STELLA DA SILVA FERREIRA

**Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de
caseína e ovalbumina**

São Paulo

2011

STELLA DA SILVA FERREIRA

**Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de
caseína e ovalbumina**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação 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-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ferreira, Stella da Silva

Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de caseína e ovalbumina [versão original] / Stella da Silva Ferreira; orientador Maria Ângela Pita Sobral. -- São Paulo, 2011.

84p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação -- 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. Caseína. 3. Ovalbumina. 4. Dentística. I. Sobral, Maria Ângela Pita. II. Título.

Ferreira SS. Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de caseína e ovalbumina. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre 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: _____

*Dedico este trabalho à minha família que sempre foi o alicerce da minha vida... Aos meus amados pais, **Ruy** e **Sandra**, que me permitiram alcançar mais este sonho, sempre depositando em mim a sua confiança. Obrigada, pelo exemplo de vida que vocês são para mim e por todo o seu amor e dedicação durante toda a minha educação.*

*Ao meu irmão, **Dani**, por estar sempre presente em minha vida, apoiando as minhas decisões e torcendo com as minhas conquistas.*

*À família que tive a oportunidade de construir ao lado do meu grande amor, **Marcus**, meu noivo e companheiro com quem hoje divido todos os meus momentos. Obrigada por fazer parte da minha vida de uma forma tão especial, nunca medindo esforços para me ajudar. Por todo o seu amor e paciência, sempre apoiando as minhas escolhas e por fazer dos meus sonhos os seus.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Maria Angela Pita Sobral**, que desde o nosso primeiro contato me recebeu muito bem, estando sempre disposta a me ajudar, e por ter acreditado que eu era capaz sem nem mesmo me conhecer. Obrigada pela confiança depositada e por dividir comigo a sua experiência e conhecimentos.*

*Ao **Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef**, que me recebeu tão bem e acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava. Agradeço por toda a confiança, pelas oportunidades e por todas as pessoas especiais que você colocou no meu caminho, que contribuíram muito para o meu crescimento profissional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por estar sempre presente em minha vida, e por permitir que eu chegasse até aqui, me fazendo suportar a saudade e a ausência dos meus familiares e amigos. Obrigada por colocar no meu caminho pessoas especiais, que tornaram essa jornada mais amena.

À toda a minha **família** que está em Belém, por sempre acreditar em mim, apoiando-me em todos os momentos e incentivando-me na busca dos meus ideais.

Às minhas **amigas** de Belém, Ana Camila, Flávia e Karime por entenderem a minha ausência física e por demonstrarem sempre a sua verdadeira amizade.

À **Prof^a. Dr^a. Miriam Lacalle Turbino**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Dentística, por toda a ajuda durante o curso e por ter apoiado e permitido a realização do meu projeto em Indianapolis. Obrigada por toda a ajuda na estatística dessa dissertação.

Ao **Prof. Dr. Narciso Garone Netto**, pela excelente convivência que tivemos ao longo deste curso, pela sua contribuição na minha qualificação e pelos momentos de descontração e alegria que dividimos.

À **Prof^a. Dr^a. Margareth Oda**, por todas as nossas conversas pelos corredores do departamento e pelas suas palavras de conforto nas situações difíceis.

À todos os **professores** do Departamento de Dentística, por toda a experiência e conhecimento passados ao longo destes dois anos.

À **Prof^a. Dr^a. Idalina Vieira Aoki**, do Departamento de Engenharia Química/Poli-USP, pela pessoa tão competente e prestativa que é. Obrigada por sempre encontrar um espaço na sua atribulada agenda para me ajudar a entender, interpretar e desenvolver as nossas pesquisas, e pela sua grandiosa colaboração neste trabalho.

À minha professora particular de Bioquímica, **Eliciane Matos**, aluna de doutorado da Bioquímica – USP, que muito me ensinou e me ajudou no entendimento desta parte da minha dissertação.

À todos os meus **professores** da graduação, que contribuíram muito para o meu crescimento e à **Faculdade de Odontologia da UFPA**, do qual muito me orgulho pela formação que tive.

Ao **Grupo de Apoio à Bioestatística** do Departamento de Dentística, por todo o auxílio e ajuda na realização da estatística desta dissertação. Em especial ao colega **Washington**, que colaborou e muito me ajudou nesta fase.

Aos Profs. **Dr. Domenick T. Zero** e **Dr. Anderson T. Hara** da Universidade de Indiana, pela grandiosa oportunidade que me deram de poder realizar o meu projeto nesta reconhecida universidade, aprendendo muito com o seu vasto conhecimento no assunto, e tendo a oportunidade de conhecer novos equipamentos e uma nova metodologia.

À **Tais Scaramucci**, que me ajudou muito desde a execução do projeto de pesquisa até a realização final dessa dissertação. Obrigada pela oportunidade de ter realizado essa pesquisa ao seu lado em Indianapolis e por dividir os seus conhecimentos comigo.

À minha grande amiga **Déa**, que tive a oportunidade de conhecer durante a pós. Por toda a nossa amizade, companheirismo, convivência dentro da faculdade e na intimidade com as nossas famílias, por todos os momentos de descontração e risada que tivemos juntas e por tornar as situações difíceis sempre mais fáceis com esse seu jeito alegre de ser.

À minha outra grande amiga **Taci**, que também tive o privilégio de conhecer na pós e conviver ao longo desses dois anos. Obrigada por todas as nossas conversas, pelos seus conselhos e por toda a sua ajuda, confiando em mim e no meu trabalho.

À **Karina**, minha única colega de turma, pela nossa convivência desde o estágio antes de entrarmos na pós e por todo esse caminho que percorremos juntas.

À todos os demais colegas da pós, **Fernando, Luciana, Fred, Simone, Amanda, Sérgio, Camila Bengston, Tati e Maíra** com quem tive a oportunidade de conviver nos estágios e durante a pós-graduação.

À querida **Wanessa Christine de Souza-Zaroni**, pela oportunidade de dividir comigo todos os seus conhecimentos. Obrigada pela paciência em me ensinar e pela sua amizade.

À **Soninha** querida, por toda a ajuda e companhia no laboratório. Obrigada pela sua paciência e o seu jeito sempre tão solícito.

Às funcionárias da Pós-Graduação **Cátia, Alessandra, Nair e Donata** pela competência em realizar o seu trabalho e sempre nos orientar.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, **Davi, Ana, Selma, Arnaldo, Aldo e Leandro** por todo o auxílio e colaboração.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à **Glauci** por toda ajuda e atenção na correção deste trabalho.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida, permitindo a realização deste trabalho.

Ao **Grant Indiana University School of Dentistry – Professional Development Program**, pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

RESUMO

Ferreira SS. Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de caseína e ovalbumina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

Nesse estudo *in vitro* foi avaliado o potencial erosivo do suco de laranja modificado pela adição de caseína, ovalbumina e a combinação entre elas, sobre o esmalte e a dentina humanos. Duas proteínas da dieta, 0.2 g/l de caseína (CAS), 2.0 g/l de ovalbumina (OVA) e a combinação entre elas (CAS + OVA) foram adicionadas a um suco de laranja disponível comercialmente. O suco de laranja sem aditivos foi utilizado como controle negativo (C-) e o suco de laranja com adição de cálcio, também disponível comercialmente, como controle positivo (C+). O potencial erosivo dos sucos experimentais foi primeiramente comparado utilizando o método do pH-Stat, e em seguida, através de um modelo *in vitro* de erosão-remineralização. 55 espécimes de esmalte e 55 de dentina radicular (4 x 4 x 2mm) foram obtidos e incluídos em um bloco de resina acrílica. Esses blocos foram então planificados com discos de lixa abrasivos e polidos com disco de feltro e pasta diamantada. As superfícies polidas receberam a aplicação de fitas adesivas, expondo uma janela de 4 x 1mm. Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos entre os 5 grupos experimentais (n = 11), e imersos nos respectivos sucos por 5 min, 6x ao dia, durante 5 dias. Entre as imersões e durante o período noturno, os espécimes permaneceram armazenados em saliva artificial. Após a ciclagem, os espécimes de esmalte foram analisados através de perfilometria óptica e microdureza (50 g, 15 s), enquanto que os espécimes de dentina foram analisados apenas por perfilometria óptica. Para o método do pH-Stat foi calculada a média do volume de HCl obtida em triplicata. Para a análise dos dados obtidos através de perfilometria e microdureza, foi utilizado o teste de Análise de Variância, um fator, seguido pelo teste complementar de Tukey, adotando um nível de significância de 5%. As médias do volume de HCl (em ml) obtidas no método do pH-Stat foram: C+ 0,46 ($\pm$ 0,03); CAS 1,22 ($\pm$ 0,06); OVA 1,10 ($\pm$ 0,10); CAS+OVA 1,08 ($\pm$ 0,01) e C- 1,07 ($\pm$ 0,02). Na avaliação do esmalte, a perda de estrutura (μ m) observada foi de: C+ 0,09 ($\pm$ 0,20); CAS -0,40 ($\pm$ 0,32); OVA -0,44 ($\pm$ 0,26); CAS+OVA -0,39 ($\pm$ 0,25) e C- -1,04 ($\pm$ 0,36).

Quanto a microdureza superficial, os valores de dureza Knoop obtidos foram: C+ 312,68 ($\pm$ 20,45); CAS 121,99 ($\pm$ 10,70); OVA 108,87 ($\pm$ 11,16); CAS+OVA 102,57 ($\pm$ 11,89) e C- 101,94 ($\pm$ 8,56). Para a dentina, a perda de estrutura observada foi de: C+ -0,82 ($\pm$ 0,28); CAS -7,26 ($\pm$ 0,65); OVA -6,74 ($\pm$ 1,18); CAS+OVA -7,16 ($\pm$ 0,75) e C- -7,51 ($\pm$ 1,26). Conclui-se que para o esmalte, os sucos de laranja modificados pela adição de proteínas apresentaram um potencial erosivo reduzido. A caseína mostrou uma melhor proteção da desmineralização subsuperficial do esmalte; a sua combinação com a ovalbumina não apresentou nenhum benefício adicional. Para a dentina, nenhuma redução no potencial erosivo foi observado para os sucos de laranja modificados pela adição de proteínas.

Palavras-chave: Erosão dentária. Esmalte dentário. Dentina. Ovalbumina.

ABSTRACT

Ferreira SS. Evaluation of the erosive potential of an orange juice modified by the addition of casein and ovalbumin [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

The erosive potential of a modified orange juice by addition of casein, ovalbumin and its combination, on human enamel and root dentin was evaluated in this in vitro study. Two dietary proteins, 0.2 g/l casein (CAS), 2.0 g/l ovalbumin (OVA) and their combination (CAS + OVA) were added to a commercially available orange juice. The juice with no additives was used as negative control (C-) and a commercially available calcium-modified juice as positive control (C+). The erosive potential of the experimental juices was initially compared by the pH-Stat method, and then, by an in vitro erosion-remineralization cycling model. 55 enamel and 55 root dentin specimens (4 x 4 x 2mm) were obtained and embedded in acrylic resin blocks. These blocks were ground flat with abrasive discs and polished with felt paper and diamond paste. The polished surfaces were covered with an adhesive tape, leaving a central area of 4 x 1mm exposed. The specimens were randomly allocated within the 5 experimental groups (n=11), and immersed in the respective juices for 5 min, 6x/day, for 5 days. Between the immersions and overnight they were stored in artificial saliva. After the cycling, the enamel specimens were analyzed by surface Knoop microhardness (50g, 15s) and optical profilometry, while dentin specimens were analyzed only by profilometry. The mean volume of HCl obtained in triplicate were calculated for the pH-Stat method. The data obtained for profilometry and microhardness were statistically analyzed using ANOVA, one-way, followed by Tukey's test considering a significance level of 5%. The mean volume of HCl (ml) obtained for the pH-stat method were: C+ 0,46 ($\pm$ 0,03); CAS 1,22 ($\pm$ 0,06); OVA 1,10 ($\pm$ 0,10); CAS+OVA 1,08 ($\pm$ 0,01) e C- 1,07 ($\pm$ 0,02). For enamel, the surface loss (μ m) was: C+ 0,09 ($\pm$ 0,20); CAS -0,40 ($\pm$ 0,32); OVA -0,44 ($\pm$ 0,26); CAS+OVA -0,39 ($\pm$ 0,25) e C- -1,04 ($\pm$ 0,36). Regarding microhardness, the Knoop hardness values were: C+ 312,68 ($\pm$ 20,45); CAS 121,99 ($\pm$ 10,70); OVA 108,87 ($\pm$ 11,16); CAS+OVA 102,57 ($\pm$ 11,89) e C- 101,94 ($\pm$ 8,56). For dentin, the surface loss (μ m) was: C+ - 0,82 ($\pm$ 0,28); CAS -7,26 ($\pm$ 0,65); OVA -6,74 ($\pm$ 1,18); CAS+OVA -7,16 ($\pm$ 0,75) and

C- -7,51 ($\pm$ 1,26). It was concluded that protein-modified orange juices presented reduced erosive potential on enamel. Casein showed a better subsurface demineralization protection, and its combination with ovalbumin did not lead to additional benefits. For dentin, any reduction on the erosive potential was observed for protein-modified orange juices.

Keywords: Tooth erosion. Dental enamel. Dentin. Ovalbumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - A – Suco de laranja original; B – Suco de laranja com adição de cálcio.....	48
Figura 4.2 - Balança analítica	49
Figura 4.3 - Tituladora automática	50
Figura 4.4 - A - Espécimes de esmalte e dentina incluídos em resina acrílica; B - Fita adesiva posicionada sobre os espécimes polidos	51
Figura 4.5 - Ciclo completo de erosão-remineralização..	52
Figura 4.6 - Copo com o espécime, encaixado no copo contendo a solução desmineralizante. Espécime completamente imerso na solução.....	54
Figura 4.7 - Espécimes imersos em saliva artificial, sob agitação na plataforma vibratória.....	55
Figura 4.8 - Fita adesiva sendo removida dos espécimes	55
Figura 4.9 - Perfilômetro óptico	56
Figura 4.10 - Imagem 3D mostrando as áreas da lesão e as áreas de referência totalmente escaneadas	57
Figura 4.11 - Esquema mostrando as 6 endentações realizadas nas áreas de referencia e as 3 endentações na área da lesão	58
Gráfico 5.1 - Médias da microdureza inicial e final para os espécimes de esmalte..	60
Quadro 4.1 - Nome comercial e fabricante das proteínas utilizadas.....	47
Quadro 4.2 - Composição da saliva artificial.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Nome comercial, fabricante e valor do pH inicial dos sucos utilizados.....	47
Tabela 4.2 - Descrição dos cinco grupos experimentais	48
Tabela 5.1 - Médias $\pm$ desvio-padrão do pH e do volume de HCl 0.1 M (em ml) necessários no método do pH-Stat.....	59
Tabela 5.2 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da alteração de dureza superficial do esmalte segundo os tratamentos propostos.....	61
Tabela 5.3 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da perda de esmalte segundo os tratamentos propostos	62
Tabela 5.4 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da perda de dentina segundo os tratamentos propostos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	micrômetro
$\mu\text{gF/g}$	micrograma de Flúor por grama
μl	microlitro
Al_2O_3	óxido de alumínio
Ca	cálcio
Ca^{+2}	íons cálcio
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cloreto de cálcio diidratado
g	grama
g/l	grama por litro
h	hora (s)
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodalton
KH_2PO_4	fosfato monopotássio
l	litro (s)
M	molar
mg	miligrama
mgCa/g	miligrama de cálcio por grama
mg/dia	miligrama por dia
mg/g	miligrama por grama
mg/ml	miligrama por mililitro
mgP/g	miligrama de Fósforo por grama
min	minuto (s)
ml	mililitro
mM	miliMolar
mmol/l	milimol por litro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
P	fósforo
pH	potencial hidrogeniônico

pka	constante de dissociação ácida
PO_4^{-2}	íons fosfato
ppm	parte por milhão
rpm	rotações por minuto
s	segundo (s)

LISTA DE SÍMBOLOS

x	vezes
%	porcentagem
~	aproximadamente
°C	graus Celsius
>	maior que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Fatores extrínsecos da Erosão Dental	20
2.2 Métodos de controle dos fatores extrínsecos da Erosão	27
2.2.1 Modificação das bebidas ácidas	27
2.2.2 O papel das proteínas na redução da dissolução da hidroxiapatita	35
2.2.2.1 Caseína e Ovalbumina no controle da Cárie Dental	37
2.2.2.2 Caseína e Ovalbumina no controle da Erosão Dental	41
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Delineamento experimental	46
4.2 Fase 1	46
4.2.1 Medição do pH inicial das soluções	46
4.2.2 Adição das proteínas	47
4.2.3 Método do pH-Stat	50
4.3 Fase 2	51
4.3.1 Preparo dos espécimes	51
4.3.2 Desafio erosivo	52
4.3.3 Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja	55
4.3.4 Análise estatística	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Avaliação do método do pH-Stat	59
5.2 Avaliação da Microdureza de Superfície	59
5.3 Avaliação da Perda de Estrutura	61
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A instituição de maiores cuidados preventivos e o aumento da expectativa de vida têm permitido com que a população consiga manter por mais tempo os dentes na cavidade bucal. Com isso, os efeitos deletérios provenientes dos desgastes dentários têm se tornado rotineiramente visíveis, especialmente no que se refere aos efeitos da erosão.

Definida como perda irreversível dos tecidos duros dentais (Eccles, 1979), causada por ácidos sem o envolvimento de bactérias, a erosão dental pode ser ocasionada por fatores intrínsecos e extrínsecos (Lussi et al., 1993). Os fatores extrínsecos estão fortemente relacionados ao aumento do consumo de alimentos e bebidas ácidas (Zero, 1996), que nas últimas décadas tem aumentado consideravelmente (Dugmore; Rock, 2004; Moynihan; Petersen, 2004).

Dentre as características inerentes às bebidas ácidas que são relevantes para a determinação do seu potencial erosivo, o pH é nitidamente de grande importância, visto que a solubilidade da hidroxiapatita, tanto em esmalte como em dentina, aumenta à medida que o pH diminui (Barbour; Rees, 2006). No entanto, esse não é o único fator a ser considerado na causa da dissolução mineral pela erosão (Hughes et al., 2000). Outras variáveis como o tipo de ácido (Meurman et al., 1987), a quantidade de ácidos tituláveis (Hanning et al., 2005), a capacidade tampão (Grenby, 1996), as propriedades quelantes (Lussi, 1996), bem como a presença de cálcio, fosfato e flúor em sua composição (Larsen; Nyvad, 1999) também devem ser consideradas.

A principal estratégia preventiva relacionada à erosão, está ligada à eliminação dos fatores etiológicos e, neste caso, a educação do paciente é de fundamental importância para o processo. Entretanto, os resultados são limitados, por serem fortemente dependentes da colaboração do paciente. Por esse motivo, esforços vêm sendo feitos, na tentativa de modificar a composição de algumas bebidas ácidas populares, a fim de diminuir o seu potencial erosivo (Larsen; Nyvad, 1999; Hughes et al., 2002).

A modificação mais comum descrita na literatura, e que vem apresentando sucesso, está relacionada à adição de sais de cálcio e fosfato, o que torna a bebida saturada em relação à hidroxiapatita (Larsen; Nyvad, 1999; West et al., 2003; Lussi

et al., 2004; Jensdottir et al., 2005). No entanto, essas modificações podem alterar o sabor da bebida, tornando-a inaceitável pelos consumidores.

Alternativamente, outras substâncias têm se mostrado efetivas na redução do potencial erosivo de uma solução ácida, como o flúor (Attin et al., 2003), os íons cobre (Brookes et al., 2003) e o ferro (Buzalaf et al., 2006), porém fatores incluindo legislação e a intoxicação que pode ser causada devido a grande concentração dessas substâncias, podem não permitir a sua adição às bebidas ácidas disponíveis comercialmente. A goma xantana que é um polímero aprovado para uso em alimentos também foi testada como potencial agente anti-erosivo (West et al., 2004; Barbour et al., 2005). Entretanto, os melhores resultados apresentados pela goma para a redução do potencial erosivo de uma bebida ácida foi combinada a um composto de fosfato (polifosfato).

Dessa forma, seria de grande importância encontrar agentes inibidores da dissolução da hidroxiapatita que possam ser utilizados na suplementação de bebidas ácidas, e que apresentem os pré-requisitos necessários para um aditivo, como não serem tóxicos, aprovados para uso em alimentos, de baixo custo e solúveis em soluções ácidas.

Uma promissora alternativa está ligada à utilização de duas proteínas da dieta alimentar, a caseína (proteína do leite) e a ovalbumina (proteína do ovo). Essas duas proteínas que têm mostrado um excelente potencial na redução da dissolução da hidroxiapatita, no que diz respeito à cárie dental (Reynolds; Del Rio, 1984; Arends et al., 1986; Reynolds; Black, 1987; 1989), atualmente, vêm sendo testadas com sucesso como agentes anti-erosivos em soluções ácidas (Barbour et al., 2008; Hemingway et al., 2008; Hemingway et al., 2010). No entanto, ainda existem poucos estudos na literatura que tenham testado essas proteínas como aditivos de bebidas ácidas disponíveis comercialmente e utilizando o esmalte e a dentina como substratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na primeira parte desse capítulo serão descritos os trabalhos relacionados aos fatores extrínsecos, responsáveis pela erosão dental. A segunda parte desse capítulo irá abordar a prevenção ou controle desses fatores extrínsecos.

2.1 Fatores extrínsecos da Erosão Dental

A erosão é descrita como o resultado físico de uma perda patológica, crônica e localizada de tecido duro dental, que é quimicamente removido da superfície do dente por ácidos e/ou quelação, sem o envolvimento de bactérias (ten Cate; Imfeld, 1996). A erosão dental pode ser caracterizada como uma desordem de etiologia multifatorial, sendo os fatores causais de origem intrínseca e extrínseca. As causas extrínsecas incluem os fatores ambientais, da dieta, de medicamentos e do estilo de vida. No entanto, os fatores relacionados à dieta têm recebido mais atenção, por afetarem um largo segmento da população. As evidências disponíveis suportam fortemente a relação de muitos alimentos e bebidas ácidas comumente ingeridos, com a erosão dental (Zero, 1996) e, ao longo dos últimos anos, a prevalência da erosão parece ter aumentado, provavelmente devido ao crescimento do consumo de refrigerantes e sucos de frutas (Numm, 1996).

O ácido cítrico, comumente presente na composição de frutas e sucos de frutas, pode estar fortemente relacionado com a erosão do esmalte, visto que apresenta enorme capacidade de quelação com o cálcio, aumentando sua capacidade erosiva. O suco de laranja é o suco de fruta mais popular consumido no mundo, e essa popularidade pode ser resultado do seu conhecido teor de vitamina C. A sua composição, com altos níveis de ácido cítrico, pode levar a uma erosão do esmalte e da dentina (Rees et al., 2006).

Existem muitos fatores envolvidos e que interagem com a erosão dental. A etiologia e a patogênese da erosão envolvem os fatores biológicos, comportamentais e químicos, os quais interagem com a superfície do dente e que, ao longo do tempo, podem remover essa superfície ou de fato protegê-la,

dependendo do seu equilíbrio (Lussi, 2006). O fator químico é um termo utilizado para descrever algumas características inerentes a alimentos e bebidas, que os tornam erosivos para a estrutura dental (Lussi et al., 2006). O potencial erosivo de uma bebida ácida não é dependente exclusivamente do seu pH, mas também é fortemente influenciada pelo tipo de ácido presente na sua composição (Meurman et al., 1987), pela sua titulação ácida (“capacidade tampão”) (Larsen; Nyvad, 1999), pelas suas propriedades quelantes (Lussi et al., 2006), bem como pela presença de cálcio, fosfato e flúor em sua composição que, em geral, é baixa e longe o suficiente para saturá-la (Larsen; Nyvad, 1999). O valor de pH e o conteúdo de cálcio, fosfato e flúor de uma bebida determinam o seu grau de saturação em relação ao mineral do dente. Soluções supersaturadas em relação aos tecidos duros dentais não irão dissolvê-los (Lussi; Jaeggi, 2006).

Muitos trabalhos *in vitro* e *in situ* têm sido realizados a fim de avaliar o potencial erosivo de diversos tipos de bebidas, frequentemente ingeridas.

West et al. (1998) desenvolveram um estudo *in situ*, para medir com precisão a erosão causada por um único agente etiológico durante um período de tempo relativamente curto. Espécimes de esmalte humano foram fixados nos dispositivos intra-orais, para serem utilizados pelos 10 voluntários selecionados para o estudo, durante 7 h ao dia. Cada voluntário consumia 250 ml de suco de laranja ou 250 ml de água, 4x ao dia, durante 15 dias. Duas medições de perfil foram feitas previamente à realização do estudo e ao final de cada dia do experimento. Após a conclusão do estudo, os espécimes também foram avaliados através de microdureza de superfície. A mesma investigação foi realizada *in vitro* utilizando espécimes de esmalte, sem a presença de saliva. Dez espécimes foram agitados em 250 ml de suco por 10 min, 4x ao dia, durante 15 dias. Entre as exposições e durante o período noturno, os espécimes eram armazenados em solução salina isotônica. Os espécimes foram avaliados da mesma forma, tanto para a perda de estrutura como para a microdureza de superfície. Os resultados do estudo *in situ* mostraram uma perda progressiva de esmalte com o tempo, durante o consumo do suco de laranja. O consumo de água não apontou nenhuma alteração nos espécimes, além dos parâmetros de referência definidos. Na investigação *in vitro*, o suco de laranja foi novamente o mais erosivo, na ordem de 10x daquele encontrado no estudo *in situ*, e o teste de microdureza revelou diferenças estatísticas

significantes entre as áreas expostas e não expostas, após o tratamento com essa bebida.

Hunter et al. (2000) desenvolveram um trabalho *in situ*, com o objetivo de avaliar a perda do esmalte e da dentina de dentes decíduos e permanentes, após o consumo de um suco de laranja de baixo pH. Os 16 voluntários selecionados utilizaram um dispositivo intra-oral contendo 4 espécimes de esmalte e 4 de dentina (2 decíduos e 2 permanentes), durante 7 h diárias, por 15 dias. Os voluntários deveriam beber 250 ml do suco de laranja, 4x ao dia. Ao final de 5, 10 e 15 dias, a perda de estrutura foi determinada através de perfilometria. Em todos os substratos, a erosão foi progressiva ao longo do tempo, com o padrão sendo mais linear no esmalte do que na dentina. Em geral, a erosão do esmalte decíduo foi maior que do esmalte permanente, e contrariamente, a erosão da dentina foi maior nos dentes permanentes. Os autores concluíram que as diferenças estatisticamente significantes na susceptibilidade do esmalte decíduo e permanente à erosão, parecem surgir ao longo do tempo e com o aumento da frequência do consumo. Assim, alertaram para a consideração que deve ser dada à prevenção da erosão através da modificação de produtos.

West et al. (2001) investigaram o efeito do pH, da titulação, do pKa e a da “capacidade tampão” de ácidos provenientes da dieta, na erosão do esmalte e da dentina. Foram utilizadas soluções de ácido cítrico, fosfórico e clorídrico, ajustadas com NaOH, e solução de ácido cítrico ajustada com citrato trissódico, em diferentes valores de pH. Os espécimes de dentina permaneceram agitados nas soluções desmineralizantes por 10 min, e os espécimes de esmalte por 30 min. A avaliação da perda de estrutura foi realizada através de perfilometria óptica. O ácido cítrico causou muito mais erosão do que o ácido fosfórico, para ambos os substratos, na faixa de pH empregado. O ácido cítrico comparado ao ácido clorídrico realçou os efeitos de dissolução e quelação. O ácido fosfórico causou uma erosão mínima em pH 3 para o esmalte e pH 4 para a dentina.

Hannig et al. (2005) investigaram os efeitos mínimos da erosão sobre o esmalte, causada por diferentes ácidos. Espécimes de esmalte bovino foram imersos de 1 a 5 min, em 8 diferentes ácidos (cítrico, málico, láctico, tartárico, fosfórico, oxálico, acético e clorídrico) em pH 2.0, 2.3 e 3.0. A quantidade de cálcio e fosfato liberados foi determinada, bem como a titulação ácida para todas as soluções. Os ácidos málico, tartárico, láctico, acético e clorídrico causaram uma

liberação linear de cálcio e fosfato. Para os ácidos cítrico, málico, láctico, tartárico, acético, fosfórico e clorídrico a perda mineral mostrou-se pH-dependente. O ácido láctico foi o mais erosivo. O ácido acético foi bastante erosivo em pH 3. Os ácidos clorídrico e málico mostraram-se com o menor potencial erosivo. Houve uma fraca correlação entre fosfato e cálcio liberados e a quantidade de titulação ácida. Os autores concluíram que durante um curto tempo de exposição, a um pH constante, os efeitos erosivos dependem principalmente do pH e do tipo de ácido, mas não da quantidade de titulação ácida.

Rees et al. (2006) compararam o potencial erosivo de um suco de laranja padrão (Tropicana) com um novo suco de laranja de baixa acidez. Os valores de pH, neutralização do ácido e a habilidade em causar erosão foram testados em laboratório. O suco de laranja padrão apresentou um menor valor de pH (3.88) quando comparado ao suco de baixa acidez (4.18). A neutralização do ácido foi menor para o suco com baixa acidez (16.96 ml de 0.1 M de NaOH) do que para o suco padrão (28.46 ml). A habilidade em causar erosão foi avaliada através de perfilometria, utilizando espécimes de esmalte humano. Os resultados apontaram que o suco de laranja de baixa acidez produziu menor erosão no esmalte (2.49 μm) do que o suco de laranja padrão (5.23 μm). Os autores concluíram que o suco de laranja com baixa acidez reduziu os valores de erosão em laboratório.

Brown et al. (2007) avaliaram o pH, a titulação e o potencial erosivo *in vitro* de uma seleção de águas gaseificadas aromatizadas disponíveis no mercado do Reino Unido. Foram utilizadas 11 bebidas diferentes e um suco de laranja com potencial erosivo conhecido, como controle positivo. O pH e a titulação das 11 bebidas aromatizadas foram medidos em triplicata. Todas as águas aromatizadas testadas mostraram uma titulação considerável e um baixo pH. Os três sabores (lima-limão, *grapefruit* e pêssego) que apresentaram maior titulação e baixo pH foram selecionados para avaliação do seu potencial erosivo, utilizando um teste de dissolução *in vitro* com pó de hidroxiapatita. No teste de dissolução da hidroxiapatita, todas as águas testadas apresentaram potencial erosivo similar ou maior do que o suco de laranja testado. Como conclusão, as águas gaseificadas aromatizadas devem ser consideradas como potencialmente erosivas.

A morfologia de superfície do esmalte humano, submetido à imersão em bebidas carbonatadas à base de cola, bebidas esportivas e bebidas energéticas foram avaliadas por Owens e Kitchens (2007). Quatro bebidas foram selecionadas

como teste (Coca-Cola clássica, Coca-Cola diet, Gatorade e Red Bull). A água foi utilizada como controle. Os valores de pH e titulação para cada bebida foram determinados. Os espécimes de esmalte permaneceram imersos nas soluções por 24 h, durante 14 dias, com as soluções sendo trocadas diariamente. Após esse período, as análises qualitativas através de microscopia por luz e microscopia eletrônica foram realizadas. A avaliação microscópica mostrou que todas as bebidas causaram dissolução no esmalte, sendo que a Red Bull causou mais erosão, seguida por Gatorade, Coca-Cola clássica e Coca-Cola diet.

Hunter et al. (2008) investigaram o efeito da diluição no potencial erosivo de 5 bebidas de frutas diluíveis. Foram testadas as diluições de 1 : 3 (uma parte de concentrado: três partes de água), 1 : 6 e 1 : 15. As medidas de pH e titulação para cada bebida foram realizadas. Espécimes de esmalte humanos foram obtidos e avaliados através de perfilometria para a determinação do seu perfil inicial. Após o delineamento da área exposta, os espécimes foram imersos em 250 ml de bebida, onde permaneceram sob agitação por 1 h. Ao final, a perfilometria foi novamente realizada, em triplicata, para determinação da perda de esmalte ocorrida. Para a maioria dos produtos, o aumento na diluição produziu um aumento estatisticamente significativo no pH inicial, embora eles ainda tenham permanecido ácidos, bem como, uma diminuição na titulação. Apenas 3 bebidas apresentaram uma redução significativa da erosão *in vitro*, após o aumento da diluição. Os autores concluíram que aumentando o fator de diluição das bebidas de frutas diluíveis, dentro de um limite considerado aceitável para os consumidores, pode não reduzir efetivamente o seu potencial erosivo.

Jager et al. (2008) avaliaram se a composição da bebida influenciaria na medição do seu potencial erosivo, e verificaram a influência de exposição a pequenos e grandes volumes das bebidas no processo de erosão. As 11 bebidas avaliadas foram: água (controle), duas bebidas alcóolicas com base em vodka e rum, três refrigerantes, um chá gelado, uma bebida esportiva, um suco de fruta e duas cervejas. Para cada bebida, 15 espécimes de esmalte bovino foram utilizados (5 para a análise química e 10 para a análise com perfilometria). Os espécimes foram expostos às bebidas por 63 min. Em seguida foi realizada a medição de Ca e P das soluções. Para a análise com perfilometria óptica os espécimes foram submersos sequencialmente em 500 ml ou 1 ml das bebidas, por 3, 6, 9, 15 e 30 min (total de 63 min). Para algumas bebidas foi encontrado um valor inicial alto da

concentração de Ca (bebida energética) ou P (Coca-Cola, Coca-Cola light lemon, cerveja e cerveja com limão). A perfilometria (para 1 e 500 ml) mostrou menores perdas de esmalte do que o método químico. Apenas para a Coca-Cola foram encontradas menores perdas de esmalte na perfilometria de 1 ml comparada a de 500 ml. Os autores concluíram que a composição das bebidas teve um efeito significativo na determinação do potencial erosivo com a análise química. A perfilometria óptica foi sugerida como uma alternativa de avaliação independente da bebida. A composição da bebida também influenciou no efeito de pequenos volumes, comparados a grandes volumes de exposição, indicando a necessidade de padronização dos parâmetros de exposição para os estudos de erosão.

Murrell et al. (2010) compararam as propriedades físico-químicas e o potencial erosivo de bebidas disponíveis na Inglaterra e nos Estados Unidos. Foram selecionadas 11 bebidas em pares, comumente consumidas, potencialmente erosivas e prontas para beber. As bebidas selecionadas incluíam: suco de maçã, suco de laranja e refrigerantes à base de Cola, laranja e limão, nas versões original e diet. As propriedades físico-químicas (pH, titulação e concentração de flúor) foram medidas para cada bebida disponível na Inglaterra e comparadas a suas similares dos Estados Unidos. O pH foi menor para o suco de maçã, suco de laranja, Pepsi diet e Sprite Zero da Inglaterra, e maior para o refrigerante de laranja original e diet da Inglaterra comparado às bebidas similares dos Estados Unidos. A profundidade das lesões foi avaliada através de microrradiografia e foram maiores para as bebidas: suco de maçã, suco de laranja, Coca-Cola diet, Sprite e Sprite Zero da Inglaterra, quando comparadas às suas similares dos Estados Unidos. Foram notadas diferenças para o pH, titulação e potencial erosivo entre as bebidas disponíveis na Inglaterra e nos Estados Unidos. Os autores ressaltam que é necessária uma investigação adicional para identificar se a formulação dos produtos contribui para os diferentes padrões clínicos de erosão observados entre a Europa e os Estados Unidos.

White et al. (2010) compararam o efeito da erosão sobre o esmalte humano e bovino, bem como sobre os tempos de exposição ao ácido de 2 s a 1 h. A desmineralização do esmalte humano e bovino foi comparada utilizando nanoindentação. Já a perda de tecido foi comparada através de perfilometria óptica. 56 espécimes de esmalte humano e bovino foram utilizados para o experimento com a nanoindentação e 64 foram utilizados para avaliação com a perfilometria. Os

espécimes foram imersos em solução de ácido cítrico (pH 3.2), sob agitação, nos tempos de 0, 2, 5, 10, 20, 30 e 60 s para a nanoendentação, e 2, 5, 10, 20, 40 e 60 min para a perfilometria. Ao final, todos os espécimes foram imersos em água deionizada por 60 s para remover totalmente o ácido e interromper a dissolução. A nanoendentação revelou um amolecimento estatisticamente significativo após 2 s (esmalte humano) e 5 s (esmalte bovino). A perda de tecido demonstrada pela perfilometria foi significativa após 20 min para o esmalte humano e 10 min para o bovino. A perda de tecido no esmalte bovino progrediu 30% mais rápido do que a perda para o esmalte humano.

Lodi et al. (2010) desenvolveram um trabalho *in vitro*, com o objetivo de avaliar a capacidade erosiva de bebidas fermentadas do leite, bem como algumas de suas propriedades que afetam a desmineralização do esmalte (pH, "capacidade tampão", conteúdo de flúor, fósforo e cálcio). Três diferentes lotes de 6 marcas comerciais de bebidas fermentadas do leite foram analisadas. Os 60 espécimes de esmalte bovino preparados foram imersos, nas primeiras 24 h, em saliva artificial. Em seguida, foram submetidos a 4 ciclos de desmineralização em 15 ml do leite fermentado, por 5 min, e remineralização em 15 ml de saliva artificial por 60 min. Após cada tratamento, os espécimes eram lavados com água deionizada. A superfície dos espécimes foi avaliada em relação à mudança de dureza de superfície (microdureza Knoop) e rugosidade superficial (rugosímetro). Os valores de pH para as bebidas analisadas variou de 3.51 a 3.87 e a "capacidade tampão" variou de 470.8 a 804.2 μ l de 1 mol/L NaOH. A concentração de flúor encontrada nas bebidas foi de 0.027 a 0.958 μ gF/g; a de cálcio foi de 0.478 a 0.817 mgCa/g e a concentração de fósforo variou de 0.266 a 0.504 mgP/g. De acordo com os resultados, algumas características que podem promover a desmineralização do esmalte, como baixo pH e alta "capacidade tampão" foram observadas nos produtos analisados. Por outro lado, a presença dos íons F, Ca e P nas bebidas analisadas podem ter reduzido a dissolução do esmalte produzida por substâncias ácidas. Nesse estudo *in vitro*, as bebidas fermentadas de leite não causaram erosão no esmalte, mas apenas uma perda mineral superficial.

2.2 Métodos de controle dos fatores extrínsecos da Erosão

Um pré-requisito importante, no que diz respeito à prevenção, relaciona-se à identificação dos pacientes sob risco de erosão, a fim de iniciar as medidas primárias de prevenção. E nesse caso é importante avaliar os diferentes fatores etiológicos que podem levar à erosão dental (Lussi; Hellwig, 2006).

No que diz respeito aos fatores relacionados à dieta, o dentista pode identificar o potencial erosivo da dieta do paciente, através de informações coletadas no diário alimentar registrado por ele. Isso é importante, pois durante uma conversa com o paciente, a identificação dos fatores de risco para a erosão é difícil, visto que o próprio paciente pode não conhecer o potencial erosivo de alguns alimentos ácidos presentes na sua dieta (Lussi; Hellwig, 2006).

A partir desses dados, uma série de orientações deve ser passada para o paciente. A forma mais efetiva de controle da erosão dental está relacionada à eliminação dos fatores etiológicos, ou seja, reduzir ou eliminar a exposição frequente à bebidas e alimentos ácidos, seria o fator principal. Nesse caso, a educação do paciente é de fundamental importância para o processo, uma vez que a maioria deles não sabe o quanto os seus hábitos contribuem para a destruição dos seus dentes (Zero; Lussi, 2005).

No entanto, essas estratégias preventivas podem apresentar um efeito limitado, já que dependem bastante da cooperação do paciente. A partir disso, seria muito interessante desenvolver estratégias preventivas que dependessem menos da colaboração do paciente.

2.2.1 Modificação das bebidas ácidas

Uma das alternativas que surgiu nos últimos anos para combater os efeitos dos alimentos e bebidas ácidas está relacionada à modificação da sua composição, de modo a reduzir o seu potencial erosivo.

Muitos alimentos ácidos, como as frutas contêm o ácido cítrico na sua composição naturalmente, e por isso não podem ser modificadas para inibir a

erosão. O ácido cítrico é amplamente utilizado para adicionar um sabor cítrico à alimentos e bebidas ácidas (Wang et al., 2008), e por esse motivo, algumas características dessas bebidas, como estabilidade e sabor são dependentes dos ácidos presentes em sua composição, e sua remoção seria, portanto, impraticável (Grenby, 1996). O método mais comum, descrito na literatura, para reduzir o potencial erosivo de uma bebida ácida está relacionado ao aumento do seu pH, ou através da adição de sais de cálcio e/ou fosfato (Grenby, 1996), o que tornaria a bebida supersaturada em relação à hidroxiapatita (Larsen; Nyvad, 1999; West et al., 2003; Lussi et al., 2004; Jendsdottir et al., 2005).

Alternativamente, outras substâncias também têm sido testadas como aditivos na redução do potencial erosivo de uma solução ácida, como o flúor (Attin et al., 2003), os íons cobre (Brooks et al., 2003), o ferro (Buzalaf et al., 2006; Kato et al., 2007), a goma xantana (West et al., 2004; Barbour et al., 2005) e o xilitol (Chunmuang et al., 2007).

Hughes et al. (1999a,b) e West et al. (1999), realizaram uma série de 3 estudos para o desenvolvimento de uma bebida de groselha (Ribena Toothkind - blackcurrant) modificada com cálcio, de menor potencial erosivo. No primeiro estudo, a bebida experimental (pH 3.8) foi adicionada de cálcio, na forma de hidróxido de cálcio, em uma concentração de 350 ppm, e foi comparada com um suco de laranja (pH 3.8), contendo 70 ppm de cálcio, e com água. No segundo, a bebida experimental (480 ppm de Ca, pH de 3.85) foi comparada com a mesma bebida de groselha sem aditivos (20 ppm de Ca, pH 2.85), novamente com o suco de laranja (167 ppm de Ca, pH 3.95) e com água. No terceiro estudo, onde se obteve sua fórmula final, o suco experimental (pH 3.8) apresentava uma concentração de 400 ppm de Ca. Nesses 3 estudos, o potencial erosivo da bebida experimental foi testado utilizando um modelo *in vitro* e *in situ*. No modelo *in situ*, os voluntários ingeriram 250 ml das bebidas testadas, 4x ao dia, durante 15 dias. A mesma metodologia foi adaptada para o estudo *in vitro*. Os resultados para os 3 estudos mostraram que a bebida experimental modificada com cálcio causou uma perda de estrutura significativamente menor quando comparada ao suco de laranja testado, mostrando um baixo potencial para causar erosão.

Larsen e Nyvad (1999) compararam o pH, a titulação e o conteúdo de cálcio, fosfato e flúor de vários refrigerantes e sucos com o seu efeito erosivo e a solubilidade da apatita. Dezoito bebidas foram avaliadas (refrigerantes, sucos de

laranja e vários tipos de água mineral). A titulação de cada bebida foi determinada através da quantidade de NaOH necessária para elevar o pH a valores de 5.5 e 7.0. Foram utilizadas amostras de esmalte humano, imersas em 1.5 l da solução desmineralizante, sob agitação, durante 1 semana. Após a exposição, os espécimes foram seccionados longitudinalmente e lixados para análise através de microrradiografia. A profundidade de erosão variou bastante, de 3 mm para a bebida mais ácida e o suco de laranja natural, para apenas superfícies pouco afetadas pela maioria das águas minerais. A dissolução do esmalte pelas bebidas aumentou inversamente com o seu pH. O suco de laranja (pH 4.0) suplementado com 42 mmol/l de cálcio e 31 mmol/l de fosfato não causou nenhuma erosão ao esmalte dental. Em geral, as bebidas com valores de pH menores necessitaram de uma quantidade maior de NaOH para levar o pH à neutralidade e, em particular, o suco de laranja apresentou a maior titulação.

Hughes et al. (2000) avaliaram a erosão do esmalte causada pelos ácido cítrico, maleico e láctico e determinaram o efeito da adição de cálcio ao ácido cítrico. Espécimes de esmalte humano foram utilizados nesse estudo e imersos por 30 min em solução de ácido cítrico, maleico e láctico em diferentes concentrações (0.1, 0.35 e 0.6 g / 100 ml) e diferentes valores de pH (2.8, 3.3 e 3.8). Na outra parte do estudo, os espécimes de esmalte foram imersos em solução de ácido cítrico em diferentes valores de pH (3.0 – 4.4) com adição de 0.02 g / 100 ml de carbonato de cálcio e também em solução de ácido cítrico com pH 3.8, contendo diferentes concentrações de cálcio (0.02 – 0.04). A perda de esmalte foi medida através de perfilometria. Os dados obtidos mostraram um padrão similar para o aumento da erosão com a diminuição do pH e o aumento da concentração do ácido e vice-versa para a diminuição da erosão. O aumento da concentração de cálcio em solução de ácido cítrico com pH fixo resultou em diminuição da erosão. Esse efeito foi mais evidente em pH mais alto. Os autores concluíram que o aumento do pH, a diminuição da concentração do ácido e a adição de pequenas concentrações de cálcio podem ser uma forma prática de formular bebidas com baixo potencial erosivo para o consumo da população.

Larsen e Richards (2002) compararam a capacidade erosiva de algumas bebidas com sabor de fruta, com e sem a adição de flúor, com outras bebidas carbonatadas, previamente testadas. Oito bebidas de fruta concentradas, disponíveis comercialmente, foram diluídas de acordo com a recomendação dos

fabricantes, utilizando água destilada, e foram comparadas com outras bebidas de referência. Dois espécimes de esmalte humano foram imersos em 500 ml das soluções com ou sem a adição de flúor, sob agitação durante 48 h. A profundidade de erosão foi medida através de microrradiografia e a dissolução do fluoreto de cálcio foi feita através da análise das soluções. O pH das bebidas variou de 2.83 – 3.51 e a quantidade de base necessária para elevar o pH para 5.5 (12 - 42 mmol/l) foi maior que o necessário para a maioria das bebidas carbonatadas. A concentração de flúor nas bebidas variou de 3-8 ppm. Os autores concluíram que as bebidas de fruta não carbonatadas contêm uma quantidade de ácido considerável, induzindo à erosão *in vitro*, similar àquela causada pelas bebidas carbonatadas. Concluíram, ainda, que o flúor não foi capaz de proporcionar um efeito preventivo contra a erosão, nem através de aplicação tópica no esmalte, nem como aditivo das bebidas.

Attin et al. (2003) avaliaram o efeito da adição de baixas concentrações de cálcio, fosfato e flúor em ácido cítrico, na diminuição do potencial erosivo. Foram utilizados 156 espécimes de incisivos bovinos, imersos em sua respectiva solução por um minuto, seguido imediatamente por um período de remineralização em saliva artificial (1 min). Esse procedimento foi repetido 5x, seguido de um período de 8 h em saliva artificial. O ciclo total de desmineralização e remineralização foi repetido 3x para cada espécime. Antes e depois da ciclagem, os espécimes foram examinados através de microdureza Knoop e perfilometria óptica. Os resultados mostraram que a dissolução e a perda de esmalte foram significativamente maiores para o grupo controle em comparação aos grupos teste. Os autores concluíram que a modificação do ácido cítrico com cálcio, fosfato e flúor apresentou uma proteção significativa em relação à erosão dental. No entanto, com as baixas concentrações utilizadas, a dissolução do esmalte não pôde ser completamente prevenida.

Barbour et al. (2003) investigaram a dissolução do esmalte em solução de ácido cítrico, em função das concentrações de cálcio e fosfato na solução, e o grau de saturação em relação à hidroxiapatita. A relevância primária do estudo foi desenvolver bebidas ácidas com um potencial erosivo reduzido. Todas as soluções foram supersaturadas em relação à hidroxiapatita. Uma dependência complexa da dissolução do esmalte na concentração de cálcio foi observada. No que diz respeito à modificação de bebidas ácidas, os resultados desse estudo mostraram que o grau de saturação da bebida não pode ser usado para caracterizar o seu potencial

erosivo. Além do mais, observou-se que a adição de cálcio foi consideravelmente mais efetiva do que a adição de fosfato na redução das taxas de dissolução. Segundo os autores, isso deve ser levado em consideração no momento do desenvolvimento de bebidas com potencial erosivo reduzido.

Os íons de cobre têm se mostrado cariostáticos em ratos devido suas propriedades bactericidas e, por esse motivo, Brookes et al. (2003) investigaram se estes íons apresentavam algum efeito inibitório na dissolução ácida do esmalte humano. Espécimes de esmalte humano foram expostos a uma sequência de sete desafios em solução de ácido acético (10 mmol/l). Para cada desafio, os espécimes eram imersos durante 1 min em solução, sob agitação. O mineral dissolvido durante cada desafio foi medido. Os resultados mostraram que as perdas de cálcio e fosfato foram reduzidas em 57 e 63% respectivamente, na presença de cobre, e as perdas também foram significativamente reduzidas durante o próximo desafio ácido, na ausência de cobre. De acordo com os autores, as propriedades cariostáticas dos íons de cobre podem ser devidas não só à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano, mas também à sua capacidade de inibir diretamente a dissolução do esmalte.

Em um estudo de West et al. (2004) o efeito erosivo de uma bebida teste, contendo cálcio e goma xantana, foi comparado com a bebida original comercializada, de baixo potencial erosivo (Ribena Toothkind - blackcurrant), com a bebida convencional de fruta sem adição de açúcar e com a água, utilizando um modelo *in situ*. A perda de esmalte foi avaliada através de perfilometria, após exposição a quatro bebidas testadas. Os 16 voluntários selecionados utilizaram um aparelho removível de acrílico contendo 2 espécimes de esmalte, durante os 15 dias de estudo. A ingestão das quatro bebidas testadas (Blackcurrant / cálcio / goma – bebida teste; Blackcurrant original – cálcio; Blackcurrant convencional e água) foi supervisionada, para que 250 ml fossem ingeridos 4x ao dia, no período entre 9 e 17h. As medidas de perfil dos espécimes foram realizadas antes do desafio, e após 5, 10 e 15 dias de desafio. Os resultados mostraram que a bebida teste com adição de goma causou uma perda de esmalte significativamente menor do que a bebida convencional, não apresentando diferença estatisticamente significativa com a bebida original (cálcio), em nenhum momento de medição. Como conclusão, os autores ressaltam que a bebida teste com goma xantana trouxe benefícios à bebida

original em termos de estabilidade e qualidade de sabor, sem influenciar negativamente na erosão clínica do esmalte.

Em um estudo *in vitro* de Attin et al. (2005) o potencial erosivo de diferentes bebidas ácidas, modificadas com a adição de baixas concentrações de cálcio, fosfato e flúor foi avaliado sob condições controladas em uma boca artificial. Espécimes de esmalte bovino foram submetidos a cinco ciclos de desmineralização e remineralização durante 1 min cada, com um período de 8 h de remineralização em saliva artificial. Esse episódio foi repetido três vezes para cada espécime. Foram utilizadas quatro bebidas diferentes (Coca-Cola, Sprite, Sprite Light e suco de laranja) na forma original, e suplementadas com 1.0 mmol de Ca ou com a combinação de 0.5 mmol de Ca, 0.5 mmol de P e 0.6 ppm de F. A perda de estrutura dos espécimes foi avaliada através de perfilometria. Em todos os subgrupos (original, adicionados de cálcio e adicionados da combinação) foi observada a perda de esmalte. A perda de estrutura para os grupos Sprite original e suco de laranja original foi significativamente maior quando comparada com todos os outros grupos. A menor perda de esmalte foi observada para a Coca-Cola original. Com a exceção desse grupo, a modificação das bebidas permitiu uma perda significativamente menor, comparada com suas respectivas bebidas originais. Os autores concluíram que a modificação das bebidas testadas com baixa concentração de cálcio, fosfato e flúor foi capaz de reduzir o seu potencial erosivo. No entanto, essas baixas concentrações utilizadas não preveniram completamente a dissolução do esmalte.

Jensdottir et al. (2005) testaram o potencial erosivo de várias bebidas ácidas, determinaram as propriedades das bebidas que eram importantes para o potencial erosivo e verificaram as possibilidades de reduzir o potencial erosivo das bebidas ácidas através de modificação. As 16 bebidas testadas foram divididas em grupos: bebidas carbonatadas, sucos de fruta puros, sucos concentrados, bebidas à base de leite, bebidas energéticas, bebidas esportivas, bebidas experimentais e água destilada. Um suco de laranja foi modificado através da adição de várias concentrações de cálcio e fosfato. Os valores de pH, a quantidade de Ca e P e a titulação ácida foram determinados. A partir desses resultados, a “capacidade tampão”, o grau de saturação em relação à hidroxiapatita e o pH crítico foram calculados. O potencial erosivo das bebidas foi determinado através da perda de peso ocorrida nos espécimes, após imersão durante 24 e 72 h, bem como o

aumento de cálcio na solução. Os resultados mostraram que o potencial erosivo das bebidas variou de 0 – 10% de perda de peso dos espécimes e de 0 – 31 mmol de aumento de cálcio na solução. O pH nas bebidas carbonatadas e bebidas esportivas foi menor do que nos sucos de fruta. No entanto, a titulação e a “capacidade tampão” foram consideravelmente maiores nos sucos de fruta. A adição de cálcio e fosfato às bebidas experimentais diminuiu consideravelmente o seu potencial erosivo. Os autores concluíram que muitas propriedades relacionadas a bebidas ácidas têm um impacto no seu potencial erosivo em longos períodos de exposição do dente, e que uma modificação moderada pode ser uma medida útil para a redução do potencial erosivo dessas bebidas.

O efeito protetor dos íons de ferro sobre a dissolução do esmalte bovino foi investigado em um estudo *in vitro* de Buzalaf et al. (2006). Foi utilizado pó de esmalte bovino para imersão em ácido acético com variadas concentrações de ferro. A quantidade de fosfato liberado na solução foi medida para a determinação da quantidade de esmalte dissolvido. O grau de proteção foi encontrado em aproximadamente 15 mmol de Fe. A partir disso, na etapa seguinte, o efeito protetor do ferro contra a dissolução mineral do esmalte bovino foi avaliado utilizando um modelo simples de desmineralização. Os espécimes foram expostos à imersão em uma sequência de 7 soluções contendo 1 ml de ácido acético (pH 3.2). Na quarta solução adicionou-se 15 mmol de Fe à solução desmineralizadora. A quantidade de mineral dissolvido em cada desafio foi então determinada. Uma menor desmineralização (cerca de 45%) foi encontrada para a solução 4 (contendo Fe) e continuou estável até a solução 7. A partir dos resultados obtidos, os autores sugerem que o ferro pode ser efetivo na inibição da dissolução do esmalte e que este efeito pode ser durável.

Em um estudo *in vitro*, Chunmuang et al. (2007) avaliaram o efeito anti-erosivo do xilitol, do flúor e da combinação entre eles, usados como aditivos em uma bebida ácida ou como bochecho após a exposição do esmalte à bebida ácida. Foram utilizados espécimes de esmalte humano, imersos por 5 min no suco de laranja (A); suco de laranja + 25% de xilitol (B); suco de laranja + 1 ppm de F (C); suco de laranja + 25% de xilitol e 1 ppm de F (D). Os demais espécimes foram imersos por 5 min no suco de laranja e, em seguida, em 40% de xilitol (E); 227 ppm de F (F); 40% de xilitol e 227 ppm de F (G) por 1 min cada. Esse processo foi realizado 4x ao dia durante 14 dias. A perda de mineral foi determinada a partir da profundidade da

lesão e dureza de superfície. A profundidade de erosão aumentou progressivamente em todos os grupos, exceto no grupo E, onde a profundidade de erosão foi significativamente menor do que o grupo A. A microdureza de superfície diminuiu progressivamente em todos os grupos, exceto no grupo E, onde a microdureza de superfície foi significativamente maior do que o grupo A. Os autores demonstraram que o xilitol, o flúor ou a combinação entre eles, tanto na forma de aditivos em bebidas ou na forma de bochecho, não puderam prevenir, mas reduziram a desmineralização causada por uma bebida ácida.

Hara e Zero (2008) compararam as propriedades químicas e a habilidade de desmineralização do esmalte de bebidas do mesmo tipo, disponíveis comercialmente com e sem cálcio na sua formulação. Foram selecionadas 10 bebidas disponíveis comercialmente, 5 sem cálcio e 5 adicionadas de cálcio. Na primeira fase do estudo, o pH, a titulação e a concentração de cálcio (total e iônico), fósforo e flúor foram analisados. Na segunda fase, a habilidade dos produtos testados em causar erosão no esmalte foi analisada em relação à microdureza de superfície e perda de estrutura, em diferentes tempos. Foram utilizados espécimes de esmalte bovino e com o posicionamento de fitas adesivas, foram criadas 6 janelas de teste com duas superfícies laterais de referência. Os espécimes foram divididos em relação aos 10 grupos experimentais e o grupo controle (0.1% ácido cítrico) e em relação aos 6 subgrupos, de acordo com os tempos analisados (0, 5, 10, 30, 60 e 120 min). Dentre as propriedades químicas testadas, o pH e a concentração de cálcio total e iônico mostraram uma forte correlação com a desmineralização e o desgaste do esmalte. Níveis mais baixos de desmineralização e desgaste do esmalte foram observados para a maioria das bebidas com adição de cálcio do que para as bebidas sem cálcio na composição. De acordo com os autores, o conteúdo dos íons de cálcio, bem como o pH foram encontrados como sendo bons preditores do potencial erosivo das bebidas testadas. As bebidas suplementadas com cálcio apresentaram capacidade de reduzir a desmineralização do esmalte.

Magalhães et al. (2009) avaliaram o efeito do cálcio, flúor, ferro e fosfato, na erosão dental, suplementados individualmente ou em combinação a uma bebida comercial carbonatada à base de ácido cítrico. Os espécimes de esmalte bovino selecionados foram distribuídos entre os grupos experimentais: G1- bebida sem aditivos; G2 - 1 mM de Ca; G3 - 0.047 mM de F; G4 - 1 mM de Fe; G5 - 1 mM de P;

G6 - 1 mM de Ca + 0.047 mM de F; G7- 1 mM de Ca + 1 mM de P; G8 - 1 mM de Fe + 0.047 mM de F; e G9 - 1 mM de Ca, 1 mM de P, 0.047 mM de F e 1.0 mM de Fe. Durante um período de 24 h, os espécimes foram submetidos a seis ciclos de desmineralização e remineralização. Em cada ciclo, os espécimes eram imersos na bebida pura ou modificada por 1 min, seguida da imersão em saliva artificial por 59 min. Os espécimes foram mantidos em saliva artificial durante o período noturno (18 h). A perda de esmalte foi avaliada através de perfilometria. Os resultados mostraram que as maiores perdas de esmalte foram observadas no grupo controle (G1) e nos grupos contendo ferro (G4 e G8). Os grupos contendo cálcio (G2 e G6) mostraram uma perda significativamente menor comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que a modificação de bebidas ácidas erosivas com baixas concentrações de cálcio, com ou sem flúor, foram capazes de reduzir o seu potencial erosivo.

Mais recentemente, Magalhães et al. (2010) avaliaram o efeito desses mesmos minerais na erosão dental, adicionados isoladamente ou em combinação à uma solução de ácido cítrico a 1%. Os grupos experimentais foram os mesmos adotados no estudo anterior. Os espécimes de esmalte bovino foram submetidos a 6 ciclos de desmineralização e remineralização, sendo 1 min em solução desmineralizante, seguida por 59 min em saliva artificial. A avaliação dos espécimes foi feita através de perfilometria (μm). A perda de esmalte variou de 0.87 μm a 1.87 μm , sem haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os autores concluíram que a modificação do ácido cítrico a 1% com diferentes minerais não apresentou um efeito protetor na erosão dental.

2.2.2 O papel das proteínas na redução da dissolução da hidroxiapatita

Alguns autores (Pearce; Bibby, 1966; Weiss; Bibby, 1966a), em pesquisas testando o efeito de diversas proteínas na solubilidade do esmalte dental, sugeriram que a adsorção da proteína ocorrida na superfície do esmalte pode modificar o processo de dissolução da hidroxiapatita. Dentre as proteínas testadas, duas proteínas que vêm sendo extensivamente estudadas a respeito da redução da dissolução da hidroxiapatita são a caseína e a ovalbumina.

O leite bovino contém dois grupos principais de proteínas, caracterizados pela sua solubilidade: a caseína (insolúvel) e as proteínas do soro (solúvel). A caseína corresponde a cerca de 80% do total de proteínas do leite, e é sintetizada e armazenada durante a lactação dos mamíferos (Aimutis, 2004). A principal função fisiológica da caseína no leite é estabilizar o fosfato de cálcio pela formação de micelas (Swaisgood, 1996; Barbour et al., 2008). A caseína está disponível comercialmente e apresenta um custo relativamente baixo (Reynolds; Black, 1987).

A ovalbumina é a principal proteína encontrada na parte branca dos ovos, a qual atua como uma proteína de armazenamento fornecendo nutrientes para o embrião da galinha em desenvolvimento (Hemingway et al., 2008). A ovalbumina é utilizada como aditivo em diversos alimentos, frequentemente como um agente espumante, gelificante ou agente de ligação (Damodaran, 1996).

A hipótese sugerida por uma série de estudos é que essas proteínas interagem com a superfície do esmalte, possivelmente aderindo-se a ela e formando uma camada protetora, a qual é responsável pela inibição da dissolução da hidroxiapatita.

Em um estudo *in vitro*, Pearce e Bibby (1966) compararam a adsorção de diferentes proteínas sobre o esmalte bovino. Onze diferentes proteínas, incluindo a caseína e a ovalbumina foram testadas em diferentes concentrações (2.0, 1.5, 1.0 e 0.5 mg/ml), utilizando esmalte bovino em pó. Para a comparação foram realizadas análises em relação ao peso da proteína adsorvida no pó de esmalte, e a quantidade de proteína restante na solução. Os resultados para a ovalbumina e a mucina gástrica mostraram que a quantidade de proteína adsorvida ao esmalte foi sempre inferior, quando comparada à quantidade de proteína na solução. Para os autores, provavelmente alguma proteína foi removida durante a lavagem do esmalte com água, feita previamente à análise. Para obter a medida de afinidade das proteínas para o esmalte bovino, a quantidade de proteína adsorvida na maior concentração de equilíbrio (1.7 mg/ml) foi testada para todas as proteínas. A adsorção foi maior para a caseína (1.64 mg/g) e menor para a ovalbumina (0.32 mg/g). Segundo os autores, uma possível correlação entre maior peso molecular e melhor adsorção é sugerida pela melhor adsorção da caseína com peso molecular de 375 kDa, do que para a ovalbumina, com peso molecular de 44 kDa. Além disso, fatores como a solubilidade das proteínas, afinidade pelo cálcio e presença de impurezas podem influenciar na sua adsorção.

2.2.2.1 Caseína e Ovalbumina no controle da Cárie Dental

Desde a década de 40, os estudos mostram que os componentes do leite são reconhecidos por apresentarem propriedades anticariogênicas (Schweigert et al., 1946; Bavetta; McClure, 1957).

Em um estudo *in vitro*, Schweigert et al. (1946) compararam o efeito da quantidade de gordura, proteína e carboidrato adicionados à ração de ratos, na incidência e extensão das lesões de cárie. O efeito das dietas à base de leite também foi estudado. Observou-se que a adição de 50% de caseína à dieta levou a uma redução na ocorrência de lesões cariosas. Entretanto, o efeito protetor foi ainda maior quando a caseína foi adicionada à ração em combinação com a gordura. Nenhuma lesão de cárie foi observada quando a dieta à base de leite integral foi administrada. A incidência e a extensão de cárie foram baixas quando os componentes sólidos do leite foram adicionados à ração. De acordo com os autores, o efeito protetor do leite foi observado, porque a presença do leite na forma de sólidos representa uma ração rica em gordura, onde a ingestão de gordura, por sua vez, mostrou uma forte redução na ocorrência de cáries. A presença da lactose como o único carboidrato do leite, e um nível ligeiramente maior de proteínas podem também ter contribuído para a baixa incidência de cárie observada.

Bavetta e McClure (1957) compararam a experiência de cárie em ratos, consumindo dietas cariogênicas com a mesma quantidade de sacarose e proteína nas dietas controle e experimental, porém utilizando diferentes proteínas. As dietas cariogênicas nesse estudo eram à base de caseína, proteína do milho, proteína do trigo e glúten. Os resultados mostraram que as dietas à base de caseína reduziram as experiências de cárie nos ratos, e os autores sugerem que a quantidade de proteína na dieta pode ser um importante fator controlador do desenvolvimento de cáries.

Reynolds e Del Rio (1984) investigaram se as proteínas da dieta (caseína e as proteínas do soro do leite) exerciam um efeito anticariogênico tópico. Foi administrada uma única dieta sólida para todos os animais, e a água ingerida por eles era água deionizada e duplamente destilada, contendo 2% de caseína, ou 2% de proteína do soro do leite ou sem suplementação de proteína (controle). A dieta sólida e líquida era pesada e trocada diariamente. Os ratos receberam essa

alimentação durante cinquenta e quatro dias, sendo a quantidade consumida por eles, diariamente calculada. Os animais do grupo controle apresentaram significativamente mais lesões de fissuras do que os outros dois grupos. A suplementação de 2% de caseína na água reduziu a extensão das cáries de fissura e de superfície lisa nos ratos que consumiam uma dieta sólida cariogênica. Os achados de que a solução contendo 2% de proteínas do soro reduziu a extensão das cáries de fissura em animais consumidores de uma dieta sólida com 26% de proteína do soro, sugere que a ação anticariogênica é mediada pela proteína presente na solução. Esses resultados sugeriram uma ação anticariogênica tópica para as proteínas da dieta.

Reynolds e Black (1987) compararam a cariogenicidade em ratos que consumiram dois chocolates, um contendo 5.6% de caseína e o outro contendo 16.6% de caseína. Os níveis de gordura e sacarose foram os mesmos para ambos os doces. A adição de caseína conseguiu-se por meio da substituição de 18% de sólidos do leite sem gordura, normalmente utilizados na confecção do chocolate ao leite, por caseinato de sódio solúvel. Dois programas diferentes de alimentação foram administrados aos ratos, um com maior quantidade de refeições e o outro com uma quantidade reduzida. Ambos ofereciam o chocolate suplementado de caseína e o chocolate original. Os resultados mostraram que os animais que consumiram o chocolate com caseína, em ambos os programas de dieta, apresentaram de forma significativa os menores escores de amolecimento da superfície e de cárie de fissura, comparados aos animais que consumiram o chocolate original. No entanto, a quantidade de caseína utilizada na suplementação do chocolate proporcionou um sabor não aceitável pelos fabricantes.

Dois anos mais tarde, Reynolds e Black (1989) resolveram testar se um chocolate suplementado com uma menor concentração de caseína (em níveis mais aceitáveis de sabor) poderia causar uma redução significativa na cariogenicidade desse produto. Os ratos foram submetidos ao mesmo programa de dieta por cinquenta e dois dias, sendo que um grupo fazia a ingestão do chocolate normal e o outro grupo do chocolate suplementado com caseína. A quantidade de caseinato de sódio adicionado ao chocolate foi de 5.3%, o que conferiu um sabor melhor ao produto. No entanto, os resultados mostraram que a suplementação do chocolate com caseína em níveis mais aceitáveis de sabor, apresentou um pequeno efeito na cariogenicidade em ratos. Segundo os autores, a caseína parece ter um valor

limitado como aditivo anticariogênico de alimentos, devido à grande quantidade de proteína necessária, bem como à inaceitabilidade do sabor.

Estudos prévios já demonstravam que a ovalbumina é adsorvida ao esmalte (Pearce; Bibby, 1966) e, por esse motivo, Arends et al. (1986) investigaram a influência da proteína ácida albumina na progressão das lesões de cárie, em diferentes concentrações. Foram utilizados espécimes de esmalte bovino, imersos em uma solução de ácido láctico (pH 4.5), sem a adição de proteína, ou contendo 0.1, 0.4, 1.2 e 20 g/l de ovalbumina. Os espécimes foram removidos da solução desmineralizante após 3, 9 ou 21 dias e a profundidade da lesão foi determinada. Após vinte e um dias, a ovalbumina foi capaz de reduzir em aproximadamente 75% (2 g/l) a profundidade da lesão de cárie formada. Isso foi atribuído à adsorção da proteína na superfície do esmalte em combinação com a penetração da ovalbumina nos poros do esmalte. Esses resultados mostraram que em concentrações de ovalbumina abaixo de 2 g/l, a profundidade da lesão diminui intensamente com o aumento da concentração da mesma. Isso está de acordo com a observação de que a quantidade de ovalbumina adsorvida aos cristais por unidade de área aumenta intensamente com o acréscimo do conteúdo de proteína. Para altas concentrações de ovalbumina (maior que 2 g/l), a quantidade adsorvida nos cristais por unidade de área é quase constante, comparado ao comportamento de profundidade da lesão. Os autores concluíram que em pH 4.5 a ovalbumina se mostrou um potente inibidor do processo de desmineralização.

Experimentalmente é muito difícil caracterizar a natureza da superfície da proteína adsorvida e, por esse motivo, Kawasaki et al. (1999) desenvolveram um novo método (DTM – Dropping Time Method) para investigar a adsorção das proteínas à hidroxiapatita, principal componente da estrutura dental. O comportamento de adsorção de quatro proteínas (albumina de soro humano; lisozima de ovo de galinha; β -lactoglobulina do leite bovino e a ovalbumina) sobre um disco hidrofóbico de hidroxiapatita em água foi estudado por esse método. As proteínas foram utilizadas nas concentrações de 0.01 mg/ml (abaixo da saturação de adsorção) e 1 mg/ml (saturação de adsorção). A superfície das proteínas adsorvidas, com exceção da ovalbumina, mostrou-se bastante hidrofílica, quando utilizada uma solução com alta concentração de proteínas. Saliente-se que essa hidrofílicidade já foi alcançada nos estágios iniciais do processo de adsorção. A superfície da ovalbumina sobre a hidroxiapatita foi mais hidrofóbica do que as outras

proteínas, e a hidrofiliidade aumentou com o processo de adsorção da proteína. Os autores descrevem que a superfície de uma molécula de proteína tem uma estrutura complexa, composta por campos hidrofílicos e hidrofóbicos. Em geral, a alteração na conformação da proteína resulta em uma mudança na hidrofobicidade da superfície das camadas de proteínas adsorvidas. A conformação das moléculas de proteínas adsorvidas deve mudar no decurso do relaxamento na superfície. A adsorção proveniente de uma solução com baixa concentração de proteína procede de forma relativamente lenta, a fim de que haja tempo suficiente para as moléculas de proteína adsorvidas relaxarem, ou seja, rearranjarem a sua conformação. Contudo, em elevadas concentrações de proteína, a alta taxa de adsorção, relativa à taxa de mudanças conformacionais, previne as moléculas desse relaxamento. Portanto, a estrutura da proteína será semelhante àquela em solução. A partir disso, os autores concluíram que a molhabilidade da superfície da proteína adsorvida depende da sua natureza. Em particular da extensão do rearranjo estrutural e da hidrofobicidade da proteína individualmente.

2.2.2.2 Caseína e Ovalbumina no controle da Erosão Dental

A influência da caseína e da ovalbumina na dissolução do esmalte bovino por soluções ácidas, têm sido testadas desde a década de 60, como mostram os trabalhos a seguir.

Weiss e Bibby (1966a) compararam os efeitos do tratamento com produtos à base de leite na solubilidade ácida do esmalte. Foram utilizados blocos de esmalte bovino, com a delimitação de uma janela central para teste. O leite fresco pasteurizado e o natural, o leite em pó desnatado e o integral, a nata e o soro do leite foram selecionados como tratamento. O experimento consistiu em duas descalcificações iniciais (A e B) executadas em cada bloco, seguidas pelo tratamento (T), e então a execução de uma nova descalcificação (C) pós-tratamento. A diferença entre B e C indicava a quantidade da redução de solubilidade dada pelo determinado tratamento (T). A primeira descalcificação (A) consistia da imersão dos blocos de esmalte em 20 ml de 0.1M de ácido acético (pH 4.0), em temperatura constante de 37°C e sob agitação por quinze minutos. Em seguida os blocos eram

lavados por 15 s em água destilada e secos em folhas de papel. A segunda descalcificação (B) foi realizada da mesma forma, e em seguida os blocos foram agitados por 15 min em 20 ml do leite testado (T). Após os blocos serem lavados por 1 min, a terceira descalcificação (C) foi realizada. Os resultados mostraram que o leite de vaca reduziu a solubilidade em mais de 20%, independente se esse era fresco ou pasteurizado, integral ou desnatado. Em relação à natureza da reação entre o leite e o esmalte, a redução da solubilidade pareceu ocorrer rapidamente, não sendo muito maior com tratamentos mais longos e nem facilmente removida pela lavagem. Comparando o efeito individual dos constituintes do leite (lactose, caseína, cálcio e fosfato) na solubilidade do esmalte, a caseína foi a única que produziu uma redução significativa da solubilidade. Os achados desse estudo indicam que, sob algumas condições, o leite pode assumir um efeito moderador na solubilidade do esmalte na boca.

Em outro trabalho *in vitro*, Weiss e Bibby (1966b) investigaram o efeito de algumas proteínas na solubilidade do esmalte, em soluções ácidas. O experimento seguiu o mesmo modelo descrito anteriormente (Weiss; Bibby, 1966a). A comparação entre as principais proteínas do leite, as proteínas do soro do leite e a lactalbumina mostraram que as duas últimas foram menos eficientes do que as principais proteínas do leite, indicando a importância da caseína como agente redutor da solubilidade. Foi notável que concentrações menores do que 0.05% de caseína reduziram a solubilidade do esmalte. Dentre as proteínas que não eram do leite e outros agentes testados, a ovalbumina (1%) não alterou a solubilidade do esmalte e a mucina gástrica foi a que apresentou o melhor resultado. Não houve nenhuma redução significativa na solubilidade com o tratamento de fosfato ou cálcio em quantidades iguais aquelas presentes em 0.1% ou 1% de caseína que, efetivamente, reduziram a dissolução. Quando as proteínas foram adicionadas à solução de descalcificação, maiores reduções foram observadas para a caseína e a mucina em pH 5.3, sendo persistente após as duas descalcificações seguintes. A adição de fosfato e cálcio à solução resultou em apenas pequenas reduções da dissolução. A demonstração de que a caseína ou a mucina adicionada na solução descalcificante reduziu a solubilidade do esmalte. Essas reduções foram muito maiores do que podiam ser, atribuídas a qualquer efeito comum do íon, resultantes da associação do cálcio ou fosfato, foram de grande interesse para o estudo.

Um pouco mais tarde, van der Linden et al. (1989) estudou a distribuição das proteínas penetradas nos poros do esmalte e na superfície dos cristais de esmalte parcialmente dissolvidos, bem como as possíveis interações da albumina com esse esmalte. Os resultados mostraram que o esmalte bovino exposto a uma solução desmineralizante de ácido acético (pH 4.5), contendo diferentes concentrações de albumina, resultou na penetração da proteína dentro dos poros do esmalte. Um simples procedimento de lavagem do esmalte contendo albumina resultou na completa (baixa concentração de albumina) ou parcial remoção da proteína (concentrações maiores). Uma parcial remoção de albumina foi observada após a lavagem com concentrações intermediárias de fosfato ou flúor, enquanto que uma completa remoção ocorreu após a exposição a elevadas concentrações desses íons. A exposição ao cálcio ou cloreto, mesmo em concentrações altas, mostrou uma leve remoção de albumina. Os resultados indicaram uma forte interação da albumina com o mineral do interior da lesão. Essas interações, segundo os autores, são provavelmente mais fortes do que a interação da proteína com o mineral, ocorrida na camada superficial do esmalte. Os autores concluíram que o esmalte é protegido da desmineralização, principalmente pelos efeitos inibitórios da proteína que penetrou nos poros do esmalte, somados a uma possível proteção pela película formada na superfície.

Barbour et al. (2008) testaram a caseína como potencial aditivo na redução da erosão dental causada por uma solução ácida simples de ácido cítrico. Nesse estudo foram utilizados discos de hidroxiapatita, com a delimitação de uma janela central para teste. Foram utilizadas soluções de ácido cítrico (0.3%) sem caseína e com 0.02% de caseína em diferentes valores de pH (2.8, 3.0, 3.2, 3.4 e 3.6). Soluções de ácido cítrico em pH 3.2 também foram preparadas com diferentes concentrações de caseína (0.002, 0.02 e 0.2%). Adicionou-se cloreto de cálcio em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 50 mM) à solução de ácido cítrico (pH 3.2) suplementada com 0.02% de caseína. O teste foi realizado em uma tituladora automática, através do método do pH Stat. O experimento também foi realizado na presença de película salivar sobre os discos de hidroxiapatita. Os resultados mostraram que a adição de 0.02% de caseína causou uma redução significativa, cerca de 54%, na dissolução dos discos de hidroxiapatita, em todos os valores de pH testados. A redução da taxa de dissolução da hidroxiapatita em pH 3.2 pela caseína não foi significativamente afetada pela sua concentração (0.002%, 0.02% e

0.2%). Na ausência de caseína, a dissolução da hidroxiapatita diminuiu com o aumento da concentração de cálcio. A adição tanto de caseína como de cálcio (5 e 10 mM) resultou em uma maior redução (60 - 70%) na taxa de dissolução da hidroxiapatita. Foi observada uma redução na dissolução da hidroxiapatita quando esta foi coberta por película salivar. Os autores relacionaram a redução na taxa de dissolução com a adsorção da caseína na superfície na hidroxiapatita, a qual estabilizou o cristal e inibiu o desprendimento dos íons.

Hemingway et al. (2008) investigaram a ovalbumina como um potencial inibidor da dissolução da hidroxiapatita em soluções ácidas, sob condições representativas da erosão dental. Foi utilizada uma solução de ácido cítrico (0.3%) com adição de 0.02% ou 0.2% de ovalbumina em diferentes valores de pH (2.8, 3.0, 3.2, 3.6 e 4.0). A suplementação com 5, 10, 20 e 50 mM de cálcio foi realizada em solução de ácido cítrico (pH 3.2) com ou sem a presença de 0.2% de ovalbumina. A adição de 0.2% de ovalbumina foi testada em diferentes tipos de ácidos (cítrico, málico e láctico) em pH 3.2. A dissolução dos discos de hidroxiapatita foi realizada através do método do pH Stat, por um período de 30 min. Os resultados mostraram que a adição de 0.2% de ovalbumina reduziu significativamente a dissolução da hidroxiapatita em todos os valores de pH. Na faixa de pH de 2.8 - 4.0, a ovalbumina em ácido cítrico reduziu a dissolução da hidroxiapatita na faixa de 50 - 75% (0.2%) e 30 - 50% (0.02%). A adição de 0.02% de ovalbumina reduziu significativamente a dissolução da hidroxiapatita em pH 2.8, 3.0 e 3.2, mas não em pH 3.6 e 4.0. Na presença de cálcio a ovalbumina causou uma redução de 45 - 60%. Nas soluções de ácido málico e láctico, a ovalbumina não causou uma redução na dissolução da hidroxiapatita. Os autores descrevem que a redução na taxa de dissolução da hidroxiapatita causada pela ovalbumina está relacionada a adsorção das moléculas de ovalbumina nos sítios de dissolução da hidroxiapatita, formando uma barreira semipermeável, impedindo o transporte de íons para fora da superfície dos cristais.

Mais recentemente, Hemingway et al. (2010) investigaram os efeitos da caseína e da ovalbumina como agentes anti-erosivos utilizando esmalte humano na presença de película salivar. Foram utilizadas soluções de ácido cítrico, málico e láctico em diferentes valores de pH (2.8, 3.2 e 3.8) e cinco bebidas ácidas disponíveis comercialmente. A caseína e a ovalbumina foram adicionadas às soluções ácidas e às bebidas na concentração de 0.2%. Os espécimes de esmalte foram preparados, deixando uma janela central exposta para ser submetida ao processo de erosão. Os

seis espécimes de cada grupo foram imersos em 100 ml de solução por 10 min sob agitação. Em seguida os espécimes foram lavados com água destilada e secos. A superfície dos espécimes foi analisada através de perfilometria óptica. A adição de 0.2% de ovalbumina ao ácido cítrico reduziu a erosão em 46% no pH 2.8, 44% no pH 3.2 e 61% no pH 3.8. A adição de caseína reduziu a erosão em 76% no pH 2.8, em 78% no pH 3.2 e em 59% no pH 3.8. Nos valores de pH 2.8 e 3.2, a caseína reduziu mais a erosão do que a ovalbumina. Em pH 3.8 os efeitos das duas proteínas foram estatisticamente indistinguíveis. Os efeitos das subfrações individuais de caseína testadas em ácido cítrico (pH 3.2) foram iguais ao encontrado para a caseína total. Uma maior redução da erosão foi observada para o ácido cítrico, do que para os ácidos málico e láctico. Os autores sugerem que o mecanismo envolve a adsorção das proteínas à película ou à superfície do esmalte, formando um filme de proteína com propriedades de inibição da erosão. O íon citrato pode desempenhar um papel estabilizador ativo, visto que a redução da erosão foi menor para os ácidos málico e láctico. Os autores concluíram que a caseína e, em menor extensão, a ovalbumina mostraram-se como potenciais agentes anti-erosivos a serem adicionados em bebidas ácidas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo *in vitro* foi avaliar o potencial erosivo de um suco de laranja modificado pela adição de caseína, ovalbumina e a combinação entre elas, sobre o esmalte e a dentina humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – CEP/FOUSP (Protocolo nº 155/2009) (Anexo A), bem como após a aprovação pelo Comitê de Revisão Institucional (Institutional Review Board – IRB) (Protocolo nº 0911-07) (Anexo B).

4.1 Delineamento experimental

Esse estudo foi conduzido em duas fases independentes, e em parceria com a Universidade de Indiana. Todas as fases foram realizadas no "Oral Health Research Institute" pertencente à Faculdade de Odontologia da "Indiana University", na cidade de Indianapolis – IN, USA. Na primeira fase, duas proteínas aprovadas para o uso em alimentos (caseína e ovalbumina) e a combinação entre elas foram adicionadas a um suco de laranja natural disponível comercialmente. O potencial erosivo desses sucos experimentais foi comparado inicialmente utilizando o método do pH-Stat. Na segunda fase, os três sucos experimentais e os controles (positivo e negativo) foram testados utilizando-se um modelo *in vitro* de erosão-remineralização.

4.2 Fase 1

4.2.1 Medição do pH inicial das soluções

O valor do pH inicial dos sucos selecionados para o estudo (Minute Maid Original® e Minute Maid Calcium®) foi medido utilizando 50 ml de cada suco, através de um eletrodo de pH calibrado (Accumet 13-620-530; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Essa medição foi realizada em triplicata e com os sucos em

temperatura ambiente. A Tabela 4.1 apresenta os nomes comerciais, os fabricantes e os valores do pH inicial para cada suco utilizado.

Tabela 4.1 – Nome comercial, fabricante e valor do pH inicial dos sucos utilizados

Suco	Nome Comercial	Fabricante / Local	pH Inicial
Suco de laranja Original	Minute Maid Original	The Coca-Cola Company Atlanta, GA, USA	3.8
Suco de laranja com adição de cálcio	Minute Maid Calcium	The Coca-Cola Company Atlanta, GA, USA	3.8

4.2.2 Adição das proteínas

Nessa fase, duas proteínas aprovadas para o uso em alimentos: a caseína (CAS) e a ovalbumina (OVA) foram adicionadas ao suco de laranja original de forma isolada e em combinação. O Quadro 4.1 apresenta o nome comercial e o fabricante das proteínas utilizadas.

Proteína	Nome Comercial	Fabricante / Local
Caseína	Sodium Caseinate	BDH Poole, UK
Ovalbumina	Ovalbumin	MP Biochemicals Ohio, USA

Quadro 4.1 - Nome comercial e fabricante das proteínas utilizadas

O suco de laranja sem nenhum aditivo (Minute Maid Original[®]) foi utilizado como controle negativo (C-) (Figura 4.1A), e o suco de laranja com adição de cálcio (Minute Maid Calcium[®]) como controle positivo (C+) (Figura 4.1B). A Tabela 4.2 descreve os cinco grupos experimentais obtidos a partir da adição das proteínas, em relação ao aditivo e a concentração utilizados.

Figura 4.1 – A – Suco de laranja original; B – Suco de laranja com adição de cálcio

Tabela 4.2 - Descrição dos cinco grupos experimentais

Grupos	Aditivo	Concentração (g/l)
C-	---	---
CAS	caseinato de sódio	0.2
OVA	ovalbumina	2.0
CAS + OVA	caseinato de sódio + ovalbumina	0.2 + 2.0
C+	lactato e fosfato de cálcio	~ 1,6

As proteínas foram pesadas na concentração determinada, em um pequeno recipiente de alumínio, utilizando-se para isso uma balança analítica (Figura 4.2) com precisão de 0,0001g (Analytical Balance, Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA).

Para o preparo dos sucos experimentais (CAS, OVA e CAS + OVA), cada suco de laranja foi dispensado em um Becker de vidro de 1000 ml e mantido sob agitação em um agitador magnético, para que as proteínas fossem adicionadas. Após a adição das proteínas, o suco permaneceu sob agitação por pelo menos 60 min até que a proteína estivesse completamente dissolvida. Todos os sucos experimentais foram preparados no primeiro dia do estudo e na quantidade necessária para serem utilizados durante todo o experimento, sendo armazenados sob refrigeração quando não utilizados.

Figura 4.2 – Balança analítica

Após a adição das proteínas ao suco de laranja, foi realizada uma nova medição do pH dos sucos experimentais obtidos, para verificar se havia a necessidade de ajustá-los ao valor do pH inicial de 3.8. Essa medição foi realizada em triplicata, utilizando 50 ml de cada suco experimental em temperatura ambiente.

4.2.3 Método do pH – Stat

Primeiramente, o potencial erosivo dos cinco grupos experimentais foi comparado através do método do pH-Stat, utilizando uma tituladora automática (Figura 4.3) (Titralab 856, Radiometer Analytical, Lyon, France). Inicialmente, 25 ml de cada suco foi dispensado em um copo descartável, posicionado na tituladora e mantido sob agitação (100 rpm), para a determinação do seu pH inicial. Em seguida, 25 mg de um cristal de hidroxiapatita anidro (Hydroxyapatite, Acros, Organics, Geel, Belgium), previamente pesado foi adicionado ao suco, e a reação foi iniciada imediatamente. A partir disso, a máquina de titulação automática adicionava alíquotas do titulante (HCl 0.1 M) ao suco que estava sendo analisado, em um mecanismo de “feedback negativo”, a fim de manter constante o valor do pH inicial, sem que houvesse qualquer alteração durante os 5 min da reação. O volume de HCl 0.1 M necessário para a manutenção do pH inicial foi anotado para a posterior comparação entre os grupos. Esse teste foi realizado em triplicata para cada suco experimental.

Figura 4.3 – Tituladora automática

4.3 Fase 2

4.3.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 28 terceiros molares humanos, hígidos e não-erupcionados. Os dentes foram limpos com curetas periodontais e, em seguida, foi realizada a profilaxia com pedra-pomes e escova de Robinson. Posteriormente, todos os dentes foram examinados com lupa estereoscópica (SZ-PT/SZ40, Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de 10x, para que os dentes que apresentassem trincas ou anomalias de estrutura fossem descartados. Os dentes permaneceram armazenados em solução de timol a 0.1% a 4°C até a sua utilização.

As coroas e as raízes dos dentes foram submetidas a secções em uma cortadeira automática (Isomet Buehler) para a obtenção dos espécimes de esmalte e dentina (4 x 4 x 2 mm). Um espécime de esmalte e um espécime de dentina foram incluídos em um mesmo bloco de resina acrílica (Varidur, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Os blocos obtidos foram então planificados em uma politriz, utilizando discos abrasivos de Al₂O₃ (500-, 1200-, 2400- e 4000-, Buehler) sob refrigeração e polidos, utilizando papel de feltro com pasta diamantada de 1 µm (Buehler) (Figura 4.4A). As superfícies polidas receberam a aplicação de fitas adesivas (Graphic tape; Chartpak, Leeds, MA, USA), nas duas margens, mantendo uma área central de teste exposta de 4 x 1 mm (Figura 4.4B).

Figura 4.4 – A – Espécimes de esmalte e dentina incluídos em resina acrílica; B – Fita adesiva posicionada sobre os espécimes polidos

No total, foram obtidos 55 espécimes de esmalte e 55 espécimes de dentina, os quais foram aleatoriamente distribuídos entre os 5 grupos experimentais (n=11), como descrito na Tabela 4.2.

4.3.2 Desafio erosivo

Todos os espécimes foram submetidos a ciclos alternados de erosão-remineralização. Um ciclo completo compreendia as seguintes etapas: **(1)** 5 min de imersão em 10 ml das soluções desmineralizantes (sucos experimentais) / espécime **(2)** lavagem com água deionizada e leve secagem com papel absorvente **(3)** 60 min de imersão em 10 ml de solução remineralizante (saliva artificial; pH 7.0) / espécime. Este ciclo foi repetido 6x ao dia durante 5 dias, totalizando 2 h e 30 min de imersão em solução desmineralizante. A Figura 4.5 representa um ciclo completo de desmineralização (des-) e remineralização (remin-). No período noturno, entre os ciclos, os espécimes permaneceram armazenados em saliva artificial. Todas as soluções foram utilizadas em temperatura ambiente. O Quadro 4.2 apresenta a fórmula da saliva artificial utilizada nesse estudo.

Figura 4.5 – Ciclo completo de desmineralização-remineralização

Reagentes	Concentração
CaCl₂*2H₂O	0.213g [*]
KH₂PO₄	0.738g [*]
KCl	1.114g [*]
NaCl	0.381g [*]
Tris buffer	12g [*]
Mucina	2.2g [*]

Valores correspondentes a cada 1 L de solução

Quadro 4.2 - Composição da saliva artificial

Período des-

Durante o período de desmineralização, os espécimes de esmalte e dentina foram colocados em um copo plástico, contendo orifícios no fundo. Em outro copo do mesmo tamanho foram dispensados os 10 ml da solução desmineralizante (suco experimental). O copo contendo os espécimes foi então encaixado dentro do copo contendo o suco (Figura 4.6), para que os espécimes permanecessem totalmente imersos durante os 5 min do desafio erosivo. Ao final desse período, os espécimes foram removidos da solução desmineralizante e imediatamente lavados com água deionizada para a total remoção do ácido. Em seguida, os espécimes foram secos com folhas de papel absorvente.

Figura 4.6 – Copo com o espécime, encaixado no copo contendo a solução desmineralizante. Espécime completamente imerso na solução

Período remin-

Após o período des-, os espécimes foram posicionados em outro copo contendo orifícios no fundo para a imersão na solução remineralizante (saliva artificial). O mesmo procedimento citado anteriormente foi então repetido para essa fase. Os espécimes permaneceram imersos em saliva artificial por 60 min, sob agitação (150 rpm) em uma plataforma vibratória (Figura 4.7).

Ao final do período de remineralização, os espécimes foram removidos da saliva artificial, lavados com água deionizada e levemente secos com folhas de papel absorvente, para então serem submetidos ao próximo desafio erosivo.

A cada período des- e remin-, as soluções foram substituídas, utilizando sempre soluções frescas. O ciclo de erosão-remineralização foi realizado ao mesmo tempo, para todos os grupos experimentais.

Concluído o período de ciclagem, as fitas adesivas foram removidas da superfície dos espécimes, com o auxílio de uma pinça clínica (Figura 4.8), para a realização das análises de superfície.

Figura 4.7 – Espécimes imersos em saliva artificial, sob agitação na plataforma vibratória

Figura 4.8 – Fita adesiva sendo removida dos espécimes

4.3.3 Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja

O potencial erosivo dos sucos de laranja utilizados como controle positivo e negativo, e dos sucos experimentais a partir da adição das proteínas, foi avaliado através da análise da perda de estrutura em esmalte e dentina por perfilometria óptica, e através da análise da dureza superficial do esmalte.

Perfilometria óptica

Nesse estudo, a análise de perfil foi realizada nos espécimes de esmalte e dentina utilizando-se um perfilômetro óptico (Proscan 2000; Scantron, Venture Way, Taunton, UK) (Figura 4.9). Esse aparelho permite realizar o escaneamento sobre toda a superfície do espécime, envolvendo a área da lesão, a qual foi submetida ao desafio erosivo, e as duas áreas de referência hígdas, cobertas com a fita adesiva. Uma área de 2 mm de comprimento (eixo x) por 1 mm de largura (eixo y) foi escaneada. O tamanho do passo foi programado para 0.01 mm (x) e 0.1 mm (y), e o número de passos foi de 200 (x) e 20 (y). Com o uso de um software, determinou-se a perda de estrutura calculando a diferença de profundidade da lesão em relação às áreas de referência (Figura 4.10). Para isso, a ferramenta de “*3-point height*” foi utilizada.

Figura 4.9 – Perfilômetro óptico

Figura 4.10 – Imagem 3D mostrando as áreas da lesão e as áreas de referência totalmente escaneadas

Microdureza de superfície

A microdureza de superfície foi realizada apenas para os espécimes de esmalte. Esse método foi realizado com o uso de um endentador Knoop (Wilson 2100 Hardness Tester, Instron), utilizando 50 g de carga por 15 seg. Foram realizadas 6 endentações nas superfícies de referência (três de cada lado) e 3 na área da lesão (Figura 4.11). Cada endentação foi realizada a uma distância de pelo menos 100 µm uma da outra. A média das endentações da superfície hígida e da área da lesão foi calculada. Os valores de média obtidos para as superfícies híginas foram utilizados para padronizar os espécimes, excluindo aqueles que apresentassem valores discrepantes e fora do padrão. Apenas os valores da área da lesão foram utilizados para a comparação entre os grupos.

Figura 4.11 – Esquema mostrando as 6 endentações realizadas nas áreas de referencia e as 3 endentações na área da lesão

4.3.4 Análise estatística

Para o método do pH-Stat, as médias de pH e do volume de HCl (em ml) foram calculadas em triplicata. As variáveis de resposta analisadas neste estudo foram a perda de superfície (em μm), medida por perfilometria óptica para os espécimes de esmalte e dentina, e a desmineralização de superfície medida através da dureza superficial, para os espécimes de esmalte.

Para a análise dos dados utilizou-se o programa SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foram realizados os testes preliminares de normalidade de Shapiro-Wilk e os testes de homogeneidade de Levene.

A partir da homogeneidade apresentada por todos os dados avaliados, a análise estatística da perda de superfície em esmalte e dentina e a análise da alteração de dureza superficial em esmalte foram realizadas através do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), um fator, seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do método do pH-Stat

As médias do pH e do volume de HCl 0.1 M (em ml) necessários para o método do pH-Stat são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Médias $\pm$ desvio padrão do pH e do volume de HCl 0.1 M (em ml) necessários no método do pH-Stat

Grupos	Média pH (DP)	Média vol HCl 0.1 M (DP)
C+	3.83 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.03
CAS	3.85 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.06
OVA	3.87 $\pm$ 0.01	1.10 $\pm$ 0.10
CAS + OVA	3.88 $\pm$ 0.01	1.08 $\pm$ 0.01
C-	3.85 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.02

Os resultados para o método do pH-Stat mostram que o grupo C+ necessitou do menor volume de titulante (HCl) em comparação aos demais grupos experimentais. Comparado ao grupo C+, o suco sem aditivos (C-) e os sucos com adição das proteínas, necessitaram de grandes volumes de HCl para manterem o valor do pH inicial.

5.2 Avaliação da Microdureza superficial (MDS)

A avaliação da microdureza superficial nesse estudo, para os espécimes de esmalte, possui uma variável dependente (Dureza Knoop) com um único fator de

variação (tratamentos de superfície), em cinco níveis (cálcio, caseína, ovalbumina, caseína + ovalbumina e original). Para a análise estatística da microdureza foram utilizados apenas os valores da MDS final de cada grupo. Os valores das médias de MDS inicial e final para os espécimes de esmalte dos cinco grupos experimentais são apresentadas no gráfico 5.1.

Gráfico 5.1 - Médias da microdureza inicial e final para os cinco grupos experimentais

Os valores da microdureza final, medidos após o desafio erosivo mostraram uma distribuição homogênea ($p = 0.061$) de acordo com o teste de Levene. Dessa forma, o teste da ANOVA foi empregado. Os resultados dessa análise mostraram haver diferença estatisticamente significativa ($p = 0.000$) entre os grupos, e por esse motivo o teste complementar de Tukey foi aplicado (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da microdureza final do esmalte segundo os tratamentos propostos

Tratamentos	N	Subgrupo por $\alpha = .05$		
		A	B	C
C+	11	312,68 $\pm$ 20,45		
CAS	11		121,99 $\pm$ 10,70	
OVA	11		108,87 $\pm$ 11,16	108,87 $\pm$ 11,16
CAS + OVA	11			102,57 $\pm$ 11,89
C-	11			101,94 $\pm$ 8,56

* Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Os resultados apontam que o grupo C+ apresentou o maior valor de microdureza superficial, seguido pelo grupo CAS. O grupo C- apresentou o menor valor de MDS. Dentre os tratamentos propostos, o grupo CAS apresentou valores estatisticamente semelhantes ao grupo OVA, e diferentes estatisticamente do grupo C-. O grupo OVA e CAS + OVA apresentaram valores de MDS semelhantes estatisticamente ao grupo C-.

5.3 Avaliação da Perda de Estrutura (PE)

A avaliação da perda de estrutura nesse estudo, para os espécimes de esmalte e dentina, possui uma variável dependente (perda de estrutura) com um único fator de variação (tratamentos de superfície), em cinco níveis (cálcio, caseína, ovalbumina, caseína + ovalbumina e original).

Perda de estrutura do esmalte (PEE)

Os valores de PEE medidos após o desafio erosivo apresentaram uma distribuição homogênea ($p = 0.203$), confirmada a partir do teste de Levene. Dessa forma, foi realizado o teste da ANOVA, que revelou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0.000$). Em seguida, o teste complementar de Tukey foi aplicado para determinar a diferença ocorrida entre os grupos (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da perda de esmalte segundo os tratamentos propostos

Tratamentos	N	Subgrupo por $\alpha = .05$		
		A	B	C
C+	11	0,09 $\pm$ 0,20		
CAS	11		-0,40 $\pm$ 0,32	
OVA	11		-0,44 $\pm$ 0,26	
CAS + OVA	11		-0,39 $\pm$ 0,25	
C-	11			-1,04 $\pm$ 0,36

* Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

A partir desses resultados, pode-se observar que o grupo C+ foi o que apresentou menor PEE quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, o grupo C- apresentou o maior valor de PEE. Todos os tratamentos propostos (CAS, OVA e CAS + OVA) apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos valores de PEE quando comparados ao grupo C- e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

Perda de estrutura da dentina (PED)

De acordo com o emprego do teste de Levene, os valores de PED obtidos após o desafio erosivo mostraram uma distribuição homogênea ($p = 0.050$). Dessa forma, o teste da ANOVA foi empregado. Esse teste mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0.000$). Em seguida, o teste complementar de Tukey foi aplicado para determinar a diferença ocorrida entre os grupos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Teste de Tukey para os tratamentos de superfície. Média $\pm$ desvio-padrão da perda de dentina segundo os tratamentos propostos

Tratamentos	N	Subgrupo por $\alpha = .05$	
		A	B
C+	11	$-0,82 \pm 0,28$	
CAS	11		$-7,26 \pm 0,65$
OVA	11		$-6,74 \pm 1,18$
CAS + OVA	11		$-7,16 \pm 0,75$
C-	11		$-7,51 \pm 1,26$

* Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Os resultados apontam que o grupo C+ apresentou o menor valor de perda de dentina. Nenhum dos tratamentos propostos (CAS, OVA e CAS + OVA) apresentou uma redução nos valores de PED, mostrando-se semelhantes estatisticamente ao grupo C-.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o desgaste dental causado por processos químicos (erosão) e mecânicos (abrasão e atrição) tem recebido maior atenção por parte dos dentistas. Embora esses processos possam ocorrer individualmente ou associados, o efeito da erosão é sempre dominante (Addy; Shellis, 2006).

Definida como a perda irreversível dos tecidos duros dentais por processos químicos, sem o envolvimento bacteriano, a erosão dental pode ser causada por uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos, o consumo de bebidas ácidas tem sido relacionado com o aumento da prevalência da erosão em crianças e adultos jovens (Dugmore; Rock, 2004).

O ácido cítrico faz parte da composição da maioria das frutas e sucos de frutas frequentemente ingeridos, como o suco de laranja (Rees, 2004), que é o suco de fruta mais popularmente consumido no mundo. Esse consumo pode ser resultado do seu conteúdo conhecido de vitamina C (Rees et al., 2006). Entretanto, os altos níveis de ácido cítrico presentes nos sucos de laranja podem levar a uma erosão do esmalte e da dentina (Rees et al., 2006), conferindo-lhe um potencial erosivo reconhecido (West et al., 1998; Attin et al., 2005; Rees et al., 2006; Murrell et al., 2010).

Por essas razões, o suco de laranja foi selecionado para ser utilizado nesse estudo como solução desmineralizante para o esmalte e a dentina humanos.

A modificação de bebidas ácidas, como meio de controle da erosão causada por fatores extrínsecos, vem sendo estudada nos últimos anos. O método mais comum descrito na literatura está relacionado com a adição de sais de cálcio e/ou fosfato (Grenby, 1996), o que tornaria a bebida supersaturada em relação à hidroxiapatita (Larsen; Nyvad, 1999; West et al., 2003; Lussi et al., 2004; Jensdottir et al., 2005). Uma série de estudos *in vitro* e *in situ* (Hughes et al., 1999a,b; Larsen; Nyvad, 1999; West et al., 1999; Barbour et al., 2003; Jensdottir et al., 2005; Hara; Zero, 2008) tem mostrado o efeito positivo desse método na redução do potencial erosivo de bebidas e soluções ácidas, e por esse motivo, o suco de laranja com adição de cálcio foi escolhido como controle positivo para esse estudo.

Duas proteínas da dieta, a caseína (derivada do leite) e a ovalbumina (derivada da parte branca dos ovos) têm sido estudadas ao longo dos anos em relação ao seu potencial anticariogênico, por causar uma redução na dissolução da hidroxiapatita.

Agentes que inibem a dissolução da hidroxiapatita podem encontrar aplicação em produtos desenvolvidos para reduzir ou prevenir a erosão no esmalte e na dentina. Sua principal utilização está na formulação de bebidas com menor potencial erosivo. Para que isso seja possível, esses agentes devem preencher alguns pré-requisitos, de não serem tóxicos, serem aprovados para uso em alimentos, de baixo custo e solúveis em solução ácida (Hemingway et al., 2008).

Por apresentarem todas essas características, a caseína e a ovalbumina passaram a ser testadas, recentemente, como possíveis agentes anti-erosivos em soluções simples de ácido cítrico (Barbour et al., 2008 e Hemingway et al., 2008) e como aditivos de algumas bebidas ácidas (Hemingway et al., 2010). No entanto, devido à escassez de estudos que comprovem a eficácia dessas proteínas como aditivos em bebidas ácidas, disponíveis comercialmente, utilizando os substratos de esmalte e dentina humanos, a caseína e a ovalbumina foram escolhidas para serem testadas nesse estudo *in vitro*.

Baseando-se nos primeiros estudos (Barbour et al., 2008 e Hemingway et al., 2008) que testaram diferentes concentrações dessas proteínas, tanto de forma isolada como em combinação com o cálcio, as concentrações que apresentaram o melhor resultado da proteína isolada, na redução do potencial erosivo da solução ácida testada foram selecionadas para a utilização nesse estudo.

Além da utilização de cada uma dessas proteínas isoladamente, sem a adição de cálcio e/ou fosfato, foi criado para esse estudo, um terceiro grupo contendo a combinação das duas proteínas (caseína + ovalbumina), com a intenção de verificar se existia algum sinergismo entre elas.

Um dos métodos de avaliação do potencial erosivo dos sucos de laranja utilizados foi o do pH-Stat. Esse método tem sido extensivamente utilizado para medir a cinética de dissolução da hidroxiapatita e dos tecidos dentais (White; Nancollas, 1977; Christoffersen; Christoffersen, 1986). No entanto, é um método indireto que permite uma observação contínua do processo de dissolução, utilizando um titulador automático criado para manter uma reação a um pH constante, pela adição de ácido ou base, conforme necessário (Shellis et al., 2010).

Os resultados do método do pH-Stat, nesse estudo, mostraram que o suco de laranja com adição de cálcio (C+) necessitou de um pequeno volume de HCl para manter o pH inicial constante durante a reação. A presença de cálcio nesse suco foi capaz de reduzir o seu potencial erosivo em menos da metade, quando comparado ao grupo controle negativo (C-). Por outro lado, todas as proteínas testadas (caseína, ovalbumina e caseína + ovalbumina) necessitaram de um volume grande de titulante (HCl). Nesse teste, portanto, nenhuma das proteínas mostrou um efeito positivo na redução do potencial erosivo do suco de laranja. Esses resultados são contrários aos resultados encontrados por Barbour et al. (2008) e Hemingway et al. (2008), que diferente desse estudo, utilizaram uma solução simples de ácido cítrico como teste e relataram uma redução significativa na dissolução da hidroxiapatita, na faixa de 54% para a adição de 0.02% de caseína (pH 3.2) e na faixa de 50 – 75% para a adição de 0.2% de ovalbumina (pH 3.2) respectivamente.

Uma das possíveis explicações para a diferença encontrada entre esse estudo e os estudos citados acima, pode estar relacionada às diferenças de metodologia empregadas. Apesar do método do pH-Stat ter sido utilizado nos três estudos, o substrato testado foi diferente. Nos estudos de Barbour et al. (2008) testando a caseína como aditivo e Hemingway et al. (2008) testando a ovalbumina, foram utilizados discos de hidroxiapatita durante a reação de dissolução, diferente dos cristais de hidroxiapatita utilizados nesse estudo. Os discos apresentavam uma superfície plana, com área de dimensões semelhantes para todos os discos testados, onde seria realizado o desafio erosivo. Apesar de existir uma grande diferença em relação à composição desses discos, quando comparados ao substrato dental humano, na comparação com os cristais de hidroxiapatita, os discos apresentam-se fisicamente mais semelhantes aos espécimes de esmalte e dentina.

Os cristais de hidroxiapatita, por sua vez, apresentam uma superfície de contato muito maior do que aquela determinada para os discos de hidroxiapatita. Dessa forma, apesar da concentração utilizada de proteínas ter sido a mesma para os três estudos, dentro das condições empregadas nesse estudo, esta concentração pode não ter sido suficiente para reagir com todas as superfícies disponíveis dos cristais de hidroxiapatita.

Outra explicação pode estar relacionada ao tempo total da reação que, nesse estudo, foi de 5 min, comparado aos 30 min de reação empregados nos estudos citados acima. Essa diferença no tempo da reação é muito importante no que diz

respeito à adsorção das proteínas à superfície da hidroxiapatita, visto que, segundo Kawasaki et al. (1999), em uma solução com baixa concentração de proteína, a adsorção ocorre de forma relativamente lenta, para que haja tempo suficiente para as moléculas de proteína adsorvidas relaxarem, ou seja reorganizarem a sua conformação, uma vez que a conformação das moléculas de proteínas adsorvidas deve mudar durante o relaxamento na superfície. Esse mecanismo é diferente no caso de elevadas concentrações de proteína, em que a alta taxa de adsorção, relativa à taxa de mudanças conformacionais, previne as moléculas de relaxarem. A partir disso, a utilização de pequenas concentrações de proteínas, aliada aos 5 min de reação, podem não ter sido suficientes para que as proteínas se reorganizassem e fossem adsorvidas à superfície dos cristais de hidroxiapatita, utilizados nesse teste.

Para tentar se aproximar das condições ocorridas na boca, os espécimes de esmalte e dentina utilizados nesse estudo, foram submetidos a ciclos alternados de erosão-remineralização, previamente desenvolvido (Schlueter et al., 2007).

A avaliação do potencial erosivo do suco de laranja, utilizado nesse estudo, foi realizada através da análise da perda de estrutura ocorrida nos espécimes de esmalte e dentina por perfilometria óptica, bem como por meio da análise da dureza superficial encontrada nos espécimes de esmalte após o desafio erosivo.

A perfilometria foi escolhida como método de análise para esse estudo, por ser descrita como o método padrão ouro (Hall et al., 1997) para a avaliação das perdas de estrutura causadas pelos processos erosivos. A perfilometria óptica permite que seja feito um mapeamento de toda a superfície erodida e hígida, sem causar nenhum dano ao espécime, por não ter contato com a superfície. Uma vez que a perda de estrutura é avaliada no lugar da desmineralização superficial, a perfilometria tem sido utilizada para investigar os estágios mais avançados da erosão, diferentemente das técnicas de endentação (Barbour; Rees, 2004).

De forma complementar, a microdureza de superfície foi realizada para avaliar a desmineralização superficial ocorrida na superfície do esmalte, visto que as técnicas de endentação têm sido extensivamente utilizadas para investigar a erosão no esmalte através da medição da dureza superficial desse tecido. Como inicialmente o processo erosivo envolve a dissolução do esmalte, que está associada ao “amolecimento” da superfície devido ao enfraquecimento da estrutura do esmalte, a microdureza é um método simples de observação dos estágios iniciais da erosão do esmalte (Barbour; Rees, 2004). Dessa forma, as análises das

endentações de antes e depois dos processos erosivos têm sido utilizadas para avaliar as perdas iniciais de até 1µm (Jaeggli; Lussi, 1999).

Os dois métodos de avaliação foram realizados nesse estudo, por se tratar de dois substratos diferentes (esmalte e dentina) que apresentam susceptibilidades diferentes à erosão.

Em relação ao esmalte, os resultados da microdureza de superfície apontaram que o grupo com cálcio (C+) apresentou o menor potencial erosivo, quando comparado aos demais grupos experimentais. Dentre as proteínas testadas, todas apresentaram valores de MD menores do que o suco sem aditivo (C-), entretanto apenas a caseína (CAS) se mostrou capaz de prevenir a desmineralização superficial do esmalte. Os demais grupos, OVA e CAS + OVA não apresentaram um efeito positivo na prevenção dessa desmineralização.

No que diz respeito à perda de estrutura, os resultados da perfilometria mostraram que o suco de laranja com adição de cálcio também apresentou o menor potencial erosivo. Todas as proteínas testadas (caseína, ovalbumina e caseína + ovalbumina) apresentaram uma redução significativa na perda de esmalte quando comparadas ao suco sem aditivo (C-).

O efeito positivo encontrado com a suplementação de cálcio está de acordo com uma série de estudos (Hughes et al., 1999a,b; West et al., 1999; Larsen; Nyvad, 1999; Barbour et al., 2003; Jensdottir et al., 2005; Hara; Zero, 2008) que demonstraram essa capacidade anti-erosiva do cálcio, quando adicionado à bebidas ou soluções ácidas. A atuação do cálcio está baseada no efeito do íon comum, onde a força motriz para a dissolução da superfície dental pode ser diminuída pelo estado saturado da bebida em relação ao cálcio (Barbour et al., 2008).

O suco de laranja utilizado nesse estudo como controle positivo, de acordo com o fabricante, contém cálcio na forma de lactato de cálcio e fosfato de cálcio. Supõe-se que, como o íon lactato apresenta propriedades quelantes de cálcio (Featherstone; Lussi, 2006), quando o lactato de cálcio foi adicionado ao suco, este cálcio encontrava-se na forma de complexos estáveis com o lactato. A constante de equilíbrio de formação (Ks) é definida como a força entre a combinação de cálcio (ou outros íons metálicos) com o seu ligante (Furia, 1980). Quanto maior a constante de equilíbrio de formação do complexo, mais estável ele é.

O lactato de cálcio apresenta uma Ks de 10^2 , bem próxima da Ks do complexo formado entre o íon citrato e o cálcio, que está na ordem de 10^3 . Por esse motivo,

embora o íon citrato também seja capaz de quelar o cálcio (Rees, 2004), ele não consegue complexar tão facilmente o Ca^{+2} que já está complexado com lactato e, dessa forma, o equilíbrio da reação se mantém estável. Por outro lado, caso os íons cálcio sejam adicionados de forma não complexada, como pode ter sido o caso do fosfato de cálcio presente neste suco, eles serão imediatamente complexados pelos íons citrato e não estarão disponíveis para deslocar o equilíbrio de solubilidade da hidroxiapatita.

Neste caso, portanto, o lactato de cálcio seria capaz de manter o equilíbrio da solução, deslocando o equilíbrio de solubilidade, no sentido de proteger a dissolução desses cristais e, caso necessário, por não ser um complexante não tão estável, o lactato disponibilizaria o Ca^{+2} para se incorporar à hidroxiapatita, no sentido de evitar a sua dissolução.

O principal objetivo dos sucos de laranja disponíveis comercialmente, enriquecidos com diferentes concentrações de cálcio, é aumentar a ingestão de cálcio da dieta e prevenir a osteoporose (Davis et al., 2007). Indiretamente estes sucos são efetivos na redução da erosão, como mostrado neste estudo, porém apresentam alguns efeitos indesejáveis. Em geral, a concentração de cálcio presente nessas bebidas é grande, como no caso do controle positivo utilizado nesse estudo que continha ~1.6 g/l (Hara; Zero, 2008), o que pode alterar o sabor e a estabilidade da bebida (Grenby, 1996; Jensdottir et al., 2005; Barbour et al., 2008). Além do mais, a suplementação adicional com cálcio deve ser considerada quando a ingestão de cálcio na dieta for menor do que 700 mg/dia (van den Bergh et al., 2011). Dessa forma, o consumo de cálcio em excesso (> 2000 mg/dia) pode ocasionar um aumento no risco de pedra nos rins e a interferência na absorção de outros minerais como o ferro (Bilezikian et al., 1994).

Tentando contornar esses problemas, duas proteínas da dieta alimentar foram testadas nesse estudo como suplementação do suco de laranja, visando reduzir o seu potencial erosivo.

Dentre as proteínas testadas, a caseína foi a única capaz de prevenir a desmineralização superficial do esmalte, bem como a perda de estrutura. Esse efeito pode estar relacionado ao fato da caseína apresentar uma natureza relativamente hidrofóbica (Aimutis, 2004), em que a sua afinidade com a água é pequena. Além do mais, o seu alto peso molecular (375 kDa) lhe confere uma longa cadeia de aminoácidos, com maiores possibilidades de ligações laterais entre as cadeias das

moléculas de caseína. Essas moléculas interagem entre si pelos seus grupos hidrofóbicos (apolar), através de ligações fracas de Van der Waals. Como as moléculas de caseína possuem grandes trechos de cadeias apolares, em um determinado momento que a nuvem eletrônica dessas moléculas estiver mais deslocada, será formado um dipolo instantâneo, que irá gerar uma pequena força intermolecular de atração entre elas. Apesar das forças de Van der Waals serem muito fracas, elas atuam significativamente quando existe um número grande de moléculas muito próximas umas das outras.

Os outros grupos carregados (fosfoserina, histidina, glutamato, aspartato) presentes nas moléculas de caseína irão interagir com os íons da hidroxiapatita, já que a parte polar dessa molécula fica voltada para ela, enquanto que a parte apolar, ou hidrofóbica, se volta para a parte externa da hidroxiapatita. Devido à grande interação entre os grupos hidrofóbicos, as moléculas de caseína são adsorvidas nos sítios ativos de adsorção da superfície da hidroxiapatita. Isso permite a formação de uma barreira física de caseína que se deposita sobre a superfície de hidroxiapatita impedindo o acesso de íons H^+ provenientes da solução e a saída de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} dos cristais de hidroxiapatita, o que está de acordo com o que havia sido sugerido por Barbour et al. (2008) e Hemingway et al. (2008).

No estudo de Weiss e Bibby (1966a), a caseína, mesmo após os procedimentos de lavagem vigorosa, mostrou uma persistência na redução da sua solubilidade. Isso pode ser explicado pela sua natureza hidrofóbica, o que a torna pouco solúvel em água, estando de acordo com os achados desse estudo.

Em relação à ovalbumina, os resultados deste estudo não encontraram um efeito positivo dessa proteína no que diz respeito à desmineralização superficial. Uma possível explicação para estes achados pode estar relacionada à grande hidrofiliabilidade da ovalbumina, como descrita em estudos anteriores (Keshavarz; Nakai, 1979). Segundo Christoffersen et al. (1986) a natureza fortemente hidrofílica da ovalbumina leva a uma interação relativamente fraca com a superfície da hidroxiapatita.

Os grupos polares presentes nas moléculas de ovalbumina permitem uma melhor interação dessa proteína com a água, o que a torna mais solúvel. De acordo com os estudos de Pearce e Bibby (1966) e van der Linden et al. (1989), a realização de procedimentos simples de lavagem com água destilada, causou a remoção dessa proteína da superfície da hidroxiapatita, o que pode explicar os

resultados encontrados nesse estudo. A partir disso, o mecanismo de ação da ovalbumina não sugere a formação de uma barreira protetora na superfície, como observado pela caseína.

Os achados de Arends et al. (1986) e van der Linden et al. (1989) descrevem uma forte interação da albumina com os minerais do interior da lesão, sugerindo que esta interação seja mais forte do que as interações ocorridas entre a proteína e os minerais na superfície externa do esmalte. Isso estaria de acordo com os resultados encontrados nesse estudo, que mostraram um efeito positivo da ovalbumina na redução da progressão da erosão do esmalte. Uma explicação para essa forte interação da proteína com os minerais do interior da lesão, pode estar relacionada à sua característica hidrofílica, e ao seu baixo peso molecular (45 kDa), que lhe confere moléculas pequenas, permitindo com que elas cheguem mais facilmente a todos os sítios ativos de adsorção presentes no interior dos cristais de hidroxiapatita.

Por outro lado, no grupo em que as proteínas foram testadas em combinação (CAS + OVA), a desmineralização do esmalte não pôde ser evitada, mas a progressão da erosão foi significativamente reduzida. De acordo com Pearce e Bibby (1966), a caseína apresentou o maior valor de adsorção ao esmalte bovino, enquanto que a ovalbumina apresentou o menor valor. Sugere-se que a constante de equilíbrio de adsorção da caseína seja maior do que a da ovalbumina. Entretanto, nesse estudo, o resultado das proteínas em combinação mostrou-se semelhante ao encontrado para a ovalbumina isoladamente, sugerindo que na competição entre a caseína e a ovalbumina, houve uma predominância da ovalbumina na preferência de adsorção. Isso pode ser explicado pela diferença de concentração utilizada para as proteínas, com a ovalbumina estando em maior concentração do que a caseína. Neste caso, portanto, a presença de apenas algumas poucas cadeias de caseína não foi capaz de formar uma barreira efetiva contra os íons H^+ .

Em relação à dentina, apenas o suco de laranja adicionado de cálcio apresentou um potencial erosivo reduzido. Todas as proteínas testadas não apresentaram um efeito positivo na redução da perda de estrutura, comportando-se de forma semelhante ao suco de laranja sem aditivo. A comparação desse resultado obtido com outros estudos se torna difícil, visto que não há relato na literatura acerca do papel dessas proteínas na prevenção da erosão sobre a dentina humana.

Uma hipótese para a explicação desses resultados diz respeito à estrutura e composição da dentina que são muito diferentes do esmalte. O menor conteúdo

mineral e a estrutura tubular mais irregular da dentina podem ter contribuído para uma menor adsorção das proteínas. Além disso, os cristais na dentina são muito menores do que aqueles encontrados no esmalte, o que faz com que a área de superfície por grama de dentina seja muito maior, oferecendo mais superfície disponível para o ataque ácido (Featherstone; Lussi, 2006) e, consequentemente, uma maior superfície de contato para reagir com as proteínas. Neste caso, a concentração de proteínas utilizadas nesse estudo pode não ter sido suficiente para reagir com toda essa superfície disponível.

Sugere-se, ainda, que a estrutura tubular da dentina tenha levado a um impedimento estérico da caseína pelo seu tamanho, ou seja, as longas moléculas dessa proteína foram impedidas de entrar nos espaços vazios da dentina. Supostamente, essa estrutura privilegiaria mais as moléculas de ovalbumina, por terem maior facilidade de penetrar nesses espaços. Entretanto, isso não foi observado neste estudo.

Todavia, as respostas para a dentina são muito vagas, sendo necessários mais estudos a respeito do papel das proteínas sobre esse substrato dental.

7 CONCLUSÕES

Conforme a metodologia utilizada, e dentro das limitações deste estudo *in vitro*, é possível concluir que:

- A caseína foi capaz de diminuir a desmineralização superficial do esmalte, bem como a progressão da erosão;
- A adição da ovalbumina ao suco de laranja, isoladamente ou em combinação com a caseína, não evitou a desmineralização superficial do esmalte, mas reduziu significativamente a perda de estrutura.
- Em relação à dentina, nenhuma das proteínas testadas mostrou um efeito positivo na redução do potencial erosivo quando adicionadas ao suco de laranja.

REFERÊNCIAS¹

Addy M, Shellis RP. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:17-31.

Aimuts WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr.* 2004;134:989-95.

Arends J, Schuthof J, Christoffersen J. Inhibition of enamel demineralization by albumin in vitro. *Caries Res.* 1986;20:337-40.

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 Diseases.* 2005;11:7-12.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:428-33.

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.* 2005;32:16-20.

Barbour ME, Rees GD. The role of erosion, abrasion and attrition in tooth wear. *J Clin Dent.* 2006;17[special issue]:88-93.

Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent.* 2004;32:591-602.

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;116:473-8.

Bavetta LA, McClure FJ. Protein factor and experimental rat caries. *J Nutr.* 1957;63:107-17.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bilezikian JP, Bailey L, Elmer PJ, Favus MJ, Go VLW, Goldring SR, et al. Optimal calcium intake. *J Am Med Assoc.* 1994;272(24):1942-8.

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

Brown CJ, Smith G, Shaw L, Parry J, Smith AJ. The erosive potential of flavoured sparkling water drinks. *Int J Ped Dent.* 2007;17:86-91.

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

Christoffersen MR, Christoffersen J, Ibsen P, Ipsen H. Adsorption of ovalbumin on calcium hydroxyapatite crystals. *Colloids Surf.* 1986;18:1-8.

Chunmuang S, Jitpukdeebodintra S, Chuenarrom C, Benjakul P. Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro. *J Oral Sci.* 2007;49:293-7.

Damodaran S. Amino acids, peptides, and proteins. In: Fennema OR. 3^a ed. *Food Chemistry.* New York: Marcel Dekker; 1996. 321-428.

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: 1593-1598.

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

Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent.* 1979;42:649-53.

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

Furia TE. *Handbook of food additives.* 2a ed. Cleveland: CRC Press; 1980, cap. 6.

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

Hall AF, Sadler JP, Strang R, de Josselin de Jong E, Foye RH, Creanor SL: Application of transverse microradiography for measurement of mineral loss by acid erosion. *Adv Dent Res.* 1997;11:420-5.

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;50:541-52.

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

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. *Eur J Oral Sci.* 2008;42:348-53.

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

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

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;27:285-9.

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. 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent.* 1999b;27:345-50.

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

Hunter ML, Patel R, Loyn T, Morgan MZ, Fairchild R, Rees JS. The effect of dilution on the in vitro erosive potential of a range of dilutable fruit drinks. *Int J Pediatr Dent*. 2008;18:251-5.

Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent*. 2000;28:257-63.

Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: An in situ study. *Caries Res*. 1999;33:455-61.

Jager DHJ, Vieira AM, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Influence of beverage composition on the results of erosive potential measurement by different measurement techniques. *Caries Res*. 2008;42:98-104.

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

Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol*. 2007;52:614-7.

Kawasaki K, Kambara M, Matsumura H, Norde W. Measurements of the wettability of protein-covered hydroxyapatite surfaces. *Caries Res*. 1999;33:473-8.

Keshavarz E, Nakai S. The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. *Biophysica Acta*. 1979;576:269-79.

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;33:81-7.

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

Lodi CS, Sassaky KT, Fraiz FC, Delbem ACB, Martinhon CCR. Evaluation of some properties of fermented milk beverages that affect the demineralization of dental enamel. *Braz Oral Res*. 2010;24:95-101.

Lussi A. Dental erosion. Clinical diagnosis and case history taking. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:191-8.

Lussi A. Erosive Tooth Wear – A Multifactorial Condition of Growing Concern and Increasing Knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8.

Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and preventive measures. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:190-9.

Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent.* 2006; 19(6):319-25.

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

Lussi A, Jaeggi 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.

Magalhaes 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.

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

Meurman JH, Rytomaa I, Kari K, Laakso T, Murtomaa H. Salivary pH and glucose after consuming various beverages including sugar-containing drinks. *Caries Res.* 1987;21:353-9.

Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr.* 2004;7:201-26.

Murrell S, Marshall TA, Moynihan PJ, Qian F, Wefel JS. Comparison of in vitro erosion potentials between beverages available in the United Kingdom and the United States. *J Dent.* 2010;38:284-9.

Numm JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:156-61.

Owens BM, Kitchens M. The erosive potential of soft drinks on enamel surface substrate: an in vitro scanning electron microscopy investigation. *J Contemp Dent Pract.* 2007;8:11-20.

Pearce EIF, Bibby BG. Protein adsorption on bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 1966;11:329-36.

Rees J, Loyn T, Gilmour A. Does low acid orange juice equal low erosion? *Dental Update.* 2006;33:242-4.

Rees JS. The role of drinks in tooth surface loss. *Dent Update.* 2004;31:318-26.

Reynolds EC, Del Rio A. Effect of casein and whey-protein solutions on caries experience and feeding patterns of the rat. *Arch Oral Biol.* 1984;29:927-33.

Reynolds EC, Black CL. Cariogenicity of a confection supplemented with sodium caseinate at a palatable level. *Caries Res.* 1989;23:368-70.

Reynolds EC, Black CL. Reduction of chocolate cariogenicity by supplementation with sodium caseinate. *Caries Res.* 1987;21:445-51.

Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2007;41:141-5.

Schweigert BS, Shaw JH, Zepplin M, Elvehjem CA. Dental caries in the cotton rat. VI The effect of the amount of proteins, fat and carbohydrate in the diet on the incidence and extend of carious lesions. *J Nutr.* 1946;31:439-47.

Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:475-82.

Swaigsoog HE. Characteristics of milk. In: Fennema OR. 3^a ed. *Food chemistry.* New York: Marcel Dekker; 1996. 841-78.

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

van der Bergh JP, Bours SP, van Geel TA, Geusens PP. Optimal use of vitamin D when treating osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9(1):36-46.

van der Linden AHIM, Booij M, ten Bosch JJ, Arends J. Albumin interaction with caries-like lesions in bovine enamel. *Caries Res.* 1989;23:393-8.

Wang X, Klocke A, Mihailova B, Tosheva L, Bismayer U. New insights into structural alteration of enamel apatite induced by citric acid and sodium fluoride solutions. *J Phys Chem B* 2008; 112: 8840-8848.

Weiss ME, Bibby BG. Effects of milk on enamel solubility. *Arch Oral Biol.* 1966a;11:49-57.

Weiss ME, Bibby BG. Some protein effects on enamel solubility. *Arch Oral Biol.* 1966b;11:59-63.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil.* 2001;28(9):860-4

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;31:361-5.

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.

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

West NX, Hughes JA, Parker D, Weaver LJ, Moohan M, De`Ath J, Addy M. Modification of soft drinks with xanthan gum to minimise erosion: a study in situ. *Brit Dent J.* 2004;196:478-81.

White W, Nancollas GH. Quantitative study of enamel dissolution under conditions of controlled hydrodynamics. *J Dent Res.* 1977;56:524-20.

White AJ, Yorath C, Hengel VT, Leary SD, Huysmans MCDNJM, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under “single-drink” conditions. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:604-9.

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

Zero DT, Lussi A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005;55(suppl1):285-90.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (FOUSP)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 298530
Protocolo 155/2009

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Avaliação do potencial erosivo do suco de laranja através da adição de proteínas**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Stella da Silva Ferreira, sob a orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Maria Angela Pita Sobral.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 22 de outubro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Indiana University School of Dentistry)

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

1

v05/01/09

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/cdbiol.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.