Hara et al., 2006).

Os fatores comportamentais são aqueles que modulam a extensão do desgaste dental. De acordo com Zero e Lussi (2006) e Lussi e Jaeggi (2008), eles podem ser assim listados: hábitos não convencionais de se comer e beber alimentos ácidos; hábitos de vida saudáveis, o que inclui uma dieta rica em frutas ácidas e vegetais; hábitos de vida não-saudáveis, com o consumo de algumas drogas ácidas; doença associada ao alcoolismo; consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas; ocupacionais, como acontece nos degustadores de vinho (Wiktorsson et al., 1997) e nos nadadores profissionais que usam piscinas sem uma regulação adequada de pH

(Centerwall et al., 1986); consumo de mamadeira noturna contendo bebidas ácidas e o excesso de zelo nas práticas de higiene oral.

2.3 Estratégias de controle e prevenção

Por ser uma condição multifatorial, as estratégias de controle e prevenção da erosão devem englobar os fatores que estão diretamente relacionados à sua patogênese e etiologia (Lussi, 2006; Magalhães et al., 2009b).

Em relação aos fatores comportamentais, a mais importante medida a ser implementada é a redução da frequência e também da duração da ingestão de bebidas ácidas (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2004), reduzindo, assim, a atuação do principal agente etiológico. No entanto, existem outras medidas que também podem ser úteis para se evitar o contato excessivo de bebidas ácidas com os dentes. Johansson et al. (2002) relacionaram as diferentes formas de se beber uma bebida ácida de dois grupos distintos, um deles com alta prevalência de erosão e, o outro, com baixa. Os autores notaram que houve diferença significativa no tempo em que eles seguravam a bebida na boca antes de engolir, em média, 71s para o grupo de alta e 41s para o de baixa, confirmando a hipótese de que a exposição prolongada, como a que ocorre quando os pacientes mantêm a bebida por um tempo na boca antes de engolir, é um dos fatores que devem ser controlados. Assim, recomenda-se consumir as bebidas ácidas o mais rápido possível (Imfeld, 1996), uma vez que bebericar em pequenos goles está relacionado a quedas mais frequentes do pH bucal (Millward et al., 1997). Adicionalmente, foi demonstrado que a maneira como a bebida é introduzida na boca pode exercer grande influência no processo. Grobler et al. (1985) e Edwards et al. (1998) observaram que a ingestão de uma bebida através de um canudo, posicionado no fundo da boca, pode reduzir o contato dessa com os dentes. Moss (1998) recomenda também limitar o consumo de alimentos ácidos às refeições principais.

Lussi et al. (2004) sugeriram que o consumo de outros alimentos e também bebidas junto com a bebida ácida pode ajudar a neutralizar e eliminar os ácidos da

boca. Confirmando esse fato, estudos *in situ* mostraram que o tratamento de espécimes de esmalte, que foram submetidos à erosão, com leite ou queijo foi capaz de promover a sua remineralização (Gedalia et al., 1991a; Gedalia et al., 1991b; Gedalia et al., 1992; Wiegand et al., 2008b). Mais recentemente, Honório et al. (2010) observaram que, além do leite e do queijo, o extrato de brócolis também possui esse efeito protetor.

Ainda nesse contexto, foi observado que o consumo de alimentos ácidos à noite pode ser particularmente danoso, devido à redução do fluxo salivar que ocorre nesse período. Como exemplo, pode-se citar a mamadeira noturna com bebidas ácidas oferecidas a bebês e os casos de refluxo gastroesofágico, onde ocorre regurgitação durante o sono (Lussi; Jaeggi, 2008).

Por fim, há um consenso na literatura sobre o fato de que a escovação após um desafio erosivo pode exacerbar a perda de estrutura (Davis; Winter, 1980; Attin et al., 2001; Wiegand et al., 2008a), uma vez que ela pode remover a frágil camada desmineralizada da superfície dental (Magalhães et al., 2009b). Assim, para pacientes portadores de erosão, o ideal é que se indique escovar os dentes antes do desafio erosivo (Wiegand et al., 2008a) ou que se espere, pelo menos, uma hora depois dele (Attin et al., 2001).

Em relação aos fatores biológicos, sabe-se que a saliva tem a importante função protetora contra erosão (Gedalia et al., 1991a; Gedalia et al., 1991b; Kim et al., 2001; Amaechi; Higham, 2001), devido a sua ação de diluição, de remoção e de tamponamento dos ácidos, além da sua capacidade de remineralização e também de formar uma película protetora sobre a superfície dos dentes (Hara et al., 2006). Esse efeito protetor da saliva pode ser observado em pacientes que, por algum motivo, apresentam redução do fluxo salivar. Como exemplo, podemos citar os pacientes que receberam radioterapia como tratamento para neoplasias na cabeça e no pescoço (Dreizen et al., 1977). Quando detectada essa diminuição do fluxo salivar, existem algumas estratégias que podem estimulá-lo. Rios et al. (2006) observaram, *in situ*, uma menor perda de estrutura e menor alteração na microdureza em espécimes de esmalte com a mastigação de uma goma de mascar após um desafio erosivo/abrasivo, sugerindo que essa pode ser uma recomendação válida para estimular o fluxo. A estimulação do fluxo também pode ser feita de maneira

sistêmica com a ingestão de algumas drogas colinérgicas, como a pilocarpina (Magalhães et al., 2009b). Em adição a isso, pode-ser também recomendar o uso de substitutos salivares, indicados para aliviar os sintomas que a boca seca pode causar (Van der Reijden et al., 1997).

Em relação aos fatores químicos, alguns estudos sugerem que a aplicação tópica de flúor, na forma de gel, enxaguatório ou verniz mostrou ser efetiva em reduzir a perda de estrutura por erosão (Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004; Lagerweij et al., 2006; Murakami et al., 2009). De acordo com Ganss et al. (2004) o principal mecanismo de ação do flúor se dá pela deposição de precipitados de fluoreto de cálcio na superfície dental, que atuam como reservatórios de flúor. No entanto, existem evidências que sugerem que o flúor pode não ser tão efetivo (Larsen; Richards, 2002), uma vez que existe a hipótese de que esse precipitado seja rapidamente dissolvido na presença de bebidas ácidas (Ganss et al., 2007). Ainda em relação aos produtos de aplicação tópica, temos a opção do uso de uma solução de bicarbonato de sódio (Amaechi; Higham, 2005; Messias et al., 2010), o que causaria uma neutralização dos ácidos alimentares.

Como propostas de terapias alternativas, temos o uso do laser. Estudos sugerem que a aplicação de lasers de alta potência, como por exemplo, o Nd:YAG e o laser de CO₂, podem reduzir a sua susceptibilidade à desmineralização do tecido dental (Tsai et al., 2002), principalmente quando associados a fluoretos (Vlacic et al., 2007; Sobral et al., 2009).

Outra sugestão de crescente interesse entre a comunidade científica é a redução do potencial erosivo das bebidas ácidas. Esse tópico será detalhadamente revisado a seguir.

2.4 Das bebidas ácidas

Estudos epidemiológicos vêm relacionando o consumo excessivo de bebidas ácidas com o aumento da prevalência (Millward et al., 1994; Nunn et al., 2003; Correr et al., 2009) e da incidência (Lussi; Schaffner, 2000; Dugmore; Rock, 2004)

da erosão dental. Adicionalmente, uma série de estudos *in vitro* e *in situ* foram dedicados a mostrar os efeitos erosivos das bebidas ácidas nos tecidos dentais, especialmente o suco de laranja.

Apesar do pH do suco de laranja ser de aproximadamente de 3,8, estudos reportam que seu alto potencial erosivo está relacionado também aos seus altos valores de titulação ácida. Além do ácido cítrico, geralmente numa concentração aproximada de 10g/L (ou 1%), o suco de laranja também contém o ácido ascórbico e o citrato, um ânion ácido capaz de quelar o cálcio do dente e da saliva, aumentando assim seus efeitos erosivos (Featherstone; Lussi, 2006).

Rytomaa et al. (1988) compararam o potencial erosivo de diferentes bebidas ácidas e do leite. Espécimes de esmalte bovino foram imersos em 50mL de suas respectivas soluções teste por 4h, sob leve agitação. A variável resposta foi a perda de superfície, em μm , medida por um perfilômetro de contato. A bebida que causou a maior perda de superfície foi a bebida à base de cola ($26 \mu\text{m} \pm 10$), seguida pela “bebida de laranja” ($14 \mu\text{m} \pm 7$), que promoveu uma perda semelhante à bebida esportiva ($14 \mu\text{m} \pm 11$). Logo na sequência veio o suco de laranja ($8 \mu\text{m} \pm 6$). A cerveja, o café, o iogurte de morango, o leite e a água gaseificada não foram capazes de causar perda de estrutura detectável pelo método.

Grenby et al. (1989) avaliaram as propriedades erosivas de oito diferentes bebidas ácidas: suco de laranja puro, suco de abacaxi, suco de limão, “bebida de laranja”, “bebida de laranja de baixa caloria”, bebida à base de groselha preta, bebida à base de cola e bebida de limão carbonatada. Os seguintes parâmetros dessas bebidas foram analisados: pH, titulação ácida e as quantidades de cálcio e fósforo em sua composição. As medidas de cálcio e fósforo também foram realizadas em 10mL das bebidas teste após a imersão de 0,01g de hidroxiapatita em pó por 2, 4, 6 e 24h. Em relação ao pH, o suco de limão e a bebida à base de cola foram as bebidas com os menores valores, enquanto que os maiores valores foram encontrados para os sucos de laranja e de abacaxi. Em relação à titulação ácida, os sucos de frutas foram os que apresentaram os valores mais altos. O suco de laranja e o de abacaxi foram os que tinham inicialmente as maiores quantidades de cálcio. Quanto à quantidade de fósforo, os valores para esses sucos também foram altos, somente superados pela bebida à base de cola. Analisando a dissolução da hidroxiapatita, o suco de limão foi o mais erosivo, seguido pelo suco de laranja. A bebida à base de cola foi a menos erosiva. Na discussão, os autores chamam a

atenção para o fato da bebida à base de cola ter sido a que menos causou erosão, mesmo com os valores mais baixos de pH. Esse fato foi justificado pelos baixos valores de titulação ácida dessa bebida e pela sua alta concentração de fosfato, o que, pela lei de ação de massas, pode ter influenciado o processo. Inversamente, o suco de laranja foi um dos que mais causou erosão, apesar do seu mais alto valor de pH. Vale lembrar que esse suco também foi o que obteve os mais altos valores de titulação ácida.

Também com o objetivo de analisar o potencial erosivo de diferentes bebidas ácidas, Zero e Lussi (2005) investigaram os seguintes parâmetros: pH, titulação ácida, as concentrações de cálcio, fosfato e flúor e a alteração de microdureza (usando indentador Knoop com 50g de carga) provocada por elas em espécimes de esmalte, após a imersão por 6min. Os autores observaram que o suco de laranja natural possuía pH de 3,64; enquanto que um refrigerante à base de cola possuía pH de 2,6. Apesar do menor pH do refrigerante, em torno de uma unidade, ambos promoveram quase a mesma alteração da microdureza (refrigerante: -163; suco de laranja: -144), o que indica que o somente o pH não é um bom parâmetro para se determinar o potencial erosivo de bebidas ácidas. A grande diferença encontrada entre as duas bebidas foi em relação à titulação (ou capacidade tampão). Enquanto que o suco necessitou de 124mmol/L de base, o refrigerante necessitou apenas de 34mmol/L. De acordo com os autores, quanto maior for a capacidade tampão da bebida, mais tempo a saliva levará para neutralizar os seus ácidos. A capacidade tampão mostra a sua importância em ataques erosivos prolongados, onde a bebida permanece em contato com os dentes por um grande período de tempo, sem ser substituída pela saliva, como ocorre, geralmente, nos estudos *in vitro*.

West et al. (1998) compararam o potencial erosivo do suco de laranja com o da água mineral *in vitro* e *in situ*. Para o estudo *in situ*, foi utilizado um modelo “crossover” de erosão de duas fases, onde espécimes de esmalte humano foram fixados no palato de aparelhos removíveis pertencentes a dez voluntários. Uma fita adesiva foi colocada na superfície teste dos espécimes, deixando uma janela de 2mm exposta. Os voluntários utilizaram o aparelho das 9h da manhã às 5h da tarde, por 15 dias. A cada dia, 250mL de água ou suco eram consumidos por 10min, às 9, 11, 13 e 15h. Ao final de cada dia, dois espécimes eram removidos dos aparelhos para análise de perfil no perfilômetro. Após esse período, as fitas eram novamente recolocadas sobre os espécimes. Uma semana de “wash out” foi realizada entre

cada fase. Ao final do estudo, os espécimes também foram avaliados através de microdureza de superfície. Cinco indentações foram realizadas nas superfícies conservadas e também nas expostas. O estudo *in vitro* foi realizado levando-se em consideração o mesmo tempo de exposição aos ácidos do estudo *in situ*. No estudo *in situ*, em relação à perda de superfície, o suco de laranja causou uma perda progressiva de esmalte (2,77µm), enquanto que não houve perda para os espécimes tratados com a água (+0,05µm). Em relação a microdureza, os autores observaram uma diferença entre as áreas não expostas às soluções em comparação à área exposta apenas nos espécimes tratados com o suco de laranja. Os resultados do estudo *in vitro* foram semelhantes ao do estudo *in situ*, com exceção da perda de estrutura. Esta foi dez vezes menor em relação ao estudo *in vitro*, devido a ação protetora da saliva e da película.

Jensdottir et al. (2006) avaliaram o potencial erosivo imediato (nos primeiros 3min de exposição) de diversos sucos de laranja e diversas bebidas à base de cola. Inicialmente, o pH de 50mL de cada bebida era obtido. Em seguida, a essa bebida era adicionada 50mg de hidroxiapatita em pó e o pH desse conjunto era medido a cada 15s, em um total de 3min. Por fim, o pH final era obtido 30min após a inserção da hidroxiapatita. De acordo com os autores, a reação de dissolução da hidroxiapatita ocorre da seguinte forma:

onde os íons liberados PO_4^{3-} e OH^- se combinam com os íons de hidrogênio, mudando o pH da bebida para uma direção mais alcalina. A magnitude do aumento do pH corresponde a quantidade de titulação ácida da bebida. Assim, o volume de base (NaOH) necessário para alcançar o valor de pH obtido após a inserção da hidroxiapatita foi determinado. Semelhantemente ao que foi observado nos demais estudos, os autores observaram que, apesar dos sucos de laranja possuírem maiores valores de pH do que as bebidas à base de cola, a sua titulação ácida também apresentou valores cerca de cinco vezes maiores. Assim, apesar do potencial erosivo das bebidas à base de cola ter sido maior do que os dos sucos de laranja nos primeiros 3min de exposição, notou-se que, após esse período, ele diminuiu consideravelmente (40 vezes) em contraste a pequena diminuição observada nos sucos de laranja (apenas 3 vezes). Com isso, os pesquisadores concluíram que quando ocorre uma exposição prolongada a quantidades limitadas de volume de bebidas ácidas, a titulação ácida é um fator importante a ser considerado.

Mais recentemente, outro estudo comparou o potencial erosivo de algumas bebidas ácidas, incluindo o suco de laranja (Cochrane et al., 2009). As variáveis analisadas foram: o pH, a titulação ácida, as composições iônicas de cálcio, fosfato e flúor e a perda de superfície (em μm). Espécimes de esmalte bovino foram encubados por 30min nas suas respectivas bebidas ácidas. A bebida carbonatada à base de cola foi a mais erosiva, provocando uma perda de superfície de $7,04\mu\text{m}$. O suco de laranja provocou uma perda de $2,49\mu\text{m}$, enquanto que o leite e a água mineral não provocaram perda nenhuma. Todas as bebidas estudadas, com exceção do suco de laranja e do leite possuíam conteúdo de cálcio menor que 1mmol/L , enquanto que a bebida à base cola tinha um alto conteúdo de fosfato. Houve uma alta correlação entre o pH das bebidas e seus efeitos ácidos, enquanto que essa correlação não foi encontrada para os outros fatores químicos estudados.

2.5 Das modificações das bebidas ácidas

Para iniciar esse item, será primeiramente reportado o estudo de revisão feito por Grenby (1996). Este estudo mostra um panorama geral das modificações feitas nas bebidas ácidas, com o objetivo de diminuir seu potencial erosivo até o ano de sua elaboração. De acordo com o autor, as estratégias utilizadas para a reformulação de bebidas ácidas podem ser divididas da seguinte forma: (1) adição de um tampão à solução para manter o pH perto da neutralidade: os tampões geralmente são constituídos por um ácido ou uma base, ambos fracos, que tem a função de resistir a alterações de pH. No entanto, devido ao fato de que algumas características e também a aceitabilidade das bebidas ácidas estarem diretamente relacionadas com os ácidos presentes na sua composição, essa manobra foi julgada como inviável; (2) adição de suplementos de cálcio e/ou fosfato. O princípio envolvido nessa modificação é dependente da Lei de Ação de Massas, na qual, a taxa da reação química (nesse caso, a dissolução do esmalte) é proporcional a concentração das substâncias reagentes (cálcio e/ou fosfato) presentes no momento. Assim, no caso de um desafio ácido, a presença inicial dos produtos reagentes pode diminuir a taxa e a extensão da desmineralização. Porém, o pesquisador comenta que a efetividade dessa modificação depende de uma série de

fatores, como a concentração e solubilidade do aditivo, a sua capacidade de formação de complexos, o seu pH e também a temperatura. Além disso, ele ressalta que a adição de cálcio e/ou fosfato pode ter um impacto no pH e no sabor da bebida, de acordo com o sal utilizado e a concentração; (3) adição de citrato: esse componente apresenta uma forte propriedade quelante de ions cálcio, o que aumentaria o potencial erosivo de uma bebida ácida a primeira vista; no entanto, o autor destaca que essa propriedade não possui importância em baixos valores de pH. Assim, foi observado que a adição de baixas quantidades de citrato à bebidas ácidas poderia diminuir seus efeitos erosivos, devido a uma possível estimulação do fluxo salivar pelo citrato, ou ainda, pela ação tamponante de ácidos do citrato; (4) redução dos níveis de acidez das bebidas. De acordo com o autor, existem evidências que sugerem que, por exemplo, o ácido cítrico é mais erosivo que o ácido málico e assim, esse último deveria ser o ácido de escolha na formulação de bebidas. Outra sugestão diz respeito a redução do grau de gás carbônico das bebidas carbonatadas, o que as deixariam menos erosivas; (5) adição de flúor. Apesar de alguns estudos mostrarem que a adição de flúor é efetiva em reduzir o potencial erosivo de uma bebida ácida, existem problemas relacionados a sua toxicidade que limitam o uso desse composto como aditivo.

2.5.1 Uso de sais de cálcio e/ou de fosfato

O método mais comumente utilizado para a redução do potencial erosivo de uma bebida ácida é o da adição de sais de cálcio e/ou fosfato (Grenby et al., 1996), o que reduz a sua capacidade de desmineralização pela lei de “ação de massas” (Barbour et al., 2008).

Um dos primeiros estudos a utilizar esses aditivos especificamente para a prevenção de erosão foi o estudo de Wagg et al. (1965). Neste estudo, os autores avaliaram o potencial erosivo de dois tipos de “gelinho” de frutas, um feito para crianças e o outro para adultos, modificados pela adição de cálcio e fosfato. O “gelinho” para crianças, que originalmente continha 144mg/L de cálcio e 5-7mg/L de fosfato, foi modificado com a adição de lactato de cálcio (em duas concentrações: 625mg/L e 1030mg/L) e fosfato (em duas concentrações: 434mg/L e 734mg/L, na

forma de $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O “gelinho” para adultos continha, originalmente, 119mg/L de cálcio e foi modificado com a adição de carbonato de cálcio (em duas concentrações: 637mg/L e 1056mg/L) e fosfato (em duas concentrações: 515mg/L e 786mg/L). Os respectivos “gelinhos” sem aditivos e a água foram utilizados como controle. Duas metodologias foram utilizadas neste estudo. Na primeira, os autores avaliaram *in vitro* as quantidades de cálcio e fosfato liberados por espécimes de esmalte humano, após a exposição aos respectivos “gelinhos” teste. Na segunda, foi avaliada a quantidade de erosão causada pelos “gelinhos” em dentes de ratos, através de “scores”. Em relação ao primeiro experimento, as quantidades de cálcio e fosfato liberadas pelos “gelinhos” com as maiores concentrações de cálcio e fosfato não foram significantes. Nos “gelinhos” com concentrações menores desses íons, pouca erosão foi observada. Os “gelinhos” sem aditivos causaram uma significativa perda de cálcio e fosfato. Em ratos, os “gelinhos” sem aditivos causaram significativamente mais erosão do que os modificados, sendo que houve apenas pouca diferença entre a proteção dada pelas duas concentrações testadas, nos dois tipos de “gelinhos”.

Mais tarde, McDonald Jr. e Stookey (1973) investigaram se apenas a adição de fosfato, na forma de NaH_2PO_4 (a 0,125%) reduziria a erosão causada por uma bebida ácida com açúcar e por uma bebida à base de laranja. Para este estudo, sessenta ratos foram divididos em quatro grupos, de acordo com suas respectivas bebidas teste (as duas bebidas originais e as duas modificadas). A eles foram oferecidas as bebidas, à vontade, por 28 dias. A erosão causada pelas bebidas nos molares dos ratos foi analisada no microscópio ótico no aumento de 20x, para a obtenção de 32 “scores”. Cada região analisada recebia um “score” que variava de 0 a 5, baseado na seguinte escala: 0=ausência de erosão; 1= erosão leve, somente em esmalte; 2=erosão com exposição de dentina; 3=perda do esmalte lingual, com formação de uma concavidade; 5=erosão que se estende até a superfície vestibular; 6=erosão severa, com redução na altura da cúspide e perda de volume do dente. A adição de fosfato a ambas as bebidas experimentais reduziu o “score” dessas, mas essa redução não foi significativa.

No estudo de Reussner et al. (1975), os autores avaliaram o potencial erosivo de uma bebida ácida de uva, após a adição de diferentes tipos de compostos de fosfato e do cloreto de cálcio. Os aditivos de fosfato testados foram: 0,15% de hexametáfosphato de sódio, 0,15% de trimetáfosphato de sódio, 0,21% de ortofosphato

monosódico (NaH_2PO_4), 0,03% de monofluorofosfato e 0,15% de cloreto de cálcio. As concentrações de fosfato para cada composto foram escolhidas de modo a se obter 0,5mg/mL de fosfato. Semelhantemente, a concentração de cálcio resultou em 0,5mg/mL de cálcio. O controle foi representado pela bebida sem aditivos. Essas bebidas foram administradas para grupos contendo 13 ratos, com regime de 20mL de bebida por 20h diárias, durante um período de 2 semanas. A superfície lingual dos molares mandibulares desses animais foi analisada em microscópio ótico, com aumento de 20x, para receberem “scores”. Os pesquisadores observaram uma redução significativa nos “scores” de erosão apenas no grupo da bebida que tinha como aditivo o monofluorofosfato. No mesmo estudo, os autores utilizaram a mesma metodologia descrita anteriormente, para avaliar a adição de 0,15 ou 0,30% de monocálcio fosfato à mesma bebida ácida de uva. Os autores observaram uma redução significativa nos efeitos erosivos da bebida com a adição de ambas as concentrações do aditivo. De acordo com os autores, o monocálcio fosfato é solúvel em bebidas ácidas e não altera o seu sabor.

Um ano mais tarde, Reussner e Pearl River (1976) registraram uma patente americana (USPatent 3,968,263) para o uso do composto tripolifosfato de cálcio em bebidas ácidas, com objetivo de torná-las menos erosivas. De acordo com as especificações da patente, a adição de 1 a 6g (preferencialmente 1,25 a 2,5g) de tripolifosfato de cálcio (feito para uso em alimentos) por quarto de uma bebida ácida (pH de 2,5 a 3,5) irá reduzir a desmineralização dental que essa bebida normalmente causaria. Por exemplo, os autores reportaram 70% de redução da erosão em ratos com a adição de 1,7g/quarto a um suco de laranja. No entanto, o autor adverte o possível efeito colateral que a adição de altas concentrações do composto pode causar: uma espécie de “turbamento” na bebida.

Focando na suplementação com cálcio, Beiraghi et al. (1989) testaram a adição de lactato de cálcio à Coca-Cola®. Para este estudo foram utilizados 36 ratos, que foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, de acordo com as seguintes soluções teste: água destilada (controle), Coca-Cola® e Coca-Cola® com lactato de cálcio a 5%. O pH da Coca-Cola® modificada foi ajustado após a adição do lactato de cálcio para o pH da Coca-Cola® original (2,4) com ácido cítrico e fosfórico em quantidades iguais. Foram então ministradas, aos ratos, suas respectivas bebidas por um período de 5 semanas. Ao final do experimento, a erosão foi determinada nos molares mandibulares por “scores”. Os autores

observaram redução significativa na erosão causada pela Coca-Cola® modificada em relação à original. De acordo com os autores, o lactato de cálcio é uma substância solúvel em bebidas ácidas e não causa nenhuma alteração no seu sabor, sendo, portanto, indicado como aditivo.

Ainda sobre o cálcio, Andon et al. (1992) registraram uma patente americana (US Patent 5,108,761) sobre a adição de um composto de cálcio em bebidas ácidas, visando torná-las menos erosivas. De acordo com a patente, a adição de 35 a 270mg de cálcio, na forma de cálcio-citrato-malato (CCM), a 180mL de uma bebida ácida (0,02% a 0,15% peso/volume) pode reduzir o seu potencial erosivo. O cálcio-citrato-malato é uma mistura de sais de cálcio (carbonato, hidróxido, entre outros) numa taxa de mols de citrato/malato de aproximadamente 1:0,16 a 1:13,5. Para exemplificar os efeitos desse aditivo, a patente descreve duas investigações realizadas pelos autores. Em um estudo com ratos, pouca ou nenhuma erosão foi encontrada com a adição do cálcio-citrato-malato a uma bebida ácida. Em um estudo *in vitro*, o composto de cálcio foi adicionado (1,25mg/L) a um suco de laranja e de grapefruit. Espécimes de esmalte humano foram imersos nas bebidas modificadas por 60min. As bebidas sem aditivos foram utilizadas como controle positivo e a água como negativo. Antes e após a imersão, os espécimes foram avaliados em relação a microdureza de superfície. Os sucos modificados e a água não causaram uma alteração de microdureza significativamente diferente dos valores de dureza iniciais, enquanto que os sucos originais sim.

Com o objetivo de testar o aditivo patenteado por Andon et al. (1992), Rugg-Gunn et al. (1998) realizaram um estudo *in situ*, onde foi avaliado o potencial erosivo de uma bebida de laranja modificada pelo aditivo CCM (pH 4,0; 1344mg/L de cálcio; 101mg/L de fósforo), em comparação com a mesma bebida sem aditivos (pH 3,6; 72mg/L de cálcio; 133mg/L de fósforo), uma bebida à base de cola (pH 3,1; 35mg/L de cálcio; 94mg/L de fósforo) e a água. Dez voluntários utilizaram um aparelho removível contendo espécimes de esmalte bovino por seis dias. Quatro vezes ao dia, os espécimes eram imersos nas suas respectivas bebidas teste, fora da boca, por 15min. Os espécimes foram avaliados através da perfilometria. Somente foi encontrada uma diferença significativa na perda de superfície entre a água e a bebida à base de cola. Ambas as bebidas de laranja não apresentaram perdas significativamente diferentes da água. Assim, os autores concluíram que o efeito anti-

erosivo do CCM não foi possível de ser determinado, devido a ausência de erosão causada pela bebida de laranja sem aditivos.

Larsen e Nyvad (1999) realizaram um estudo para avaliar o pH, a capacidade tampão, as concentrações de cálcio, fosfato e flúor e a capacidade de desmineralização de 18 bebidas disponíveis comercialmente na Dinamarca. Entre os sucos testados, havia um suco de laranja modificado com adição de cálcio e fosfato (pH=4,03; cálcio=43mmol/L; fosfato=31mmol/L e flúor=0,09ppm), que é comercializado como uma bebida funcional para prevenção de doenças, como a osteoporose. O suco sem aditivos apresentava pH de 3,84; cálcio=2,97mmol/L; fosfato=3,55mmol/L e flúor=0,8ppm. Espécimes de esmalte humano foram imersos em 1,5L de suas respectivas bebidas teste por uma semana, sob leve agitação. Após, os espécimes foram seccionados longitudinalmente e a profundidade da lesão foi determinada por um programa de computador, usando a maior distância perpendicular encontrada na área da lesão até o desenho da anatomia original da superfície. Entre as bebidas testadas, a limonada carbonatada (pH=2,48; cálcio=0,43mmol/L; fosfato=0; flúor=0,41ppm) foi a que apresentou o menor pH, com uma alta capacidade tampão. A capacidade tampão de ambos os sucos de laranja foi semelhantemente alta. A bebida de limão causou a lesão mais profunda, enquanto que a água mineral provocou a menos profunda. O suco sem aditivos causou uma profundidade de lesão significativamente maior do que o suco suplementado. De acordo com os autores, devido a sua alta capacidade tampão, o suco de laranja sem aditivos foi capaz de produzir uma lesão semelhante a de uma bebida com uma unidade de pH a menos. No entanto, apesar de apresentar a mesma capacidade tampão, os aditivos presentes no suco modificado foram capazes de contrapor-se aos seus efeitos erosivos.

No primeiro estudo de uma série de investigações com o objetivo de criar uma bebida de groselha preta com menor potencial erosivo, Hughes et al. (1999a) testaram, *in vitro* e *in situ*, a adição de 350ppm de cálcio (na forma de hidróxido de cálcio) a essa bebida. O potencial erosivo da bebida experimental (pH= 3,8) foi comparado com o potencial de um suco de laranja sem aditivos, disponível comercialmente (pH= 3,8 e 70ppm de cálcio), e com a água (pH= 7,8 e 29ppm de cálcio). O estudo *in vitro* consistia da imersão de espécimes de esmalte em 250mL das suas respectivas soluções teste por 10min, quatro vezes ao dia, durante 15 dias. Os espécimes foram avaliados no perfilômetro após 20, 40 e 60 exposições. O

estudo *in situ* também durou 15 dias. Este estudo foi realizado em um centro único, com um único investigador, cego, com um design “crossover” randômico, balanceado para efeitos residuais. Durante o estudo, 12 voluntários usaram aparelhos removíveis no período das 9h às 17h. Nos horários de 9h, 11h, 12h e 15h, eles bebericavam 250mL das suas bebidas teste do dia, por 10min. Os espécimes foram removidos dos aparelhos nos dias 5, 10 e 15 para a realização das medidas de perfil. No estudo *in vitro*, o suco de laranja causou quatro vezes mais erosão do que o suco experimental, o qual, por sua vez, foi mais erosivo do que a água. Em relação ao estudo *in situ*, todas as bebidas testadas causaram uma perda de superfície ao longo do tempo, sendo que, em média, a água causou 0,19µm de perda, o suco experimental 0,41µm e o suco de laranja 2,54µm. O suco de laranja foi mais erosivo do que as outras duas bebidas em todos os tempos experimentais. O suco experimental somente causou erosão significativamente diferente da água no dia 15. Em conclusão, em ambos os modelos, o suco experimental se posicionou mais perto da água do que do suco de laranja.

No segundo estudo da série, West et al. (1999) compararam o potencial erosivo do mesmo suco de groselha preta modificado com cálcio (neste estudo, a quantidade de cálcio foi aumentada para 480ppm, na forma de hidróxido de cálcio, com pH de 3,85) com o de um suco de laranja disponível comercialmente (pH=3,95; 167ppm de cálcio), um suco de groselha preta sem aditivos (pH=2,85; 20ppm de cálcio) e a água (pH=7,8; 29ppm de cálcio). Os mesmos modelos *in vitro* e *in situ* do estudo anterior foram utilizados. Em ambos os modelos, em todos os tempos experimentais, as bebidas seguiram a seguinte ordem decrescente de erosividade: suco de groselha preta sem aditivos, suco de laranja, suco de groselha preta modificado e água. Assim, além do suco de laranja, o suco experimental também mostrou ser menos erosivo do que a bebida de groselha preta sem aditivos.

No último estudo que completa a série, Hughes et al. (1999b) realizaram as últimas modificações na composição do suco de groselha preta com cálcio (pH=3,8 e 400ppm de cálcio na forma de carbonato de cálcio) e compararam os efeitos erosivos desse suco com os efeitos de uma bebida de laranja concentrada (pH=3,0 e 20ppm de cálcio), um suco mix de maçã e groselha preta concentrado (pH=3,4 e 13ppm de cálcio), da água (pH=7,8 e 9,9ppm de cálcio) e de uma forma concentrada do suco de groselha preta, também modificada com cálcio (pH=3,8 e 195ppm de cálcio). As bebidas concentradas foram diluídas na proporção 50mL de bebida

concentrada para 200mL de água. Para este estudo seguiu-se a mesma metodologia *in situ* dos dois estudos anteriores, com apenas uma diferença: a leitura do perfil dos espécimes foi realizada nos dias 2, 5, 10 e 15. No geral, todas as bebidas, com exceção da água, causaram uma perda de estrutura progressiva em relação ao tempo. No final dos 15 dias, a seguinte ordem crescente de perda de estrutura foi observada: água, suco de groselha preta modificado com cálcio concentrado, suco de groselha preta modificado com cálcio, bebida de groselha preta e maçã e bebida de laranja concentrada. Apesar de ter existido uma ligeira diferença na perda provocada pelas duas bebidas modificadas com cálcio, essa não foi significativa. Ambas as bebidas modificadas foram capazes de produzir sete vezes menos erosão do que a bebida de groselha preta e maçã e vinte vezes menos do que a bebida de laranja.

Após a elaboração da bebida de groselha preta com menor potencial erosivo, Hunter et al. (2003) dirigiram esforços para desenvolver uma bebida de laranja carbonatada e uma bebida esportiva também com baixo potencial erosivo, através da adição de cálcio. O potencial erosivo dessas bebidas experimentais (o pH, a quantidade de cálcio e o sal que foi adicionado não foram descritos) foi comparado com o potencial erosivo de duas bebidas carbonatadas convencionais (Diet Coca-Cola® e Diet Tango®) e da água, usando uma metodologia *in vitro* e uma *in situ*. No estudo *in vitro*, espécimes de dente humano decíduo e permanente foram imersos nas suas respectivas bebidas teste por 4h no total. A cada 60min, as soluções foram substituídas. A variável resposta foi perda de superfície em μm . O estudo *in situ*, seguiu a mesma metodologia previamente descrita por West et al. (1998). No estudo *in vitro* não houve diferença entre a perda de superfície das bebidas experimentais em todos tempos experimentais. Ambas as bebidas experimentais foram menos erosivas do que as bebidas utilizadas para comparação, com exceção da água. Em relação ao estudo *in situ*, diferentemente do estudo *in vitro*, a água produziu uma perda progressiva de estrutura, de aproximadamente $0,5\mu\text{m}$ no final de 15 dias. Além disso, os resultados não foram consistentes com os do estudo *in vitro*. No final do experimento *in situ*, ambas as bebidas experimentais (bebida de laranja= $-1,24\mu\text{m}$ e bebida esportiva= $-0,85\mu\text{m}$) produziram erosão similar a Diet Coca-Cola® ($1,18\mu\text{m}$). Diante desse fato, os autores sugeriram que mais estudos serão necessários para se determinar o potencial erosivo das bebidas experimentais.

No mesmo ano, West et al. (2003) compararam os efeitos erosivos de uma bebida experimental de groselha preta carbonatada modificada com cálcio (pH= 4,0 e 410mg/L de cálcio) em relação a uma bebida de laranja carbonatada (pH 3,14, sem cálcio) e a água (pH 7,8 e 9,9mg/L de cálcio). A mesma metodologia *in situ* descrita em um estudo anterior (West et al., 1998) foi empregada, com uma diferença no período de duração do estudo, que saltou para 20 dias. A leitura dos espécimes foi realizada com um perfilômetro nos dias 2, 5, 10, 15 e 20. A bebida experimental foi significativamente menos erosiva do que a bebida de laranja em todos os tempos. Não foram encontradas diferenças significantes entre a bebida experimental e a água nos dias 2, 5 e 20, apenas nos dias 10 e 15. No entanto, a diferença nesses tempos foi pequena. Assim, a bebida carbonatada experimental se mostrou uma alternativa às bebidas carbonatadas convencionais para pacientes com risco de erosão.

Estudando a modificação de bebidas esportivas, Hooper et al. (2004) realizaram um estudo *in situ* para comparar o potencial erosivo de duas bebidas esportivas suplementadas com cálcio, uma contendo açúcar (pH=3,8 e 320ppm de cálcio) e a outra, maltodextrina (pH=3,8 e 35 ppm de cálcio); uma bebida esportiva convencional (pH=3,15 e 2,8ppm de cálcio); e a água (pH=6,8 e 10,2ppm de cálcio). A mesma metodologia *in situ* de um estudo anterior foi empregada (West et al., 1998). A perda de superfície dos espécimes foi avaliada nos tempos 5, 10 e 15 através de um perfilômetro. A bebida convencional causou significativamente mais erosão do que as outras bebidas testadas, em todos os tempos experimentais. A bebida com cálcio e maltodextrina causou mais erosão do que a água apenas no tempo experimental de 15 dias. As bebidas com cálcio não apresentaram diferenças significantes entre si. Dessa forma, os autores concluíram que a adição de maltodextrina, um polímero com uma longa cadeia de glicose, não interferiu com o baixo potencial erosivo da bebida esportiva modificada por cálcio. Baseados em estudos anteriores, a vantagem da substituição da sacarose por esse polímero seria a redução de um eventual desafio cariogênico também. Com esse estudo pode se concluir que o cálcio também se mostrou efetivo na redução do potencial erosivo de uma bebida esportiva.

Barbour et al. (2003a) investigaram a dissolução do esmalte humano em ácido cítrico (19,1mmol/L) em função de diferentes concentrações de cálcio e fosfato e diferentes graus de saturação em relação a hidroxiapatita (GS). O GS na solução

foi determinado com base nas concentrações de cálcio e fosfato e pelo pH, através de um programa de computador. De acordo com os autores, o entendimento do impacto desses fatores no potencial erosivo das bebidas é importante, uma vez que existe a hipótese que concentrações individuais de cálcio e fosfato não sejam importantes na determinação da taxa de dissolução do esmalte. Adicionalmente, esse entendimento ajudará a guiar as modificações realizadas nas bebidas ácidas com o objetivo de torná-las menos erosivas, a fim de que elas não tenham um pH ou concentrações de cálcio maiores do que o necessário. Este estudo foi dividido em duas partes: a primeira avaliou, através da nanoindentação e da microscopia de força atômica, o impacto de soluções de ácido cítrico com diferentes concentrações de cálcio e GS, porém, com a concentração de fosfato constante (0,57mmol/L). Na segunda, as soluções continham o mesmo GS, no entanto, diferentes concentrações de cálcio e fosfato. Todas as soluções tiveram o seu pH ajustado para 3,3, quando necessário. Espécimes de esmalte foram imersos em 50mL de suas respectivas soluções teste por 120 ou 300s, sob agitação. No tempo de 120s, em relação ao grupo que continha uma constante concentração de fosfato, os autores observaram uma dependência entre a dissolução do esmalte em relação a concentração de cálcio, com valores menores que 120mmol/L. Assim, até 120mmol/L, um pequeno aumento na concentração de cálcio da solução resultou num grande aumento da dureza do esmalte. O uso de concentrações de cálcio maiores do que 120mmol/L não mostrou diferenças significantes nos valores de dureza, em relação ao grupo dos espécimes não tratados (controle). Dessa forma, as concentrações de cálcio de 120mmol/L e a de fosfato de 0,57mmol/L foram suficientes para reduzir a dissolução causada pelo ácido cítrico com pH de 3,3, apesar dessa solução ainda não ser saturada em relação a hidroxiapatita, fato que foi explicado pela cinética da dissolução da hidroxiapatita. Durante esse processo, os íons cálcio se desprendem primeiro do que os íons fosfato. Portanto, se a solução é rica em cálcio, essa alta concentração inibe a saída de cálcio da superfície do esmalte. Em relação à segunda parte do estudo, as soluções com o mesmo GS, porém, com proporções cálcio/fosfato diferentes, causaram diferentes extensões de dissolução. A solução com uma proporção cálcio/fosfato=10 causou valores de dureza apenas levemente menores do que as amostras não tratadas. A proporção de 0,1 causou tanta dissolução quanto a solução de ácido cítrico sem aditivos, sendo que a proporção de 1,2 causou um grau intermediário de dissolução. Esses resultados reforçam a maior

eficiência da adição de cálcio em relação ao fosfato na redução do potencial erosivo de soluções ácidas.

Com o objetivo de elucidar os efeitos erosivos da adição de pequenas quantidades de cálcio (na forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; concentrações de 0,5; 1 e 1,5mmol/L), fosfato (na forma de KH_2PO_4 ; concentrações de 1,5; 3 e 4,5mmol/L) e flúor (NaF ; concentrações de 0,016; 0,031 e 0,047mmol/L) a uma solução de ácido cítrico (1%, pH=2,21), Attin et al. (2003) testaram diferentes combinações desses aditivos, formando 13 grupos teste. Espécimes de esmalte bovino foram submetidos as suas respectivas soluções, de acordo com um ciclo de erosão-remineralização em uma boca artificial. O ciclo consistia nos seguintes passos: 1min de imersão na solução desmineralizante, seguido por 1min de imersão em saliva artificial, cinco vezes ao dia. Esse ciclo foi repetido 3 vezes, com um intervalo de 8h de remineralização. A variável resposta foi a alteração de microdureza e a perda de superfície (em μm). A maior alteração de microdureza e a maior perda de superfície foram encontradas no grupo tratado com ácido cítrico sem suplementação. A menor alteração da microdureza foi encontrada no grupo que continha os três aditivos em combinação, nas seguintes concentrações (em mmol/L): 0,5 de cálcio; 0,5 de fosfato e 0,031 de flúor. O grupo com 1mmol/L de cálcio foi o que apresentou a menor perda de superfície. Com exceção do controle, o grupo com 1,5mmol/L de cálcio foi o que apresentou a maior perda de superfície. Diante desses fatos, os autores concluíram que, apesar dessas soluções não serem saturadas em relação a hidroxiapatita, elas mostraram ter um efeito anti-erosivo.

Baseado nos resultados do estudo anterior, Attin et al. (2005) avaliaram o potencial erosivo de diferentes bebidas ácidas (Coca-Cola®, Sprite®, Sprite Light® e suco de laranja) modificadas com a adição de 1mmol/L de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou a combinação de 0,5mmol/L de cálcio + 0,5mmol/L de fosfato (KH_2PO_4) + 0,031mmol/L de flúor (NaF). Espécimes de esmalte bovino foram submetidos às suas respectivas soluções teste, de acordo com o mesmo ciclo de erosão/remineralização descrito anteriormente (Attin et al., 2003). A variável resposta foi a perda de superfície, em μm . As bebidas testadas foram caracterizadas através de medições de pH e das suas concentrações de cálcio e fosfato. Adicionalmente, foi realizado um teste cego de sabor com as bebidas originais e modificadas. Esse teste envolveu 21 voluntários. Após experimentarem as bebidas, os voluntários eram questionados se haviam notado alguma diferença no sabor

delas. O Sprite® seguido pelo suco de laranja foram as bebidas mais erosivas. A Coca-Cola® foi a bebida que apresentou a menor perda de superfície, sendo que as duas modificações nela realizadas não foram efetivas na redução dessa perda. Em relação às outras bebidas, ambas as modificações reduziram os seus efeitos erosivos. Esse efeito foi mais pronunciado para a combinação de aditivos no suco de laranja. No Sprite® e no Sprite Light®, não houve diferença entre os efeitos protetores da modificação com cálcio e com a combinação de aditivos. Quanto ao teste de sabor, não houve diferenças na percepção do sabor da bebida original com as bebidas cega original e modificadas, o que sugere que os voluntários não foram capazes de diferenciar claramente o sabor da bebida original com o sabor das bebidas modificadas.

Jensdottir et al. (2005) realizaram um estudo para se avaliar as propriedades erosivas de dezesseis diferentes bebidas ácidas, assim como as modificações realizadas em uma delas (no caso, o suco de laranja) para se reduzir o seu potencial erosivo. As propriedades erosivas dessas bebidas foram determinadas através de medições de pH, titulação ácida, concentrações de cálcio e fosfato e grau de saturação em relação a hidroxiapatita. Os efeitos erosivos das bebidas foram avaliados pela alteração de peso de espécimes de esmalte humano após a imersão nas suas respectivas bebidas teste por 24h. Adicionalmente, também se avaliou a diferença do conteúdo de cálcio nas bebidas após a imersão dos espécimes, em comparação com o seu conteúdo de cálcio inicial. O suco de laranja foi modificado (a) através da adição de 6,67g/L de citrato de cálcio ou (b) através da adição de 4g/L de trifosfato de cálcio ou (c) através da adição de 8g/L de trifosfato de cálcio. Após 24h de imersão, a perda de peso dos espécimes variou de 0 a 9,9%, sendo que, para esse parâmetro, a bebida mais erosiva foi o suco concentrado de limão. O suco de laranja provocou uma perda de 1,3% de peso, enquanto que o suco modificado (a) também causou 1,3% de perda, em contraste com o 0,5% e 0,2% dos sucos (b) e (c), respectivamente. Em relação a perda de cálcio, o suco de laranja causou uma perda de 1,99mmol/L, enquanto que os sucos (a), (b) e (c) causaram, respectivamente, 4,4; 5,3 e 7,9mmol/L. A correlação entre a perda de peso e a liberação de cálcio não foi significativa. Baseados nos resultados da perda de peso, os autores concluíram que a modificação do suco de laranja ($\text{pH} < 4$) com a adição de sais de cálcio e fosfato foi uma medida válida para reduzir seus efeitos erosivos; no

entanto, eles advertem que a adição de grandes quantidades desses íons pode dar um gosto metálico e não agradável à bebida.

Com o objetivo de se estudar as bebidas modificadas com cálcio disponíveis comercialmente no mercado dos Estados Unidos, Davis et al. (2007) compararam o potencial erosivo dos sucos de uva (pH=3,2), maçã (pH=3,6), laranja (pH=4) e grapefruit (pH=3,4) e as suas respectivas versões modificadas com cálcio (pHs= uva: 3,2; maçã: 3,93; laranja: 4,33; grapefruit: 3,8). O pH e a titulação ácida dessas bebidas foram medidos. Em seguida, espécimes de esmalte e de dentina foram imersos em 250mL de suas respectivas bebidas teste por 25h, sob agitação, à temperatura ambiente. Os espécimes então foram seccionados para a obtenção de fatias e analisados em um microscópio de luz polarizada. As lesões foram fotografadas e as respectivas imagens analisadas em um programa de computador, para se medir a sua profundidade. Para esmalte, houve ausência de perda de superfície com os sucos de laranja, grapefruit e maçã modificados, enquanto que, para o suco de uva foi observada uma redução da erosão causada por ele em relação a sua versão sem aditivos. Para dentina, as versões modificadas dos sucos foram capazes de reduzir a perda de estrutura, com exceção do suco de uva. Uma forte correlação inversa foi encontrada entre o pH e a perda de superfície, fato que não ocorreu com a titulação ácida. Os pesquisadores comentaram que, além do efeito íon comum, o mecanismo através do qual a adição de cálcio a uma bebida ácida à base de ácido cítrico reduz seu efeito erosivo pode estar também relacionado à ligação desse íon com o citrato, evitando, assim, que o citrato se ligue ao cálcio do dente. Adicionalmente, foi salientado neste estudo que o consumo excessivo de cálcio pode ser tóxico e que, quando esses sucos modificados forem indicados para a prevenção de erosão, os profissionais devem levar em consideração o consumo de outras fontes de cálcio pelos pacientes.

Também estudando as bebidas comercialmente modificadas por cálcio, disponíveis no mercado norte-americano, Hara e Zero (2008) compararam os efeitos erosivos dessas bebidas em relação as suas respectivas versões originais. Na primeira fase do estudo, foram avaliados o pH, a titulação ácida e as concentrações de cálcio, fósforo e flúor dessas bebidas (Coca-Cola®, Calci-Coca-Cola®, Gatorade®, Calci-sport®, Faygo Orange Drink®, Calci-Orange drink®, 7-Up®, 7-Up plus®, Minute Maid Orange Juice®, Minute Maid Calcium Orange Juice®). Na segunda, espécimes de esmalte bovino foram imersos nas suas respectivas soluções teste nos diferentes

tempos experimentais: 0 (sem exposição, controle), 5, 10, 30, 60 e 120min. Após, os espécimes foram analisados em relação à microdureza e à perda de superfície. Em relação ao pH, os valores das bebidas modificadas com cálcio foram sempre maiores do que os respectivos produtos originais. Por exemplo, para o suco de laranja Minute Maid Original®, o valor de pH foi de 3,83, enquanto a sua versão com cálcio apresentou 4,08. Neste estudo, o pH foi um bom indicador do potencial erosivo das bebidas, enquanto que a titulação ácida não foi. As quantidades de cálcio total e iônico foram maiores para o suco de laranja Minute Maid Calcium® (respectivamente, 43,83mmol/L e 10,57mmol/L) em relação a todas as outras bebidas. Uma correlação inversa entre a concentração de cálcio e a progressão da erosão foi encontrada. Por exemplo, enquanto que o suco de laranja Minute Maid®, em sua versão original, causou uma perda de superfície de aproximadamente 2µm em 120min de exposição, a sua bebida correspondente modificada, não apresentou perda de superfície nesse tempo experimental, nem tampouco alteração da microdureza de superfície. No entanto, nem todas as bebidas com adição de cálcio foram efetivas em reduzir o potencial erosivo, como a 7-Up plus®. Esse fato foi atribuído a concentração de cálcio iônico dessa bebida, que foi menor do que a concentração encontrada nas outras bebidas modificadas. Os pesquisadores também citam uma possível influência do tipo de sal de cálcio presente (que variou entre as bebidas modificadas), o que podem diferir no que diz respeito a sua solubilidade e alterar algumas características da bebida.

Semelhantemente ao estudo de Attin et al. (2003), Magalhães et al. (2009a) investigaram a adição de baixas concentrações de cálcio (1mmol/L de cálcio na forma de lactato de cálcio), fosfato (1mmol/L de fosfato na forma de Na₂PO₄ · 2H₂O), flúor (0,047mmol/L de flúor na forma de fluoreto de sódio) e de ferro (1mmol/L de ferro na forma de FeSO₄) a uma bebida carbonatada à base de ácido cítrico. O ferro não foi testado no estudo de Attin et al. (2003). Durante um período de 24 horas, espécimes de esmalte bovino foram submetidos a seis ciclos de pH. Em cada ciclo, os espécimes foram imersos em 30mL das suas respectivas soluções teste durante 1min. Entre os desafios ácidos (50min) e no restante do tempo (18h), os espécimes foram imersos em saliva artificial. A variável resposta foi a perda de superfície, medida por um perfilômetro de contato. Os grupos que continham ferro e flúor, cálcio e fosfato, somente ferro, somente flúor, somente fosfato e todos os íons juntos não apresentaram perda significativamente diferente da bebida sem aditivos. Os grupos

com cálcio e cálcio+ferro foram os únicos que causaram uma perda significativamente menor do que o controle.

Seguindo a mesma linha do estudo anterior, Magalhães et al. (2010) investigaram a adição de íons de cálcio (lactato de cálcio, na concentração de 1mmol/L), fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1mmol/L), ferro (FeSO_4 ; 1mmol/L), flúor (NaF ; 0,047 e 0,89ppm) e suas respectivas combinações a uma solução de ácido cítrico (50mmol/L; pH 2,5). Espécimes de esmalte bovino foram imersos, sequencialmente, em 30 mL das suas soluções teste durante 1min, por seis vezes, no período 24h. Nos intervalos dos desafios erosivos (59min) e no restante do tempo (18h), os espécimes foram imersos em saliva artificial. A variável resposta era a perda de superfície (em μm). A média da perda de superfície causada pelo ácido cítrico sem aditivos foi de 1,74 μm . O ácido cítrico com cálcio causou uma perda de 1,31 μm ; o ácido com fosfato, 1,17 μm ; o ácido com ferro, 1,43 μm e o ácido com flúor, 0,87 μm . Diferente do estudo anterior (Magalhães et al. 2009a), nenhuma das soluções testadas foram capazes de reduzir significativamente a erosão causada pela solução de ácido cítrico.

2.5.2 Uso de polímeros de fosfato e gomas alimentares

Os polímeros de fosfato são substâncias formadas pela ligação de íons de fosfato (PO_4)⁻ (Harris et al., 1967). Inicialmente, alguns estudos investigaram o potencial desses compostos em reduzir a solubilidade e mineralização da hidroxiapatita, devido a sua capacidade de adsorver a essa superfície, formando uma barreira. Mais recentemente, estudos mais direcionados ao processo de erosão reportaram que esses compostos também possuem efeitos anti-erosivos quando adicionados a bebidas ácidas.

As gomas alimentares são polissacarídeos solúveis em água utilizados como aditivos de alimentos para conferir textura, evitar a formação de cristais e reter a umidade (Geshi et al., 2010). Em relação à erosão dental, estudos sugerem que algumas gomas, em especial a goma xantana, também possuem propriedades anti-erosivas, possivelmente devido a um mecanismo de ação semelhante ao dos polímeros de fosfato.

Com o objetivo de testar os efeitos de diferentes tipos de sais de sódio contendo fosfato (ortofosfato, pirofosfato, tripolifosfato, hexametafosfato e trimetafosfato) no controle da cárie dental, Harris et al. (1967) realizaram um estudo comparativo desses sais *in vivo*, usando um modelo com ratos. Neste modelo, 12 ratos foram distribuídos aleatoriamente entre os 5 tratamentos e o controle (ração especial com ou sem os aditivos). A duração do estudo foi de 13 semanas e a ração dos ratos e a água destilada eram oferecidas à vontade. Ao final do estudo, os molares dos ratos foram avaliados através de “scores”. Todas as rações contendo algum tipo de fosfato causaram uma redução significativa na cárie dental. O pirofosfato foi o que menos reduziu, enquanto que o trimetafosfato foi o que mais causou redução, seguido pelo hexametafosfato e pelo tripolifosfato. Os autores observaram que, apesar dos polímeros de fosfato se degradarem em ortofosfatos, eles apresentaram maiores poderes cariostáticos que os ortofosfatos em si.

Focando apenas no pirofosfato, Jung et al. (1973) realizaram um estudo para se verificar a ligação do pirofosfato aos cristais de hidroxiapatita. De acordo com os autores, o pirofosfato é efetivo na inibição de ambos, tanto a formação, quanto a dissolução dos cristais de hidroxiapatita. Essa inibição deve-se, muito provavelmente, à sua adsorção a esses cristais. Para se estudar a ligação desse componente a hidroxiapatita, os autores prepararam uma solução equilibrada de apatita, para que a dissolução dos cristais durante o experimento fosse minimizada. A essa solução foi adicionado o pirofosfato, num fluxo constante de 70µl/min por um período de 50min. Frações de 10mL da suspensão eram removidas em intervalos diferentes e a concentração de pirofosfato nessas frações foi então medida. A diferença entre a concentração inicial do pirofosfato e a mensurada nos intervalos de tempo correspondia ao quanto do composto se ligou à hidroxiapatita. Como resultado, houve um rápido desaparecimento de pirofosfato da solução, em função do tempo, principalmente no primeiro dia. Após, a curva atingiu um equilíbrio. Assim, os pesquisadores concluíram que o pirofosfato pode, de fato, ligar-se a hidroxiapatita, o que explica a sua ação inibidora da dissolução e da formação dos seus cristais.

Também investigando os efeitos de alguns polifosfatos na solubilidade e mineralização da hidroxiapatita, McGaughey e Stowell (1977) testaram os seguintes compostos: trimetafosfato (TMP), hexametafosfato (HMP), tripolifosfato (STP), pirofosfato (PP) e o ortofosfato. De acordo com os autores, com vistas à prevenção

de cáries, algumas propriedades desses compostos estão relacionadas com a inibição dessas lesões, tais como: redução da solubilidade ácida da hidroxiapatita, inibição da produção de ácidos bacterianos, bem como, formação de placa e o crescimento dos cristais. Para se determinar os efeitos da pré-exposição da hidroxiapatita a esses polifosfatos em relação a sua dissolução, 50mg de hidroxiapatita foram tratadas (com agitação constante) com 2mL dos polifosfatos, na qual a concentração utilizada foi ajustada a fim de se obter concentrações iguais de fosfato: 10mmol/L de PP, 6,7mmol/L de STP, 6,7mmol/L de TMP, 3,3mmol/L de HMP. O controle foi feito com pré-exposição a água destilada. O conjunto foi centrifugado, o sobrenadante removido e a hidroxiapatita lavada com 15mL de água destilada. A água então foi descartada e cada amostra de hidroxiapatita recebia 5mL de ácido acético a 5% por 20min. Esse conjunto foi novamente centrifugado e alíquotas do sobrenadante foram avaliadas em relação ao seu conteúdo de fosfato. Para se determinar os efeitos desses polifosfatos na mineralização da hidroxiapatita, 8mg de hidroxiapatita foram pré-tratadas com 0,5mL das soluções de cada um dos polifosfatos ou água. Em seguida, a hidroxiapatita foi agitada com 4mL de uma solução calcificante, por um período total de 3 dias. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas e suas alíquotas analisadas em relação aos conteúdos de cálcio e fosfato (subtraindo os conteúdos iniciais desses íons que já estavam presentes na solução calcificante). Foi observado que todos os polifosfatos testados reduziram o fosfato solubilizado pela hidroxiapatita na seguinte sequência: HMP>STP>PP>TMP. A inibição da ligação de íons cálcio a hidroxiapatita, no experimento de mineralização ocorreu na seguinte ordem: HMP>STP>PP>TMP. De acordo com os autores, o mecanismo através do qual os polifosfatos se ligam à hidroxiapatita é pela substituição de um íon fosfato do cristal por um monômero de fosfato do polifosfato. Os autores, portanto, confirmaram que todos esses polímeros não só reduzem a dissolução da hidroxiapatita, mas também a sua mineralização.

Sobre o pirofosfato, Melberg et al. (1988) realizaram um estudo para se avaliar os efeitos da adição de pirofosfato de sódio a 1% e de fluoreto de sódio a 0,02% no equilíbrio desmineralização/remineralização. De acordo com os autores, o pirofosfato é um agente que pode interferir no crescimento dos cristais de hidroxiapatita, e, por isso, é frequentemente presente em dentifrícios com ação anti-cálculo. No entanto, o crescimento de cristais, assim como a sua precipitação, é fundamental no processo de remineralização, um efeito natural protetor exercido

pela saliva contra cáries e erosão dental. Assim, os autores hipotetizaram que o pirofosfato possa interferir também nesse processo. Para este estudo, foi utilizado um modelo crossover *in situ* para cáries, onde 15 voluntários utilizaram um aparelho removível, contendo espécimes de esmalte e dentina, durante duas semanas. Esses espécimes eram cobertos por uma rede que permitia o crescimento de placa bacteriana e a formação da lesão de cárie artificial. Três enxaguatórios bucais foram avaliados: o primeiro continha pirofosfato de sódio e de potássio a 1%, Gantrez® (copolímero polivinilmetoxietileno maleico anidro) a 0,25% e fluoreto de sódio a 0,02%; o segundo continha apenas fluoreto de sódio a 0,02% e o terceiro era o placebo, que não possuía nenhum ingrediente ativo anticáries. Os voluntários realizaram bochechos com 10mL de seus respectivos enxaguatórios, por 1min, duas vezes ao dia. Foi observada uma perda mineral de 71,2% no grupo tratado com placebo. No grupo tratado com apenas flúor, a perda foi de 24,2% e no grupo com pirofosfato, a perda foi de 28,1%, sem diferenças significantes entre eles. Assim, os autores puderam concluir que a presença do pirofosfato não inibiu a remineralização do substrato dental pela saliva e nem pelo flúor.

Dando sequência a série de três estudos para a elaboração de uma bebida de groselha preta modificada com cálcio (pH 3,98 e 190ppm de cálcio), Hughes et al. (2002) realizaram uma nova modificação nessa bebida. O objetivo dessa nova modificação foi melhorar os parâmetros de sabor e estabilidade da bebida, uma vez que a adição do composto de cálcio causou um ligeiro aumento no seu pH. Neste novo estudo, os pesquisadores adicionaram uma goma alimentar a essa bebida, a goma xantana. A adição dessa goma causou uma ligeira queda no pH da bebida (pH=3,81 e 208ppm de cálcio). Os efeitos erosivos da nova bebida experimental foram comparados com os efeitos erosivos do suco de groselha preta modificado com cálcio somente e da água. Para essa comparação foi empregada a mesma metodologia *in situ* dos estudos anteriores (West et al., 1998), com apenas uma redução no tempo do experimento para 10 dias. A leitura do perfil dos espécimes foi realizada nos dias 2, 5 e 10. Houve diferenças significantes na perda de estrutura causada pelos sucos modificados apenas nos tempos experimentais de 5 e 10 dias. Ambas as bebidas modificadas causaram menos erosão do que o suco de laranja em todos os tempos experimentais. No tempo de 10 dias, a nova bebida experimental causou menos erosão do que a bebida com cálcio apenas; no entanto, ambas não foram diferentes da água em todos os tempos experimentais. Assim, os

autores concluíram que a adição da goma possibilitou melhorar os parâmetros da bebida modificada com cálcio, sem interferir no seu baixo potencial erosivo.

A partir dos resultados do estudo anterior, West et al. (2004) realizaram um estudo *in situ* para avaliar o potencial erosivo dessa nova bebida experimental modificada com cálcio e goma xantana. Este estudo utilizou a mesma metodologia *in situ* descrita em um estudo anterior (West et al., 1998), com as seguintes bebidas teste: (a) bebida de groselha modificada por cálcio e goma xantana, (b) bebida de groselha modificada por cálcio, (c) bebida de groselha sem aditivos, (d) água mineral. A leitura do perfil dos espécimes foi realizada nos dias 5, 10 e 15. Neste estudo *in situ* os autores comprovaram os resultados do estudo de Hughes et al. (2002), onde as bebidas (a) e (b) foram significativamente menos erosivas do que a bebida (c), sem diferença significativa entre (a) e (b). Assim, o baixo potencial erosivo de (b) foi mantido; no entanto, de acordo com os autores, a goma trouxe benefícios ao sabor e à estabilidade da bebida.

Para comprovar a capacidade de ligação do tripolifosfato de sódio à superfície dental, Shellis et al. (2005) estudaram os efeitos do pré-tratamento de um pó de hidroxiapatita com esse polifosfato, em relação a sua capacidade de interferir com a adsorção de um pigmento e proteínas salivares à hidroxiapatita. Os autores observaram que o tripolifosfato foi capaz de inibir a adsorção, tanto do pigmento, quanto das proteínas salivares, devido a sua capacidade de se ligar diretamente à superfície mineralizada ou através da película.

Com o objetivo de investigar os efeitos anti-erosivos de alguns polímeros aprovados para serem utilizados como aditivos de alimentos, Barbour et al. (2005b) adicionaram essas substâncias (na concentração de 0,02%) a uma solução de ácido cítrico 0,3%, com pH de 3,2. Entre os polímeros estudados havia algumas gomas alimentares (goma xantana, carboximetilcelulose, carragena iota, carragena kappa, goma gelana, goma de guar, goma arábica, goma de sementes e alfarroba e pectina) que são extensivamente utilizadas como agentes espessantes e geleificantes e ainda alguns fosfatos condensáveis (pirofosfato de sódio, tripolifosfato de sódio, hexametáfosfato de sódio), utilizados como preservativos em carnes e algumas bebidas não acólicas. Uma solução com a adição de 10mmol/L de cálcio, também foi testada, como comparação. Essa concentração de cálcio mostrou-se efetiva na redução do potencial erosivo de uma bebida ácida em estudos anteriores (Hughes et al., 1999a; Hughes et al.; 1999b; West et al., 1999). O efeito

erosivo das soluções foi testado através do método de pH-stat, numa tituladora automática. Neste método, 15mL de cada solução teste foi colocado dentro de um recipiente, sob agitação. O pH inicial da solução era então determinado. A reação iniciava quando um disco de hidroxiapatita de dimensões conhecidas era imerso na solução. Assim que o pH da solução aumentava, a tituladora realizava automaticamente a injeção de um ácido (HCl com concentração de 50mmol/L) para a manutenção do pH da solução no valor inicial. O tempo da reação foi ajustado para 30min. A quantidade total de ácido injetado era o fator que indicava o quanto de hidroxiapatita havia sido dissolvida. A solução com cálcio reduziu em 50% a dissolução da hidroxiapatita em comparação ao controle ácido cítrico sem aditivos. O hexametáfosfato reduziu em 64% a dissolução, seguido pelo tripolifosfato (46%) e o pirofosfato (35%). A combinação hexametáfosfato+goma xantana reduziu a dissolução em 70%, enquanto que somente a goma foi capaz de reduzir apenas 29%. O restante dos aditivos testados não reduziu significativamente a dissolução da hidroxiapatita em relação ao controle. De acordo com os autores, o fato das outras gomas testadas não demonstrarem o mesmo efeito protetor da goma xantana foi relacionado a baixa afinidade dessas gomas pela superfície da hidroxiapatita. Entre os polifosfatos, a melhor performance do hexametáfosfato foi atribuída ao maior comprimento de sua cadeia.

Para verificar a influência da saliva e da película no efeito protetor da erosão de alguns desses polímeros, Hooper et al. (2007) realizaram um estudo *in situ* randomizado, cego, com um design “crossover”, envolvendo 15 voluntários, com o objetivo de se avaliar o potencial erosivo de uma bebida experimental modificada com goma xantana, hexametáfosfato de sódio e cálcio. O delineamento experimental foi semelhante ao dos estudos anteriores (West et al., 1998). As seguintes bebidas foram testadas (todas possuíam o mesmo pH de 3,4 e a mesma titulação ácida): (1) bebida experimental sem aditivos, (2) bebida experimental com hexametáfosfato de sódio a 0,02%, (3) bebida experimental com hexametáfosfato de sódio a 0,02% e cálcio a 0,01% (CaCl_2), (4) bebida experimental com hexametáfosfato de sódio a 0,02% e goma xantana a 0,03%, (5) água mineral. A variável resposta foi a perda de superfície, em μm , medida nos dias 5 e 10. Como resultados, a bebida sem aditivos foi significativamente mais erosiva do que as outras, em todos os tempos experimentais. No dia 5, a água foi a bebida menos erosiva, seguida pela bebida (3). As bebidas (2) e (4) vieram logo em seguida, sem

diferenças significantes entre elas. No dia 10, praticamente o mesmo padrão se repetiu, com apenas algumas pequenas alterações, como a ausência de significância entre 2 e 3. Os autores então observaram que a adição de hexametáfosfato conferiu uma proteção aos espécimes contra o desafio erosivo, enquanto que a combinação desse aditivo com o cálcio forneceu uma proteção um pouco melhor. No entanto, como o cálcio não foi testado sozinho, não se pode afirmar se houve efeito sinérgico desse íon com o hexametáfosfato.

No mesmo ano, Hooper et al. (2007) avaliaram através de um estudo *in vitro* e *in situ* o efeito protetor de um dentifrício experimental contendo flúor (SnF_2 , pH=5,8) e hexametáfosfato de sódio contra erosão ácida. Ao contrário do hexametáfosfato presente em dentifrícios que tem como objetivo reduzir a formação de cálculo dental, a adição do composto neste estudo foi realizada com vistas as suas propriedades anti-erosivas demonstradas em estudos anteriores. O estudo *in situ* foi realizado de acordo com um modelo “crossover” e teve a duração de 15 dias. Neste estudo, um dentifrício fluoretado disponível comercialmente (NaF , pH=7,0) foi utilizado como controle positivo e a água (pH=7,8) como controle negativo. Os voluntários usaram os aparelhos removíveis contendo dois espécimes de esmalte das 9h às 17h. Às 9h, a eles foi solicitado bochechar por 1min uma mistura de dentifrício e água ou água somente, seguido pelo consumo de 250mL de suco de laranja (250mL/min durante 10min), 1 ou 3h depois. Esse mesmo procedimento era repetido às 13h. Cada voluntário recebeu, em ordem aleatória, cada tratamento do estudo durante três, dos 15 dias totais do estudo. A variável resposta foi a perda de superfície (em μm) que foi avaliada nos dias 5, 10 e 15 por um perfilômetro. No estudo *in vitro*, os mesmos produtos foram testados de acordo com o seguinte regime: os espécimes eram imersos nos produtos teste por 1min, lavados em água destilada e imersos por 20min, sob agitação, em suco de laranja. Esse procedimento foi repetido por 15 dias. A avaliação do perfil foi realizada nos dias 7 e 15. Em relação ao estudo *in situ*, no dia 5, os espécimes submetidos à água apresentaram a maior perda, seguido pelos espécimes tratados pelo dentifrício comercial. Os espécimes tratados com o dentifrício teste apresentaram a menor perda. Nos dias 10 e 15, o mesmo padrão foi repetido; no entanto, não houve diferenças significantes entre o dentifrício comercial e a água. No estudo *in vitro*, os mesmos resultados puderam ser observados. Os autores hipotetizaram que o mecanismo protetor do hexametáfosfato ocorre devido a ligação dos seus grupos fosfato aos íons de cálcio livre na superfície dental, criando

uma barreira protetora contra os ataques ácidos, que por sua vez não impede a penetração do flúor nos espaços interprismáticos, atingindo os locais onde é necessário para se prevenir cáries.

Com base nos promissores resultados obtidos nos estudos citados anteriormente, Baker e Parker (2007) registraram uma patente americana (US Patent 7,279,152 B2) para o uso dos polifosfatos como agentes redutores da erosão causada por bebidas ácidas (com pH entre 2,2 e 5,5). A patente descreve também que o uso da combinação desses polifosfatos com cálcio ou com polímeros viscosos, como a goma xantana, pode aumentar esse efeito protetor. O polifosfato é definido como um polímero de fosfato, onde o número de fosfatos é de pelo menos 3 e preferencialmente maior do que 12. Os polifosfatos utilizados devem ser apropriados para o uso em alimentos e ter concentração de 0,005 a 2g/L, preferencialmente entre 0,01 a 1g/L. De acordo com os autores, a adição desses compostos de fosfato não altera o sabor da bebida. Como exemplo da efetividade desses compostos, um estudo adicionou um polifosfato com uma cadeia linear com aproximadamente 17 monômeros a uma solução de ácido cítrico 0,03% (pH=3) em diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 3g/L), associado ou não a um sal de cálcio (carbonato de cálcio, quantidade suficiente para 80ppm de cálcio) ou a goma xantana (0,05% peso/volume). Espécimes de esmalte bovino foram imersos por 4h nas suas respectivas soluções teste e analisados por perfilometria ao final do experimento. Enquanto que a solução de ácido cítrico sem aditivos promoveu uma perda de, pelo menos, 40µm no perfil dos espécimes, a adição de 0,5g/L de polifosfato reduziu a perda para 20µm. A solução com cálcio resultou numa perda de, pelo menos 40µm; no entanto, a adição de 0,5g/L de polifosfato a essa solução reduziu a perda para apenas 6µm. O uso das outras concentrações de polifosfato (0,25 e 1g/L) também se mostraram efetivas, com exceção da concentração de 3g/L. A adição de 0,05% de goma xantana a essa mesma solução ácida reduziu a perda de esmalte para 5.6µm e, a combinação do polifosfato (0,5g/L) com a goma (0,05%) reduziu a perda para somente 1,2µm.

Mais recentemente, Beyer et al. (2010) investigaram os efeitos da adição de alguns polímeros alimentares (na concentração de 1%: a goma arábica, a pectina estereficada e o propilenoglicol alginato) em soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH (2,3; 3,3 e 4) em relação a redução do seu potencial erosivo. Espécimes de esmalte humano foram imersos nas suas respectivas soluções teste

por 30, 60 e 120s. Ao final do experimento, os espécimes tiveram a nanodureza de superfície e redução do módulo de elasticidade, avaliados. Como resultados, no pH de 2,3, a solução modificada com a goma arábica foi significativamente menos erosiva do que o controle em todos tempos experimentais. No pH de 3,3, no tempo experimental de 60s, os espécimes tratados com o alginato e a pectina foram significativamente menos erosivos do que os tratados com ácido cítrico. Para o pH de 4, os espécimes tratados com alginato apresentaram os maiores valores de nanodureza nos tempos de 30 e 60s em relação ao controle. Não houve diferença entre a redução do módulo de elasticidade para nenhum dos grupos. De acordo com os autores, o mecanismo protetor desses polímeros pode ser atribuído à sua adsorção a superfície do esmalte, alguns devido à presença de grupos aniônicos, como o alginato, que se ligam ao cálcio da superfície, geleificando e formando uma matriz de gel, e outros como a goma arábica, adsorvem a nanopartículas da hidroxiapatita, formando ligações eletrostáticas e de hidrogênio com íons positivamente carregados (como o cálcio), formando uma camada protetora. Os autores comentaram que a proteção desses polímeros também pode estar relacionada ao aumento da viscosidade da solução que eles promovem.

2.5.3 Uso de outros compostos e métodos

Além da suplementação com cálcio, fosfato e alguns polímeros alimentares, outros compostos ou métodos também foram propostos para a redução do potencial erosivo de uma solução ou bebida ácida.

Em relação a suplementação com flúor, Sorvari et al. (1988) avaliaram os efeitos erosivos, em dentes de ratos, da adição de 15ppm de flúor (NaF) ou 38,5ppm de magnésio ($MgSO_4$), ou então ambos, a uma bebida esportiva (pH= 3,2). As bebidas teste foram oferecidas à vontade aos ratos durante 42 dias. A superfície lingual dos primeiros molares inferiores foi escolhida para a análise. Essa superfície era posicionada em uma lupa estereoscópica, onde eram localizadas e circundadas as áreas intactas e erodidas. Essas áreas circundadas eram analisadas em um programa de computador. No grupo onde a bebida não continha aditivos, 48% da superfície apresentava-se com erosão. A adição de flúor, em combinação ou não

com magnésio, mostrou um efeito protetor, enquanto que a adição somente de magnésio não mostrou nenhum efeito.

Para se verificar a possibilidade de substituição de um ácido com alto potencial erosivo por um de baixo potencial em bebidas esportivas, Meurman et al. (1990) avaliaram *in vitro* os efeitos erosivos de duas bebidas esportivas experimentais, uma com ácido cítrico e a outra com ácido málico (respectivamente, pH de 5,54 e 5,58) em comparação à outras bebidas esportivas disponíveis comercialmente (uma reconhecidamente com alto potencial erosivo e, portanto, controle positivo) e a água. No primeiro experimento, os autores avaliaram a dissolução da hidroxiapatita da seguinte forma: 5mg de hidroxiapatita foi adicionada a 5mL de cada bebida teste em pequenos tubos de plástico. Os tubos foram agitados por 30min e centrifugados por 15min. A concentração de cálcio no sobrenadante foi analisada por espectrometria de emissão atômica. No segundo, espécimes de esmalte bovino foram imersos em 50mL das bebidas teste, sob agitação por 5, 30 e 120min. A erosão causada pelas bebidas na superfície dos espécimes foi analisada através de perfilometria e microdureza Vickers. Em relação ao primeiro experimento, ambas as bebidas experimentais apresentaram valores de cálcio menores do que as outras e a quantidade de cálcio da bebida experimental com ácido cítrico foi maior do que a com ácido málico. No segundo experimento, os autores observaram ausência de erosão nos espécimes tratados com a bebida que continha o ácido málico e também com a água. Na bebida que continha o ácido cítrico, apenas uma pequena quantidade de erosão pode ser observada. O controle positivo foi significativamente mais erosivo do que as bebidas teste. Assim, os autores concluíram que a substituição do ácido cítrico pelo málico em bebidas esportivas pode reduzir o seu potencial erosivo.

Com o objetivo de avaliar os efeitos erosivos da manipulação do pH e da quantidade de ácidos de soluções contendo diferentes ácidos orgânicos, Hughes et al. (2000) estudaram o potencial erosivo dos ácidos cítrico, málico e láctico; nas concentrações de 0,1; 0,35 e 0,6g/100mL e pHs de 2,8; 3,3; 3,8. Para testar os efeitos da adição de cálcio a uma solução de ácido cítrico (na concentração de 0,24g/100mL), dois experimentos também foram conduzidos: no primeiro, testou-se a adição de crescentes concentrações de cálcio (de 0 a 0,0496g/mL, na forma de carbonato de cálcio) ao ácido cítrico, com pH de 3,8; no segundo, foi avaliada a adição de uma concentração fixa de cálcio (0,0248g/100mL) a mesma solução de

ácido cítrico, porém, como valores de pH variando de 3 até 4,4. Foram utilizados espécimes de esmalte humano. Esses espécimes foram imersos em 250mL das suas respectivas soluções por 30min, a 35°C. A variável resposta foi perda de superfície, em μm , medida por perfilômetro ótico. Os autores observaram que para os três ácidos, o pH, a concentração do ácido e a interação entre esses dois fatores, contribuem para a erosão. Nos extremos, o mais baixo pH e a mais alta concentração do ácido resultaram em maior erosão, ao mesmo tempo que o pH mais alto e a mais baixa concentração do ácido resultaram em menor erosão. Comparando o potencial erosivo desses ácidos na mesma concentração e pH, os autores puderam concluir que o ácido láctico foi o mais erosivo. Não houve diferença significativa entre os ácidos cítrico e málico. Em relação ao primeiro experimento com cálcio, os autores observaram que todas as concentrações de cálcio testadas foram capazes de reduzir em, pelo menos, 50% a erosão, sendo que uma baixa concentração (0,0198g/mL) foi necessária para se atingir esse efeito. Em relação ao segundo experimento, foi observado que um aumento do pH da solução foi capaz de reduzir progressivamente o seu potencial erosivo, ao ponto que no pH de 4,4 não houve erosão detectável pelo método. Os autores assim concluíram que a manipulação do pH e da concentração de ácido, bem como a adição de relativamente baixas concentrações de cálcio à uma bebida, que possui ácidos orgânicos na sua composição, pode ser feita para reduzir seu potencial erosivo; no entanto, eles também mencionam os efeitos adversos que isso pode provocar, principalmente, os relacionados à aceitabilidade dessa bebida.

Barbour et al. (2003b) investigaram a dissolução do esmalte humano em soluções de ácido cítrico (38,1mmol/L) com diferentes pHs (entre 2,30 e 6,30), para se determinar se um pequeno aumento no pH da bebida era suficiente para reduzir o seu potencial erosivo. Para este estudo, foram utilizados espécimes de esmalte humano. Estes foram imersos em 50mL nas suas respectivas soluções teste (n=8) por 120s, a 500rpm de agitação. A variável resposta foi a perda de nanodureza e redução no módulo de elasticidade. Não foram encontradas diferenças na dureza dos espécimes após a exposição às soluções com pHs no intervalo de 2,3-2,9. Acima desse valor, houve uma dependência linear entre dureza e pH. Houve um aumento no módulo de elasticidade com o pH para todas as soluções. De acordo com os autores, o platô encontrado na dureza dos espécimes expostos as soluções com valores de pH entre 2,3 e 2,9 não indica que essas soluções não são diferentes

quanto ao seu potencial erosivo. Sugeriu-se que existe um valor mínimo possível de dureza do esmalte desmineralizado. Assim, se o esmalte continuar exposto a solução ácida, ocorrerá perda de estrutura e a camada de esmalte logo abaixo será então exposta e submetida ao desafio ácido. Com a continuação da exposição, a dureza atinge um valor constante, independente do tempo de exposição, que indica a dureza mínima possível. Portanto, os espécimes submetidos às soluções com pH no intervalo de 2,3 a 2,9 apresentaram o mínimo valor de dureza possível, antes da perda de estrutura. Um aumento do pH de 3,2 a 3,9 resultou em um aumento de dureza de apenas 15%. Assim, os pesquisadores concluíram que, em termos de modificações de bebidas, esse estudo indicou que um pequeno aumento no pH da bebida causa somente uma pequena redução na sua taxa de dissolução e, portanto, outros métodos são mais indicados com esse propósito, como a adição de cálcio, por exemplo.

Para estudar os efeitos erosivos da adição de cobre (10mmol/L, na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a uma solução de ácido acético (10mmol/L, pH=3,2), Brooks et al. (2003) utilizaram um sistema abiótico. Neste sistema, espécimes de esmalte humano eram imersos por 1min, sob agitação, em 7 recipientes contendo 1mL de ácido acético, na sequência. No recipiente 4, além do ácido, havia o cobre. Para o controle, o mesmo procedimento foi repetido, no entanto, não havia cobre no recipiente 4. Para se determinar a dissolução de esmalte em cada recipiente, as quantidades de cálcio e fosfato foram avaliadas após as imersões. Para se determinar os efeitos da adição de diferentes concentrações de cobre, os autores utilizaram um pó de esmalte humano. Inicialmente, 1mg desse pó era adicionado a soluções de ácido acético contendo diferentes concentrações de cobre (0-8,75mmol/L). O conjunto era agitado por 30s e na sequência centrifugado por mais 30s. O sobrenadante foi removido no tempo de 1min e 40s e o conteúdo de fosfato era então determinado. Em relação ao primeiro experimento, a presença do cobre no recipiente 4 foi responsável por reduzir em 57% a perda de cálcio e em 63% a perda de fosfato. Essa redução também foi observada no recipiente 5. Em relação ao segundo experimento, foi encontrada uma dose resposta entre as concentrações de cobre até 5mmol/L e a dissolução do esmalte, no entanto, com concentrações de cobre acima desse valor, o grau de proteção atingiu um platô. Os autores comentaram que o possível mecanismo protetor do cobre está relacionado a ligação dos íons cobre no lugar dos íons cálcio no esmalte. Com essa ligação, a

concentração de cálcio no meio aumentaria, diminuindo assim a taxa de desmineralização. Os pesquisadores também especularam que a ligação do cobre no lugar do cálcio deixaria a superfície da apatita mais estável devido a maior densidade de carga do cobre, o que também reduziria a taxa de desmineralização.

Ramaligan et al. (2005) estudaram os efeitos erosivos da adição do composto CCP-ACP (fosfopetideo de caseína – fosfato de cálcio amorfo), em diferentes concentrações (0,063%, 0,09%, 0,125%, 0,25%) a uma bebida esportiva. Espécimes de esmalte humano foram imersos em 50mL de suas respectivas soluções teste por 30min. No final do experimento, esses espécimes tiveram seu perfil avaliado com um perfilômetro. Adicionalmente, foi realizado um teste de sabor com a bebida original e a bebida modificada por 0,125% de CCP-ACP. Foi observado que, com o aumento da concentração do CPP-ACP, o pH da bebida aumentou e a sua titulação ácida diminuiu. Todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir os efeitos erosivos da bebida esportiva, com exceção da concentração de 0,063%. No teste de sabor, os voluntários não foram capazes de distinguir o sabor das duas bebidas. Assim, concluiu-se que o CCP-ACP foi capaz de reduzir a erosão causada pela bebida esportiva, sem causar nenhuma alteração no seu sabor.

Focando apenas no grau de saturação em relação a hidroxiapatita (GS), Barbour et al. (2005a) avaliaram a erosão provocada por duas soluções de ácido cítrico de concentração 19,1mmol/L, com pH de 3,3, e diferentes GS. A água mineral foi utilizada como controle. O GS foi calculado com a fórmula, utilizando um programa de computador:

$$GS = \left[\frac{\{Ca^{2+}\}^5 \{PO_4^{3-}\}^3 \{OH^-\}}{\{Ca_5(PO_4)_3(OH)\}} \right]^{1/9}$$

Uma das soluções apresentava GS=0 e, a outra, GS=0,032. A água apresentava GS=0,673. Espécimes de esmalte foram imersos, sob agitação, em 50mL das suas respectivas soluções teste. A variável de resposta foi a perda de dureza. As indentações foram realizadas com um nanoindentador nos seguintes tempos experimentais: 30, 60, 120, 300 e 600s. Foi observada uma perda na dureza e uma redução no módulo de elasticidade nos espécimes submetidos as soluções de ácido cítrico. No entanto, a perda de dureza dos espécimes do grupo ácido cítrico com GS=0,032 foi mais lenta do que no de GS=0. Por exemplo, os autores não

encontraram diferenças significantes entre a perda de dureza no tempo 30s, para o GS=0 e 60 s para o GS=0,032. Assim, foi sugerido que apenas uma pequena mudança no GS, sem mudar o pH, de uma solução ácida pode reduzir o seu potencial erosivo. De acordo com os autores, esse fato deve ser considerado na formulação de bebidas com baixo potencial erosivo, uma vez que

Para estudar as propriedades anti-erosivas do ferro, Buzalaf et al. (2006) avaliaram os efeitos da adição de diferentes concentrações de ferro (0,625; 1,25; 2,50; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90 e 120mmol/L, na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a uma solução de ácido acético, em relação a dissolução da hidroxiapatita. Usando uma metodologia similar a de Brooks et al. (2003), este estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento, 40mg de pó de hidroxiapatita foi adicionado a 0,4mL de ácido acético (10mmol/L). O conjunto foi agitado por 30s e imediatamente centrifugado por mais 30s. O sobrenadante foi removido no tempo de 1min e 40s e o seu conteúdo de fósforo foi então determinado. Esse procedimento foi repetido para as soluções de ácido contendo as diferentes concentrações de ferro. No segundo experimento, espécimes de esmalte bovino foram imersos por 1min em um recipiente contendo 1mL da solução de ácido acético (10mmol/L, pH=3,2). Após esse minuto, o conjunto era centrifugado e o espécime era sequencialmente imerso em mais seis recipientes contendo a mesma quantidade do mesmo ácido; todavia, no recipiente 4, havia a adição de 15mmol/L de ferro. O conteúdo de fósforo liberado em cada recipiente foi analisado. Em relação ao primeiro experimento, o conteúdo de fósforo em solução diminuiu com o aumento da concentração de ferro. A solução de 15mmol/l diminuiu a dissolução do pó de hidroxiapatita em 50%. Concentrações de ferro acima da citada não provocaram nenhum efeito extra na dissolução. Em relação ao segundo experimento, a presença de ferro no recipiente 4 reduziu significativamente a perda de fosfato (em torno de 45%) quando comparado com o recipiente 1. Esse efeito foi mantido até o recipiente 7. Os autores especularam que o mecanismo envolvido no efeito protetor do ferro pode estar relacionado a formação de uma camada fina de óxido de ferro hidratado sobre a superfície dental. Contudo, devido aos valores máximos diários de toxicidade do ferro, uma bebida eventualmente modificada com 15mmol/L desse composto deveria ter seu consumo reduzido a apenas 70mL por dia.

Na sequência, Kato et al. (2007) avaliaram a adição de ferro (na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em diferentes concentrações (1,25; 2,50; 5; 10; 15; 30 e 60mmol/L) a

duas bebidas ácidas carbonatadas, a Coca-Cola® e o Sprite Zero®, em relação a sua capacidade de reduzir a dissolução de um pó de esmalte bovino. Assim, os autores adicionaram 1mg do pó de esmalte a 1µl da bebida e agitaram a mistura por 30s. Em seguida, o conjunto foi centrifugado por 30s e a solução sobrenadante foi removida após 1min e 40s. Esse procedimento foi repetido cinco vezes para cada bebida teste contendo as diferentes concentrações de ferro. O fosfato liberado na solução sobrenadante foi então determinado. Para a Coca-Cola®, a adição de ferro na concentração de 15mmol/L ou menor não mostrou nenhum efeito na redução da dissolução do pó de esmalte. O ferro, nas concentrações de 30 e 60mmol/L, reduziu a dissolução em, respectivamente, 11 e 17%. Para o Sprite Zero®, a adição de ferro até 10mmol/L não mostrou nenhum efeito; porém, concentrações maiores desse composto aumentaram a dissolução do pó de esmalte. De acordo com os autores, o fato da adição de ferro em altas concentrações ter reduzido a dissolução do esmalte na Coca-Cola®, porém não no Sprite Zero®, pode estar relacionado aos diferentes tipos de ácido dessas bebidas. O Sprite Zero® tem ácido cítrico, que possui um reconhecido potencial quelador de íons inorgânicos. Assim, foi postulado que o ferro pode ter sido quelado pelo ácido cítrico, liberando íons H^+ no meio, diminuindo ainda mais o pH da bebida.

Ainda em relação ao ferro, Sales-Peres et al. (2007) avaliaram os efeitos de se bochechar um enxaguatório experimental contendo ferro (10mmol/L na forma de sulfato de ferro) após desafios erosivos ou erosivo-abrasivos. Para este estudo, foi utilizado um modelo *in situ*, “crossover” de 5 dias. Um dia antes de cada dia teste, os voluntários usaram o aparelho para permitir a formação da película adquirida. Em cada dia teste, os aparelhos removíveis eram imersos, fora da boca, por 5min em 150mL de uma bebida à base de cola. Após, os voluntários do grupo sem bochecho inseriam o aparelho na boca. Os voluntários do grupo bochecho o realizavam por 1min antes de inserir o aparelho na boca. Em seguida, os espécimes designados a escovação após 1min de erosão, eram escovados pelos próprios voluntários. O mesmo ocorreu com os espécimes designados a serem escovados após 30min. A variável resposta era a perda de superfície em µm, medida por um perfilômetro e alteração da microdureza superficial. Para os espécimes de esmalte submetidos a erosão somente, a alteração da microdureza foi menor para o grupo que fazia o bochecho com ferro em relação ao grupo sem bochecho. No entanto, isso não ocorreu para os espécimes submetidos à escovação posterior. Em relação à perda

de estrutura, não houve diferenças significantes entre os grupos que fizeram o bochecho, em relação ao grupo que não o fez. Para dentina, não houve diferenças entre a microdureza dos grupos, enquanto que o bochecho com ferro reduziu significativamente a perda de estrutura, tanto após a erosão apenas quanto para a erosão seguida de abrasão. Assim, os autores concluíram que o bochecho com a solução de ferro após o ataque erosivo/abrasivo foi uma alternativa viável para se reduzir a erosão causada pela bebida à base de cola.

Em relação às proteínas alimentares, Barbour et al. (2008) desenvolveram um estudo para se determinar os efeitos da adição de caseína a soluções de ácido cítrico, em concentrações e pHs representativos de algumas bebidas ácidas mais comuns, em relação a sua capacidade de reduzir a dissolução da hidroxiapatita. Para este estudo foi utilizado o método do pH-Stat. Neste método, uma tituladora automática foi programada para manter o pH das soluções teste num valor constante durante a dissolução de um disco de hidroxiapatita, através da adição de alíquotas de HCl (50mmol/L), num “feedback negativo”. Antes da exposição às soluções teste, o disco era previamente exposto a 15mL de uma solução de ácido cítrico 0,3%, por 30min, para padronização. Assim, cada solução teste tinha seu próprio controle de ácido cítrico. No primeiro experimento, a solução de ácido cítrico com 0,02% de caseína (na forma de caseinato de sódio) e a mesma solução sem aditivos foram testadas em diferentes pHs: 2,8; 3; 3,2; 3,4 e 3,6. Em um segundo experimento, tendo com base a mesma solução de ácido cítrico, no entanto, com o pH fixo de 3,2, foram testadas diferentes concentrações de caseína: 0,002; 0,02 e 0,2%. Em seguida, a solução de ácido cítrico (pH=3,2) com ou sem caseína (0,02%) receberam cálcio (na forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) até atingir as concentrações de 5, 10, 20 e 50mmol/L. Finalmente, no último experimento, os discos de hidroxiapatita foram pré-expostos a um “pool” de saliva humana por 120min. Depois, foram expostos a uma solução de ácido cítrico e a essa mesma solução suplementada com 0,02% de caseína. Em relação ao primeiro experimento, houve uma dependência linear da dissolução da hidroxiapatita, com ou sem caseína, em função do pH, no entanto, em todos os valores de pH, a dissolução da solução com caseína foi significativamente menor do que o controle. A redução da dissolução da hidroxiapatita no pH de 3,2 não foi afetada pelas diferentes concentrações de caseína utilizadas (as três reduziram a dissolução em torno de 50%). Na ausência de caseína, a dissolução da hidroxiapatita reduziu com as crescentes concentrações de cálcio, no entanto,

quando a caseína estava presente, as concentrações de 5 e 10mmol/L de cálcio resultaram em maior redução, diferente do que ocorreu nas concentrações de 20 e 50mmol/L de cálcio. Nessas concentrações, não houve diferença na presença ou não de caseína. Para finalizar, a presença da película salivar não interferiu com os efeitos protetores da caseína. O efeito protetor da caseína foi explicado pela sua ligação a superfície dental, formando uma barreira protetora. Todavia, os autores especulam que essa barreira seja pequena, uma vez que a inibição parece ser saturada com a concentração de 0,002% de caseína. Outro achado importante é que a presença da película salivar não interferiu no efeito protetor da caseína.

Hemingway et al. (2008) realizaram um estudo para avaliar a adição da ovoalbumina do ovo em soluções ácidas, em relação a sua capacidade de reduzir a dissolução da hidroxiapatita, em função do pH, da concentração de cálcio e do tipo de ácido. Para este estudo foi utilizado o mesmo método de pH-Stat do estudo de Barbour et al. (2008). No primeiro experimento, foram testadas soluções de ácido cítrico a 0,3% contendo duas diferentes concentrações de ovoalbumina (0,02% e 0,2%), nos seguintes valores de pH: 2,8; 3; 3,2; 3,6 e 4. Para investigar a adição de cálcio a essas soluções foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 20 e 50mmol/L (o cálcio foi adicionado na forma de CaCl_2). Para se testar o efeito do tipo de ácido, 0,2% de ovoalbumina foi adicionada aos ácidos cítrico, málico e láctico, no valor de pH de 3. Em relação à primeira investigação, na faixa de pH testada, a adição de ovoalbumina reduziu a dissolução da hidroxiapatita de 50-75% para a concentração de 0,2% e de 30-50% para a de 0,02%. A maior concentração reduziu significativamente a dissolução em todos os valores de pH, enquanto que, para a menor concentração, isso não ocorreu para os valores de pH de 3,6 e 4. Quando o cálcio foi adicionado a solução, a combinação de cálcio e ovoalbumina reduziu em 45-60% a dissolução em comparação com a solução de ácido contendo cálcio apenas. Isso ocorreu para todas as concentrações de cálcio, com exceção da de 50mmol/L. A ovoalbumina não causou uma redução significativa na dissolução da hidroxiapatita nos ácidos málico e láctico. De acordo com os autores, o mecanismo no qual a ovoalbumina é capaz de reduzir a dissolução da hidroxiapatita está provavelmente relacionado a adsorção de suas moléculas nos sítos de dissolução da hidroxiapatita, formando uma barreira protetora semi-permeável.

Com uma proposta diferente, Syed e Chadwick (2009) investigaram a adição de leite com o objetivo de se reduzir o potencial erosivo de bebidas carbonatadas

(Coca-Cola®: pH=3,56, Pepsi Max®: pH=3,86, Diet Coke®: pH=4,1, Sprite®: pH=3,72, 7-Up®: pH=3,38, Lucozade de laranja®: pH=3,82) *in vitro*. Para a modificação das bebidas, 6,25mL de leite foram adicionados a 25mL de cada bebida teste (valores de pH após a adição do leite: Coca-Cola®: pH=6,67, Pepsi Max®: pH=6,66, Diet Coke®: pH=6,75, Sprite®: pH=5,56, 7-Up®: pH=5,36, Lucozade de laranja®: pH=5,13). A titulação ácida dessas bebidas foi realizada. Em seguida, espécimes de esmalte humano foram imersos em 60min de suas respectivas bebidas teste. Ao final, os espécimes foram avaliados por microdureza e perda de superfície. Os autores observaram um aumento no pH e diminuição da titulação ácida quando o leite era adicionado às bebidas. Em relação à microdureza de superfície, a adição de leite a todas as bebidas causou uma menor redução de dureza em comparação às suas respectivas versões originais, com exceção do Sprite®. Em relação à perda de superfície, não houve diferenças significantes entre as bebidas originais e modificadas. Os autores concluíram que a adição de leite às bebidas carbonatadas pode reduzir, no geral, a sua capacidade de provocar erosão dental.

Recentemente, Hemingway et al. (2010) realizaram um estudo *in vitro* para se avaliar a adição da caseína (na concentração de 0,2%) e da ovoalbumina (a 0,2%) a soluções de ácidos cítrico (0,3%), málico, láctico (nos pHs de 2,8; 3,2 e 3,8) e cinco bebidas disponíveis comercialmente. Previamente ao início do estudo, os espécimes foram expostos a um “pool” de saliva humana por 2h e secos. Após, uma fita adesiva foi colocada sobre a superfície deixando uma janela de 2mm exposta. Os espécimes foram então submetidos a 100mL de suas respectivas soluções teste, por 10min. Em seguida, eles foram avaliados em um perfilômetro, visando obter-se a perda de superfície. Em relação ao ácido cítrico, a adição de 0,2% de ovoalbumina reduziu a erosão em 46% no pH de 2,8; 44% no pH de 3,2 e 61% no pH de 3,8. A adição de caseína ao ácido cítrico reduziu a erosão em 76% no pH de 2,8; 78% no pH de 3,2 e 59% no pH de 3,8. Nos valores de pH de 2,8 e 3,2, a caseína causou a maior redução na erosão do que a ovoalbumina, ao passo que, no valor de pH de 3,8, não houve diferença entre as proteínas. No ácido málico, a ovoalbumina somente reduziu a erosão significativamente (19%) no pH de 3,2 e a caseína reduziu em 45% a erosão no pH de 2,8 e em 29% no pH de 3,2. Entretanto, não houve redução no pH de 3,8. No ácido láctico, a ovoalbumina reduziu a erosão em 15% no pH de 2,8; 16% no pH de 3,2 e 57% no pH de 3,8. A caseína reduziu em 36% no pH 2,8; 33% no pH 3,2 e 70% no pH de 3,8. Nas bebidas ácidas, a ovoalbumina reduziu

significativamente a erosão apenas em uma delas (Robinson's Fruit Shoot®). A caseína reduziu a erosão significativamente em todas as bebidas, com exceção de uma de laranja. Dessa forma, com base nesse estudo, os autores observaram que as proteínas usadas podem interagir com o esmalte e também com a película adquirida. Assim, é possível que as proteínas aumentem as propriedades restritoras de difusão de íons da película. O fato das proteínas apresentarem um melhor efeito no ácido cítrico foi atribuído ao citrato que possivelmente pode estabilizar essa película protetora de caseína e saliva.

Manton et al. (2010) realizaram um estudo para se determinar os efeitos erosivos da adição de CCP-ACP (na concentração de 0,2%) a duas diferentes bebidas ácidas (uma carbonatada com sabor de limão e a outra, não-carbonatada de lima, ambas nas versões com açúcar e diet). A água destilada foi utilizada como controle negativo. Espécimes de esmalte humano foram imersos em 50 mL de suas respectivas bebidas teste durante 30min. A variável resposta foi perda de superfície, medida por um perfilômetro ótico. A adição do CCP-ACP aumentou ligeiramente o pH das bebidas e diminuiu a sua titulação ácida. As bebidas com o CCP-ACP foram significativamente menos erosivas que suas respectivas versões originais. As bebidas modificadas também não causaram uma perda significativamente diferente da água. De acordo com os autores, o possível mecanismo protetor do CCP-ACP está relacionado ao aumento da disponibilidade de íons de cálcio e fosfato na superfície do dente. Adicionalmente, também foi postulado que os nanocomplexos de CCP-ACP se liguem a superfície da apatita, reduzindo o número de sítios possíveis para a dissolução.

2.6 Dos métodos de avaliação da erosão dental

Barbour e Rees (2004) revisaram os diferentes métodos *in vitro* de análise da erosão dental em esmalte. A primeira técnica descrita foi a microdureza e a nanodureza de superfície. De acordo com os autores, essas técnicas são úteis para se determinar os estágios iniciais da erosão, uma vez que a dissolução do esmalte envolve o “amolecimento” da superfície devido ao enfraquecimento de sua estrutura. Em ambas as técnicas, uma ponta de diamante de dimensões conhecidas é

pressionada contra a superfície teste com certa carga e por um determinado período de tempo. A microindentação fornece o resultado em números Knoop (KHN) ou Vickers (VHN), enquanto a nanoindentação fornece a dureza e o módulo de elasticidade. A principal diferença entre os métodos é a escala da indentação. Enquanto que a microdureza em esmalte sadio produz profundidades na ordem de micrometros, a nanoindentação causa profundidades na ordem de submicrometros (nanômetros). Outra diferença importante está no fato de que, na microindentação, a medida de dureza é dada pela mensuração das dimensões da marca do indentador deixada na superfície, investigando apenas a deformação plástica, enquanto que, na nanoindentação, as deformações plásticas e elásticas são determinadas, uma vez que a carga aplicada é monitorada continuamente durante a indentação. A principal desvantagem de ambas as técnicas é que o esmalte precisa ser polido previamente. A perfilometria, outra técnica que foi descrita, também exige um polimento prévio dos espécimes e, devido ao fato de medir a perda de estrutura e não o “amolecimento”, ela é indicada para estágios mais avançados de erosão. O perfilômetro pode ser de contato ou a laser. Na técnica de contato, uma pequena ponta de diamante (20µm) percorre a superfície do espécime a uma velocidade de aproximadamente 10mm/min. Para se obter a profundidade da lesão, parte da superfície é protegida com fita adesiva ou esmalte de unha e parte é deixada exposta aos agentes erosivos. Na perfilometria a laser, a ponta de diamante é substituída pelo laser e não há contato físico direto entre a sonda e a superfície de esmalte. Dessa forma, não ocorrem danos nem riscos na superfície desmineralizada. A microradiografia é outra técnica na qual um feixe de raio-x incide sobre a superfície do esmalte e uma placa fotográfica ou um contador de fótons são utilizados para se medir a penetração da radiação. O grau de preto do filme ou a densidade dos fótons fornecem um mapa da densidade mineral do esmalte. Existem três tipos utilizados: a longitudinal, onde são utilizados finos cortes dos espécimes; a transversal, utilizada na maioria dos estudos; e a independente do comprimento de onda, utilizada para se determinar o conteúdo mineral no dente todo. Essa técnica permite se identificar ambos, a perda de estrutura e o amolecimento. Outros possíveis métodos são as análises químicas, que são úteis na investigação da cinética e termodinâmica da dissolução do esmalte e da hidroxiapatita. Assim, pode-se medir os conteúdos de cálcio e fósforo liberados em solução, geralmente por espectrometria de emissão atômica ou por métodos colorimétricos. O pH-stat é uma

técnica frequentemente utilizada para se estudar a dissolução pura da hidroxiapatita, mas também tem sido utilizada para estudos de erosão. Esse método se baseia na reação de dissolução da hidroxiapatita ou do esmalte, onde ocorre a liberação de íons hidroxila para o meio. Assim, quando o esmalte ou a hidroxiapatita entra em contato com uma solução ácida (de pH 3,3, por exemplo), eles começam a se dissolver liberando íons hidroxila, que se ligam aos íons hidrogênio da fonte ácida, neutralizando-os, o que resulta em um aumento do pH da solução. O aparelho do pH-Stat então age como um mecanismo de “feedback” negativo, adicionando automaticamente um ácido a essa solução para manter o pH no mesmo valor inicial (3,3). Medindo a taxa necessária de ácido para se manter o pH da solução constante, é possível calcular a taxa de dissolução do esmalte ou hidroxiapatita num valor de pH escolhido. Apesar de esses métodos serem sensíveis e acurados, eles somente nos fornecem valores das concentrações de íons liberados; sendo assim, metodologias adicionais para se avaliar diretamente a superfície dos espécimes também devem ser empregadas. Neste estudo, os autores também revisam os métodos de análise de erosão por imagens microscópicas; entretanto, eles esclarecem ser difícil de quantificar o grau de erosão por esses métodos.

Ganss et al. (2005) compararam diversos métodos quantitativos de análise da perda de estrutura por erosão dental: análise de cálcio e fósforo liberados em solução, microradiografia longitudinal e perfilometria de contato. De acordo com os autores, a microdureza de superfície não foi incluída nesta investigação, uma vez que esse método é mais recomendado para se avaliar estágios iniciais de erosão, diferente do que ocorreu. Para este estudo foram utilizados espécimes polidos de esmalte humano. Cada espécime foi imerso em 10mL de ácido cítrico a 0,05mmol/L nos tempos de 30, 60, 90 e 120min. O cálcio liberado em solução foi medido através da espectrometria de emissão atômica. O fósforo foi obtido por um método colorimétrico. Com essas duas concentrações, a perda mineral foi calculada. Como resultado, todos os métodos mostraram uma perda de superfície linear de acordo com o tempo. Os métodos apresentaram boa correlação entre si; todavia, a perfilometria e a microradiografia apresentaram menores valores de perda (em torno de 20%) em relação as análise de cálcio e fósforo. Após 30min de exposição ao ácido, a microradiografia não mostrou correlação com os outros métodos.

Attin (2006) também revisou os principais métodos de avaliação da erosão e, de acordo com o autor, devido ao fato da erosão dental possuir dois padrões, a

perda e o “amolecimento” dos tecidos duros dentais, a sua avaliação deve englobar ambos os fenômenos de superfície, por exemplo, através da medição da alteração de dureza superficial e da perda de estrutura em si. Complementando as informações já descritas no artigo de Barbour e Rees (2004), em relação à microdureza de superfície para o esmalte, o autor comentou que a medida da dimensão da indentação pode ser realizada logo após a sua confecção; contudo, para a dentina, devido à flexibilidade desse substrato, deve-se esperar um tempo para a medição da indentação. Quando se utilizou a carga de 500g, uma espera de 24h foi necessária; no entanto, o tempo de espera para cargas menores ainda não foi determinado, mas especula-se que seja um tempo menor. Adicionalmente, o pesquisador relata que em superfícies submetidas a desafios erosivos muito agressivos, as indentações aparecem com formatos estranhos e a obtenção de medidas precisas é dificultada. Outra precaução a ser tomada é quanto ao uso de cargas baixas (em torno de 50g), uma vez que não só as redondezas são alteradas pela indentação, mas também a superfície que está dez vezes distante, considerando-se o tamanho da indentação. Em relação à perfilometria, no modo de contato, o autor discute que a camada desmineralizada mais externa muitas vezes é danificada ao se passar a ponta de diamante. Adicionalmente, no perfilômetro a laser, a precisão é maior, de aproximadamente 10 nm em altura. Todavia, o perfilômetro a laser pode ir além do limite nas bordas agudas no fundo das ranhuras, resultando em artefatos de técnica. Outra limitação da técnica é a magnitude do processo erosivo. A dissolução da superfície após um ataque ácido deixa uma superfície rugosa, dessa maneira, uma detecção precisa de perdas menores que 1µm é difícil de ser detectada pelo método; entretanto, existem estudos que reportam que o perfilômetro foi capaz de distinguir perdas de superfície menores que esse valor; mas, o autor cita que, para se obter uma medição correta nesses casos, a superfície deve estar muito bem planificada e polida.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in situ* o potencial erosivo do suco de laranja modificado por cálcio e alguns polímeros alimentares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi feito em parceria com o Oral Health Research Institute, da Indiana University, localizado em Indianapolis, Estado de Indiana, Estados Unidos da América, local onde ele foi conduzido. Ambas as partes que o constituem, a *in vitro* e a *in situ*, receberam a aprovação do Comitê de Ética local (IUPUI/Clarian Institutional Review Board) antes da sua realização (respectivamente, Anexos A e B).

4.1 Delineamento Experimental

Este estudo foi dividido em quatro fases, sendo as três primeiras realizadas *in vitro* e, a quarta, *in situ*:

- Primeira Fase: cinco substâncias e suas respectivas combinações foram adicionadas a um suco de laranja comercial (totalizando 15 formulações) e o potencial erosivo dessas soluções foi comparado utilizando o método de pH-Stat, em triplicata. A variável resposta foi o volume de titulador (HCl a 0.1N) utilizado, em mL.
- Segunda Fase: seis sucos selecionados da primeira fase e os controles (negativo e positivo) foram testados em espécimes de esmalte e dentina humanos (n=10), utilizando um modelo de ciclagem erosão-remineralização. Um fator único e um modelo randômico foram empregados. A variável resposta foi perda de superfície, em μm , para esmalte e dentina, e microdureza de superfície, determinada pelo número de dureza Knoop, para esmalte.
- Terceira Fase: o mecanismo de ação dos aditivos foi investigado mais detalhadamente, através da separação do modelo de ciclagem em dois testes independentes: desmineralização somente e remineralização. O substrato utilizado nesta fase foi o esmalte bovino (n=5). A variável resposta foi a perda de superfície (em μm) e/ou a microdureza de superfície, determinada pelo número de dureza Knoop.

- Quarta Fase: os aditivos mais efetivos na redução da erosão causada pelo suco de laranja nas fases 2 e 3 foram testados com um modelo *in situ*, crossover, cego, de 5 fases, envolvendo 10 voluntários que se encaixavam nos critérios de inclusão/exclusão. Os fatores avaliados foram suco de laranja (em 5 níveis: suco de laranja sem aditivos; suco de laranja modificado com lactato de cálcio; suco de laranja modificado com hexametáfostato de sódio; suco de laranja modificado com lactato de cálcio e hexametáfostato de sódio e suco de laranja modificado com cálcio, disponível comercialmente) e desafio ácido (em 4 níveis: 0 [controle]; 10; 20 e 30min). Os voluntários foram designados a receber os cinco sucos teste em uma ordem randômica. Eles usaram aparelhos palatinos removíveis contendo oito espécimes de esmalte bovino, quatro em cada lado da boca. Dois espécimes foram randomicamente selecionados e removidos dos aparelhos após cada desafio erosivo, um de cada lado do aparelho. A variável resposta foi a alteração da microdureza de superfície (em %). Antes dos procedimentos clínicos, os voluntários participaram de um estudo cego de sabor, onde o suco modificado designado para aquela fase foi cegamente comparado com o suco sem aditivos. A variável resposta foi a percepção de diferença no sabor dos sucos, respondidas com sim ou não. Respostas positivas a essa pergunta requeriam uma descrição qualitativa da diferença observada.

4.2 Primeira Fase

4.2.1 Preparo dos sucos teste

Nesta fase, cinco substâncias, aprovadas para serem usadas em alimentos, foram adicionadas, sozinhas ou em combinação, a um suco de laranja disponível comercialmente (Minute Maid Original®, The Coca-Cola Company, Atlanta, GA, EUA), criando os grupos experimentais mostrados no Quadro 4.1. Os aditivos escolhidos para este estudo foram: Lactato de cálcio pentahidratado (Fisher Scientific Pittsburgh, PA, EUA); Hexametáfostato de sódio (Thermos Inc., Cheshire,

RU); Tripolifosfato de sódio (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Pirofosfato de sódio tetrabásico (Sigma Aldrich Co., EUA) e Goma xantana (Keltrol R; CP Kelco UK, Leatherhead, RU). As quantidades utilizadas foram baseadas em publicações prévias (HUGHES et al., 1999a; HUGHES et al., 1999b; WEST et al., 1999; BARBOUR et al., 2005b; HOOPER et al., 2007). O suco sem aditivos foi o controle negativo (C-) e o suco modificado com cálcio, disponível comercialmente (Minute Maid Calcium®, The Coca-Cola Company, Atlanta, GA, EUA), foi o controle positivo (C+) (Figura 4.1). Este último suco contém aproximadamente 40mmol/L de cálcio (HARA; ZERO, 2008), na forma de tricálcio fosfato, monocálcio fosfato e lactato de cálcio. Após a adição das substâncias, os sucos que apresentaram uma alteração nos valores de pH, tiveram o seu pH ajustado para o valor de pH do suco sem aditivos (3,8) com a adição de NaOH a 0,1N ou HCl a 0,1N (Fisher Scientific Pittsburgh, PA, EUA). Os valores de pH foram determinados com o uso de um eletrodo de pH calibrado (Accumet 13-620-530; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Em seguida, os sucos tiveram seu potencial erosivo testado com o método de pH-Stat.

Código do Grupo	Aditivos e suas concentrações (em g/L)
C-	nenhum
Ca	3,1 de Lactato de cálcio pentahidratado (Ca)*
XG	0,2 de Goma xantana (XG)
HMP	0,2 de Hexametáfosfato de sódio (HMP)
STP	0,2 de Tripolifosfato de sódio (STP)
PP	0,2 de Pirofosfato de sódio tetrabásico (PP)
Ca+XG	3,1 de Ca + 0,2 de XG
Ca+HMP	3,1 de Ca + 0,2 de HMP
Ca+STP	3,1 de Ca + 0,2 de STP
Ca+PP	3,1 de Ca + 0,2 de PP
XG+HMP	0,2 de XG + 0,2 de HMP
XG+STP	0,2 de XG + 0,2 de STP
XG+PP	0,2 de XG + 0,2 de PP
Ca+XG+HMP	3,1 de Ca + 0,2 de XG + 0,2 de HMP
Ca+XG+STP	3,1 de Ca + 0,2 de XG + 0,2 de STP
Ca+XG+PP	3,1 de Ca + 0,2 de XG + 0,2 de PP
C+	Lactato e Fosfato de cálcio

*Quantidade suficiente para fornecer 10mmol/L ou 0,4g/L de cálcio

Quadro 4.1 – Grupos experimentais e seus respectivos códigos, os aditivos e as concentrações utilizadas

Sucos de laranja testados: o suco da esquerda é o original e o da direita, a sua versão modificada com cálcio

Eletrodo de pH

Figura 4.1 – Sucos e o eletrodo de pH utilizados no estudo

4.2.2 Método pH-stat

O teste de pH-stat foi realizado em uma tituladora automática (Titralab 856, Radiometer Analytical, Lyon, FR). Inicialmente, 25mL de cada suco teste era colocado em um recipiente, sob agitação constante (100rpm) e o seu pH era mensurado. Após, ainda sob agitação, 25mg de um cristal de hidroxapatita anidra (Acros Organic, Geel, BE) era introduzido no suco e a análise então se iniciava. Assim, a tituladora automática adicionava alíquotas do titulador (HCl 0,1N; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) no recipiente, numa taxa de 0,5mL/min, de acordo com uma função de “feedback” negativo, onde o pH da solução era mantido no valor inicial (no caso, 3,8) por um período pré-determinado de 5min. Após esse período, o volume total de HCl (em mL) necessário para manter o pH inicial era obtido. Para cada suco, o teste foi repetido por 3 vezes, de maneira aleatória. A Figura 4.2 mostra uma representação da sequência do método do pH-stat.

Figura 4.2 – Representação da sequência do método de pH-stat

4.2.3 Análise dos dados

As médias e os desvios-padrão foram calculados das triplicatas.

4.3 Segunda Fase

Nesta fase, seis sucos selecionados da primeira fase (Ca, Ca+HMP, HMP, PP, STP, XG) e os controles (C+ e C-) foram testados com um modelo de ciclagem de erosão-remineralização. Para se avaliar os efeitos individuais de cada aditivo,

foram escolhidos os sucos em que cada substância havia sido adicionada isoladamente. A única combinação testada foi a de cálcio com hexametáfosfato de sódio. A escolha dessa combinação específica foi baseada no seu promissor efeito anti-erosivo, demonstrado na primeira fase deste estudo e também em estudos anteriores (Hooper et al., 2007).

4.3.1 Preparo dos espécimes

Espécimes de esmalte e de dentina radicular (4x4x2mm) foram usados para este teste. Esses espécimes foram obtidos de molares humanos que foram limpos com curetas periodontais, para a remoção de restos teciduais, e submetidos à profilaxia, com uma mistura de pedra-pomes e água, aplicada com escova de Robinson. Os dentes ficaram armazenados em solução de timol a 0,1% (Sigma-Aldrich Co.), sob refrigeração a 4°C, até a época do seu uso. As coroas dos dentes foram separadas das raízes em uma cortadeira automática (Isomet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluf, IL, EUA). Em seguida, as coroas e as raízes foram novamente seccionadas para a obtenção de fragmentos de esmalte e dentina. Esses fragmentos foram fixados em placas de acrílico com cera pegajosa, para serem, finalmente, cortados no tamanho de 4x4xmm, com o uso de dois discos de diamante, separados por um espaçador de 4mm (Figura 4.3). Após, as superfícies pulpares dos fragmentos foram planificadas em uma politriz (RotoPol31/RotoForce4, Struers Inc., Cleveland, Ohio, EUA) com o uso de uma lixa abrasiva de granulação 500 (MD-Fuga, Struers), até que os fragmentos atingissem uma espessura de 2mm.

Figura 4.3 – Sequência para a obtenção dos fragmentos de esmalte e dentina de 4x4mm

Os fragmentos foram observados em lupa estereoscópica (Nikon SMZ1500, Nikon Inc., Melville, NY, EUA) e os que apresentaram trincas ou algum outro defeito de estrutura foram excluídos. O restante foi incluído em resina acrílica (Varidur, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), de forma que cada espécime continha um fragmento de esmalte e um de dentina. Após, os espécimes foram fixados em blocos (Struers Inc.) para serem planificados e polidos (RotoPol 31/RotoForce 4, Struers Inc.). Para esse procedimento, foram utilizados discos abrasivos de granulação 500, 1200, 2400 e 4000 (MD-Fuga, Struers Inc.), sob refrigeração. O polimento final foi realizado com disco de feltro e suspensão de diamante (1 μ m; Struers Inc.). Em seguida, os espécimes foram lavados com água deionizada e submetidos a um banho de ultrassom por 3min. A Figura 4.4 mostra a sequência de inclusão e polimento dos espécimes da segunda fase.

Figura 4.4 – Sequência de inclusão em resina acrílica e polimento dos espécimes da segunda fase

4.3.2 Mensuração da microdureza de superfície (MDS) inicial nos fragmentos de esmalte

Após o preparo dos espécimes, a mensuração inicial da MDS foi conduzida apenas nos fragmentos de esmalte. Assim, três indentações foram realizadas na porção central dos espécimes, com o uso de um indentador Knoop (2100 B, Instron Corporation, Wilson Instruments, Norwood, MA, EUA), com 50g de carga, por 15s, com uma distância de 100 μ m entre elas. A média dessas três indentações foi calculada e os espécimes com valores similares de MDS (entre 317 a 380, em números Knoop) foram selecionados. Em seguida, as superfícies polidas receberam uma fita adesiva de UPVC, que deixou uma janela central de 4x1mm exposta. A Figura 4.5 mostra o microdurômetro utilizado, uma representação das 3 indentações realizadas no centro do espécimes de esmalte e o espécime com a fita adesiva.

Figura 4.5 – Microdurômetro utilizado, representação das 3 indentações realizadas no centro do espécime e espécime com a fita adesiva delimitadora

4.3.3 Desafio Erosivo

Oitenta espécimes (contendo um fragmento de esmalte e um de dentina cada) foram aleatoriamente distribuídos nos oito grupos experimentais ($n=10$). Após, eles foram submetidos a um modelo de ciclagem de erosão-remineralização (Figura 4.6). Um ciclo completo consistia na imersão dos espécimes por 5min nas suas respectivas soluções teste (10mL por espécime), sem agitação, à temperatura ambiente; seguido pela imersão por 60min em 10mL de saliva artificial (composição no Quadro 4.2), com agitação de 150rpm, na temperatura ambiente. Esse ciclo foi repetido por 6 vezes ao dia, durante 5 dias. Após os períodos de erosão e de remineralização, os espécimes foram lavados com água deionizada e gentilmente secos com papel absorvente. Durante o período da noite, os espécimes foram armazenados em saliva artificial (com agitação de 150rpm, na temperatura ambiente).

Reagentes*	Concentração g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,213
KH ₂ PO ₄	0,738
KCl	1,114
NaCl	0,381
Tampão Tris	12
Mucina gástrica de porco	2,2

*O pH da saliva foi ajustado para o valor de 7,0 com o uso de HCl concentrado

Quadro 4.2 – Composição da saliva artificial

Figura 4.6 – Ciclo de erosão-remineeralização utilizado na segunda fase

4.3.4 Determinação da erosão causada pelas bebidas teste

Após a ciclagem, a fita adesiva foi removida dos espécimes e a superfície teste foi analisada com um perfilômetro ótico (Proscan 2000, Scantron, Tauton, RU), para a determinação da perda de superfície (PS). O sensor do aparelho escaneou uma área de 2mm de comprimento (no eixo X) por 1mm de largura (eixo Y) no centro do espécime. Esse comprimento cobriu ambas, a área tratada e as superfícies de referência (onde a fita estava posicionada), nos dois lados. O aparelho foi programado para percorrer um número de 200 passos, com um tamanho de 0,01mm, no eixo X. No eixo Y, o tamanho dos passos foi de 0,05 mm, e o número de 20. Com o uso de um software específico (Proscan Application software version 2,0,17), a profundidade da lesão foi calculada baseada na subtração da média da altura da área teste, em relação a média da altura das superfícies de referência. A Figura 4.7 mostra o perfilômetro ótico utilizado e duas imagens resultantes do seu escaneamento na superfície.

Figura 4.7 – Perfilômetro ótico e duas imagens resultantes do seu escaneamento, uma de esmalte (inferior) e a outra de dentina (superior), de espécimes submetidos a um desafio erosivo

Adicionalmente, nos espécimes de esmalte, a mensuração final da MDS foi conduzida, com os mesmos parâmetros descritos anteriormente (item 4.3.2). Nesta medida final, três indentações foram realizadas na área da lesão. A média dessas três indentações representou a MDS final.

4.3.5 Análise estatística

A homogeneidade e a normalidade dos dados foram verificadas com os testes de Hartley e Shapiro-Wilks. Uma vez que essas premissas foram satisfeitas, one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey foram conduzidos para a comparação entre os grupos. O software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA) foi usado para os cálculos, com o nível de significância de 5%.

4.4 Terceira Fase

Nesta fase, foram testadas as mesmas soluções da segunda fase. No entanto, para se investigar mais detalhadamente o mecanismo de ação dos aditivos, o modelo de ciclagem de erosão-remineralização foi separado em dois modelos: um somente de erosão e o outro de remineralização.

4.4.1 Preparo dos espécimes

Este teste utilizou espécimes de esmalte bovino (5x5x2mm). Esses espécimes foram obtidos de incisivos bovinos (coletados de um matadouro), que ficaram armazenados em solução de timol a 0,1% até a sua utilização. Desses dentes, fragmentos de esmalte foram cortados do terço médio da superfície vestibular. As secções para a obtenção dos fragmentos com dimensões de 5x5mm foram realizadas em uma cortadeira automática, de modo semelhante ao descrito no

item 4.3.1. Após, as superfícies pulpares dos fragmentos foram planificadas em uma politriz (RotoPol31/RotoForce4, Struers Inc.) com o uso de uma lixa abrasiva de granulação 500 (MD-Fuga, Struers). Em seguida, a superfície externa foi planificada e polida (com a seguinte sequência de lixas abrasivas 500, 1200, 2400, 4000 e suspensão de diamante de 1µm, Struers Inc.), resultando em fragmentos de 2mm de espessura. Os espécimes com trincas ou outro defeito de superfície foram descartados. No final desses procedimentos, os espécimes foram fixados em blocos de acrílico, para a leitura inicial da MDS (Figura 4.8).

Espécime de esmalte bovino 5 x 5 x 2 mm fixado com cera pegajosa em bloco de acrílico

Figura 4.8 – Espécime de esmalte bovino 5x5x2mm fixado no bloco de acrílico

4.4.2 Mensuração da microdureza inicial nos fragmentos de esmalte

A mensuração da MDS inicial foi realizada de forma similar a descrita no item 4.3.2, onde foram selecionados espécimes com valores de MDS semelhantes (313-

376, em números Knoop). Estes espécimes tiveram as fitas adesivas colocadas na sua superfície, mantendo uma janela de 5x1mm exposta. Essa foi a superfície teste.

4.4.3 Modelo de erosão

Quarenta espécimes de esmalte bovino foram aleatoriamente divididos nos mesmos oito grupos experimentais da segunda fase ($n=5$). Na sequência, eles foram imersos em 10mL das suas respectivas soluções teste por um período total de 150min, sem agitação, na temperatura ambiente. Nos tempos experimentais de 30, 90 e 150min, os espécimes foram avaliados em relação a PS, utilizando os mesmos parâmetros da segunda fase, e MDS, com a realização de três indentações na área da lesão em cada tempo experimental (Figura 4.9)

Figura 4.9 – Representação esquemática do modelo de erosão

4.4.4 Modelo de remineralização

Quarenta espécimes de esmalte bovino foram aleatoriamente divididos nos mesmos grupos experimentais da segunda fase ($n=5$). Em seguida, eles foram imersos em 10mL de suas respectivas soluções teste por 30min. Após esse período,

a segunda medição de MDS foi realizada. Na sequência, eles foram imersos em saliva artificial por 24h e a mensuração final de MDS foi conduzida (Figura 4.10)

Figura 4.10– Representação esquemática do modelo de remineralização

4.4.5 Análise estatística

A homogeneidade e a normalidade dos dados foram verificadas com os testes de Hartley e Shapiro-Wilks. Uma vez que essas premissas foram satisfeitas, one-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey foram conduzidos para a comparação entre os grupos. O software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA) foi usado para os cálculos, com o nível de significância de 5%.

4.5 Quarta Fase

Nesta fase, as substâncias que apresentaram os melhores resultados na diminuição do potencial erosivo do suco de laranja nas segunda e terceira fases (Ca, HMP e Ca+HMP) foram testadas com um modelo de erosão *in situ*. Os mesmos controles (positivo e negativo) das fases anteriores foram utilizados.

4.5.1 Aspectos éticos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Indiana University (IUPUI Institutional Review Board, processo número 1004-53, Anexo B). Dez voluntários (quatro do sexo masculino e seis do sexo feminino), com uma média (desvios-padrão) de idade de 39 (12) anos, participaram deste estudo, após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C). Esse termo de consentimento foi realizado com base nas regulamentações governamentais norte-americanas de proteção aos participantes do estudo, e incluem os elementos básicos especificados no Código de Regulamentações Federais dos EUA, 12 CFR 50.25(a).

Os seguintes critérios foram seguidos para a inclusão dos voluntários no estudo:

- ter pelo menos 18 anos de idade;
- apresentar uma boa saúde geral;
- ter um fluxo salivar estimulado (pela mastigação de pedaços de uma goma sem sabor, Wrigley Company, Chicago, IL, EUA) e não estimulado de >0.2 mL/min e >1.0 mL/min, respectivamente;
- não apresentar sinais de erosão dental, cáries ativas ou doença periodontal.

Os critérios de exclusão do estudo foram:

- condição médica que possa interferir na segurança do voluntário durante o período do estudo, como diabetes ou reações alérgicas a bebidas cítricas;
- gravidez ou intenção de engravidar durante o período do estudo;
- estar em outro estudo no mesmo período;
- demonstrar incapacidade de realizar os procedimentos experimentais requeridos.

Os voluntários podiam desistir do estudo a qualquer momento, por qualquer razão, se assim o desejassem. Os pesquisadores também podiam remover os voluntários do estudo, caso achassem necessário. Se os voluntários fossem removidos por condições médicas ou odontológicas, eles seriam encaminhados à profissionais da área e monitorados pelos pesquisadores do estudo até a resolução do problema, ou até que este se tornasse clinicamente não significativo.

Os voluntários receberam orientações específicas sobre o uso dos sucos testados. Esses sucos foram testados sempre sob supervisão de um pesquisador e somente no local do estudo. Os produtos não foram ingeridos.

Para o preparo dos sucos modificados, os aditivos foram pesados e misturados ao suco imediatamente antes do primeiro dos três desafios erosivos do dia, para cada voluntário. Para esse procedimento, foram utilizados instrumentos estéreis e recipientes limpos. A pessoa que realizou esse procedimento estava paramentada com luvas, máscara, touca de cabelo e avental descartável. A balança analítica (AB135-S, Mettler Toledo, Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, EUA), utilizada para pesar os aditivos, foi previamente limpa e desinfetada. Os sucos de laranja foram comprados em um supermercado local e foram armazenados sob refrigeração até o dia de seu uso.

4.5.2 Preparo dos espécimes

Para este estudo foram utilizados espécimes de esmalte bovino (5x5x2mm), preparados da mesma forma descrita no item 4.4.1.

4.5.3 Mensuração da MDS inicial

Para esta medida, foram realizadas cinco indentações (com uma distância de 100 μ m entre elas) no centro do espécime com o uso de um indentador Knoop, com 50g de carga, por um período de 15s (2100 HT, Wilson Instruments). Quatrocentos espécimes com uma média de comprimento de indentação de 43($\pm$ 3) μ m foram selecionados e esterelizados com exposição a gás de etileno por uma hora, em condições úmidas, a 55°C (8XL esterelizador/aerador, 3M Health Care, St. Paul, MN, EUA). Após a aeração por 12h, nas mesmas condições de umidade e temperatura, os espécimes foram lavados três vezes, por 15min, em água deionizada.

4.5.4 Preparo dos aparelhos palatinos

Aparelhos palatinos de acrílico, capazes de acomodar dois aparatos de plástico (5mm largura x 28mm comprimento x 2.3mm altura) foram confeccionados de forma personalizada (Figura 4.11). Os aparatos foram feitos do material polieterimida (Ultem®, GE Plastics, Pittsfield, MA, EUA) e eram capazes de receber 4 espécimes cada. Os aparatos possuíam 4 recessos que mantinham uma fenda uniforme de 1mm entre eles e o espécime. Esse espaço permitia o contato livre da saliva e dos sucos com a superfície dos espécimes e, também, os protegiam de distúrbios mecânicos (Figura 4.12). Os aparatos de plástico eram fixos aos aparelhos palatinos com o uso de cera pegajosa (Figura 4.13). Antes do início do experimento, os voluntários tiveram a consulta de prova dos aparelhos, onde os ajustes necessários foram feitos.

Figura 4.11 – Aparelho palatino de acrílico contendo os dois recessos de 5mm de largura x 28mm de comprimento x 2,3mm de altura, para a acomodação dos aparatos de plástico que carregavam os espécimes

Figura 4.12 – Aparatos de plástico que carregavam os espécimes

Figura 4.13 – Aparelho palatino com os aparatos fixos com cera pegajosa

4.5.5 Procedimentos Experimentais

Antes dos procedimentos experimentais, os voluntários foram atendidos em uma consulta inicial onde eles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, forneceram informações sobre seu histórico médico e foram examinados clinicamente, para a verificação das suas condições bucais. Antes e após cada dia teste, os voluntários recebiam um exame dos tecidos moles. Esse exame foi conduzido via uma visualização da cavidade oral e da região perioral, utilizando a luz do refletor, gaze e espelho clínico. As estruturas examinadas incluíam a gengiva, os palatos mole e duro, a orofaringe, a mucosa bucal, a língua, o assoalho bucal, a mucosa labial e os lábios. Os voluntários também eram questionados sobre a presença de algum efeito adverso do tratamento.

Os voluntários foram instruídos a usar o dentífrício (Crest Cavity Protection, Protector & Gamble Distributing Co., Cincinnati, OH, EUA) e a escova dental (Oral B 40 Indicator, Protector & Gamble Distributing Co.), oferecidos pelos pesquisadores. Não era permitido usar nenhum outro produto de higiene oral a não ser esses. Também não era permitido escovar os dentes com dentífrício por 2h antes dos procedimentos experimentais e nem ingerir nenhum tipo de alimento 30min antes dos procedimentos.

Os desafios erosivos foram conduzidos em 5 dias teste. Em cada dia teste, os dez voluntários foram aleatoriamente designados nos cinco grupos experimentais ($n=2$) descritos no Quadro 4.3. Os aditivos testados foram: o Lactato de cálcio (DeeCee Laboratories Inc., White House, TN, EUA), que recebeu a sigla de Ca; o hexametáfosfato de sódio (Ruger Chemical Company, Inc., Linden, NJ, EUA), que recebeu a sigla de HMP; bem como a combinação deles (Ca+HMP). Ambos aditivos eram próprios para serem utilizados em alimentos e a quantidade de lactato de cálcio utilizada foi suficiente para se obter uma concentração de cálcio de 10mmol/L (ou 0,4g/L). Antes dos desafios erosivos (e antes também da inserção dos aparelhos na boca), os voluntários participaram de um teste cego de sabor.

Grupos	Suco de laranja	Lactato de Cálcio	HMP
C-	Minute Maid Original*	----	----
Ca	Minute Maid Original*	2,98 g/L	----
HMP	Minute Maid Original*	----	0,2 g/L
Ca+HMP	Minute Maid Original*	2,98 g/L	0,2 g/L
C+	Minute Maid Original + Ca [*]	----	----

Quadro 4.3 – Grupos Experimentais, aditivos testados e suas concentrações

4.5.6 Teste cego de sabor

Neste teste, os voluntários foram instruídos, inicialmente, a inserir 10mL do controle negativo (C-), perceber o sabor da bebida por 15s (apenas segurar na boca, sem agitar, bochechar e nem engolir) e após cuspir. Em seguida, os voluntários tiveram que agitar 10mL de água de beber na boca por 15s e, em seguida, cuspir. O objetivo da água era de limpar o paladar, evitando interferência de sabor do C- com o suco teste. Após, os voluntários recebiam uma amostra de 10mL do suco que foi randomicamente designado para ser o produto teste do dia. Eles tinham que perceber o sabor desse produto por 15s e, após, cuspir. Finalmente, os voluntários lavavam a boca com 25mL de água por 30s. Após o teste, os voluntários foram questionados se haviam notado alguma diferença no sabor dos dois sucos. Se a resposta fosse positiva, eles tinham que descrever qualitativamente a diferença notada.

4.5.7 Desafio Erosivo

Após o teste de sabor, os voluntários de todos os grupos inseriram os aparelhos que continham os 8 espécimes na boca e ali deixavam permanecer por 5min, para entrar em equilíbrio com os fluidos bucais. Na sequência, dois espécimes

(controle, sem exposição ao ácido) eram removidos do aparelho. Após, os voluntários inseriam novamente os aparelhos na boca para o início do primeiro desafio erosivo. Nesse desafio, cada voluntário introduzia 10mL do seu respectivo suco na boca e segurava o líquido por 15s contra o palato, com a ajuda da língua. O líquido era então cuspid e um intervalo de 15s imediatamente se iniciava. Logo após o intervalo, o processo se repetia até completar 20min. Após esse tempo, os voluntários ficavam sentados calmamente com os aparelhos em posição por 60min. Ao final do descanso, os aparelhos eram retirados da boca e mais dois espécimes (10min de exposição a 400mL de suco) eram removidos. Neste período em que os espécimes estavam fora da boca, os voluntários podiam tomar água, se assim o desejassem. Os aparelhos eram novamente inseridos na boca e o procedimento teste (segundo desafio erosivo) era repetido por mais 20min. Após os 60min de descanso, mais dois espécimes eram removidos (20min de exposição a 800mL do suco), a água era consumida e o aparelho era reinserido na boca. O procedimento teste então era repetido pela última vez (terceiro desafio erosivo). O aparelho era removido da boca do voluntário após os 60min de descanso finais e os espécimes remanescentes (30min de exposição a 1200mL de suco) eram coletados.

Houve, pelo menos, dois dias de “wash-out” entre cada dia teste, até o final dos cinco dias teste.

No final dos procedimentos experimentais, os voluntários eram instruídos a lavar a boca com água durante 1min e, na sequência, bochechar 10mL de uma solução contendo fluoreto de sódio a 0,02% (NaFrinse Packets, Medical Product Laboratories Inc., Philadelphia, PA, EUA) por 1min. A Figura 4.14 mostra a sequência do desafio erosivo da quarta fase.

Figura 4.14 – Sequência do desafio erosivo da quarta fase

4.5.8 Determinação da erosão

Os espécimes foram remontados em blocos de acrílico e os valores finais de microdureza foram determinados com a média das 5 indentações finais (realizadas a 100µm das indentações iniciais), de acordo com os parâmetros previamente descritos (item 4.5.3). A alteração de microdureza (AMD, em %) foi calculada usando a seguinte equação:

$AMD (\%) = (E-B) / B \times 100$, onde:

B = comprimento da indentação (µm) no baseline

E = comprimento da indentação (µm) após os tratamentos *in situ*

A média dos valores de AMD das duplicatas foram obtidas e consideradas com a variável resposta na análise estatística.

4.5.9 Análise estatística

A comparação da AMD (em %) avaliou os efeitos dos sucos e dos tempos experimentais. A comparação foi realizada com uso de modelos da análise de variância (ANOVA) apropriados para a análise de dados de estudos crossover. Devido ao fato de os dados de AMD não terem seguido uma distribuição normal, um teste não-paramétrico foi utilizado através da análise do posto dos dados. Todas as comparações foram realizadas com testes pareados, num nível de significância de 5%. Uma análise descritiva foi utilizada para o teste de sabor.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados seguindo a mesma sequência do item Materiais e Métodos.

5.1 Resultados da Primeira Fase

5.1.1 Valores de pH e o volume de titulador (HCl 0,1N) obtidos no método pH-Stat

As médias dos valores de pH dos 15 sucos testados na primeira fase, assim como as médias do volume (em mL) do titulador (HCl 0,1N) que foi necessário para manter o pH desses sucos no valor inicial, no método pH-stat, estão apresentados na Tabela 5.1. Pode ser observado que a adição de aproximadamente 10mmol/L de cálcio ao suco de laranja (Ca) foi capaz de reduzir o volume de titulador necessário em menos da metade em relação ao C-, enquanto que o C+ não necessitou nenhuma quantidade do titulador. Todos os polímeros de fosfato testados foram capazes de reduzir o volume de titulador; no entanto, o HMP foi mais efetivo. Uma redução adicional foi observada quando qualquer um dos polifosfatos foi combinado com o cálcio. A XG isoladamente não demonstrou nenhum efeito protetor.

Tabela 5.1 – Médias (desvios-padrão) do pH e do volume (em mL) do titulador (HCl 0,1N) utilizado no método pH-stat

Grupos	Médias do pH (DP)	Médias do Vol HCl 0.1 N (DP)
C-	3,83 (0,02)	1,23 (0,08)
Ca	3,83 (0,01)	0,46 (0,03)
XG	3,82 (0,02)	1,39 (0,01)
HMP	3,83 (0,00)	0,20 (0,01)
STP	3,82 (0,01)	0,73 (0,04)
PP	3,81 (0,01)	0,75 (0,08)
Ca+XG	3,82 (0,01)	0,63 (0,06)
Ca+HMP	3,83 (0,01)	0,03 (0,03)
Ca+STP	3,83 (0,00)	0,13 (0,10)
Ca+PP	3,82 (0,02)	0,16 (0,13)
XG+HMP	3,81 (0,00)	0,27 (0,02)
XG+STP	3,83 (0,01)	0,82 (0,01)
XG+PP	3,83 (0,01)	0,77 (0,01)
Ca+XG+HMP	3,83 (0,01)	0,04 (0,07)
Ca+XG+STP	3,82 (0,02)	0,07 (0,06)
Ca+XG+PP	3,83 (0,00)	0,01 (0,01)
C+	4,11 (0,01)	0,00 (0,00)

5.2 Resultados da Segunda Fase

5.2.2 Resultados obtidos no modelo de ciclagem erosão-remineralização

As médias (desvios-padrão) das 3 indentações finais (em números Knoop) e as médias da perda de superfície (desvios-padrão), em μm , relativas aos oito grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 5.2. Para o esmalte, os grupos C+, Ca+HMP, Ca e HMP apresentaram valores de PS bem abaixo do limite de detecção do método, de aproximadamente $0,3\mu\text{m}$ e, portanto, não foram considerados na análise estatística. A PS dos grupos XG, PP e STP não foram significativamente diferentes de C-. Para dentina, C+ promoveu significativamente menos PS, seguido por Ca+HMP. A PS para os grupos Ca, STP, HMP e XG não foi significativamente diferente de C-. Em relação à MDS, C+ apresentou a menor redução da MDS, seguido por Ca+HMP e Ca. A redução da MDS para os outros grupos não foi significativamente diferente de C-.

Tabela 5.2 – Médias (desvios-padrão) da PS para esmalte e dentina (μm) e da MDS para esmalte. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$), em colunas

Grupos	PS esmalte	PS dentina	MDS enamel
C-	-0,49 (0,37) ^{a,b}	-5,92 (0,85) ^{c,d}	115,04 (11,34) ^d
Ca	-0,04 (0,36)	-5,02 (0,64) ^{b,c}	184,17 (25,46) ^c
XG	-0,97 (0,77) ^a	-6,82 (0,90) ^d	110,25 (11,07) ^d
HMP	-0,11 (0,22)	-6,72 (0,91) ^d	105,55 (15,75) ^d
STP	-0,33 (0,26) ^b	-6,09 (0,77) ^d	107,42 (17,94) ^d
PP	-0,33 (0,24) ^b	-6,05 (0,94) ^{c,d}	124,78 (14,40) ^d
Ca+HMP	0,15 (0,10)	-4,47 (0,55) ^b	266,70 (33,43) ^b
C+	0,11 (0,19)	-0,87 (0,24) ^a	321,63 (7,65) ^a

5.3 Resultados da Terceira Fase

5.3.1 Resultados obtidos no modelo de erosão

As Tabelas 5.3 e a 5.4 mostram as médias (desvios-padrão) da MDS e da PS dos 8 grupos, nos 3 diferentes tempos experimentais (30, 90 e 150min). Após os primeiros 30min de exposição aos sucos, a PS de todos os grupos foi mínima, sendo que os valores se apresentavam muito abaixo do limite de detecção do método de perfilometria, com exceção do grupo XG. O mesmo fato ocorreu para os grupos C+, Ca+HMP e Ca em todos os tempos experimentais. Após 90min de exposição ao suco, os grupos C-, STP e PP começaram a apresentar uma detectável PS. Após 150min, os grupos C-, XG, STP e PP praticamente dobraram seus valores de PS e o grupo HMP começou a apresentar uma PS detectável. Em relação à MDS, o grupo C+ apresentou significativamente a menor redução da MDS em comparação aos outros grupos, em todos os tempos experimentais. Nos tempos de 90 e 150min, Ca+HMP também apresentou uma significativa menor redução da MDS em comparação ao grupo C-. Semelhante fato ocorreu com o grupo Ca no tempo experimental de 90min, mas não em 150min. No entanto, vale a pena lembrar que, no tempo de 150min, o grupo C- apresentou uma PS detectável, enquanto Ca não. Os demais grupos apresentaram uma redução na MDS semelhante de C-, em todos os tempos experimentais. A Figura 5.1 mostra as médias (desvios-padrão) da MDS dos grupos obtidas no modelo de erosão, em todos os tempos experimentais. A Figura 5.2 mostra as médias (desvios-padrão) da PS dos grupos obtidas no modelo de erosão, em todos os tempos experimentais, facilitando a comparação desses resultados.

Tabela 5.3 - Médias (desvios-padrão) da MDS obtidas no modelo de erosão nos tempos experimentais de 30, 90 e 150min. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$), em colunas

Grupos	MDS Modelo de Erosão		
	30min	90min	150min
C-	234,33 (35,88) ^{b,c}	113,67 (30,17) ^d	69,09 (18,02) ^c
Ca	276,80 (51,35) ^{a,b,c}	183,73 (48,58) ^c	129,90 (40,74) ^c
XG	217,47 (38,73) ^c	129,95 (26,43) ^{c,d}	69,63 (10,20) ^c
HMP	243,20 (38,62) ^{b,c}	149,13 (17,36) ^{c,d}	112,49 (41,68) ^c
STP	231,07 (37,83) ^c	133,07 (13,13) ^{c,d}	79,73 (6,98) ^c
PP	264,53 (20,81) ^{a,b,c}	145,33 (20,92) ^{c,d}	92,30 (11,28) ^c
Ca+HMP	308,67 (36,60) ^{a,b}	265,00 (41,53) ^b	233,07 (72,17) ^b
C+	339,73 (29,29) ^a	328,27 (21,38) ^a	307,60 (22,73) ^a

Tabela 5.4 - Médias (desvios-padrão) da PS obtidas no modelo de erosão nos tempos experimentais de 30, 90 e 150min. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$), em colunas

Grupos	PS Modelo de Erosão		
	30min	90min	150min
C-	-0,20 (0,06) ^{b,c}	-0,76 (0,29) ^d	-1,37 (0,42) ^{c,d}
Ca	0,06 (0,08) ^{a,b}	-0,01 (0,18) ^{a,b,c}	-0,25 (0,19) ^{a,b}
XG	-0,35 (0,17) ^c	-0,80 (0,13) ^d	-1,50 (0,54) ^d
HMP	0,06 (0,04) ^a	-0,07 (0,07) ^{a,b,c}	-0,32 (0,09) ^{a,b}
STP	-0,08 (0,16) ^{a,b}	-0,32 (0,13) ^{b,c}	-0,82 (0,27) ^{b,c}
PP	-0,12 (0,22) ^{a,b}	-0,37 (0,32) ^c	-0,78 (0,47) ^{b,c}
Ca+HMP	0,05 (0,03) ^a	0,01 (0,04) ^{a,b}	-0,04 (0,06) ^a
C+	0,05 (0,03) ^a	0,06 (0,04) ^a	0,07 (0,05) ^a

Figuras 5.1 – Médias (desvios-padrão) da MDS dos grupos nos diferentes tempos experimentais do modelo de erosão

Figuras 5.2 – Médias (desvios-padrão) da PS dos grupos nos diferentes tempos experimentais do modelo de erosão

5.3.2 Modelo de Remineralização

A Tabela 5.5 e a Figura 5.3 mostram as médias (desvios-padrão) da MDS de todos os grupos, obtidas após 30min de erosão e após as 24h de remineralização com saliva, no modelo de remineralização. Com base nos resultados desse experimento, pode ser observado que nenhum dos aditivos interferiu com a remineralização dos espécimes promovida pela saliva artificial, na medida em que, para todos os grupos, certo aumento da microdureza de superfície ocorreu após o tratamento com saliva. Esse aumento de dureza apresentou uma magnitude semelhante em todos os grupos, com exceção do C+, onde quase nenhuma redução da dureza inicial havia acontecido com o tratamento ácido e, como consequência, pouca alteração de dureza foi observada após o tratamento com saliva.

Tabelas 5.5 – Médias (desvios-padrão) da MDS obtidas no modelo de remineralização após 30min de exposição ao ácido e após 24h de remineralização

Médias de MDS do Modelo de Remineralização		
Grupos	Erosão	Remineralização
C-	226,60 (18,18)	254,47 (11,36)
Ca	290,30 (21,59)	318,62 (32,64)
XG	244,71 (14,99)	276,57 (8,51)
HMP	245,00 (18,83)	270,89 (22,71)
STP	256,97 (23,79)	288,92 (26,26)
PP	258,52 (19,46)	306,04 (12,20)
Ca+HMP	297,23 (6,79)	326,42 (20,79)
C+	348,01 (7,58)	348,94 (38,36)

Figura 5.3 – Médias (desvios-padrão) da MDS dos grupos nos tempos: inicial, após a erosão e após a remineralização

5.4 Resultados do estudo *in situ*

5.4.1 Alteração da Microdureza de Superfície (AMD), em porcentagem (%)

Os resultados da AMD estão apresentados (em %) na Tabela 5.6 e na Figura 5.4. Não houve diferenças entre os sucos testados e os valores iniciais de microdureza, o que confirmou a efetividade da randomização para o balanceamento dos espécimes entre os grupos experimentais. Foram observadas diferenças na AMD entre os sucos e os desafios erosivos. Ao final de todos os desafios erosivos, a AMD para os grupos C- e HMP foi a maior, seguida pelos grupos Ca+HMP e Ca, sem diferenças significantes entre esses dois últimos. O grupo C+ apresentou a menor AMD em comparação a todos os outros grupos.

Tabela 5.6 – Médias (desvios-padrão) da AMD (em %) dos grupos, em cada tempo experimental. Os grupos conectados por barras verticais não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$), em cada tempo (em colunas). As médias seguidas pelas mesmas letras não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$), em linhas

Grupos	0	10 min	20 min	30 min
C-	3.0(2.6) a	14.9(12.8) b	28.2(26.0) c	31.9(48.0) bc
HMP	2.0(1.9) a	13.6(9.8) b	15.5(9.0) b	22.1(20.0) b
Ca	2.1(2.0) a	4.4 (2.6) bc	3.9(2.7) b	6.7(5.3) c
Ca+HMP	2.5(1.9) a	4.0(3.2) b	4.3(2.7) b	4.7(2.9) b
C+	2.7(1.4) a	2.4(2.0) a	2.5(1.9) a	2.2(2.2) a

Figura 5.4 – Médias (+desvios-padrão) da AMD (em %) dos grupos, em cada tempo experimental. Os grupos conectados por barras horizontais não foram significativamente diferentes, em cada tempo ($p>0,05$). As médias com as mesmas letras não apresentaram diferenças significantes, em cada grupo ($p>0,05$)

5.4.2 Teste de Sabor

Os resultados do teste de sabor estão apresentados na Tabela 5.7. Apesar do número de participantes no estudo ter sido relativamente pequeno, este teste pode nos dar uma idéia da percepção de cada voluntário em relação aos sucos modificados. Cinco em cada dez voluntários notaram uma diferença no sabor do suco modificado com cálcio disponível comercialmente (C+) e, quatro em dez notaram uma diferença no sabor do suco com menores quantidades de cálcio (Ca). A maioria dos voluntários que reportaram uma alteração no sabor desses dois sucos comentou que ambos pareciam ser mais doces do que C-. Três em dez voluntários notaram uma diferença no sabor dos sucos modificados com HMP e com a combinação Ca+HMP, onde um sabor mais azedo foi a alteração mais relatada. Dois voluntários reportaram uma diferença no sabor do suco sem aditivos (C-), sendo que ambos reportaram que esse também parecia ser mais doce.

Tabela 5.7 – Resultados do teste de sabor, onde os sucos teste foram comparados cegamente com o controle negativo (C-). A terceira coluna mostra o número de voluntários que notaram uma diferença no sabor dos sucos. A quarta coluna mostra a alteração notada e a frequência no qual essa alteração foi citada

Sucos	Contra	nº voluntários	Alteração notada
C-	C-	2/10	2/mais doce;
HMP	C-	3/10	1/mais azedo; 1/mais ácido; 1/mais doce
Ca+HMP	C-	3/10	1/mais ácido; 2/mais azedo;
Ca	C-	4/10	1/mais ácido; 3/mais doce
C+	C-	5/10	3/mais doce; 1/mais denso; 1/menos ácido

6 DISCUSSÃO

Esse capítulo será dividido em quatro partes. A primeira delas discutirá os aditivos escolhidos neste estudo; a segunda, os resultados da primeira fase; a terceira, os resultados da segunda e terceira fases; e, a quarta, os resultados do estudo *in situ*.

6.1 Dos aditivos

Esse estudo testou alguns aditivos aprovados para serem usados em alimentos, em relação a sua capacidade de reduzir a erosão dental causada por um suco de laranja. Os aditivos e as suas respectivas concentrações foram escolhidos com base nos resultados promissores alcançados em estudos anteriores, onde foram testados em outras diferentes bebidas ou soluções ácidas (Hughes et al., 1999a; Hughes et al., 1999b; West et al., 1999; Barbour et al., 2005b; Hooper et al., 2007).

Entre esses aditivos, os sais de cálcio são os mais comumente utilizados. Não somente porque o cálcio tem a capacidade de reduzir a erosão dental, mas também porque ele pode evitar outros importantes problemas de saúde geral, como a osteoporose (Davis et al., 2007). Na verdade, essa é a maior preocupação por detrás das bebidas modificadas com cálcio disponíveis comercialmente, tal como o suco de laranja escolhido para ser o controle positivo nesse estudo (Minute Maid Calcium®, The Coca-Cola Co.). Essas bebidas possuem um baixo potencial erosivo, como já foi observado em investigações prévias (Larsen; Nyvad, 1999; Hara; Zero, 2008). No entanto, no geral, elas possuem grandes quantidades de cálcio (por exemplo, o Minute Maid Calcium® possui aproximadamente 40mmol/L de cálcio) (Hara; Zero, 2008), o que pode alterar o seu sabor e estabilidade (Grenby, 1996; Jensdottir et al., 2005; Barbour et al., 2005b). Adicionalmente, existem riscos associados ao se exceder o limite máximo tolerável (nível que pode causar efeitos de saúde adversos) de cálcio de 2,5g/dia (aproximadamente 60mmol/dia), o que

inclui hipercalcemia, aumento do risco de pedras renais, insuficiência renal, interferência na absorção de outros minerais, incluindo o zinco, magnésio e fósforo, entre outros (Straub, 2004). Portanto, como uma medida de prevenção da erosão dental, a adição de uma concentração de cálcio menor, porém efetiva, seria desejável.

West et al. (1999) demonstraram que a adição de, aproximadamente, 10mmol/L de cálcio à uma bebida de groselha preta foi capaz de reduzir o seu potencial erosivo, quando comparado a bebida sem aditivos. No entanto, nesse estudo, o pH da bebida modificada foi aumentado em uma unidade. Esse aumento pode tornar a bebida mais susceptível à degradação por microorganismos e, como consequência, diminuir o seu tempo de armazenamento (Barbour et al., 2005b; Beyer et al., 2010). Assim, no presente estudo, foi testada a mesma quantidade de cálcio no suco de laranja; no entanto, para evitar os problemas de estabilidade, o pH original da bebida (3,8) foi mantido.

O lactato de cálcio foi o sal de cálcio escolhido para esse estudo, principalmente devido ao fato de já ter sido utilizado anteriormente, com sucesso, na redução do potencial erosivo de bebidas ácidas por Beiraghi et al. (1989) e Magalhães et al. (2009a). Aliado a isso, ele é um aditivo aprovado para ser utilizado em uma grande variedade de alimentos, tais como queijos e cereais matinais, atuando como um agente regulador de acidez, emulsificante, estabilizante e espessante.

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido pela fermentação da bactéria *Xanthomonas Campestris*. Ela também é utilizada pelas indústrias alimentícias como um agente espessante, emusificante e estabilizante (Geshi et al., 2010). Para melhorar os padrões de estabilidade e de aceitabilidade da bebida de groselha preta modificada com cálcio, do estudo de West et al. (1999) citado anteriormente, Hughes et al. (2002) e West et al. (2004) adicionaram a goma xantana a essa bebida. O autores observaram que tal goma conseguiu diminuir ligeiramente o pH da bebida, mantendo o seu baixo potencial erosivo, melhorando assim seus parâmetros. No entanto, como nesses dois estudos a goma xantana não foi testada isoladamente, como um aditivo único, não ficou claro se ela, por si só, tinha alguma ação anti-erosiva. Mais tarde, Barbour et al. (2005b) observou que a adição somente da goma xantana em uma solução de ácido cítrico foi capaz de

reduzir a sua capacidade de desmineralização. De acordo com Barbour et al. (2005b), o possível mecanismo pelo qual a goma reduziu a dissolução da hidroxiapatita foi através da sua adsorção à essa superfície, formando uma camada protetora. Essa camada causou uma redução na troca de íons hidrogênio da solução, com os íons cálcio e fosfato, da hidroxiapatita. Nesse mesmo estudo, além da goma xantana, outras gomas alimentares foram adicionadas a mesma solução de ácido cítrico, com o objetivo de reduzir a dissolução da hidroxiapatita. Porém, nenhuma outra goma apresentou esse efeito. Os pesquisadores hipotetizaram que a goma xantana possa ter maior afinidade com a superfície da hidroxiapatita do que as outras gomas; contudo, eles também sugerem que essa afinidade possa ser pH dependente, uma vez que os valores de pH podem alterar as cargas da goma e da superfície da hidroxiapatita, afetando assim, a adsorção.

Os polifosfatos são polímeros de fosfato formados pela ligação de grupos fosfato (PO_4)-. O pirofosfato de sódio contém dois átomos de fosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) e, ambos, o tripolifosfato de sódio e o hexametafosfato de sódio, são compostos de cadeias de P-O-P, com a fórmula de $\text{Na}_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$ (Harris et al., 1967). Esses polímeros são utilizados pelas indústrias como conservantes de carnes e de algumas bebidas não alcoólicas (Barbour et al., 2005b). De acordo com Barbour et al. (2005b), o mecanismo no qual os polifosfatos podem proteger a superfície dental contra ao ataque ácido é semelhante ao da goma xantana, ou seja, devido a adsorção a essa superfície no lugar dos íons $(\text{HPO}_4)^{2-}$, prevenindo o deslocamento de íons para o meio. De fato, estudos anteriores já haviam demonstrado essa característica dos polifosfatos (Jung et al., 1973; Mcgaughney; Stowell, 1977).

No estudo de Barbour et al. (2005b), foi testada a capacidade de três tipos desses polímeros, ou seja, o hexametafosfato de sódio, o pirofosfato de sódio e o tripolifosfato de sódio, em reduzir a dissolução da hidroxiapatita causada por uma solução de ácido cítrico. Todos esses aditivos foram capazes de reduzir a dissolução, porém, a maior redução foi encontrada com a adição do hexametafosfato. Mais recentemente, Hooper et al. (2007) comprovaram a eficácia do hexametafosfato em reduzir o potencial de uma bebida ácida experimental em um estudo clínico.

Alternativamente a esses aditivos citados anteriormente, e que foram testados neste estudo, a literatura mostra que existem outros compostos que também

possuem importantes efeitos anti-erosivos, como o flúor, o ferro e o cobre (Attin et al., 2003; 2005; Brooks et al., 2003; Buzalaf et al., 2006). No entanto, existem problemas relacionados a sua toxicidade, o que praticamente os contra-indicam para serem usados como aditivos. Adicionalmente, alguns desses compostos podem alterar o sabor das bebidas e provocar manchas nos dentes; por isso, são mais recomendados para produtos de uso tópico.

Mais recentemente, estudos sugerem que a adição de duas proteínas alimentares, a caseína do leite e, em com menor intensidade, a ovoalbumina do ovo, são capazes de reduzir a demineralização provocada pelo ácido cítrico e por diversas bebidas ácidas (Barbour et al., 2008; Hemingway et al., 2008; Hemingway et al., 2010). Esse efeito protetor também foi atribuído a capacidade de adsorção dessas proteínas à superfície dental (Hemingway et al., 2010). Por serem proteínas alimentares, esses aditivos não possuem contra-indicações para seu uso em alimentos, sendo substâncias promissoras a serem testadas em estudos futuros.

Outro aditivo que também apresentou um promissor efeito anti-erosivo foi o CCP-ACP. Ramaligam et al. (2005) e, mais recentemente, Manton et al. (2010) demonstraram que a adição de CCP-ACP a bebidas ácidas foi capaz de reduzir o seu potencial erosivo. Foi postulado que o possível mecanismo de ação desse composto é a sua atuação como um vetor, transportando partículas de cálcio e fosfato para a superfície de esmalte e mantendo-as lá até que o pH caia. Nessas condições, esses íons são liberados, aumentando a saturação do meio e, por consequência, diminuindo a desmineralização e aumentando a remineralização do substrato dental (Hemingway et al., 2010). De acordo com Ramaligam et al. (2005), esse aditivo não possui contra-indicações para ser usado em alimentos e também não causou alterações no sabor da bebida que serviu de teste para seu estudo. Entretanto, mais estudos são necessários para se comprovar a efetividade desse composto como aditivo de bebidas.

6.2 Da Primeira Fase

Na primeira fase desse estudo, os aditivos escolhidos foram testados, isoladamente ou em combinação, utilizando-se o método do pH-stat. Neste método, a variável reposta é o volume de titulador necessário (HCl 0.1N) para manter o pH da solução no valor inicial, por um período de tempo pré-determinado. Essa técnica se baseia no fato de que, durante a dissolução da hidroxiapatita, são liberados íons OH^+ para o meio, de acordo com a seguinte equação:

Dessa forma, quando a hidroxiapatita é inserida na solução ácida, os íons H^+ dessa solução se ligam aos íons OH^- liberados da hidroxiapatita, neutralizando-os e, como consequência, o pH da solução aumenta. Assim, a tituladora injeta HCl em aliquotas para manter o pH da solução nos valores iniciais (Barbour; Rees, 2004). De acordo com Barbour et al. (2005b) e Barbour e Rees (2004), o volume total de titulador necessário é correspondente a dissolução da hidroxiapatita. Portanto, quanto maior o volume de titulador necessário, maior o potencial erosivo da solução.

No presente estudo, o suco sem aditivos (C-) necessitou, em média, de 1,23mL de titulador, enquanto que o suco com HMP (que foi o aditivo isolado que mais reduziu esse volume) necessitou de apenas 0,20mL. Assim, o suco modificado por HMP reduziu em 84% a dissolução da hidroxiapatita. Os aditivos PP e STP também foram capazes de reduzir a dissolução, porém, em uma porcentagem menor (aproximadamente 40%). O suco com uma menor concentração de cálcio (10 mmol/L), o Ca, reduziu a dissolução em 63%, enquanto que o suco modificado com cálcio disponível comercialmente (C+), não necessitou de nenhuma quantidade de titulador.

Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Barbour et al. (2005b), que utilizaram o mesmo método de análise. Os autores encontraram uma redução na dissolução de 50% quando adicionaram 10mmol/L de cálcio a uma solução de ácido cítrico, 64% de redução com o HMP, 35% com o PP e 46% com o STP. É interessante de observar que, além de soluções diferentes (suco de laranja e

solução de ácido cítrico), o presente estudo apresentou outras diferenças em relação ao estudo de Barbour et al. (2005b), como o uso de cristal de hidroxiapatita no lugar do disco de hidroxiapatita e o tempo da reação (5min contra 30min). O tempo da reação foi reduzido, pois, conceitualmente, o pH-stat é um método indireto, simples e rápido, de se prever o potencial erosivo de soluções ácidas, tal como as medições de pH e de titulação ácida. Dessa forma, o tempo da reação foi programado para apenas 5min, o que, de acordo com o estudo de Millward et al. (1997) simula com fidelidade as condições bucais após a ingestão de uma bebida ácida. No entanto, nos nossos testes preliminares (dados não mostrados), com o tempo de reação de 5min, pouca dissolução com o uso do disco de hidroxiapatita foi observada; portanto, optou-se pela utilização do cristal.

Em todos os sucos em que foram adicionadas as combinações dos aditivos, principalmente os que envolviam o cálcio, uma redução adicional do potencial erosivo foi observada, alcançando, em alguns casos, a valores próximos ao do grupo C+.

Nesse teste, o único aditivo que não foi capaz de reduzir a dissolução do suco foi a goma xantana, quando adicionada isoladamente (grupo XG). Pelo contrário, esse aditivo aumentou a quantidade de titulador necessária de 1,23mL, em média, para 1,39mL. Esse resultado está em desacordo com o estudo de Barbour et al. (2005b), que encontrou uma redução de 30% na dissolução da hidroxiapatita, com a adição da goma xantana uma solução de ácido cítrico. Essa diferença pode ser explicada pela diferença de pH entre as duas soluções testadas (3,8 do suco contra 3,2 da solução de ácido cítrico), uma vez que, o pH pode alterar as cargas da goma e da superfície da hidroxiapatita, afetando assim, a adsorção (Barbour et al., 2005b).

Apesar do pH-stat ser um método de análise química sensível e acurado, ele não nos possibilita acessar às alterações ocorridas na superfície do substrato, que é apenas possível em estudos *in vitro* e *in situ* (Barbour; Rees, 2004). Dessa forma, nesse estudo, os aditivos também foram testados com esses modelos.

6.3 Da Segunda e Terceira Fases

Para essas duas fases do estudo foram selecionados seis sucos modificados: o Ca, Ca+HMP, HMP, STP, PP, XG, mais os controles. Para se entender melhor o mecanismo de ação dos aditivos testados, deu-se preferência aos sucos onde cada substância havia sido adicionada isoladamente. A escolha da combinação Ca+HMP foi baseada no seu promissor efeito anti-erosivo, demonstrado na primeira fase deste estudo e em estudos anteriores (Hooper et al., 2007).

Em acordo com a primeira fase deste estudo, a adição de 10mmol/L de cálcio ao suco de laranja também foi capaz de reduzir o seu potencial erosivo em dois dos modelos testados: o de erosão e o de ciclagem erosão-remineralização. Em ambos os modelos, o suco modificado com menores quantidades de cálcio (grupo Ca) não foi capaz de causar uma perda de superfície detectável pelo método de perfilometria, diferentemente do que ocorreu com o suco de laranja sem aditivos. No grupo Ca, só foi possível de se observar uma redução da microdureza e, mesmo assim, na maioria das medições, essa redução não se apresentou tão severa quanto à redução causada por C-. Na terceira fase, o valor da redução da MDS para o grupo Ca no tempo de 150min não foi significativamente diferente do grupo C-; todavia, nesse tempo experimental, C- apresentou perda de superfície detectável, enquanto que Ca não. Portanto, pode-se supor que a medição da microdureza para o grupo C- foi realizada na camada subsuperficial dos espécimes, uma vez que a camada superficial mais externa já havia sido perdida. Assim, analisando os resultados da PS, ainda podemos concluir que o grupo Ca foi menos erosivo que o grupo C-.

Apesar de Attin et al. (2005) e Magalhães et al. (2009a) terem demonstrado que uma concentração ainda menor de cálcio, de 1mmol/L, foi capaz de reduzir a erosão causada por um suco de laranja e, também, por diferentes bebidas carbonatadas, essa concentração de cálcio não mostrou os mesmos efeitos protetores em nossos testes preliminares. Esse resultado foi também observado por Magalhães et al. (2010), quando adicionou essa mesma quantidade de cálcio a uma solução de ácido cítrico. Assim, no presente estudo, optou-se por utilizar a

concentração de 10mmol/L. Diferenças na metodologia e na solução utilizada como teste podem explicar esses resultados contraditórios.

Outro fator que pode ter exercido influência nos resultados é o tipo de sal de cálcio utilizado. Em nossos testes preliminares, primeiramente, tentamos adicionar ao suco de laranja o sal cloreto de cálcio dihidratado, de fórmula $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Attin et al., 2003; Attin et al., 2005). Contudo, mesmo na concentração de 10mmol/L, não foi observada nenhuma redução no potencial erosivo do suco. Assim, optou-se por testar o sal lactato de cálcio pentahidratado $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Beiraghi et al., 1989; Magalhães et al., 2009a), que apresentou bons resultados e, portanto, foi o sal escolhido para essa pesquisa. Ambos os sais são extremamente solúveis e apresentam somente um íon cálcio em sua molécula; porém, eles possuem diferentes componentes em sua fórmula, como, por exemplo, o ânion lactato, o que, provavelmente, pode ter exercido alguma influência no processo de desmineralização/remineralização. Essa diferença na efetividade desses dois sais de cálcio também foi observada, previamente, por Magalhães et al. (2010).

Nós hipotetizamos que devido ao fato do ânion lactato possuir uma capacidade de quelar os íons cálcio, quando o lactato de cálcio foi adicionado à bebida, todo o cálcio estava na forma de complexos estáveis com o lactato. A constante de associação para esse complexo é de $10\text{-}20\text{L mol}^{-1}$. A constante de associação é definida como a força de ligação entre o cálcio (ou outro íon metálico) ao seu ligante. Para o lactato, essa ligação não é tão forte como para outros compostos, como o citrato ($K_o = 6 \times 10^4\text{L mol}^{-1}$) ou o EDTA ($K_o = 5 \times 10^{10}\text{L mol}^{-1}$) (Jackson, 2004); no entanto, foi suficiente para proteger os íons de cálcio, evitando que eles se ligassem a outros componentes menos estáveis presentes no suco, tornando-os, assim, disponíveis para interagir com a superfície dental. Por outro lado, com o cloreto de cálcio, todo o cálcio do sal estava disponível no suco no momento da suplementação; porém, a maioria desses íons acabava se ligando a outros compostos presentes no meio, antes de atingir a superfície dental.

Em vista dessas diferenças entre os sais de cálcio, nos parece razoável como direcionamento futuro, investigar os sais de cálcio mais comumente utilizados como aditivos, para verificar se eles se comportam da mesma forma quando adicionados a uma mesma bebida ácida.

Em relação aos polímeros alimentares testados, nos modelos de erosão e de ciclagem erosão-remineralização, apesar do grupo HMP ter apresentado uma redução da microdureza de superfície semelhante a do grupo C-, o suco com HMP não foi capaz de causar uma perda de superfície detectável pelo método da perfilometria em quase todas as medições realizadas, com exceção da realizada no tempo experimental de 150min do modelo de erosão. Assim, houve uma desmineralização; porém, a progressão da perda física não ocorreu de modo semelhante a do grupo C-, diferentemente do ocorreu com os grupos STP, PP e XG. Todavia, melhores resultados foram observados com a combinação Ca+HMP, o que confirma o efeito sinérgico entre essas duas substâncias, como já havia sido previamente sugerido por Hooper et al. (2007).

De acordo com Hesaraki et al. (2009), o HMP tem a capacidade de se adsorver a superfície de partículas positivamente carregadas através de ligações eletrostáticas e iônicas. Portanto, ele pode se ligar à superfície da hidroxiapatita e criar um filme adsorvido. Devido ao grande tamanho de sua cadeia molecular (Barbour et al., 2005b), o grau de cobertura desse polímero é grande, maior que o do PP e do STP. Assim, o efeito sinérgico entre o HMP e o cálcio observado nesse estudo pode ser explicado pela atuação de dois mecanismos protetores, o do HMP, explicado anteriormente, e o dos íons cálcio, que interagiram com a superfície dental nos sítios onde o HMP não estava presente. Interessante de se notar que o HMP também tem uma forte capacidade de quelação de íons cálcio (Hesaraki et al., 2009) e, portanto, o cálcio, quando adicionado juntamente com esse composto, deve estar protegido na forma de algum complexo com uma força de ligação mais fraca, como, por exemplo, o lactato de cálcio. Do contrário, o HMP irá quelar os íons de cálcio e ambos compostos ficarão impossibilitados de exercer seus efeitos protetores.

Não se sabe ao certo porque os aditivos PP e STP reduziram o potencial erosivo do suco no pH-stat, mas não nos modelos de erosão e de ciclagem. No entanto, pode-se especular que, no pH-stat, o substrato utilizado foi o cristal de hidroxiapatita, que possui uma maior área disponível para interagir com os polifosfatos do que a superfície dental em si. Além disso, o cristal se apresenta numa forma mais pura. Outro fator que devemos levar em consideração é o tempo da reação. Como já foi citado anteriormente, o tempo da reação no método pH-stat foi programado para apenas 5min. Contudo, nos modelos de erosão e de ciclagem,

o tempo total de contato dos sucos com a superfície dental foi muito maior que 5min; portanto, podemos supor que, tanto o PP, quanto o STP, podem não possuir uma ação prolongada, como a que foi observada para HMP.

O aditivo goma xantana não foi capaz de reduzir o potencial erosivo do suco de laranja nos dois modelos testados. Pelo contrário, em alguns casos, como na análise da perda de superfície no modelo de ciclagem, a média do grupo XG foi maior do que a do grupo C-. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Hooper et al. (2007) declararam que a goma xantana é capaz de causar uma ligeira diminuição no pH e também aumentar os valores de titulação ácida da bebida previamente modificada com cálcio. Provavelmente, o efeito protetor da goma é mínimo e o seu papel como aditivo de bebidas ácidas pode estar mais relacionado com a melhora da aceitabilidade e longevidade dessas bebidas, quando modificadas por cálcio, do que sua atuação como um agente anti-erosivo por si. Como nesse estudo o pH de todos os sucos experimentais foi ajustado para o pH natural do suco sem aditivos (3,8), a goma não teve a oportunidade de apresentar tais efeitos.

Para a dentina, somente a modificação Ca+HMP apresentou efeito anti-erosivo. Esse fato pode ser explicado pela diferente morfologia desse substrato em comparação com o esmalte, o que pode ter interferido na sua interação com os polifosfatos. Como já foi citado anteriormente, os polifosfatos possuem afinidade com a superfície da hidroxiapatita (Mcgaughney; Stowell, 1977; Barbour et al., 2005b) e, uma vez que eles se adsorvem a essa superfície, podem diminuir o processo de desmineralização. Assim, pode ser hipotetizado que, pela dentina apresentar menor conteúdo mineral do que o esmalte (Featherstone; Lussi, 2006), a adsorção dos polifosfatos ocorreu com uma magnitude menor e, portanto, algum efeito apenas foi observado quando o HMP foi associado ao cálcio, reafirmando a idéia de um efeito sinérgico entre esses dois compostos.

Estudos anteriores sugeriram que alguns dos aditivos testados, principalmente os polifosfatos, podem inibir a formação dos cristais de hidroxiapatita e assim, interferir no processo de mineralização (Jung et al., 1973; Mcgaughney; Stowell, 1977). No entanto, com base nos resultados do modelo de remineralização do presente estudo, pode ser observado que nenhum dos aditivos testados foi capaz de interferir com a remineralização da superfície desmineralizada, que não foi

removida pelo processo de erosão. Nesse modelo, pode ser observado que houve aumento da microdureza superficial dos espécimes após a imersão em saliva em todos os grupos, com exceção do grupo C+. Nesse grupo, pouca redução da MDS foi observada após os 30min de erosão e, como consequência, pouco aumento da MDS foi observado após o tratamento com a saliva.

Nessas duas fases do estudo foram utilizados dois métodos para a determinação dos efeitos erosivos dos sucos nos substratos dentais: a perfilometria ótica e a microdureza de superfície. De acordo com Barbour e Rees (2004), a dureza é um método adequado para se observar os estágios iniciais de erosão, enquanto que a perfilometria é mais adequada para estágios mais avançados. A decisão do uso de ambos os métodos foi relacionada ao uso de substratos com diferentes susceptibilidades à erosão (esmalte e dentina) e à diferença no potencial erosivo dos sucos testados. Em alguns casos, a perda de superfície causada pelos sucos foi mínima, bem abaixo do limite de detecção do método de perfilometria, ou seja, de aproximadamente 0,3 μm . Para esses casos, a medição de dureza foi um método mais adequado.

6.4 Da Quarta Fase

Devido aos resultados promissores obtidos nas fases anteriores com o uso do cálcio, na concentração de aproximadamente 10mmol/L (ou 0,4g/L) e do hexametáfosfato de sódio à 0,2g/L, esses foram os aditivos escolhidos para serem testados nesta fase, com um modelo *in situ*. Interessante notar que essa quantidade de cálcio é quase quatro vezes menor do que o presente no suco modificado com cálcio, disponível comercialmente, que foi utilizado como controle positivo.

De acordo com os resultados obtidos, essa menor quantidade de cálcio foi capaz de reduzir a erosão causada pelo suco de laranja; todavia, em menor extensão do que o grupo C+, o que sugere que essa redução pode ser concentração-dependente. Por outro lado, o teste de sabor reforçou a idéia de que a adição de cálcio em altas concentrações pode alterar o sabor da bebida (Grenby, 1996; Larsen; Nyvad, 1999; Jensdottir et al., 2005).

Nesse teste, metade dos voluntários (5/10) notou uma diferença no sabor no suco do grupo C+. Uma pequena redução nesse número (4/10) foi obtida com o suco modificado com menores quantidades de cálcio (Ca). A maioria dos voluntários que notaram uma diferença no sabor dos sucos modificados com cálcio reportou que eles pareciam ser mais doces do que o suco sem aditivos (C-). Porém, apesar de mais doce, deve-se ressaltar que voluntários ainda consideravam o sabor desses sucos aceitável. Apesar do número de participantes nesse teste ter sido pequeno, ele pode nos dar uma idéia de como o cálcio afeta o sabor do suco, uma vez que, como comparação, apenas dois voluntários notaram uma diferença no sabor do suco sem aditivos (C-).

O outro aditivo testado foi o hexametáfosfato de sódio. Esse composto foi adicionado isoladamente ou em combinação com o cálcio, devido ao efeito sinérgico protetor que essas duas substâncias apresentaram no estudo *in vitro*. Neste estudo *in situ*, tanto o grupo Ca, quanto o grupo Ca+HMP reduziram significativamente a AMD em relação ao C-; entretanto, apesar do grupo Ca+HMP ter apresentado uma menor AMD em relação ao grupo Ca, não foi encontrada uma diferença significativa entre eles. O grupo HMP não apresentou uma AMD diferente de C-. Isso sugere que o efeito protetor observado no grupo Ca+HMP foi basicamente relacionado à presença do cálcio.

Não ficou claro porque HMP reduziu o potencial do suco de laranja *in vitro*, mas não *in situ*. Pode ser hipotetizado que, no estudo *in situ*, a adsorção desses polifosfatos à superfície do esmalte pode ter sido prejudicada pela presença de algumas proteínas salivares, que também possuem afinidade com essa superfície e podem ter competido por sítios de ligação (Barbour et al., 2005b). Todavia, como houve uma tendência de redução do potencial erosivo do grupo Ca+HMP em relação ao grupo Ca, também podemos supor que a adição de maiores quantidades de HMP poderia ter resultado em um efeito protetor mais evidente, especialmente, se em realidade, existir mesmo essa competição por sítios de ligação. De acordo com Baker e Parker (2007) na patente Americana (US Patent 7,279,152 B2) que descreveu o uso da adição dos polifosfatos à bebidas ácidas para a redução do seu potencial erosivo, a concentração de polifosfatos adicionada deve estar, preferencialmente, entre 0,01g/L a 1g/L. Portanto, a adição de maiores

concentrações de HMP pode ser uma alternativa viável a ser considerada em estudos futuros.

Também deve ser salientado que os voluntários que notaram uma diferença no sabor dos sucos modificados com HMP reportaram, com mais frequência, que esses sucos pareciam ser mais azedos, em comparação ao C-. Esse fato também deve ser levado em consideração quando do teste de maiores concentrações desse aditivo.

Portanto, pode ser observado nesse estudo que a adição de cálcio ao suco de laranja, mesmo na baixa concentração testada, mostrou ser uma alternativa viável para pacientes com risco de erosão dental; no entanto, mais estudos são necessários para a determinação do hexametáfosfato de sódio como um agente anti-erosivo efetivo nesse suco.

7 CONCLUSÕES

7.1 Considerando as limitações das investigações *in vitro*, foi possível concluir que:

Para esmalte, o cálcio e o hexametáfosfato de sódio, nas concentrações testadas, apresentaram os melhores resultados em relação à redução do potencial erosivo do suco de laranja; sendo que a associação desses compostos aumentou os seus efeitos individuais.

Em dentina radicular, um efeito protetor foi apenas alcançado com a associação entre cálcio e hexametáfosfato de sódio.

7.2 Sob as condições do estudo *in situ*, foi possível concluir que:

A adição de cálcio, mesmo na baixa concentração testada, foi capaz de reduzir a erosão causada pelo suco de laranja. O hexametáfosfato de sódio, na concentração testada, não apresentou efeitos protetores, nem quando combinado com cálcio.

REFERÊNCIAS¹

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent. 2005;33(3):243-52.

Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralization of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001;29(5):371-6.

Andon MB, Kanerva RL, Rotruck JT, Smith KT. Methods of preventing tooth enamel erosion utilizing an acidic beverage containing calcium. US Patent no. 5,108,761. 1992.

Attin T. Methods for assessment of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:152-72.

Attin T, Knöfel S, Buchalla W, Tütüncü R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. Caries Res. 2001;35(3):216-22.

Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. Arch Oral Biol. 2003;48(11):753-9.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. Oral Dis. 2005;11(1):7-12.

Baker NJ, Parker DM. Use of polyphosphates as a tooth erosion inhibitors in acidic compositions. US Patent no. 7,279,152 B2. 2007.

Barbour ME, Rees SJ. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. J Dent. 2004;32(8):591-602.

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. 2003a;111(5):428-33.

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range $2.30 < \text{pH} \leq 6.30$ --a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci.* 2003b;111(3):258-62.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *J Oral Rehabil.* 2005a;32(1):16-21.

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

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(5):473-8.

Beiraghi S, Atkins S, Rosen S, Wilson S, Odom J, Beck M. Effect of calcium lactate in erosion and *S. mutans* in rats when added to Coca-Cola. *Pediatr Dent.* 1989;11(4):312-5.

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

Bowman SA. Beverage choices of young females: changes and impact on nutrient intakes. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(9):1234-9.

Brooks SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):25-30.

Buzalaf MA, de Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CC, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2006;51(10):844-8.

Centerwall BS, Armstrong CW, Funkhouser GS, Elzay RP. Erosion of dental enamel among competitive swimmers at a gas-chlorinated swimming pool. *Am J Epidemiol.* 1986;123(4):641-7.

Cochrane NJ, Cai F, Yuan Y, Reynolds EC. Erosive potential of beverages sold in Australian schools. *Aust Dent J.* 2009;54(3):238-44.

Correr GM, Alonso RC, Correa MA, Campos EA, Baratto-Filho F, Puppini-Rontani RM. Influence of diet and salivary characteristics on the prevalence of dental erosion among 12-year-old schoolchildren. *J Dent Child*. 2009;76(3):181-7.

Davis RE, Marshall TA, Qian F, Warren JJ, Wefel JS. In vitro protection against dental erosion afforded by commercially available calcium-fortified 100 percent juices. *J Am Dent Assoc*. 2007;138(12):1593-8.

Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *Br Dent J*. 1980;148(11-12):253-6.

Dreizen S, Brown LR, Daly TE, Drane JB. Prevention of xerostomia-related dental caries in irradiated cancer patients. *J Dent Res*. 1977;56(2):99-104.

Dugmore CR, Rock WP. A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. *Br Dent J*. 2004;196:283-6.

Edwards M, Ashwood RA, Littlewood SJ, Brocklebank LM, Fung DE. A videofluoroscopic comparison of straw and cup drinking: the potential influence on dental erosion. *Br Dent J*. 1998;185(5):244-9.

Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:66-76.

Ganss C. Definition of Erosion and Links to Tooth Wear. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:9-16.

Ganss C. How valid are current diagnostic criteria for dental erosion? *Clin Oral Investig*. 2008;12(Suppl 1):S41-9.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:32-43.

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

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schumann A. Effects of two fluoridation measures in erosion progression on enamel and dentin in situ. *Caries Res* 2004;38(6):561-6.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2004;38(6):561-6.

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001;35(5):325-30.

Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions- A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol.* 2007;52(1):9-14.

Gedalia I, Davidov I, Lewinstein I, Shapira L. Effect of hard cheese exposure, with and without fluoride prerinse, on the rehardening of softened human enamel. *Caries Res.* 1992;26(4):290-2.

Gedalia I, Ionat-Bendat D, Ben-Mosheh S, Shapira L. Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *J Oral Rehabil.* 1991a;18(6):501-6.

Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. *Am J Dent.* 1991b;4(3):120-2.

Geshi N, Petersen BL, Scheller HV. Toward tailored synthesis of functional polysaccharides in plants. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1190(1):50-7.

Grenby TH, Phillips A, Desai T, Mistry M. Laboratory studies of the dental properties of soft drinks. *Br J Nutr.* 1989;62(2):451-64.

Grenby TH. Lessening dental erosive potential by product modification. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):221-8.

Grobler SR, Jenkins GN, Kotze D. The effects of the composition and method of drinking of soft drinks on plaque pH. *Br Dent J.* 1985; 20;158(8):293-6.

Hanning C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005;50(6):541-52.

Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci.* 2008;116 (1):60-5.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:88-99.

Harris RS, Nizel AE, Walsh NB. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res.* 1967;46(1): 290-4.

Hemingway CA, Shellis RP, Parker DM, Addy M, Barbour ME. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by ovalbumin as a function of pH, calcium concentration, protein concentration and acid type. *Caries Res.* 2008;42(5):348-53.

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

Hesaraki S, Zamanian A, Moztarzadeh F. Effect of adding sodium hexametaphosphate liquefier on basic properties of calcium phosphate cements. *J Biomater Res Part A.* 2009;88:314-21.

Honório HM, Rios D, Júnior ES, de Oliveira DS, Fior FA, Buzalaf MA. Effect of acidic challenge preceded by food consumption on enamel erosion. *Eur J Dent.* 2010;4(4):412-7.

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

Hooper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'Ath J, et al. A comparison of enamel erosion by a new sports drink compared to two proprietary products: a controlled, crossover study in situ. *J Dent.* 2004;32(7):541-5.

Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M, et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. A study in situ. *Caries Res.* 2002;36(1):70-4.

Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ. 1. Comparison with orange juice. *J Dent.* 1999a;27(4):285-9.

Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent*. 1999b;27(5):345-50.

Hughes JA, West NX, Parker DM, van den Braak MH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent*. 2000;28(2):147-52.

Hunter ML, Hughes JA, Parker DM, West NX, Newcombe RG, Addy M. Development of low erosive carbonated fruit drinks. 1. Evaluation of two experimental orange drinks in vitro and in situ. *J Dent*. 2003;31(4):253-60.

Imfeld T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104(2):215-20.

Jackson DC. Surviving extreme lactic acidosis: the role of calcium lactate formation in the anoxic turtle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004;144(2-3):173-8.

Jensdottir T, Bardow A, Holbrook P. Properties and modification of soft drinks in relation to their erosive potential in vitro. *J Dent*. 2005;33(7):569-75.

Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-30.

Johansson AK, Lingström P, Birkhed D. Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(3):204-11.

Jung A, Bisaz S, Fleiscl H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res*. 1973;11(4):269-80.

Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol*. 2007;52(11):1109-11.

Kim JW, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, García-Godoy F. In vivo rehardening of enamel eroded by a cola drink. *ASDC J Dent Child*. 2001;68(2):122-4, 142.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res.* 2006;40(2):148-53.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res.* 2002;36(1):75-80.

Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8.

Lussi A, Jaeggi T. Chemical factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:77-87.

Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res.* 2000;34:182-7.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion—diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 2008;12(Suppl 1):S5–S13.

Lussi A, Jaggi T, Scharer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.

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

Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of ion supplementation of a commercial soft drink on tooth enamel erosion. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009a;26(2):152-6.

Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Wiegand A, Buzalaf MA. The erosive potential of 1% citric acid supplemented by different minerals: an in vitro study. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(1):41-5.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009b;17(2):75-86.

Manton DJ, Cai F, Yuan Y, Walker GD, Cochrane NJ, Reynolds C, et al. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate added to acidic beverages on enamel erosion in vitro. *Aust Dent J*. 2010;55(3):275-9.

McDonald JL Jr, Stookey GK. Influence of inherent dietary calcium and phosphorus on the cariostatic properties of NaH_2PO_4 in the rat. *J Dent Res*. 1973;52(1):79-82.

McGaughey C, Stowell EC. Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity. *J Dent Res*. 1977;56(6):579-87.

Mellberg JR, Petrou ID, Deutchman M, Grote N. The effects of 1% pyrophosphate and 0.02% sodium fluoride on artificial caries lesions in vivo. *J Dent Res*. 1988;67(12):1461-5.

Messias DC, Turssi CP, Hara AT, Serra MC. Sodium bicarbonate solution as an anti-erosive agent against simulated endogenous erosion. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(4):385-8.

Meurman JH, Härkönen M, Näveri H, Koskinen J, Torkko H, Rytömaa I, et al. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res*. 1990;98(2):120-8.

Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr*. 2001;20(Suppl):168S-185S.

Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res*. 1997;31(1):44-9.

Millward A, Shaw L, Smith AJ, Rippin JW, Harrington E. The distribution and severity of tooth wear and the relationship between erosion and dietary constituents in a group of children. *Int J Paediatr Dent*. 1994;4:151-7.

Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J*. 1998;48(6):529-39.

Murakami C, Bönecker M, Corrêa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol*. 2009;54(11):997-1001.

Nunn JH, Gordon PH, Morris AJ, Pine CM, Walker A: Dental erosion—changing prevalence? A review of British National children's surveys. *Int J Paed Dent*. 2003;13:98-105.

Ramalingam L, Messer LB, Reynolds EC. Adding casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to sports drinks to eliminate in vitro erosion. *Pediatr Dent*. 2005;27(1):61–7.

Reussner GH, Coccodrilli JJ, Thiessen JR. Effects of phosphates in acid-containing beverages on tooth erosion. *J Dent Res*. 1975;54(2):365-70.

Reussner GH, Pearl River NY. Beverage mix and method. US Patent no. 3,968,263. 1976.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2006;40(3):218-23.

Rugg-Gunn AJ, Maguire A, Gordon PH, McCabe JF, Stephenson G. Comparison of erosion of dental enamel by four drinks using an intra-oral appliance. *Caries Res*. 1998;32(5):337-43.

Rytömaa I, Meurman JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R. In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res*. 1988;96(4):324-33.

Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol*. 2007;52(2):128-32.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2):178-90.

Shellis RP, Addy M, Rees GD. In vitro studies on the effect of sodium tripolyphosphate on the interactions of stain and salivary protein with hydroxyapatite. *J Dent*. 2005;33(4):313-24.

Sobral MA, Lachowski KM, de Rossi W, Braga SR, Ramalho KM. Effect of Nd:YAG laser and acidulated phosphate fluoride on bovine and human enamel submitted to erosion/abrasion or erosion only: an in vitro preliminary study. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):709-13.

Sorvari R, Kiviranta I, Luoma H. Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats. *Scand J Dent Res*. 1988;96(3):226-31.

Straub DA. Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications. *Nutr Clin Pract*. 2004;22(3):386-96.

Syed J, Chadwick RG. A laboratory investigation of consumer addition of UHT milk to lessen the erosive potential of fizzy drinks. *Br Dent J*. 2009;206(3):154-5.

ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2):241-4.

Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res*. 2002;36(6):423-9.

Van der Reijden WA, Buijs MJ, Damen JJM, Veerman ECI, ten Cate JM, Nieuw Amerongen AV. Influence of polymers for use in saliva substitutes on de- and remineralization of enamel in vitro. *Caries Res*. 1997;31(3):216-23.

Vlacic J, Meyers IA, Walsh LJ. Laser-activated fluoride treatment of enamel as prevention against erosion. *Aust Dent J*. 2007;52(3):175-80.

Wagg BJ, Friend JV, Smith GS. Inhibition of the erosive properties of water ices by addition of calcium and phosphate. *Br Dent J*. 1965;119(3):118-23.

West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil*. 2000;27(10):875-80.

West NX, Hughes JA, Parker D, Weaver LJ, Moohan M, De'Ath J, et al. Modification of soft drinks with xanthan gum to minimise erosion: a study in situ. *Br Dent J*. 2004;196(8):478-81

West NX, Hughes JA, Parker DM, Moohan M, Addy M. Development of a low erosive carbonated fruit drinks. 2. Evaluation of an experimental carbonated blackcurrant drink compared to a conventional carbonated drink. *J Dent*. 2003;31(5):361-5.

West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. *J Dent.* 1999;27(5):341-4.

West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent.* 1998;26(4):329-35.

Wiegand A, Egert S, Attin T. Toothbrushing before or after an acidic challenge to minimize tooth wear? An in situ/ex vivo study. *Am J Dent.* 2008a;21(1):13-6.

Wiegand A, Müller I, Schnapp JD, Werner C, Attin T. Impact of fluoride, milk and water rinsing on surface rehardening of acid softened enamel. An in situ study. *Am J Dent.* 2008b;21(2):113-8.

Wiktorsson AM, Zimmerman M, Angmar-Mansson B. Erosive tooth wear: prevalence and severity in Swedish winetasters. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(6):544-50.

Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):162-77.

Zero DT, Lussi A. Behavioral factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:100-5.

Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

ANEXO A – Folha de aprovação da IUPUI/Clarian Institutional Review Board para o uso de dentes humanos nas pesquisas realizadas no Oral Health Research Institute da Universidade de Indiana

IUPUI/CLARIAN INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (IRB) REVIEW

APPLICATION FOR RESEARCH NOT SUBJECT TO FDA OR COMMON RULE
DEFINITIONS OF HUMAN SUBJECTS RESEARCH

NS0911-07

Please type only in the gray boxes. To mark a box as checked, double-click the box, select "checked", and click "OK".

SECTION I: PERSONNEL INFORMATION

Principal Investigator: Domenick Zero, DDS Department: Oral Health Research Institute
Building/Room No.: OH Phone: 317-274-8822 E-Mail: dzero@iupui.edu
Contact Information: Name: Sue Kelly, CCRC Address: OH 106
Phone: 274-3954 Fax: 274-5425 E-Mail: sakelly@iupui.edu
If this is a Student Protocol, List Name of the Student: _____ Phone: _____
Study Title: Collection of Human Teeth for In Vitro and In Situ Research Studies (03-D-158)
Sponsor/Funding Agency: n/a Grant/Sponsor No.: /
Sponsor Protocol #/Grant #: _____ Period: From: Nov 2009 to indefinite
Sponsor Type: ☐ Federal ☐ State ☐ Industry ☐ Not-for-Profit ☒ Unfunded; ☐ Internally Funded
Grant Title (if different from project title): _____

SECTION II: PROJECT TYPE

Refer to the Checklist for Determining Whether an Activity Requires Review by the IUPUI/Clarian IRB for additional information.

☐ **Research Involving Data on Decedent PHI.** Please indicate that the following criteria are satisfied:

- ☐ The use is solely for research on the identifiable health information of decedents.
- ☐ The PHI sought is necessary for the purposes of the research; and
- ☐ Upon request, the covered entity disclosing the data may require the investigator to provide documentation of the death of the individual(s) about whom information is being sought.

☐ **Limited Data Set.** The research uses or discloses PHI as a limited data set for research purposes.

This project type may only be selected if the following is true: Your data set excludes 16 specified identifiers that are listed in the regulations, including: name, street address, telephone and fax numbers, e-mail address, social security number, certificate/license number, vehicle identifiers and serial numbers, URLs and IP addresses, and full face photos and other comparable images. The limited data set could include the following identifiable information: admission, discharge, and service dates, date of death, age (including age 90 and older), and five digit zip code.

Indicate from where the data will be obtained:

☐ The data will be provided from a covered entity (e.g. division, department, or practice plan) separate from that of the investigator. **NOTE: A data use agreement must be established between the entity(ies) providing the data and the investigator.** See the Confidentiality and Privacy SOP for additional information.

☐ The data will be obtained from within the investigator's own covered entity (e.g. his/her own data or that of the department). **No data use agreement is required.**

☐ Other, please explain:

☐ **De-Identified Health Information.** The research involves the use or disclosure of de-identified health information.

This project type may only be selected if the following is true: The health information excludes all of the following: (1) Name; (2) All geographic subdivisions smaller than a state, including street address, city, county, precinct, zip codes if the geographic unit of combining all the same three initial digits contains more than 20,000 people; (3) All elements of dates (except year) for dates directly related to an individual, including birth date, admission date, discharge date, date of death; and all ages over 89 and all elements of dates (including year) indicative of such age, except that such ages and elements may be aggregated in a single

category of age 90 or older; (4) Telephone numbers; (5) Fax numbers; (6) Electronic mail addresses; (7) Social security numbers; (8) Medical record numbers; (9) Health plan beneficiary numbers; (10) Account numbers; (11) Certificate/license numbers; (12) Vehicle identifiers and serial numbers, including license plate numbers; (13) Device identifiers and serial numbers; (14) Web universal resource locators (URLs); (15) Internet protocol (IP) address numbers; (16) Biometric identifiers, including finger and voice prints; (17) Full face photographic images and any comparable images; and (18) Any other unique identifying number, character, or code.

- ☒ **Coded Private Information or Biological Specimens.** The research involves only coded private information or specimens.

To qualify for this type of review, the private information or specimens cannot be linked to specific individuals by the investigator(s) either directly or indirectly through coding systems. To qualify, both of the following conditions must be met:

- ☒ The private information or specimens were **not** collected specifically for this proposed research project through an interaction or intervention with living individuals. **NOTE: If this condition is not met, then your research involves human subjects and requires a human subjects research submission.**

AND

- ☒ The investigator(s) cannot readily ascertain the identity of the individuals to whom the private information or specimens pertain because: (mark which option(s) applies)

- ☐ the key to decipher the code will be destroyed before the research begins
- ☐ the investigator(s) and the holder of the key will enter into an agreement prohibiting the release of the key to the investigator(s) under any circumstances, until the individuals are deceased
- ☒ Other. Please explain: Human teeth are needed for in situ and in vitro studies. Dentists send teeth in large jars that are completely deidentified. The jars are emptied into vats that contain hundreds of teeth that cannot be identified.

For additional information on research with coded private information or biological specimens, please refer to the OHRP Guidance on Research Involving Coded Private Information or Biological Specimens (October 16, 2008) at: <http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/cdebiol.pdf>.

SECTION III: PROJECT DESCRIPTION

1. Provide a brief description, in lay terms, of the purpose of the proposed project and the procedures to be used.

The purpose of this project is to collect human teeth from oral surgeons around the country for development into enamel specimens for in situ and in vitro research studies. Specimens are received in bulk from dental offices and placed into large vats for sorting and development of specimens. No identifiers are provided from the oral surgeons collecting the teeth.

2. Provide a list of all data points that will be collected below or attach a data collection sheet.

na

Statement of Principal Investigator. By submitting this form, the Principal Investigator acknowledges that he/she has personally reviewed this report and agrees with the above assessment.

For IRB Use Only:

- ☒ Accepted
- ☐ Denied
- ☐ Separate human subjects application must be submitted.
- ☐ Project doesn't meet ethical principles
- ☐ Other action required: _____

Authorized Signature: _____

Date: _____

NOV 27 2009

ANEXO B – Folha de aprovação IUPUI/Clarian Institutional Review Board para a realização do estudo *in situ* apresentado nessa tese

04

IUPUI/CLARIAN INSTITUTIONAL REVIEW BOARD (IRB) REVIEW
DOCUMENTATION OF REVIEW AND APPROVAL (DRA)

IRB STUDY NUMBER: **1004-53**
(IRB Office will assign)

Please type only in the gray boxes. To mark a box as checked, double-click the box, select "checked", and click "OK". April 8, 2010

SECTION I: INVESTIGATOR INFORMATION

Principal Investigator: Anderson Hara, DDS, Ph.D. Department: OH
(Last, First, Middle Initial-----must have faculty/staff status or faculty sponsor must sign)

Building/Room No.: OH 106 Phone: 4-8822 E-Mail: ahara@iupui.edu

Contact Information:
Name: Sue Kelly Address: OH 106 Phone: 4-3954
Fax: 4-5425 E-Mail: sakelly@iupui.edu

If this is a Student Protocol, List Name of the Student: na Phone: na

Protocol Title: Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)

Sponsor/Funding Agency: internal PI on Grant: na

Sponsor Protocol #/Grant #: _____ Period: From: May 2010 to July 2010

Sponsor Type: ☐ Federal ☐ State ☐ Industry
☐ Not-for-Profit ☐ Unfunded ☒ Internally Funded

Grant Title (if different from project title): na

SECTION II: TYPE OF REVIEW

☒ Expedited Review
☐ Full Board Review (Choose One) → ☐ Behavioral or Social Sciences (IRB-01)
☐ Biomedical (Choose One) → ☐ IRB-02 ☐ IRB-03 ☐ IRB-04 ☐ IRB-05

SECTION III: SPECIAL SUBJECT POPULATIONS INVOLVED IN THE RESEARCH

☐ Children ☐ Human Fetuses (or Fetal Tissue) or Neonates
☐ Cognitively Impaired ☐ Pregnant Women
☐ Economically/ Educationally Disadvantaged ☐ Prisoners

SECTION IV: DOCUMENTS INCLUDED WITH RESEARCH SUBMISSION

☒ Informed Consent Document(s), dated: April 8, 2010 ☐ Assent Document(s), dated: _____

# of consent documents: 1 # of assent documents: _____

☒ Expedited Research Checklist, dated: April 8, 2010 ☒ Summary Safeguard Statement (SSS), dated: April 8, 2010
☒ Recruitment Checklist, dated: April 8, 2010 ☒ Authorization(s), dated: April 8, 2010
☐ Advertisement(s), dated: _____ ☒ Protocol, dated: April 8, 2010
☐ Drug Brochure/Packet Insert, dated: _____ ☒ Other, description: IND Checklist, dated: April 8, 2010
☒ Other, description: Telephone form, dated: April 8, 2010
☒ Other, description: acknowledgements

You only need to list document dates if they are required by the investigator or sponsor.

Recorded in the Minutes of: _____ 1 v05/01/09

SECTION V: INVESTIGATOR STATEMENT OF COMPLIANCE

By submitting this form, the Principal Investigator assures the Board that all procedures performed under the project will be conducted in strict accordance with those federal regulations, University and Clarian Health Partners policies that govern research involving human subjects. He/she acknowledges that he/she has the resources required to conduct research in a way that will protect the rights and welfare of participants. He/she agrees to submit *any* deviation from the project (e.g. change in principal investigator, research methodology, subject recruitment procedures, etc.) to the Board in the form of an amendment for IRB approval prior to implementation.

SECTION VI: IRB APPROVAL

This research project, including all documents included with the submission (e.g., informed consent statement, authorization, and/or waiver of authorization) has been reviewed and approved by the Indiana University-Purdue University Indianapolis Institutional Review Board or the Clarian Institutional Review Board for a maximum of a one year period beyond the final approval date unless otherwise indicated as follows:

Authorized IRB Signature: AMM WALT IRB Approval Date: 5.4.2010

MAY 04 2010

Recorded in the Minutes of: MAY 18 2010

ANEXO C – Modelo do Consentimento Livre e Esclarecido (em inglês) utilizado no estudo *in situ***IUPUI and Clarian Informed Consent Statement for “Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)”**

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Anderson Hara, DDS, Ph.D.

ADDRESS OF STUDY SITE: Oral Health Research Institute
415 Lansing Street
Indianapolis, IN 46202

DAYTIME TELEPHONE: (317) 274-8822

AFTER HOURS TELEPHONE: In a study related emergency only, call (317) 278-9095

INTRODUCTION

You are being asked to volunteer for a dental research study. You were chosen as a possible subject because you have been in a previous study using a palatal appliance (fits in the roof of the mouth) that we made just for you. This study will use that same appliance. Before agreeing to be in this study, it is important that you read this form. This form, called a consent form, describes the purpose, procedures, benefits, risks and discomforts of the study. No promises or guarantees can be made as to the results of the study. Please ask any questions you have so you can decide if you want to be in the study.

To be in this study, it is important that you answer the questions asked of you truthfully. If you are not completely truthful with the study dentist and staff, you may harm yourself by being in this study.

BACKGROUND AND PURPOSE OF STUDY

Dental erosion is the gradual wearing away of the enamel (outside surface) of the teeth caused by drinking high acid products like soda or orange juice. In research, we can create an erosion-like process on teeth specimens in an appliance in the mouth that helps us study products to see how well they fight dental erosion.

In this study we will look at the erosive potential of orange juice with and without food-approved calcium salts. To do this, 8 bovine (cow) teeth specimens will be placed in your appliance. You will do three erosive challenge tests (described below) per test day, using one of the five orange juice products per test day. At the end of each four hour test day, we will remove the specimens from the appliance and study them in the lab.

STUDY PRODUCTS

There will be five orange juice products tested in this study. Two of the orange juice products will be purchased at the store, one with calcium and one without. The other three products will be orange juice purchased at the store with calcium salts added the morning of the test.

LENGTH OF STUDY AND NUMBER OF SUBJECTS EXPECTED TO PARTICIPATE

It is expected that the length of time you will be in this study will be about four weeks. If you agree to be in this study, you will be one of up to 10 subjects participating in this study.

TO BE IN THIS STUDY

You must be at least 18 years old to be in this study and not have cavities or gum disease. You cannot be diabetic or have any other condition that would make not eating for over four hours unsafe for you.

WHAT WILL HAPPEN DURING THE STUDY

This study will require you to make the following six visits:

Visit 1 Screening (about 60 minutes): You will be asked to read this consent and an Authorization for Release of Health Information for Research form. The information in these forms will be explained to you, and you will have the chance to ask questions and to decide if you want to be in this study. The study dentist will examine your mouth and ask you questions to determine if you are eligible to participate. You will provide two saliva samples to see if you have a normal flow of saliva. To do this

IUPUI and Clarian Informed Consent Statement for "Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)"

you should allow your saliva to pool in your mouth and spit into a cup whenever you feel the need to swallow. During one of the collections, you will chew tasteless gum to help increase your saliva flow.

If you qualify to participate your appliance will be tried in to determine fit and comfort. You may sit with the appliance in place for up to 15 minutes to be sure it fits comfortably. After removal from your mouth, the appliance will be cleaned and loaded with 8 tooth specimens and refrigerated until your next visit. You will be given a marketed (bought at the store) toothpaste to use twice daily throughout the study.

Visit 2 – Test Day 1 (about 4 hours and 20 minutes): On the morning of your test visit you can brush your teeth at home with study toothpaste up to two hours before the appointment. You may eat up to 30 minutes before the appointment but you should brush your teeth with water when you finish eating. You will receive an exam of your mouth and answer questions to determine if you are eligible to continue in the study.

You will do a taste test to see if you think there is any difference in taste between the orange juice bought at the store and the juice you will be testing that day. To do this you will hold the first juice in your mouth for 15 seconds and then spit it out. You will rinse with water and hold the second juice in your mouth for 15 seconds and spit it out. You will then rinse with water and answer questions about differences in taste between the two juice products.

You will place the appliance in your mouth for five minutes. After five minutes, two specimens will be removed from your appliance and the appliance will immediately be placed back in your mouth. You will begin the first of three erosion challenge tests. To do this, you will place 10 mL of juice in your mouth and with your tongue, hold the juice against the appliance for 15 seconds, spit out the juice, wait 15 seconds, and repeat the procedure with 10 ml of fresh juice continuously for 20 minutes. You will then sit quietly for 60 minutes after which two more specimens will be removed from the appliance. During this brief time when the appliance is out of your mouth, you may drink water, if desired. The appliance will be placed back in your mouth and the erosion challenge test will be repeated for the next 20 minutes. After waiting 60 minutes, two more specimens will be removed, you may again drink water, the appliance will be placed back in your mouth and the erosion challenge testing procedure will be repeated for the last time. You will wear the appliance a final 60 minutes and the remaining specimens will be collected.

At the end of the test day you will rinse your mouth for one minute with water and then rinse your mouth for one minute with a marketed fluoride rinse. You should not brush your teeth again until bedtime. You will be scheduled for another study visit at least two days after this visit.

Visits 3, 4, 5, and 6: The steps described under Visit 2 will be repeated until you have used all five orange juice products. At the end of Visit 6, your participation in this study will end.

STUDY OBLIGATIONS AND RESPONSIBILITIES

It is important that you tell the study staff about your past and current medical conditions, even if it seems to have little to do with the study. It is important that you tell the staff if you are nursing your baby or if you are pregnant. Be sure to report your address/phone number changes during the study.

POSSIBLE SIDE EFFECTS AND RISKS OF THE TREATMENT

It is important that you tell the study staff about any side effects you have during the study. Because calcium salts are being added to the marketed juice unanticipated side effects may not be known. There may be rare and unknown side effects, including allergic reactions. As a precaution you will receive an oral exam at the beginning and end of each test visit.

During the test days you will not be able to eat or drink anything for 30 minutes before and during the estimated 4 hour and 20 minute test. You may have water during two short breaks while specimens are being removed from the appliance. You should eat and drink something up to 30 minutes before coming to your appointment to avoid feeling weak, light headed or dizzy from not eating and drinking. If you are diabetic or have any disorder that is affected by not eating more frequently you should not be in this study.

IUPUI and Clarian Informed Consent Statement for "Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)"

The tooth specimens in your appliance will be cut from bovine (cow) teeth. They will be sterilized (all germs removed) under strict infection control procedures before being inserted into your appliance.

There is a risk of possible mouth tissue soreness due to wearing the appliance and doing the orange juice erosion challenges. We will examine your mouth at the beginning and end of each test day but you should tell us if you develop any problems associated with being in the study.

The orange juice erosive challenge will involve sipping and spitting out about 5 cups of orange juice for each test day and may produce a slight risk of dental erosion on your natural teeth. This risk is very low because human teeth are stronger against dental erosion than the bovine specimens used in your appliance. In addition the amount of time the orange juice stays in the mouth would be considered too short to cause any longterm problems to human teeth. You will hold, not swish, the juice in your mouth to avoid as much contact with your teeth as possible. You will be given a fluoride rinse to use at the end of each test day. You should not brush your teeth until the evening of the test day to allow the fluoride rinse time to work.

As with any dental procedure, irritation or accidental injury to the oral soft tissues (gums, cheek linings, etc) is a possibility. Cross contamination (germ spreading) is also a risk but will be reduced through the use of experienced personnel using strict infection control procedures (germ fighting) as outlined by the Infection Control Committee of the IU School of Dentistry.

Additionally, accidental loss of confidentiality of dental records is also possible. To reduce this risk, all records and data created by this study will be stored in locked cabinets that only study personnel can get into. With the exception of the forms you signed, a unique study number will be the only thing that identifies your records.

DANGERS OF PREGNANCY AND BIRTH CONTROL FOR FEMALES OF CHILD BEARING POTENTIAL

You will not be allowed to be in the study if you are pregnant or plan to become pregnant during the next two months. If you become pregnant during study, call the study dentist right away to report you are pregnant. The study staff will follow your pregnancy to term.

POSSIBLE BENEFITS OF THE STUDY

No benefits should be expected from this study.

OTHER METHODS OF TREATMENT AVAILABLE

You are not being treated for a dental condition; hence, there is no alternative therapy. An alternative to participating in this study is to not take part.

LEGAL RIGHTS

You will not lose any of your legal rights as a research subject by signing this consent form.

RELEASE OF YOUR MEDICAL RECORDS, DISCLOSURE OF INFORMATION AND PRIVACY

Records of you being in this study will be confidential except as required by law. However, the study dentist, the Food and Drug Administration (FDA) and other government offices like the Office for Human Research Protection (OHRP) may be given a copy of this information. The Institutional Review Board (IRB) may inspect and copy your records, which will identify you by name. Therefore, absolute confidentiality cannot be guaranteed. By signing this consent form, you authorize the study dentist to release your study-related medical records to the FDA and the IRB.

PAYMENT FOR INJURY RELATED TO THE STUDY

In the event of physical injury resulting from your participation in this research, necessary medical treatment will be provided to you and billed as part of your medical expenses. Costs not covered

IUPUI and Clarian Informed Consent Statement for "Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)"

by your health care insurer will be your responsibility. Also, it is your responsibility to determine the extent of your health care coverage. There is no program in place for other monetary compensation for such injuries. However, you are not giving up any legal rights or benefits to which you are otherwise entitled.

WHOM TO CONTACT

For questions about the study or a research related injury, please call the researcher, Dr. Anderson Hara or his staff at (317) 274-8822. For emergencies that you feel may be related to this study that fall after regular business hours, call our emergency answering service at (317) 278-9095. One of the researchers will be contacted and will call you back as soon as possible. If you want to reach the researcher during regular business hours (8:00 am–5:00 pm weekdays) but can't, call the IUPUI/Clarian Research Compliance Administration office at (317) 278-3458 or toll free at (800) 696-2949.

For questions about your rights as a research participant or to discuss problems, complaints or concerns about a research study, or to obtain information, or offer input, call the IUPUI/ Clarian Research Compliance Administration office at (317) 278-3458 or (800) 696-2949.

PAYMENT FOR BEING IN THE STUDY

You will receive \$25 for the screening visit, whether you qualify or not. This payment will be as a check sent to you in the mail if you don't qualify or given on or before visit 2 if you do qualify. You will receive \$125 for each test day completed. You will receive these payments as a check at the end of each test day. If you complete the screening and qualify, and then complete the entire study you will receive a total of \$650

YOUR PARTICIPATION IN THE STUDY

You cannot be forced to be in this study. You may refuse to be in this study, or you may leave the study at any time, without punishment or loss of benefits to which you are entitled and without affecting your future medical/dental care. The study dentist may take you out of the study without your permission at any time for the following reasons:

- if you do not follow the instructions of the study dentist
- if it is discovered that you do not meet the study requirements
- if the study is canceled
- if it appears to be medically harmful to you

If you leave the study or if you are taken out of the study for any reason, you may be asked to return to the research site for a final visit. This is to make sure that you are in good health and to collect your study product.

ADDITIONAL COSTS

There is no cost to you for participating in this study.

NEW INFORMATION

You will be told about any significant new findings about the study product. This information can help you decide if you wish to continue your participation in the study.

PRIMARY CARE PHYSICIAN/DENTIST NOTIFICATION OPTION

Please indicate below whether you want us to notify your primary care physician or dentist of your participation in this study.

_____ Yes, I want the study dentist to inform my primary care physician/dentist of my participation in this study.

_____ No, I do not want the study dentist to inform my primary care physician/dentist of my participation in this study.

IUPUI and Clarian Informed Consent Statement for "Erosive potential of orange juice modified by additives (10-I-066)"

_____ I do not have a primary care physician/dentist.

AGREEMENT TO BE IN THE STUDY

This consent form contains important information to help you decide if you want to be in the study. If you have any questions that are not answered in this consent form, ask one of the study staff.

A.	Did you follow the information in this consent form?	_____
B.	Have you been able to ask questions and talk about the study?	_____
C.	Have all of your questions been answered to your satisfaction?	_____
D.	Do you think you received enough information about the study?	_____
E.	Do you know that you can leave the study at any time without giving a reason and without affecting your medical/dental care?	_____
F.	Do you know that there are five test visits in this study and each will last about four hours and 20 minutes?	_____
G.	Do you know that specimens made from cow's teeth will be sterilized And placed in the appliance you will wear during a test visit?	_____
H.	Do you know that you cannot eat or drink anything for 30 minutes before each test visit and throughout the test visit (except water two times)?	_____

If you answered NO to any of these questions, you should not sign this consent form.

When you sign this consent form you agree that:

- you have had a chance to ask questions
- you understand English
- you want to be in the study

You will not lose any of your legal rights by signing this consent form.

Signature of Study Subject or Legally Authorized Representative	Date

Printed Name of Study Subject	Date

Signature of Person Explaining Informed Consent	Date

You will be given a copy of this consent form to keep.

IRB Approval Date: May 4, 2010

Continuing Review Date: May 4, 2011