SIMONE SOARES PEDROSA

**Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de
lesões de erosão no esmalte bovino: estudo “in vitro”**

São Paulo

2013

SIMONE SOARES PEDROSA

**Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de
lesões de erosão no esmalte bovino: estudo “in vitro”**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Materias Dentários

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso

São Paulo

2013

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

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

Pedrosa, Simone Soares.

Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de lesões de erosão no esmalte bovino: estudo "*in vitro*" / Simone Soares Pedrosa; orientador Paulo Eduardo Capel Cardoso. -- São Paulo, 2013.

78 p.: il. : tab., fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Remineralização dentária. 2. Desmineralização dentinária. 3. Esmalte dentário - bovinos. 4. Erosão de dente. 5. Materiais dentários. I. Cardoso, Paulo Eduardo Capel. II. Título.

Pedrosa SS. Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de lesões de erosão no esmalte bovino: estudo “in vitro”. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 25 / 10 / 2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Maria Célia e Pedro Humberto (in memoriam), pelo amor,
apoio, dedicação e exemplo de vida, que guiaram os meus passos.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Pará** e à **Universidade de São Paulo** que possibilitaram toda a minha formação acadêmica.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de estudo durante o período do curso em São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso**, pela atenção, preciosa ajuda e orientação ao longo de todo o curso.

À **Profa. Dra. Eliza Burlamaqui Klautau** pela co-orientação, amizade e apoio durante o curso.

À **Profa. Dra. Cecy Martins Silva** por sua dedicação e colaboração como coordenadora do curso em Belém.

À **Profa. Dra. Míriam LacalleTurbino** por sua colaboração como coordenadora do curso em São Paulo, além da sua contribuição como professora.

Aos **Professores Doutores, Rafael Ballester, Vítor Arana-Chavez, Paulo Cesar, Walter Miranda Jr., Carlos Francci, Igor Medeiros, Leonardo Rodrigues Filho, Antônio Muench, Rubens Carvalho, João Humberto Antoniazzi, Ana Cecília Aranha, Carlos Eduardo de Paula, Patricia Freitas, Margareth Oda, Maria Aparecida Luz e Glauco Vieira** pelos valiosos ensinamentos que recebi durante o curso.

À **Alessandra Andrade, Helena Pinheiro, Bruno Lopes, Antônio Lascala, Douglas Nesadal, Sônia Alves, Rosa Nogueira e Elidamar Guimarães** pela imensa ajuda que recebi durante o curso.

Aos meus amigos, **Renata Esteves, Andréa Cruz, Noélia Leal, Jesuína Araújo, Cláudia Rothbarth, Luciana Silva, Roberta Santiago, Danielle Emmi, Ana Daniela Silveira, Max Rocha, Newton Guerreiro Silva Jr., Aladim Lameira, Armando Chermont e Leonardo Ferro**, pelo apoio e companheirismo durante a realização do curso de doutorado.

Aos **alunos do curso de Pós-Graduação em Materiais Dentários** pelas experiências compartilhadas.

À Glauci, bibliotecária da FOUSP pela disponibilidade para corrigir a tese em tempo reduzido.

A **todos aqueles** que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

RESUMO

Pedrosa SS. Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de lesões de erosão no esmalte bovino: estudo “in vitro” [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

A erosão dentária ocasiona a perda da estrutura dental através da dissolução da sua porção mineralizada por ácidos de origem não bacteriana. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a capacidade de materiais contendo compostos bioativos de remineralizar o esmalte bovino submetido a desafio erosivo e se o método de quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™) tem correlação com os resultados do teste de microdureza Knoop. 120 fragmentos de esmalte bovino foram distribuídos entre os grupos experimentais, sendo n=5 para o teste de microdureza (3 x 3 x 2 mm) e n=10 para o método do QLF™ (5 x 5 x 3 mm). Os corpos-de-prova foram analisados em três momentos diferentes (inicial, após 2 dias de protocolo de erosão e após 6 dias de tratamento remineralizador). As amostras foram submetidas a 2 dias de protocolo de erosão, através de imersão em ácido cítrico a 0,3% pH 3,2, por 2 minutos e manutenção das mesmas em saliva artificial (pH 7,0) durante 24 horas. Na sequência, foram realizados os tratamentos remineralizadores por 6 dias consecutivos: 1 gota de saliva foi depositada sobre as amostras e após 1 hora foram imersas por 2 minutos em suspensão aquosa preparada com os seguintes materiais: G1-Pro-Argin™+NaMFP, bicarbonato de arginina + carbonato de cálcio + monofluorofosfato de sódio (Colgate® Sensitive Pró-Alívio™); G2-Recaldent™+NaF, fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio (MI Paste™ Plus); G3-ACP+NaF, fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio + nitrato de potássio (Relief ACP); G4-CaGP+KF, glicerofosfato de cálcio + fluoreto de potássio (Flúor Protector Gel); G5-NovaMin®+NaF, fosfosilicato de cálcio e sódio + fluoreto de sódio (Nupro® Sensodyne®); G6-NovaMin®+NaMFP, fosfosilicato de cálcio e sódio + monofluorofosfato de sódio (Sensodyne® Repair&Protect); G7-NaF, fluoreto de sódio + nitrato de potássio (Sensodyne® Cool Gel) e G8-saliva artificial (controle negativo). Após 2 horas de imersão em saliva foi repetido o protocolo de erosão. Foram realizadas análises estatísticas para o teste de microdureza e QLF™ ($\alpha=0,05$). A ANOVA de dois fatores para medidas repetidas mostrou diferenças

estatisticamente significativas apenas para os momentos da análise e para a interação dos fatores tratamentos x momentos da análise. O teste de Tukey mostrou diferenças significativas na comparação entre todos os momentos da análise e na interação momentos da análise x tratamentos: valores iniciais x após erosão e após tratamento e entre os valores após erosão x após tratamento (NovaMin[®]+NaF, NovaMin[®]+NaMFP, NaF e saliva). O teste de Tukey na comparação dos tratamentos no momento final da análise mostrou diferenças significativas na análise da microdureza para o Recaldent[™]+NaF x NovaMin[®]+NaF, NovaMin[®]+NaMFP e NaF; mas no QLF[™], as diferenças ocorreram entre o Pro-Argin[™]+NaMFP x NaF e saliva; Recaldent[™]+NaF x NovaMin[®]+NaMFP, NaF e saliva e ACP+NaF x NaF. Nenhum dos tratamentos foi capaz de remineralizar totalmente o esmalte dental, mas os materiais Pro-Argin[™]+NaMFP, Recaldent[™]+NaF, ACP+NaF e CaGP+KF foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte com resultado superior aos demais tratamentos. O método do QLF[™] mostrou uma correlação positiva significativa com os resultados do teste de microdureza.

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

ABSTRACT

Pedrosa SS. Effect of materials with bioactive compounds on remineralization of bovine enamel with erosion lesions: "in vitro" study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Dental erosion leads to loss of the tooth structure by dissolving its mineral portion by acids for non-bacterial origin. The objective of this study is evaluate the ability of materials with bioactive compounds to remineralize bovine enamel subjected to erosive challenge and verify the possible correlation between the datas from the quantitative light-induced fluorescence method (QLF™) and the Knoop surface microhardness test. 120 bovine enamel pieces were distributed among experimental groups with n=5 for microhardness testing (3 x 3 x 2 mm) and n=10 for the QLF™ method (5 x 5 x 3 mm) and were analysed at three different times (initial, after 2 days of erosion protocol and after 6 remineralizing days of treatment). The samples were subjected to two-days erosion protocol, through its immersion into 0,3% citric acid solution pH 3,2 for 2 minutes and maintaining them into artificial saliva for 24 hours (pH 7,0). Following remineralizing treatments were performed for 6 consecutive days: the samples were covered with 1 drop of saliva and after 1 hour were immersed for 2 minutes in the slurry prepared with the following materials: G1-Pro-Argin™+NaMFP, arginine bicarbonate + calcium carbonate + sodium monofluorophosphate (Colgate® Sensitive Pro-Alívio™); G2-Recaldent™+NaF, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate + sodium fluoride (MI Paste™ Plus); G3-ACP+NaF, amorphous calcium phosphate + sodium fluoride + potassium nitrate (Relief ACP); G4-CaGP+KF, calcium glycerophosphate + potassium fluoride (Fluor Protector Gel); G5-NovaMin®+NaF, calcium sodium phosphosilicate + sodium fluoride (Nupro® Sensodyne®); G6-NovaMin®+NaMFP, calcium sodium phosphosilicate + sodium monofluorophosphate (Sensodyne® Repair&Protect); G7-NaF, sodium fluoride + potassium nitrate (Sensodyne® Cool Gel) and G8-Artificial saliva (negative control). After 2 hours of soaking in saliva the erosion protocol was repeated. Statistical analyzes were conducted for microhardness and QLF™ with coincidence of the results ($\alpha=0,05$). A two-factors ANOVA for repeated measures showed statistically significant differences only for the time of analysis and the interaction treatments x

time of analysis. The Tukey test showed statistically significant differences when comparing the three times of analysis and the interaction between times of analysis x treatments: baseline values with values after erosion and after treatment and the values after erosion x after treatment (NovaMin[®]+NaF, NovaMin[®]+NaMFP, NaF and saliva). The Tukey test when comparing the treatments x final times of analysis showed statistically significant differences in microhardness test for Recaldent[™]+NaF x NovaMin[®]+NaF, NovaMin[®]+NaMFP and NaF; in QLF[™] method the differences occurs between Pro-Argin[™]+NaMFP x NaF and saliva; Recaldent[™]+NaF x NovaMin[®]+NaMFP, NaF and saliva; ACP+NaF x NaF. None of the treatments was able to completely remineralize bovine enamel, but Pro-Argin[™]+NaMFP, Recaldent[™]+NaF, ACP+NaF and CaGP+KF materials were able to stabilize the eroding enamel, thus demonstrating a score higher than others and the QLF[™] method showed a significant and positive correlation with the microhardness test results.

Keywords: Tooth Remineralization. Tooth erosion. Dental Enamel. Tooth Demineralization. Hardness. Dentifrices.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 4.1 - Grupos experimentais, marca comercial e composição química dos materiais.....	56
Gráfico 5.1 - Valores médios da microdureza do esmalte em KHN obtidos para os tratamentos nos três momentos da análise das amostras	58
Gráfico 5.2 - Valores médios do ΔQ do esmalte em $\%.\text{mm}^2$ obtidos para os tratamentos nos três momentos da análise das amostras	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Espécime de esmalte incluído para o teste de microdureza Knoop	44
Figura 4.2 - Microdurômetro HMV2	46
Figura 4.3 - Endentação Knoop em esmalte	46
Figura 4.4 - Desenho esquemático das medidas iniciais de microdureza Knoop....	46
Figura 4.5 - Espécime de esmalte incluído para a análise por QLF™	48
Figura 4.6 - Equipamento QLF™ System.....	49
Figura 4.7 - Peça de mão na mesa posicionadora	50
Figura 4.8 - Amostra na mesa posicionadora	50
Figura 4.9 - Imagem inicial da amostra no programa Inspektor™ PRO	51
Figura 4.10 - Desenho esquemático das medidas de microdureza Knoop após erosão e sua relação com as medidas iniciais	52
Figura 4.11 - Imagem da amostra no programa Inspektor™ PRO após erosão	52
Figura 4.12 - Desenho esquemático das medidas de microdureza Knoop, inicial, após a erosão e finais	54
Figura 4.13- Imagem da amostra no programa Inspektor PRO™ após tratamento .	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valores médios e desvio-padrão ($\pm$) da microdureza do esmalte em KHN obtidos na interação Tratamentos x Momentos da análise das amostras	59
Tabela 5.2- Valores médios e desvio-padrão ($\pm$) do ΔQ do esmalte em $\%.\text{mm}^2$ obtidos na interação Tratamentos x Momentos da análise das amostras	61
Tabela 5.3- Teste de Correlação Linear de Pearson para o QLF™ em relação a microdureza	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCA	apatita hidroxicarbonatada
A	área da lesão em mm ²
WS	área da lesão em mm ²
Pro-Argin™	bicarbonato de arginina 8%
Recaldent™	fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo
ΔF	Delta efe (média da fluorescência do tecido em %)
ΔQ	Delta que (média do conteúdo mineral do tecido em %.mm ²)
FPA	fluorofosfato acidulado
F	fluoreto
KF	fluoreto de potássio
NaF	fluoreto de sódio
ACP	fosfato de cálcio amorfo
ACFP	fosfato fluoretado de cálcio amorfo
CPP	fosfopeptídeo de caseína
CPP-ACP	fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo
NovaMim®	fosfosilicato de cálcio e sódio
CSP	fosfosilicato de cálcio e sódio
CaGP	glicerofosfato de cálcio
H ⁺	íon de hidrogênio
SMH	microdureza de superfície
μm	micrômetro
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
NaMFP	monofluorofosfato de sódio
KNO ₃	nitrato de potássio
KHN	número da microdureza Knoop
n	número de amostras
ppm	parte por milhão

%mm ²	percentual vezes milímetro quadrado
x	por (versus)
pH	potencial hidrogeniônico
QLF™	quantificação da fluorescência induzida por luz
RPM	rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
&	e
°C	grau Celsius
=	igualdade
%	porcentagem ou percentual
+	mais
$\pm$	mais ou menos
>	maior
®	marca registrada no Brasil
™	marca registrada nos Estados unidos
<	menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Lesões não cariosas erosivas (erosão dental)	21
2.1.1 Estrutura dental	21
2.1.2 Etiologia, mecanismo de ação, localização, diagnóstico e prevalência das lesões não cariosas erosivas	22
2.1.3 Saliva: composição e seu papel na remineralização das lesões não cariosas erosivas	25
2.2 Materiais contendo compostos bioativos que atuam na remineralização das lesões não cariosas erosivas	27
2.2.1 Fluoretos	27
2.2.2 Fosfato de cálcio amorfo (ACP), Fosfopeptídeo de caseína-Fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e Fosfosilicato de cálcio e sódio (CSP)	29
2.2.3 Glicerofosfato de cálcio	32
2.2.4 Arginina-Carbonato de cálcio	33
2.3 Métodos de avaliação das lesões não cariosas erosivas	34
2.3.1 Métodos qualitativos e semiquantitativos	35
2.3.2 Métodos quantitativos	36
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Seleção da amostra	43
4.2 Preparo dos espécimes de esmalte para o teste de microdureza Knoop	43
4.3 Medidas iniciais de microdureza de superfície Knoop	45
4.4 Preparo dos espécimes de esmalte para análise por quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)	47
4.5 Quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)	48
4.6 Protocolo de erosão e medidas de microdureza Knoop e QLF™ após erosão	51
4.7 Tratamento remineralizador	53
4.8 Medidas finais de microdureza Knoop	54

4.9 Medidas finais pelo método do QLF™	55
5 RESULTADOS	57
5.1 Teste de microdureza Knoop	57
5.2 Quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)	59
5.3 Correlação entre os resultados do método do QLF™ e o teste de microdureza Knoop	62
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O modo de vida atual, com a ingestão freqüente e prolongada de comidas e bebidas ácidas (frutas, sucos e refrigerantes, principalmente em lactovegetarianos), o uso prolongado de medicamentos ácidos (ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, chás antitérmicos e xaropes), a exposição no trabalho a ambientes ácidos (fábricas de baterias e fertilizantes, provadores de vinho e nadadores profissionais), a ocorrência de vômitos crônicos (anorexia, bulimia e alcoolismo) e regurgitações passivas (refluxo gastroesofágico e alcoolismo), a diminuição do fluxo salivar (usuários de drogas) e o excesso de procedimentos de higiene oral predis põem os dentes ao desenvolvimento da erosão dentária. Esta é caracterizada pela dissolução superficial da estrutura cristalina da hidroxiapatita por ácidos de origem não bacteriana ou agentes quelantes (Amaechi; Higham, 2005).

Os íons de hidrogênio, provenientes da dissociação dos ácidos, baixam o pH do meio bucal, esgotam os íons remineralizantes da saliva, difundem-se através da placa bacteriana e da película adquirida e atacam a apatita dental, formando complexos com o fosfato e o carbonato, removendo-os da estrutura dental. Os agentes quelantes, atuam seqüestrando os íons de cálcio, formando estruturas cíclicas estáveis, atuando primeiramente nos íons mais acessíveis presentes na saliva e em seguida, na estrutura dental (Lussi, 2006).

No estágio inicial da erosão, a desmineralização causa redução da densidade mineral, mas não ocorre perda de tecido, a lesão é reversível e os íons minerais perdidos podem ser repostos pelos naturalmente existentes na saliva. Entretanto, quando o processo de desmineralização avança, ocorrem perdas irreversíveis de minerais com conseqüente colapso do esmalte (Lussi et al., 2011). O grau de dissolução do esmalte é determinado pela relação de sua estrutura mineral com o tempo e frequência à exposição ácida, coadjuvado pela temperatura dos alimentos (Amaechi et al., 1999), além do tipo de ácido, do seu pH e da sua viscosidade (Aykut-Yetkiner et al., 2013).

Instaurado este processo, se faz necessário uma reparação mineral da superfície dentária, inicialmente analisada pela ação de diferentes formulações de

fluoretos na erosão dental, em função de seu mecanismo de ação, caracterizado pela ligação de íons fluoreto a estrutura dental, formando a fluorapatita, tornando-a menos solúvel, reduzindo o pH crítico (4,5) para a dissolução mineral e favorecendo a remineralização (Rao; Malhotra, 2011).

Outros materiais bioativos como o fosfato de cálcio amorfo, a caseína fosfopeptídica associada ao fosfato de cálcio amorfo (Poggio et al., 2013), biovidros de fosfosilicato de cálcio e sódio (Turssi et al., 2011), glicerofosfato de cálcio (Barbosa et al., 2012), bicarbonato de arginina e carbonato de cálcio (Faller; Eversole, 2013) têm sido usados como agentes desensibilizantes e remineralizantes.

Paralelamente a ação destas substâncias, métodos distintos têm sido utilizados na avaliação das modificações ocorridas nos tecidos dentais devido ao processo de des-remineralização, incluindo testes que avaliam quantitativamente ou qualitativamente essas alterações. Nas pesquisas sobre erosão inicial, os métodos quantitativos mais usados são as análises químicas de perda mineral e dureza de superfície do esmalte e para a erosão avançada, são usados os métodos de perfilometria de superfície e microradiografia transversal; as mudanças morfológicas no tecido dental com erosão são avaliadas qualitativamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (Schlueter et al., 2011).

Um método alternativo para a detecção de variações do conteúdo mineral do esmalte chamado Quantificação da Fluorescência Induzida por Luz (QLF™), permite diagnosticar discretas alterações do conteúdo mineral dental e apresenta como vantagens a sensibilidade de análise, a especificidade local, além de ser um método não destrutivo e não invasivo (Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

Compostos bioativos e métodos de avaliação da erosão vêm sendo testados com o objetivo de buscar novos conhecimentos que possam ser aplicados na prevenção e tratamento das lesões de erosão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesões não cariosas erosivas (erosão dental)

A erosão dental é definida como a perda da estrutura dental decorrente de um processo químico de dissolução da estrutura cristalina da hidroxiapatita por ácidos de origem não bacteriana e por substâncias com propriedades quelantes (Grippio et al., 2004).

2.1.1 Estrutura dental

O esmalte e a dentina são compostos por uma fase mineral à base de cristais de apatita e outra fase orgânica constituída principalmente de água, proteínas e lipídeos. O principal tipo de apatita encontrada nos tecidos dentais é a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), que consiste de minerais de fosfato de cálcio, contendo também íons de sódio, potássio, magnésio, cloro e carbonatos, tornando essas apatitas mais solúveis. A apatita carbonatada ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) se forma quando a hidroxila ou o grupo fosfato são substituídos pelo carbonato, sendo encontrada no esmalte de dentes decíduos, permanentes recém-erupcionados e na dentina. A incorporação do flúor na hidroxiapatita, ao contrário dos outros minerais, melhora muito as propriedades físico-químicas da estrutura dental, de tal forma que a fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) é a menos solúvel das apatitas. O esmalte é constituído de milhares de prismas, que são formados por cristais de hidroxiapatita que se encontram em diferentes direções dentro do prisma, com pequenos espaços entre os prismas e os cristais, o que permite uma troca de substâncias com o meio bucal (Garone Filho; Silva, 2008).

O tipo de apatita (hidroxiapatita, apatita carbonatada e fluorapatita), o tipo de dente (humano ou bovino) e a idade do dente e/ou grau de mineralização (decíduo, permanente) influenciam na progressão da erosão dental (Turssi et al., 2010; White et al., 2010).

2.1.2 Etiologia, mecanismo de ação, localização, diagnóstico e prevalência das lesões não cariosas erosivas

O modo de vida atual com a ingestão freqüente e prolongada de comidas e bebidas ácidas (frutas, sucos e refrigerantes, principalmente em lactovegetarianos), o uso prolongado de medicamentos ácidos (ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, chás antitérmicos e xaropes), a exposição no trabalho a ambientes ácidos (fábricas de baterias e fertilizantes, provadores de vinho e nadadores profissionais), a ocorrência de vômitos crônicos (anorexia, bulimia e alcoolismo) e regurgitações passivas (refluxo gastroesofágico e alcoolismo), a diminuição do fluxo salivar (usuários de drogas) e o excesso de procedimentos de higiene oral predispõem os dentes ao desenvolvimento da erosão (Amaechi; Higham, 2005).

A erosão química dos dentes ocorre pela dissolução dos cristais minerais pelos íons de hidrogênio (H^+) e os agentes quelantes. Os íons de hidrogênio provenientes da dissociação dos ácidos, principalmente do ácido cítrico e do clorídrico, baixam o potencial hidrogeniônico (pH) do meio bucal, esgotam os minerais da saliva, difundem-se através da placa bacteriana e da película adquirida e atacam o cristal mineral, formando complexos com o fosfato e o carbonato, removendo-os da estrutura dental. Dessa forma, os outros íons da molécula de apatita, como o cálcio e o flúor, são liberados e ficam disponíveis na saliva. Os agentes quelantes atuam seqüestrando íons metálicos bivalentes das apatitas dentais como o cálcio (Ca^{2+}), o magnésio (Mg^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}), formando estruturas cíclicas muito estáveis, atuando primeiramente nos íons mais acessíveis presentes na saliva e em seguida, na estrutura dental, quelando preferencialmente o cálcio (Lussi, 2006).

O potencial hidrogeniônico (pH) crítico que causa desmineralização do esmalte e da dentina “in vivo” é de 5,5 para a hidroxiapatita e 6,5 para a apatita carbonatada. A remineralização pode ocorrer após desafios erosivos, desde que a saliva neutralize o ácido, retorne ao pH neutro, possibilitando a supersaturação dos íons de cálcio e fosfato na saliva para que possa ocorrer a precipitação desses íons na estrutura dentária, remineralizando-a. Este processo é reforçado na presença de íons de fluoreto (F), formando a fluorapatita que é menos solúvel ao ácido que a hidroxiapatita, com pH crítico de 4,5 (Venasakulchai et al., 2010).

No estágio inicial da erosão, a desmineralização causa redução da densidade mineral, mas não ocorre perda de tecido, a lesão é reversível e os íons minerais perdidos podem ser repostos pelos naturalmente existentes na saliva. Entretanto, se o processo de desmineralização avançar ou for particularmente agressivo, ocasionado por ácidos com baixo pH, alta acidez titulável e propriedades quelantes, ocorrerá a dissolução da bainha e do núcleo dos prismas de esmalte, da área interprismática, das camadas sucessivas dos cristais do esmalte, levando a perda permanente do esmalte, ocasionando ainda o amolecimento da camada superficial do tecido remanescente. Além do pH, outro fator que pode influenciar na capacidade erosiva de uma solução é a concentração de íons cálcio, fosfato e flúor na mesma; assim, a presença desses íons determina a velocidade com a qual a dissolução do mineral do dente ocorre (Lussi et al., 2011). O grau de dissolução do esmalte é determinado pela relação da sua estrutura mineral (tipo de dente e/ou de apatita) com o aumento do tempo e frequência de exposição aos ácidos, coadjuvado pela temperatura dos alimentos, uma vez que alimentos quentes baixam o pH (Amaechi et al., 1999); além do tipo de ácido (forte ou fraco), do seu pH (mais ou menos ácido) e da sua viscosidade, uma vez que o aumento da viscosidade protege a estrutura dental da ação do ácido (Aykut-Yetkiner et al., 2013).

O ácido clorídrico estomacal é um ácido forte, com pH entre 0,9-1,5 e é o único de origem intrínseca, que chega a cavidade oral através de vômitos e regurgitações. Dentre os ácidos de origem extrínseca, destaca-se o ácido cítrico, que existe na forma de íons hidrogênio e íons citrato. Os íons H^+ atacam as apatitas removendo o fosfato e o carbonato e os íons citrato exercem um efeito quelante, formando um complexo com o cálcio, removendo-o das apatitas e permanecem ativos em pH próximo ao neutro. O ácido cítrico age desta forma em função dos

seus três grupos carboxílicos que quelam o cálcio que se encontrava disponível para a remineralização. O ácido cítrico está presente em muitos alimentos e bebidas consumidos diariamente, como, por exemplo, sucos a base de frutas (laranja, toranja, limão e groselha: pH 3-4), em doces ácidos (pH 2,3-3,1), sprays (pH 1,9-2,3) e refrigerantes alcoólicos (pH 2,95-3,73); nos refrigerantes (coca cola ou sprite: pH 2,3-3,2) os ácidos encontrados são o carbônico, fosfórico, ascórbico e láctico; nos vinhos, os ácidos tartárico, maleico, láctico e cítrico e na água mineral, o ácido carbônico. Além do pH e do tipo de ácido, o volume (concentração), a acidez titulável, a taxa de fluidez das soluções, o tempo e a frequência de exposição aos ácidos, influenciam nos modelos de avaliação da erosão inicial “in vitro” e “in situ” (Young; Tenuta, 2011).

As lesões de erosão ativas têm aspecto microscópico poroso e macroscopicamente observa-se uma superfície acetinada e sem brilho; as lesões inativas apresentam uma superfície com padrões irregulares por sedimentação desorganizada de íons ou uma superfície brilhante pelo polimento executado pela escovação; a presença de manchas sobre a lesão indica inatividade ou progressão lenta. A localização das lesões de erosão está relacionada com a origem do ácido: lesões oclusais côncavas totais são ocasionadas por suco gástrico em função de vômito ou regurgitação; linguais anteriores e vestibulares totais, associadas ao suco gástrico por vômito; linguais posteriores, causadas pelo suco gástrico por regurgitação; oclusais em forma de pequenas concavidades, pela mastigação de frutas e medicamentos ácidos; vestibulares parciais anteriores e cervicais, relacionadas a ácidos fortes de origem extrínseca (Garone Filho; Silva, 2008).

A região cervical é a mais afetada por ácido de origem alimentar, porque a autolimpeza é menor nesta área, o ácido permanece mais tempo em contato com o dente, a saliva não atua rapidamente neste local e o seu efeito tampão demora mais para ocorrer, dificultando o mecanismo de remineralização. Além disso, a camada de esmalte é mais fina nesta área, o esmalte não é tão duro, a direção dos prismas é vertical em relação à junção cimento-esmalte, a ligação entre o esmalte e a dentina é mais fraca porque a junção é lisa sem bordas e o esmalte está irregularmente estruturado. A aparência das lesões varia de depressões rasas, discos amplos a lesões em forma de cunha e o assoalho das lesões pode ser plano, recortado ou angulado (Borcic et al., 2004).

No estágio avançado da erosão o esmalte é solubilizado expondo a dentina, desencadeando a hipersensibilidade dentinária, ocorre a perda da anatomia dos dentes e da dimensão vertical quando as faces oclusais são comprometidas e frequentemente é neste momento que o paciente procura o tratamento odontológico, necessitando de procedimentos restauradores mais complexos. A identificação da erosão em estágio moderado possibilita tratamentos restauradores mais conservadores, mas o ideal é que a erosão seja diagnosticada precocemente, quando ainda não há comprometimento da função e da estética, pois assim, será necessário apenas tratamento preventivo, assegurando-se a longevidade da dentição (Schlueter et al., 2012).

Nos últimos anos, a maioria dos estudos de prevalência de erosão dentária foi realizado em crianças e adolescentes de escolas de diversos países (Caglar et al., 2011; Huew et al., 2012), inclusive no Brasil (Gurgel et al., 2011; Moimaz et al., 2013; Nahas Pires Correa et al., 2011). Em estudo realizado no oeste europeu foi detectado que a prevalência do desgaste dentário por erosão vem aumentando principalmente nos jovens, em função das mudanças nos hábitos nutricionais e estilo de vida, como a preferência pelo consumo de produtos ácidos industrializados (Gambon et al., 2012).

2.1.3 Saliva: composição e seu papel na remineralização das lesões não cariosas erosivas

A saliva é constituída por água, sais minerais (bicarbonato, fosfato, cálcio e flúor), proteínas (mucina, proteínas ricas em prolina, estaterina, amilase, histatina, lisosima, lactoferrina, peroxidase e secretora de Iga), lipídeos e enzimas (metaloproteinases da matriz). A saliva protege o dente contra a erosão devido a sua capacidade de limpeza, diluindo e removendo os agentes desmineralizantes por meio da ação do fluxo salivar; da neutralização dos ácidos, devido à capacidade tampão do bicarbonato, do fosfato e de algumas proteínas, ligando-se aos íons hidrogênio liberados pelos ácidos, formando compostos intermediários até chegar à neutralização total; fornece cálcio, fosfato e flúor que, em pH neutro, passam a existir

em excesso e precipitam-se sobre os cristais parcialmente dissolvidos, remineralizando-os. A saliva também forma a película adquirida salivar, que é um filme orgânico livre de bactérias, pela contínua e seletiva adsorção de proteínas, glicoproteínas e enzimas na superfície do esmalte. A estaterina e as proteínas ricas em prolina mantêm na saliva a biodisponibilidade dos íons de cálcio e fosfato que, em condições normais, são suficientes para manter a integridade dos cristais de apatita dentro dos tecidos duros. Quando este mecanismo homeostático salivar é excedido podem se desenvolver lesões de cárie ou de erosão (Buzalaf et al., 2012).

Além disso, trocas constantes de proteínas ocorrem durante a formação da película e proteínas salivares de alto peso molecular, como a mucina, são capazes de se ligar à proteínas menores como a estaterina, as proteínas ricas em prolina, amilase, lisosima e lipídeos, funcionando como um reservatório de proteínas dentro da película salivar. As numerosas proteínas que compõem esta película desempenham diferentes funções dentro desta fina camada, incluindo o potencial de transporte de íons, a regulação da cristalização do fosfato de cálcio e a aderência bacteriana. A película de saliva possui capacidade de tamponamento e funciona como uma barreira, evitando o contato direto entre ácidos e superfície dental, mas o seu efeito protetor depende da intensidade do desafio ácido (Cheaib; Lussi, 2011).

A influência da película adquirida no processo de remineralização do esmalte foi testada “in vitro”, através da preparação de espécimes de esmalte bovino e da exposição contínua (por 10 minutos) e intermitente (por 1 minuto, num total de 10) desses espécimes ao suco de laranja com pH 3,8 e água deionizada ou saliva humana. As lesões de erosão foram mais profundas na exposição intermitente e alternada com água deionizada, provavelmente porque 1 minuto não foi tempo suficiente para a fixação da película na superfície dentária para que esta pudesse exercer seu efeito tampão, ajudando na remineralização do dente (Creanor et al., 2011).

A saliva pode influenciar no processo de erosão através da redução da desmineralização e aumento da remineralização. No sentido de se estabelecer um parâmetro na utilização da saliva nas pesquisas de erosão e abrasão “in vitro”, foi testado o potencial remineralizador de uma saliva artificial (AS), saliva artificial + mucina (AS+M), saliva humana (HS, referência clínica) e água deionizada (controle

negativo) no esmalte dental, com a imersão dos espécimes em 15 mililitro (ml) de ácido cítrico 1% pH 3,75 por 5 minutos, imersão em saliva por 30 minutos e escovação (500 ciclos com carga de 200 gramas) com dentífrício fluoretado (1.100 ppm de fluoreto de sódio-NaF). O desgaste do esmalte aumentou na seguinte ordem: AS, AS+M, HS e controle; a AS+M não diferiu da HS, concluindo-se que as salivas artificiais, principalmente a AS+M podem ser usadas nos experimentos “in vitro” no esmalte em substituição à saliva humana (Hara et al., 2008).

2.2 Materiais contendo compostos bioativos que atuam na remineralização das lesões não cariosas erosivas

2.2.1 Fluoretos

A literatura tem demonstrado os benefícios associados aos tratamentos a base de fluoretos na prevenção e manejo de cáries, com a adição dos fluoretos a vários produtos comerciais para uso individual (dentífrícios e colutórios) e profissional (vernizes, espumas, géis, cremes e materiais restauradores que liberam flúor). Os fluoretos aceleram a remineralização e alteram a estrutura do dente, tornando a superfície menos solúvel a ação dos ácidos, interferem na ligação iônica durante a formação da película e da placa, inibem o crescimento e o metabolismo microbiano, atuando no processo de desmineralização e remineralização do dente inibindo a progressão da lesão de cárie ou de erosão. Assim, nos últimos anos várias pesquisas foram desenvolvidas para testar o efeito preventivo de diferentes formulações de fluoretos contra a erosão dental como fluoretos associados a sódio, estanho e titânio, sendo que este último apresenta um aumento na captação do cálcio e o esmalte pré-tratado com o fluoreto de titânio perde menos cálcio durante o processo de desmineralização. Produtos contendo monofluorofosfato de sódio (NaMFP) são conhecidos por conter o mais alto nível de fluoreto em relação aos demais (Rao; Malhotra, 2011).

Dentre os compostos fluoretados estudados para a prevenção da erosão, os fluoretos metálicos, como o tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e o fluoreto de estanho (SnF_2) têm mostrado os melhores resultados; géis de fluorfosfato acidulado (APF) e os vernizes com alta concentração de fluoreto de sódio (NaF) também possuem ação inibidora significativa contra a erosão. Os dentifrícios fluoretados podem proteger o esmalte contra a desmineralização por erosão, principalmente quando entram em contato com o esmalte dentário antes do desafio erosivo (Corrêa et al., 2011).

A remineralização do esmalte depende da biodisponibilidade dos íons de fluoreto na saliva e na superfície do dente, sendo que a eficácia na sua captação e retenção depende da fonte de administração e da sua concentração. Assim, a efetividade do fluoreto na remineralização do esmalte aumenta com o aumento da sua concentração (Naumova et al., 2012).

A capacidade de remineralização do esmalte por dentifrícios com concentração semelhante de NaF (sem fluoreto, 1.450 ppm de NaF e 1.450 ppm de NaF + 5% de nitrato de potássio- KNO_3) foi demonstrada através do teste de microdureza de superfície, uma vez que o percentual médio da microdureza foi significativamente maior para os dois dentifrícios com flúor em relação ao grupo controle, com diferença significativa também entre o NaF+ KNO_3 em relação ao NaF (Hara et al., 2009).

O tratamento do esmalte bovino com a associação de um dentifrício contendo 1.450 ppm de NaF e um colutório com 450 ppm de NaF proporcionou aumento significativo na microdureza do esmalte previamente submetido ao desafio erosivo suave e aumentou significativamente a resistência do esmalte a um segundo desafio ácido (Maggio et al., 2010).

Espécimes de esmalte bovino submetidos ao protocolo de erosão foram tratados com dentifrícios e a análise com perfilômetro mostrou que a média da profundidade da erosão foi significativamente menor para os dentifrícios contendo 1.450 ppm de NaMFP + 5% de citrato de potássio, 10% de cloreto de estrôncio e 1.100 ppm de NaF em relação ao dentifrício com 1.425 ppm de NaF + KNO_3 e água deionizada; tanto o fluoreto quanto o agente desensibilizante isolados reduziram a erosão (Kato et al., 2010).

Através de microscopia de força atômica foi observado que espécimes de esmalte bovino tratados e não tratados com fluoreto (2 minutos), apresentaram após 250 e 90 minutos de exposição ao ácido cítrico respectivamente, defeitos e pequenas cavidades na superfície do esmalte, demonstrando que o fluoreto protegeu o esmalte da ação do ácido (Parkinson et al., 2010).

Em estudo “in vitro” o esmalte humano foi desmineralizado por 96 horas com solução contendo ácido acético (pH 4,4), tratado por 3 minutos com fluoreto de prata (AgF), nitrato de prata (AgNO_3), fluoreto de potássio (KF) e água deionizada (controle) e remineralizado com solução remineralizante por 5 dias. O coeficiente de atenuação linear obtido com microtomografia computadorizada após a remineralização foi de 1,08/cm, 0,95/cm, 0,86/cm e 0,60/cm para o AgF, AgNO_3 , KF e controle respectivamente, com diferença estatística significativa dos três grupos em relação ao controle e do AgF em relação ao KF, concluindo-se que a aplicação tópica de íons de prata e fluoreto aumentaram a densidade mineral do esmalte desmineralizado (Zhi et al., 2013).

2.2.2 Fosfato de cálcio amorfo (ACP), Fosfopeptídeo de caseína-Fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e Fosfosilicato de cálcio e sódio (CSP)

Em busca de novos métodos para aumentar a supersaturação de cálcio e fosfato na saliva e/ou no biofilme, agentes contendo estes elementos vêm sendo estudados para prevenção de cárie e erosão como o fosfopeptídeo de caseína (CPP), que estabiliza o cálcio e o fosfato, mantendo-os numa forma amorfa ou solúvel, conhecida como ACP, fornecendo um reservatório de íons durante um ataque cariogênico ou um desafio ácido. Quando o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP ou Recaldent™) é aplicado no ambiente oral ele se liga ao biofilme, placa bacteriana, bactérias, hidroxiapatita e tecidos moles, liberando íons de fosfato e cálcio, possibilitando a remineralização do esmalte (Cochrane; Reynolds, 2012). Cada molécula de CPP liga-se a 25 íons de cálcio, 15 de fosfato e 5 de fluoreto, formando o fosfopeptídeo de caseína com fosfato fluoretado de cálcio amorfo (CPP-ACFP), além de exercer um efeito tampão e

antibacteriano na placa, interferindo no crescimento e na aderência do *Streptococcus Mutans* e *Sorbinus* (Rao; Malhotra, 2011).

O fosfosilicato de cálcio e sódio (NovaMin[®] ou CSP) é um vidro cerâmico bioativo composto por minerais que existem naturalmente no organismo e reagem quando entram em contato com água, saliva ou outro fluido corporal. Esta reação libera íons de sódio, que são responsáveis pela elevação do pH para que os íons de cálcio e fosfato liberados, possam se precipitar sobre a estrutura dental, resultando na formação de um novo cristal de apatita hidroxycarbonatada (HCA), que é estruturalmente e quimicamente similar ao mineral do dente natural. O NovaMin[®] também tem sido usado na hipersensibilidade dentinária e na erosão dentária em função de seu mecanismo de ação através da precipitação de íons de cálcio e fosfato na superfície do dente, ocluindo os túbulos dentinários, auxiliando no processo de remineralização do esmalte submetido à desafio erosivo, além de auxiliar a saliva na neutralização dos ácidos (Burwell et al., 2009; Wefel, 2009).

Os compostos bioativos podem ser incorporados a diferentes produtos para aplicação, como os materiais restauradores (ionômeros de vidro e compômeros), selantes de fôssulas e fissuras, dentifrícios, gomas de mascar, pastas ou cremes, colutórios e fio dental, além de produtos para ingestão como leite (Gurunathan et al., 2012), sucos ácidos e bebidas esportivas (Lussi, 2009).

Foi observado, através do teste de microdureza, em espécimes de esmalte bovino, “in vitro”, após protocolo de des-remineralização e tratamento remineralizante os seguintes percentuais de perda mineral: 7,1% para dentifrício com NovaMin[®] (Tooth Revitalizing Paste, Oravive), 6,7% para dentifrício regular contendo KNO₃ e 1.100 ppm de NaF (Sensodyne Cool Gel, GSK) e 3,8% para Recaldent[™] + 900 ppm de NaF (Recaldent[™] + F, MI Paste[™] Plus, GC America). Todos estes materiais apresentaram diferença estatística significativa em relação aos 11% do grupo controle (apenas protocolo des-re). O Recaldent[™], com perda mineral de 3,2% (MI Paste[™], GC America), diferiu do grupo controle, do NovaMin[®] e do dentifrício regular (Rehder Neto et al., 2009).

O conteúdo mineral de espécimes de esmalte bovino foram avaliados “in vitro” pelo método do QLF[™] em cinco momentos distintos (inicial, após desafio erosivo e após o 1º, 7º e 14º dia de tratamento). Foram realizados três tempos de desafios

erosivos (1, 4 e 8 horas) e cinco tratamentos utilizando substâncias contendo flúor: Close up (Unilever, Brasil), Recaldent™ (MI Paste™, GC Japan), Recaldent™ + F (MI Paste™ Plus, GC Japan), Novamin® (Nanosensitive® hca, Hager e Werken, Germany), Novamin® + F (Odontis-Rx, Brasil) e um grupo controle (saliva). Nenhum dos tratamentos foi capaz de remineralizar totalmente as lesões de erosão, independentemente da severidade do desafio erosivo, sendo que a associação dos compostos bioativos Recaldent™ e flúor apresentou maior potencial remineralizador (Shimaoka, 2010).

O potencial remineralizador do Recaldent™, Recaldent™ + F e saliva (controle) foi testado em pesquisa “in situ” por 3 minutos diários de tratamento com o produto e 10 horas de remineralização em saliva (por dois dias consecutivos) após 8 minutos de desmineralização em Coca Cola (pH 2,3). Os valores obtidos através do teste de microdureza Vickers, atestaram um potencial remineralizador de 64,25%, 46,24% e 2,98% para o Recaldent™ + F (Tooth Mousse Plus, GC Japan), Recaldent™ (Tooth Mousse, GC Japan) e saliva (grupo controle) respectivamente. Foi constatada diferença estatística significativa entre os dois grupos com Recaldent™ e deste em relação ao grupo controle (Srinivasan et al., 2010).

Amostras de esmalte bovino com lesões de erosão produzidas por ácido cítrico a 0,3%, pH 3,2 foram submetidos ao tratamento remineralizador com Recaldent™ (MI Paste™, GC America), Recaldent™ + F (MI Paste™ Plus, GC America), NovaMin® (Tooth Revitalizing Paste, Oravive) e dentifrício com KNO₃ + NaF (Sensodyne Cool Gel, GSK); o grupo controle não foi exposto a nenhum produto remineralizador. Os tratamentos com Recaldent™ + F e com NovaMin® não apresentaram diferença em relação ao dentifrício fluoretado, mas mostraram valores de microdureza Knoop com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. O Recaldent™ não diferiu de nenhum outro grupo (Turssi et al., 2011).

Em recente estudo “in vitro”, espécimes de esmalte humano foram incubados por 2 horas em saliva humana para a formação de película adquirida, submetidos a desmineralização através de suco de laranja (pH 3,6) por 3 minutos, remineralização com suspensão contendo diferentes agentes: NovaMin® (DenShield, USA), NovaMin® (Nanosensitive hca, Hager&Werken, Germany), Recaldent™ (Tooth Mousse, GC Japan) e Recaldent™ + F (MI Paste™ Plus, GC Japan) por 3 minutos.

Foram realizados 2 ciclos por dia, com intervalo de 4 horas de incubação em saliva durante o dia e 15 horas por noite, totalizando 4 dias de tratamento. Foram formados dois grupos com inversão da ordem do tratamento des-re. Os resultados da nanodureza, obtidos no início e ao final de cada dia de tratamento, não foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (sem tratamento) e não foi verificada diferença entre os dois materiais, demonstrando que os tratamentos não foram capazes de prevenir a erosão dental (Wang et al., 2011).

Após a aplicação de Recaldent™ (Tooth Mousse, GC, Japan), Recaldent™ + F (Tooth Mousse Plus, GC Japan), NaF (90, 900 e 9.000 ppm, Wako, Osaka, Japan) e água deionizada na superfície do esmalte hígido bovino por 30 minutos diários durante 7 dias, os espécimes foram desmineralizados com solução contendo ácido acético (pH 4,5) por 24, 72 e 120 horas. A análise por microtomografia computadorizada constatou que a perda mineral foi significativamente menor para os grupos contendo o Recaldent™ + F e grupos do NaF, em relação ao controle. Todos os produtos apresentaram potencial para diminuição da desmineralização, sendo queo melhor resultado foi observado para o grupo com 9.000 ppm de NaF (Hamba et al., 2011).

O efeito preventivo do Recaldent™ (Tooth Mousse, GC Japan) na erosão dental do esmalte humano também foi avaliada por meio de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. Os espécimes foram divididos em quatro grupos: 1- esmalte integro; 2- esmalte + refrigerante; 3- esmalte + Recaldent™ e 4- esmalte + refrigerante + Recaldent™. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de rugosidade do grupo do esmalte + refrigerante + Recaldent™ e esmalte + refrigerante, sugerindo que o tratamento dos espécimes com o Recaldent™ exerceu um efeito protetor na desmineralização do esmalte causada por refrigerantes (Poggio et al., 2013).

2.2.3 Glicerofosfato de cálcio

O glicerofosfato de cálcio (CaGP) é outro composto com potencial para remineralização do esmalte submetido a desafios erosivos. Espécimes de esmalte

bovino foram submetidos a protocolo de erosão (des-re) com solução contendo ácido acético (pH 4,4) e saliva artificial (pH 7,0); tratamento remineralizador com soluções contendo 0,17% de NaMFP (200 ppm) + 0,05% CaGP, 0,05% de NaF (200 ppm) e controle (sem fluoreto ou cálcio). Após análise com microscopia eletrônica de varredura, os resultados mostraram: 54,08%, 38,43% e 30,18% de percentual de remineralização com o NaMFP + CaGP, NaF e controle respectivamente, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O CaGP, associado ao fluoreto, demonstrou maior potencial para remineralizar o esmalte do que o fluoreto isolado (Puig-Silla et al., 2009).

O alto consumo de refrigerantes nos dias atuais, com pH entre 2 e 3, pode contribuir para o desenvolvimento de lesões de erosão. Assim, o CaGP foi adicionado a refrigerantes em concentrações diversas para verificação da sua capacidade de proteção do esmalte bovino quando submetido aos desafios ácidos produzidos pelos refrigerantes. Após análise com perfilômetro de contato, observou-se uma redução estatisticamente significativa na erosão do esmalte para os espécimes submetidos à desafios ácidos com refrigerantes acrescidos de CaGP, em concentração de 2 a 10%, demonstrando que esta substância tem potencial para proteger os dentes da desmineralização provocada pelos ácidos (Barbosa et al., 2012).

2.2.4 Arginina-Carbonato de cálcio

A associação do aminoácido arginina com o carbonato de cálcio (Pro-Argin™ Technology) é outra classe de agente bioativo que foi desenvolvida na forma de pasta de polimento e dentifrício (contendo bicarbonato de arginina a 8%, carbonato de cálcio e 1.450 ppm de monofluorofosfato de sódio) para tratar a hipersensibilidade dentinária (Barlow et al., 2012; Cummins, 2010, 2011; Fu et al., 2010; He et al., 2011; Kakar et al., 2012; Que et al., 2010; Schiff et al., 2011), através da formação de tampões dentro dos túbulos dentinários, que são estáveis e resistentes aos desafios erosivos, além de possibilitar a deposição de alto nível de cálcio, fósforo,

oxigênio e carbonato na superfície da dentina (Lavender et al., 2010; West et al., 2011; Xiong et al., 2011).

Um novo colutório contendo arginina (Pro-Argin™ Mouthwash Technology: arginina a 0,8%, polímero de éter polivinilmetil / ácido maleico-PVM/MA, pirofosfatos e fluoreto de sódio a 0,05%) foi desenvolvido para ser utilizado no tratamento da hipersensibilidade dentinária, isolado ou em combinação com o dentifrício contendo arginina, cujo mecanismo de ação consiste na oclusão dos túbulos dentinários através da formação de um complexo de copolímero de arginina (Markowitz, 2013; Mello et al., 2013).

A ação do Pro-Argin™ pasta de polimento, dentifrício e colutório na remineralização de lesões de erosão do esmalte ainda foi pouco pesquisada, pois apenas um estudo “in vitro” avaliou o efeito protetor do Pro-Argin™ dentifrício sobre o esmalte humano através da análise do nível de fósforo removido do dente e o percentual de proteção do esmalte pelos dentifrícios avaliados foi a seguinte: fluoreto de estanho (39,3%), fluoreto de sódio (11 a 13%), monofluorofosfato de sódio (-3,5%) e monofluorofosfato de sódio + bicarbonato de arginina (-5,0%), demonstrando que o dentifrício com arginina não foi capaz de proporcionar proteção ao esmalte (Faller; Eversole, 2013).

2.3 Métodos de avaliação das lesões não cariosas erosivas

A escolha do método para avaliação da erosão depende do estágio da lesão (inicial ou avançada), da natureza do estudo (apenas erosão ou erosão e abrasão), do tipo de tecido (esmalte ou dentina), do tipo de superfície requerida (natural ou plana), do tipo de modelo experimental (“in vitro”, “in situ” ou clínico), da necessidade de repetir as medidas posteriormente (usando métodos não destrutivos) e a necessidade quantificar ou qualificar os dados (West et al., 2011).

Métodos distintos têm sido utilizados na avaliação das modificações ocorridas nos tecidos dentais devido ao processo de des-remineralização, que avaliam quantitativamente ou qualitativamente estas alterações.

2.3.1 Métodos qualitativos e semiquantitativos

As avaliações qualitativas e semiquantitativas podem ser realizadas por meio de diferentes tipos de microscopia como:

A microscopia de transmissão de luz permite que a profundidade e a espessura da área desmineralizada do esmalte e da dentina sejam visualizadas e quantificadas (Schlueter et al., 2011). A microscopia de luz polarizada no esmalte fornece menos informações nas lesões erosivas do que nas lesões de cárie, mas na dentina o método discrimina entre o tecido parcial ou totalmente desmineralizado (Hanashiro, 2009; Naumova et al., 2012; Schlueter et al., 2011). A microscopia confocal de varredura a laser usa uma luz laser monocromática para coletar imagens de planos focais específicos. Estas imagens são analisadas por um programa, obtendo-se informações qualitativas. Deve-se ressaltar que este método também permite quantificar a perda do tecido por erosão e a profundidade da lesão (Heurich et al., 2010; Schlueter et al., 2011).

A microscopia eletrônica de transmissão é utilizada para estudar a ultra-estrutura da erosão da dentina por ácido acético e também tem sido utilizada para avaliar o impacto de ácidos na película de saliva. A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para analisar mudanças estruturais associadas com erosão em esmalte e dentina (Barbour; Rees, 2004; Naumova et al., 2012; Poggio et al., 2013; Puig-Silla et al., 2009) e pode ser associada a espectroscopia de raio-X por dispersão de energia, a qual é usada para quantificar as mudanças na composição da superfície com erosão em cortes transversais e também pode detectar a deposição de agentes ativos de tratamentos terapêuticos na superfície do dente (Barbour; Rees, 2004; Nakata et al., 2009).

A microscopia de força atômica permite resoluções em nível molecular ou atômico e a desmineralização do esmalte e dentina podem ser avaliadas em detalhes. Este método permite medir a diferença de altura em nível atômico, o que é útil para quantificar mudanças iniciais na superfície (Barbour; Rees, 2004; Heurich et al., 2010; Parkinson et al., 2010; Poggio et al., 2013; Turssi et al., 2011).

A espectroscopia de massa de íons secundários permite analisar semi-quantitativamente, parte por bilhão do elemento, a composição isotópica ou molecular da superfície do espécime. Este método tem sido utilizado para estudos de erosão e incorporação de flúor em lesões erosivas iniciais no esmalte (Barbour; Rees, 2004; Schlueter et al., 2011).

2.3.2 Métodos quantitativos

As alterações das propriedades físicas e químicas da estrutura dental podem ser avaliadas quantitativamente por meio de diversos testes, como:

A análise química de minerais perdidos ou dissolvidos pode ser usada para estudos “in vitro,” “in situ” e “in vivo”, sendo útil para medidas longitudinais, mas não fornece informações de ganho mineral ou sobre mudanças físicas e morfológicas. A quantificação do cálcio, fosfato e fósforo perdido em solução ácida é um método bem estabelecido para avaliar erosão (Faller; Eversole, 2013; Schlueter et al., 2011). A análise do cálcio com eletrodo seletivo de íon pode estar sujeita a erros em função da complexidade de certos ácidos. A espectrofotometria de absorção atômica é um método confiável e sensível para a análise do cálcio em esmalte e dentina e a interferência de outros solutos como o fosfato pode ser evitada. Cálcio e fosfato também podem ser analisados colorimetricamente; este método pode ser usado para esmalte e dentina e permite a análise de volumes pequenos de solução desmineralizante e em pequenas concentrações para o cálcio e dependendo do ácido usado também para o fosfato (Barbour; Rees, 2004; Schlueter et al., 2011).

A perda de dureza é medida pela resistência do substrato à penetração do endentador. A microdureza é medida com um endentador de diamante Knoop ou Vickers, que tem forma de pirâmide alongada e tetrapiramidal, respectivamente. O número da dureza Knoop ou Vickers é calculado pela carga aplicada e tamanho da endentação. Este método tem baixo custo, possibilita uma maneira simples de se obter informação sobre erosão inicial em esmalte e dentina, pode ser usado em estudos “in vitro” e “in situ”, uma vez que necessita de uma superfície de análise plana e polida. A microdureza de superfície Knoop é mais sensível a mudanças na

camada mais superficial das lesões de erosão (Barbour; Rees, 2004; Cheaib; Lussi, 2011; Rehder Neto et al., 2009; Schlueter et al., 2011; Turssi et al., 2011; Turssi et al., 2010) do que a microdureza de superfície Vickers (Barbour; Rees, 2004; Srinivasan et al., 2010; Venasakulchai et al., 2010). A nanodureza utiliza o mesmo princípio da microdureza, mais numa escala menor, com um endentador de diamante Berkovich de forma trigonal piramidal. Além da dureza, este método permite o cálculo de outras propriedades mecânicas, como a deformação plástica (Barbour; Rees, 2004; Schlueter et al., 2011; Wang et al., 2011; White et al., 2011; White et al., 2010).

A perfilometria de superfície quantifica a perda de tecido dental em relação a uma área de referência não tratada e também fornece informações de rugosidade superficial. Os dados de rugosidade podem ser úteis em estágios iniciais de erosão. A superfície do espécime é escaneada para gerar dois ou três perfis dimensionais usando um dispositivo de medição de contato ou não contato. Pode ser usada para avaliar lesões de erosão extensas, abrasão ou a combinação de ambas, em esmalte e dentina, mas não pode medir a profundidade da superfície de esmalte amolecida ou a base da cratera de erosão. Na perfilometria de contato, a superfície é escaneada com uma caneta com ponta de aço ou diamante, que penetra na superfície erosionada e pode superestimar a profundidade da lesão (Barbosa et al., 2012; Heurich et al., 2010). A perfilometria de não contato usa uma sonda de luz laser (branca ou azul clara), podendo analisar erosões profundas ou superfícies naturais curvadas, entretanto para se obter máxima sensibilidade e precisão são necessárias superfícies planas (Ablal et al., 2009; Barbour; Rees, 2004; Elton et al., 2009; Hara et al., 2008; Schlueter et al., 2011; Venasakulchai et al., 2010; White et al., 2011; White et al., 2010).

A microradiografia quantifica o conteúdo mineral do tecido duro dental medindo a atenuação dos raios-x transmitidos através de um corte por comparação com uma escala de referência de alumínio; na microradiografia transversal (TMR) o feixe de raio-x é perpendicular a direção da progressão da lesão; na microradiografia longitudinal (LMR) o feixe é aproximadamente paralelo a esta direção. A LMR permite o estudo de espécimes em cortes mais espessos (400 e 800 µm de espessura em esmalte e dentina respectivamente) e fornece medições não destrutivas longitudinais da progressão da lesão e informações sobre mudanças no

conteúdo mineral total do espécime no plano paralelo, expresso como a espessura da hidroxiapatita perdida, mas não sobre a profundidade e o perfil do conteúdo mineral da lesão. Este método pode ser usado em estudos de erosão, abrasão e erosão-abrasão em esmalte e dentina, “in vitro” e “in situ” (Barbour; Rees, 2004; Schlueter et al., 2011). A TMR é um método amplamente utilizado para estudos de cárie, necessitando de uma superfície paralela, cortes finos (50-200 µm de espessura), é destrutivo, mas fornece informação da distribuição e da profundidade da lesão. Assim, o método TRM vem sendo modificado para os estudos de erosão e é possível quantificar a extensão da perda ou ganho mineral e a profundidade da erosão em esmalte ou dentina, “in vitro” ou “in situ” (Ablal et al., 2009; Amaechi et al., 1999; Barbour; Rees, 2004; Cochrane et al., 2012; Creanor et al., 2011; Elton et al., 2009; Pretty et al., 2004; Schlueter et al., 2011).

A microtomografia computadorizada de varredura é um método não destrutivo que pode ser usado em estudos clínicos, “in situ” e “in vitro”, que avalia a densidade mineral e a profundidade da lesão nos espécimes com o feixe de raio-x incidindo perpendicularmente à superfície tratada da amostra, gerando imagens 3D (Hamba et al., 2011; Zhi et al., 2013).

A tomografia de coerência ótica é uma técnica não invasiva que é utilizada para estudos clínicos de erosão que gera imagens subsuperficiais de amostras de esmalte usando luz infra-vermelha. As imagens fornecem informações da espessura do esmalte e sua porosidade, a qual está relacionada com o grau de perda mineral; a acessibilidade e posicionamento da sonda “in vivo” é considerado um problema deste método (Schlueter et al., 2011).

O ultrassom tem sido sugerido como uma ferramenta para medir a espessura do esmalte dental e pode ser útil para estudos de erosão dental. Sua natureza não destrutiva permite medidas repetidas e sua simplicidade justifica o seu uso clínico. O limite de detecção é de 300 µm e muitas variações são observadas na simulação das condições clínicas, limitando o uso desta técnica “in vitro”. Estas duas últimas técnicas ainda não estão totalmente validadas para estudos de erosão (Schlueter et al., 2011).

A fotografia digital pode ser usada nos estudos de erosão para quantificar a perda ou ganho no conteúdo mineral do espécime através da utilização de um protocolo de harmonização de cor e tamanho (CasMaTCH™) para padronização das imagens, determinando a média do valor de cinza da área antes e após tratamento. Esta técnica utiliza imagens de 8 bits na escala de cinza que variam de 0 (preto) a 225 (branco) (Cochrane et al., 2012; Iijima, 2008).

Entre os métodos disponíveis mais usados nas pesquisas sobre erosão, destacam-se as: análises químicas da perda mineral e dureza superficial do esmalte para erosão inicial e perfilometria de superfície (não contato) e microradiografia transversal para erosão avançada. As mudanças morfológicas no tecido dental com erosão tem sido frequentemente demonstrado por microscopia eletrônica de varredura (Schlueter et al., 2011).

Contudo se faz necessário a utilização de métodos que possibilitem quantificar a progressão ou regressão dos processos de desmineralização do esmalte. Um método alternativo para a detecção de variações do conteúdo mineral do esmalte chamado Quantificação da Fluorescência Induzida por Luz (QLF™) permite diagnosticar discretas alterações do conteúdo mineral dental. Este método quantifica a fluorescência da superfície do dente, a qual é reduzida pela perda mineral do esmalte. A desmineralização aumenta a porosidade, causando a dispersão da luz quando a superfície é irradiada com a luz azul-violeta e estas áreas aparecem escuras, podendo ser quantificadas. Dentre as vantagens deste método destacam-se, a alta sensibilidade de análise, a especificidade, a reprodutibilidade inter e intra-examinadores, a rapidez de mensuração e a facilidade de utilização. Além disso, este método pode ser utilizado em pesquisas laboratoriais e clínicas, sendo considerado um método não destrutivo e não invasivo (Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

O método do QLF™ foi desenvolvido originariamente para avaliação de lesões de cárie e tem sido pouco utilizado nos estudos de erosão, apesar da sua capacidade para quantificar as alterações ocorridas no conteúdo mineral do esmalte dental. As pesquisas sobre erosão que usaram o QLF™ como método de avaliação quantificaram o percentual de fluorescência (ΔF em %), que expressa a

profundidade da lesão ou o percentual de fluorescência pela área, em milímetro quadrado (ΔQ em $\%.mm^2$), que expressa o conteúdo mineral da lesão.

O esmalte de dentes humanos foi desmineralizado com ácido cítrico a 0,1% (pH 2,74) por 15 horas e os valores de ΔF e ΔQ obtidos através do QLF™ foram correlacionados com os valores de ΔZ (perda do conteúdo mineral em volume, % por micrômetro) obtidos na microradiografia transversal, que é considerada como o método padrão ouro para estudos de erosão em função da capacidade em quantificar tanto a perda absoluta da superfície do dente (cratera), como a dissolução mineral abaixo da superfície do dente (área desmineralizada). O coeficiente de correlação linear de Pearson demonstrou uma correlação positiva para o $\Delta F \times \Delta Z$ ($r=0,87$) e $\Delta Q \times \Delta Z$ ($r=0,91$), demonstrando a habilidade do QLF™ para detectar e monitorar longitudinalmente lesões de erosão “in vitro” (Pretty et al., 2004).

Em outro estudo, em que o esmalte bovino foi fortemente desmineralizado com suco de laranja (pH 3,4) por várias horas (6, 12, 18, 24, 30 e 36), foi observada uma pobre correlação entre o ΔQ quantificado pelo método do QLF™ e a profundidade da lesão na microradiografia transversal ($r=0.245$, $p=0.059$), sugerindo que este tipo de comparação não seria adequada (Elton et al., 2009).

Espécimes de esmalte bovino foram submetidos a desmineralização por diversos refrigerantes alcoólicos (Bacardi breezer orange flavour, pH 3,63; Smirnoff ice, pH 3,18; Archers schnapps aqua peach flavor, pH 2,95; Bacardi breezer half sugar raspberry flavour, pH 3,06), suco de laranja (pH 3,73, controle positivo) e água deionizada (controle negativo) por um tempo de 20 minutos, 60 minutos e 1 hora. Ocorreu perda estatisticamente significativa no ΔF do esmalte nos espécimes de todos os grupos experimentais e controle positivo, com correlação direta com o pH e o tempo de exposição; apenas entre os tempos de 20 e 60 minutos não houve diferença significativa. Resultados semelhantes foram observados com a microradiografia transversal (perda mineral e profundidade da lesão) e a perfilometria de não contato (altura do degrau) (Ablal et al., 2009).

Em pesquisa na qual três valores de ΔF (médio, máximo e central) obtidos através do método do QLF™ foram correlacionados com três valores de profundidade da lesão de erosão (A: cratera; B: cratera + área desmineralizada

subjacente e A-B: área desmineralizada subjacente) obtidos com microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raio-X por dispersão de energia após vários tempos de desmineralização (0, 1, 3, 5 e 7 semanas) com ácido láctico 0,1 M (pH 5,0). O coeficiente de correlação foi significativo ($p < 0,001$) e positivo para as comparações $\Delta F \times B$ ($r = 0,91$; $0,93$ e $0,94$), $\Delta F \times A-B$ ($r = 0,91$; $0,92$ e $0,93$) e $\Delta F \times A$ ($r = 0,71$; $0,73$ e $0,75$), demonstrando que o QLF™ foi capaz de detectar e quantificar a perda mineral na superfície do esmalte com erosão (Nakata et al., 2009).

Correlação positiva também foi observada em pesquisa na qual o percentual de fluorescência (%F) do esmalte humano antes e após tratamento remineralizador foi quantificado pelo método do QLF™ e comparado com o percentual de remineralização (%R) na microradiografia transversal ($r = 0,625$, $p < 0,001$) e com a fotografia digital ($r = 0,637$, $p < 0,001$). O QLF™ foi mais sensível para detectar mudanças superficiais e menos sensível para mudanças subsuperficiais no conteúdo mineral quando comparado com a microradiografia transversal. Em relação a fotografia digital, o QLF™ seria o método preferencial para análises clínicas de erosão inicial, por ser um método livre de brilho intenso, por apresentar maior facilidade de análise em função do seu programa de quantificação e uma menor variabilidade. Apesar disto, ambos os métodos podem ser afetados pela geometria da imagem, hidratação do dente, espessura do esmalte e luz ambiente (Cochrane et al., 2012).

O presente estudo foi desenvolvido com intuito de investigar o efeito de materiais bioativos no processo de remineralização de lesões de erosão, através da análise da dureza superficial do esmalte e da quantificação do seu conteúdo mineral pelo método do QLF™. Além disso, verificou-se se o método do QLF™ tem correlação com o teste de microdureza.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo “in vitro” se propõe a avaliar a capacidade de materiais contendo compostos bioativos de remineralizar o esmalte bovino submetido a desafios erosivos, por meio da quantificação da microdureza (Knoop) e da fluorescência (método do QLF™) do esmalte antes, após erosão e após remineralização e verificar se existe a correlação entre os testes utilizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Foram utilizados 110 incisivos centrais permanentes bovinos (Donassollo et al., 2007; Turssi et al., 2010; White et al., 2010; Young; Tenuta, 2011), que receberam profilaxia com escova Robinson, pedra pomes e água e foram selecionados de acordo com dois critérios:

1- Integridade estrutural: as coroas foram observadas em microscópio digital em aumento de 50 vezes (MiView USB Digital Microscope, Chinavasion Wholesale, Guangdong, CN) para verificar a ausência de defeitos, trincas e/ou imperfeições no esmalte (Shimaoka, 2010).

2- Grau de mineralização: as coroas foram examinadas pelo método da Quantificação da Fluorescência Induzida por Luz (QLF™ System, Inspektor Reserch Systems BV, Amsterdam, NL) para verificar a ausência de áreas de desmineralização (Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

Após a seleção, os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% (manipulada no Laboratório de Bioquímica da FOU SP) e mantidos em refrigerador a 4°C até o início da fase experimental (Rehder Neto et al., 2009; Turssi et al., 2011; Turssi et al., 2010).

4.2 Preparo dos espécimes de esmalte para o teste de microdureza Knoop

Para o ensaio de microdureza foram utilizados 30 incisivos centrais permanentes bovinos. Cada dente foi seccionado na altura da junção cimento-esmalte e 3 mm acima desta junção usando-se uma máquina de corte de precisão em baixa velocidade (300 rpm / peso 150 gramas) e disco diamantado dupla-face sob constante refrigeração (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), obtendo-

se uma fatia da porção coronária vestibular e cervical de cada dente, sendo realizados cortes sucessivos até a obtenção de dois espécimes de esmalte (3 x 3 x 2 mm) de cada dente, totalizando 60 espécimes. Os espécimes foram limpos em aparelho de ultrassom (T 14, Thornton) com água deionizada por 20 minutos e secos com papel absorvente; em seguida foram fixados sobre uma fita dupla face (3M), previamente posicionada sobre uma placa de vidro, com a superfície do esmalte voltada para a fita. Um tubo de PVC (4 mm de altura x 15mm de largura) foi colocado em torno de cada espécime, centralizando-o no tubo, sendo este preenchido com resina acrílica autopolimerizável incolor (Vipi Dent, Vip; Figura 4.1). Após o embutimento, os corpos-de-prova foram lixados e polidos através de uma politriz (Knuth Rotor, Struers, Dinamarca), em velocidade de 125 rpm por 1 minuto, com uma sequência de discos de lixa d'água de carbeto de silício (granulações de 400, 600 e 1.200, Buehler), sob constante refrigeração, para criar uma superfície lisa. O polimento final foi realizado na politriz em velocidade de 250 rpm por 2 minutos com pano de polimento (Buehler) e suspensão de alumina (1 µm, Arotec). Para remoção dos resíduos provenientes do processo lixamento e polimento, os espécimes ficaram imersos em água deionizada dentro de uma cuba de ultrassom por 10 minutos (Ferreira, 2004; Pinheiro, 2009; Rehder Neto et al., 2009; Turssi et al., 2011; Turssi et al., 2010).

Figura 4.1 - Espécime de esmalte incluído para o teste de microdureza Knoop

As amostras foram imersas em 4 ml (por espécime) de saliva artificial (manipulada no Laboratório de Bioquímica da FOU SP) pH 7,0 e mantidas em estufa biológica a 37° C por 24 horas. A saliva artificial usada foi similar a descrita por McKnight-Hanes e Whitford (1992), modificada por Amaechi et al. (1999) pela exclusão do sorbitol e continha em grama/litro os seguintes componentes: metil-p-hidroxibenzoato, 2,00; carboximetil-celulose de sódio, 10,0; cloreto de potássio, 0,625; cloreto de magnésio P.A., 0,059; cloreto de cálcio P.A., 0,166; fosfato de potássio dibásico P.A., 0,804; fosfato de potássio monobásico P.A., 0,326. O metil-p-hidroxibenzoato é um aditivo conservante de substâncias aquosas e o carboximetil-celulose proporcionou a viscosidade da saliva, enquanto os outros constituintes forneceram os componentes inorgânicos em níveis comparáveis aos da saliva humana. Os componentes foram pesados em balança de precisão (Adventurer™, Ohaus), colocados em Becker com 1 litro de água deionizada e homogeneizados em agitador magnético em temperatura ambiente de 20°C. O pH da saliva foi ajustado (pH-Meter E 520, Metrohm Herisau, Switzerland) em 7,0 com hidróxido de potássio (Amaechi et al., 1999; McKnight-Hanes; Whitford, 1992; Rehder Neto et al., 2009; Turssi et al., 2011).

4.3 Medidas iniciais de microdureza de superfície Knoop

Os espécimes foram testados através de um microdurômetro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 4.2) com o uso de um endentador Knoop, que produz uma endentação com forma de pirâmide alongada (Figura 4.3) e apresenta uma relação comprimento/largura/profundidade de 30:4:1. (Ferreira, 2004). A dureza é uma propriedade mecânica definida como a mensuração da resistência à deformação permanente e é medida (KHN: número da dureza Knoop) por meio da relação da força (F) aplicada em kilogramaforça (kgf) pela área (A) da endentação ($KHN = F/A$), sendo que a área representa a projeção da área não recuperada da endentação em mm^2 ($A = C \cdot L^2$). A área é medida relacionando-se a constante do endentador ($C = 0,07028$) pelo comprimento da diagonal maior da área projetada da endentação ao quadrado (L^2) e as medidas de dureza foram feitas com carga estática de 50g, por um tempo de 15 segundos (Cheaib; Lussi, 2011; Elias; Lopes,

2007; Ferreira, 2004; Lachowski; Matos, 2009), com o auxílio de um software (New Age, Software Cams-Win, South Ampton, PA, USA) (Ferreira, 2004; Lachowski; Matos, 2009). Foram realizadas quatro endentações com espaçamento de 200 μm entre elas, a 500 μm da margem direita e inferior de cada espécime (Figura 4.4)(Turssi et al., 2011). Levando-se em consideração que o valor da microdureza Knoop para o esmalte é de cerca de 343 KHN (Elias; Lopes, 2007), foram selecionados 40 dos 60 corpos-de-prova preparados, que alcançaram valor de microdureza entre 330 e 360 KHN, de modo que a média de cada 5 corpos-de-prova resultasse em torno de 343, os quais foram distribuídos aleatoriamente entre os 7 grupos experimentais e grupo controle negativo (n=5).

Figura 4.2- Microdurômetro HMV 2

Figura 4.3 – Endentação Knoop em esmalte

Figura 4.4- Desenho esquemático das medidas iniciais de microdureza Knoop

4.4 Preparo dos espécimes de esmalte para análise por quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)

Para a análise por QLF™ foram utilizados 80 incisivos centrais permanentes bovinos. Cada elemento dental foi seccionado na junção cimento-esmalte e 5 mm acima desta, usando-se uma máquina de corte de precisão em baixa velocidade (300 rpm / peso 150 gramas) e disco diamantado dupla-face sob constante refrigeração (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Foi obtida uma fatia da porção coronária vestibular e cervical de cada dente, sendo realizados cortes sucessivos até a obtenção de um espécime de esmalte (5 x 5 x 3 mm), totalizando 80 espécimes. Após o corte, todos os fragmentos foram limpos em aparelho de ultrassom com água deionizada por 20 minutos e secos com papel absorvente (Andrade, 2009).

Estes espécimes foram embutidos em tubo de PVC (4 mm de altura x 15 mm de largura) com resina acrílica auto-polimerizável incolor, permanecendo exposta apenas a superfície convexa do esmalte (Figura 4.5). A área central (2 x 2 mm) deste esmalte foi protegida com fita adesiva (Adere, São Paulo, Brasil), sendo a superfície externa restante impermeabilizada com duas camadas de um verniz ácido resistente de secagem rápida (Colorama Maybelline, São Paulo, Brasil). Após 24 horas, o papel adesivo foi removido e cada espécime ficou com uma área central de esmalte de 4 mm², onde o protocolo de erosão e os tratamentos remineralizadores foram realizados (Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

As amostras foram imersas em 4 ml (por espécime) de saliva artificial (pH 7,0) e mantidas em estufa biológica a 37°C por 24 horas (Amaechi et al., 1999; McKnight-Hanes; Whitford, 1992; Rehder Neto et al., 2009).

Figura 4.5 - Espécime de esmalte incluído para a análise por QLF™

4.5 Quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)

Este método de quantificação mineral por fluorescência (QLF™ System - Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, NL) (Figura 4.6), baseia-se em diferenças ópticas encontradas entre o esmalte hígido e o desmineralizado. Uma lâmpada de xenon ($\lambda=404$ nm, 10^{-20} mW/cm²) produz um feixe azul-violeta que é conduzido à peça de mão através de uma fibra óptica, gerando fluorescência no tecido mineralizado irradiado (Andrade, 2009; Hanashiro, 2009; Shimaoka, 2010).

Figura 4.6 - Equipamento QLF™ System

O esmalte hígido ao ser irradiado produz fluorescência. O esmalte desmineralizado apresenta um aumento de porosidades e isto se torna a causa da dispersão na incidência da luz quando a superfície do dente é irradiada com a luz azul-violeta. Estas áreas aparecem escuras e podem ser quantificadas. Desta forma, uma micro-câmera, acoplada na peça de mão, que contém um filtro laranja ($\lambda=520$ nm) é responsável por eliminar a luz espalhada, captar a fluorescência produzida pelo tecido iluminado e gerar as imagens (Andrade, 2009; Hanashiro, 2009; Shimaoka, 2010).

As imagens são capturadas em uma câmara escura e armazenadas no próprio equipamento. Em seguida, são analisadas através do aplicativo Inspektor™ PRO em relação a profundidade da lesão, expressa em percentual de fluorescência do tecido (ΔF em %), a área (A ou WS) da lesão em mm^2 e o volume da lesão (ΔQ em $\%.\text{mm}^2$), que representa o índice final relativo ao valor do conteúdo mineral do substrato analisado ($\Delta Q = \Delta F \cdot A$) (Andrade, 2009; Hanashiro, 2009; Shimaoka, 2010).

Figura 4.7 – Peça de mão na mesa posicionadora Figura 4.8 – Amostra na mesa posicionadora

Os valores do ΔQ foram analisados em relação a uma medida inicial, sendo que em cada espécime foram registradas três imagens para avaliação: inicial, após o protocolo de erosão (2 dias) e no final do tratamento remineralizador (após 6 dias). A peça de mão foi fixada na mesa posicionadora (Figura 4.7) e os corpos de prova previamente marcados na face superior e lateral da resina acrílica foram secos com papel absorvente e colocados sobre o orifício central da mesa posicionadora, mantendo-se a maior distância possível entre os corpos de prova e a fonte de luz e em câmara escura, a superfície do esmalte foi irradiada com a luz azul violeta e a micro-câmera captou a fluorescência produzida pelo tecido iluminado e gerou as imagens para o programa Inspektor™ PRO (Figura 4.8). Para a análise da imagem inicial selecionou-se no programa a opção mancha branca (White Spot-WS) e a área do espécime a ser avaliada foi delimitada e analisada (Figura 4.9). Os corpos de prova foram distribuídos entre os 7 grupos experimentais e grupo controle negativo (n=10) e as imagens foram armazenadas em um banco de dados, sendo ordenadas através da identificação dos espécimes e datas das leituras (Andrade, 2009; Hanashiro, 2009; Shimaoka, 2010).

Figura 4.9 - Imagem inicial da amostra no programa Inspektor™ PRO

4.6 Protocolo de erosão e medidas de microdureza Knoop e QLF™ após erosão

As lesões erosivas foram induzidas pela incubação dos 40 espécimes da microdureza e dos 80 do QLF™ em 4 ml (por espécime) de solução aquosa de ácido cítrico a 0,3% pH 3,2 (manipulada no Laboratório de Bioquímica da FOU SP) em temperatura ambiente, durante 2 minutos. Após lavagem com água deionizada em seringa descartável de 20 ml (4 ml por espécime), os espécimes foram imersos em 4 mL de saliva artificial e mantidos em estufa biológica a 37°C pelo restante do período de 24 horas (1 ciclo). Foram realizados dois ciclos de erosão totalizando 48 horas (Turssi et al., 2011; White et al., 2011).

A avaliação da lesão foi realizada após as 48 horas do protocolo de erosão por meio do teste de microdureza Knoop (Figura 4.10) com as quatro endentações localizadas a 250 μ m à esquerda das medições iniciais (Turssi et al., 2011). Na leitura pelo método do QLF™, os corpos-de-prova foram colocados na mesa do

equipamento na mesma posição em que foi realizada a leitura inicial (imagem de referência) e quando a imagem após erosão coincidiu em 99% com a imagem inicial, o programa automaticamente capturou a nova imagem (Figura 4.11)(Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

Figura 4.10 - Desenho esquemático das medidas de microdureza Knoop após erosão e sua relação com as medidas iniciais

Figura 4.11 - Imagem da amostra no programa InspektorTM PRO após erosão

4.7 Tratamento remineralizador

Os tratamentos remineralizadores foram iniciados logo após a finalização das avaliações de microdureza e QLF™ após as 48 horas de protocolo de erosão. Foram selecionados para remineralização: 3 dentifrícios, 1 creme e 2 géis para aplicação tópica profissional ou caseira e 1 pasta profilática para aplicação tópica profissional. Estes materiais apresentam diferentes compostos bioativos, os quais foram distribuídos entre os grupos experimentais (n=5 para a microdureza e n=10 para o QLF™) da seguinte forma: G1-Pro-Argin™+NaMFP, bicarbonato de arginina + carbonato de cálcio + monofluorofosfato de sódio (Colgate® Sensitive Pro-Alívio™); G2-Recaldent™+NaF, fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio (MI Paste Plus™); G3-ACP+NaF, fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio + nitrato de potássio (Relief ACP); G4-CaGP+KF, glicerofosfato de cálcio + fluoreto de potássio (Fluor Protector Gel); G5-NovaMin®+NaF, fosfosilicato de cálcio e sódio + fluoreto de sódio (Nupro® Sensodyne®); G6- NovaMin®+NaMFP, fosfosilicato de cálcio e sódio + monofluorofosfato de sódio (Sensodyne® Repair&Protect); G7-NaF, fluoreto de sódio + nitrato de potássio (Sensodyne® Cool Gel) e o grupo controle negativo, G8-saliva artificial. A divisão dos grupos e as especificações técnicas dos materiais, tais como marca comercial e composição química são apresentadas no quadro 4.1.

Os espécimes de cada grupo experimental foram expostos ao tratamento com o composto bioativo. Uma gota de saliva artificial foi colocada na superfície dos espécimes e após 1 hora os tratamentos foram realizados com imersão das amostras em 4 ml (por espécime) de suspensão aquosa por 2 minutos e foram lavados com água deionizada com seringa descartável de 20 ml (4 ml por espécime). As suspensões aquosas foram preparadas na proporção de 1:3, sendo 1 parte do produto (5 gramas, pesado em balança de precisão, Adventurer™, Ohaus) para 3 partes de água deionizada (15 ml, medido em proveta), totalizando 20 ml de suspensão aquosa para cada 5 espécimes (4 ml por espécime). As suspensões foram homogeneizadas em um agitador magnético em temperatura ambiente de 20°C e foi mantido o pH original de cada suspensão, medido antes e após a homogeneização com o pHmetro (G1- 9,0; G2- 7,0; G3- 6,5; G4- 7,2; G5- 11,0; G6-

9,2; G7- 6,5). As amostras do grupo controle negativo, G8, permaneceram imersas em saliva artificial a 37°C (Turssi et al., 2011).

Após os tratamentos remineralizadores dos grupos experimentais (G1 a G7), todos os corpos-de-prova, inclusive os do grupo controle negativo (G8), foram imersos em saliva artificial por 2 horas e em seguida, um novo ciclo de erosão (ácido cítrico + saliva artificial) foi realizado para todos os grupos uma vez ao dia por 6 dias consecutivos (Turssi et al., 2011).

4.8 Medidas finais de microdureza Knoop

As 4 endentações finais (Figura 4.12) foram realizadas a 500 μm à esquerda das medições iniciais após concluídos os 6 dias de tratamento (Turssi et al., 2011).

Figura 4.12- Desenho esquemático das medidas de microdureza Knoop, inicial, após a erosão e finais

4.9 Medidas finais pelo método do QLF™

As leituras finais pelo método do QLF™ foram realizadas com o correto posicionamento dos espécimes na mesa e quando estes estavam exatamente na mesma posição em que foi obtida a imagem inicial, o equipamento registrou automaticamente a nova imagem (Figura 4.13) com 99% de coincidência com a imagem de referência (Andrade, 2009; Shimaoka, 2010).

Figura 4.13 - Imagem da amostra no programa Inspektor™ PRO após tratamento

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MARCA COMERCIAL (Fabricante)	COMPOSIÇÃO*
1- Pro-Argin™ + NaMFP	Colgate® Sensitive Pro-Alívio™ (Colgate/Palmolive, Brasil)	Bicarbonato de arginina a 8% (Pro-Argin™), carbonato de cálcio (CaCO ₃), monofluorofosfato (MFP) de sódio a 1.10% (Na ₂ PO ₃ F - 1.450 ppm), água, sorbitol, lauril sulfato de sódio, aromatizante, goma celulósica, bicarbonato de sódio, acesulfame de potássio, silicato de sódio, goma xanthan, sucralose e dióxido de titânio. Dentífrico.pH 9,0.
2- Recaldent™ + NaF	MI Paste Plus™ (GC, Japan)	Fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP/Recaldent™), Fluoreto de sódio a 0,2% (NaF- 900 ppm), água, glicerol, D-sorbitol, carboximetilcelulose de sódio, glicol propileno, dióxido de silicone, dióxido de titânio, xylitol, ácido fosfórico, aromatizante, sacarina de sódio, etil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato e butil p-hidroxibenzoato. Creme tópico de uso profissional ou caseiro.pH 7,0.
3- ACP+NaF	Relief ACP (Discus Dental, USA)	Fosfato de cálcio amorfo (ACP), nitrato de potássio (KNO ₃), fluoreto de sódio, água, poloxamer 338 natural, hortelã-pimenta, nitrato de cálcio, fosfato e sacarina de sódio. Gel de uso profissional ou caseiro.pH 6,5.
4-CaGP+KF	Fluor Protector Gel (Ivoclar-vivadent, Liechtenstein)	Glicerofosfato de cálcio,Fluoreto de potássio (KF- 1.450 ppm), xylitol, pró-vitamina D-Panthenol, água, álcool, hidroximetilcelulose, lauril 23, metilparabeno, aroma e sacarina de sódio. Gel de uso profissional ou caseiro.pH 7,2.
5- NovaMin® + NaF	Nupro® Sensodyne® (GlaxoSmithKline, USA)	Fosfosilicato de cálcio e sódio 5% (NovaMin®/CSP), fluoreto de sódio a 1,23%, glicerina, pedra pomes, silicato de sódio, dióxido de titânio, metilsalicilato, saborizante, água purificada, carboximetilcelulose de sódio, sacarina de sódio. Pasta profilática de uso profissional. pH 11,0.
6- NovaMin® + NaMFP	Sensodyne® Repair&Protect (GlaxoSmithKline, Brasil)	Fosfosilicato de cálcio e sódio 5% (NovaMin®/CSP), Monofluorofosfato de sódio (1.450 ppm),glicerina, PEG-8, sílica, lauril sulfato de sódio, aroma, dióxido de titânio, carbomero, acesulfame de potássio e d-limoneno. Dentífrico.pH 9,2.
7- NaF	Sensodyne® Cool Gel (GlaxoSmithKline, Brasil)	Nitrato de potássio 5%, fluoreto de sódio (1.100 ppm), água, sorbitol, sílica, glicerina, goma celulósica, metilcocoilaurato de sódio, aroma e sacarina de sódio. Dentífrico.pH 6,5.
8- Saliva	Saliva artificial (Laboratório de Bioquímica da FOU SP)	(g:L) Metil-p-hidroxibenzoato, 2,0; carboximetilcelulose (CMC) de sódio, 10,0; cloreto de potásio (KCl), 0,625; cloreto de magnésio P.A.(MgCl ₂ .6H ₂ O), 0,059; cloreto de cálcio P.A. (CaCl ₂ .2H ₂ O), 0,166; fosfato de potássio dibásico P.A. (K ₂ HPO ₄), 0,804; fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄), 0,326; pH 7,0.

5* Informações obtidas pelos respectivos fabricantes

Quadro 4.1- Grupos experimentais, marca comercial e composição química dos materiais

5 RESULTADOS

5.1 Teste de microdureza Knoop

Os dados obtidos por meio do teste de microdureza foram submetidos à análise estatística com o pacote estatístico SigmaStat versão 3.5 para Windows, através do teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da suposição de normalidade e ao teste de Levene para avaliação da igualdade de variâncias. De acordo com os valores dos níveis descritivos para o teste de normalidade ($p=0,164$) e igualdade de variâncias ($p=0,838$), as amostras foram consideradas normais e com variâncias iguais ($p>0,05$), satisfazendo os critérios para a aplicação da análise de variância (ANOVA).

O teste ANOVA de dois fatores para medidas repetidas foi selecionado por considerar como desenho experimental um estudo com dois fatores de variação (Tratamentos e Momentos da análise) e a vinculação dos dados, uma vez que foram realizadas três mensurações em cada uma das 40 unidades experimentais. A comparação entre os grupos para avaliação de diferenças estatísticas foi realizada pelo teste de Tukey. Todos os testes empregados admitiram como nível de significância estatística $\alpha=0,05$.

A análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as médias da microdureza para o Fator Momentos da análise ($p<0,001$) e para a Interação Tratamentos x Momentos da análise ($p<0,001$). As variáveis contínuas foram expressas como a média (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Valores médios da microdureza do esmalte em KHN obtidos para os tratamentos nos três momentos da análise das amostras

O teste de Tukey para a interação dos Tratamentos por Momentos da análise (Tabela 5.1) mostrou diferenças estatisticamente significativas na comparação da microdureza dos tratamentos após 6 dias (final) para o tratamento com G2-Recaldent™+NaF em relação ao tratamento com G5- NovaMin®+NaF ($p<0,001$), G6- NovaMin®+NaMFP ($p<0,001$) e G7- NaF ($p=0,023$).

O teste de Tukey para a interação Momentos da análise por Tratamentos demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa na comparação da média da microdureza inicial de todos os grupos em relação a microdureza após 2 dias de erosão e após 6 dias de tratamento ($p<0,001$). Na comparação da média da microdureza dos grupos após 2 dias de erosão em relação a microdureza após 6 dias de tratamento, observou-se que os tratamentos com G5- NovaMin®+NaF ($p<0,001$), G6- NovaMin®+NaMFP ($p<0,001$), G7- NaF ($p<0,001$) e G8- saliva ($p<0,022$) mostraram que houve diferenças estatisticamente significativas nesta comparação das médias. As variáveis contínuas foram expressas como a média $\pm$ desvio-padrão da média (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Valores médios e desvio-padrão ($\pm$) da microdureza do esmalte em KHN obtidos na interação Tratamentos x Momentos da análise das amostras

<i>Tratamentos</i>	<i>Momentos da análise</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Após 2 dias de erosão</i>	<i>Após 6 dias de tratamento</i>
G1- Pro-Argin™+NaMFP	342.40 ($\pm$ 11.69) ^{a A}	287.80 ($\pm$ 13.45) ^{a B}	275.05 ($\pm$ 22.98) ^{a B}
G2- Recaldent™+NaF	342.35 ($\pm$ 10.88) ^{a A}	285.85 ($\pm$ 12.81) ^{a B}	290.50 ($\pm$ 9.43) ^{a b B}
G3- ACP+NaF	342.55 ($\pm$ 9.33) ^{a A}	276.31 ($\pm$ 23.62) ^{a B}	266.64 ($\pm$ 16.43) ^{a b B}
G4- CaGP+KF	342.50 ($\pm$ 9.02) ^{a A}	278.65 ($\pm$ 14.00) ^{a B}	275.80 ($\pm$ 13.68) ^{a b B}
G5- NovaMin®+NaF	342.45 ($\pm$ 8.26) ^{a A}	290.35 ($\pm$ 6.74) ^{a B}	254.30 ($\pm$ 22.10) ^{a c C}
G6- NovaMin®+NaMFP	342.15 ($\pm$ 8.38) ^{a A}	297.30 ($\pm$ 18.35) ^{a B}	254.75 ($\pm$ 17.11) ^{a c C}
G7- NaF	342.00 ($\pm$ 8.68) ^{a A}	288.85 ($\pm$ 15.82) ^{a B}	263.75 ($\pm$ 23.74) ^{a c C}
G8- Saliva (C-)	342.95 ($\pm$ 7.54) ^{a A}	287.90 ($\pm$ 13.82) ^{a B}	270.60 ($\pm$ 5.34) ^{a b C}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas (colunas) indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos em um mesmo momento da análise ($p < 0,05$).
Diferentes letras maiúsculas sobrescritas (linhas) indicam diferenças estatísticas entre os momentos da análise para um mesmo tratamento ($p < 0,05$).

5.2 Quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF™)

Os dados obtidos por meio da quantificação do conteúdo mineral pelo método da fluorescência induzida por luz (QLF™) foram submetidos à análise estatística com o pacote estatístico SigmaStat versão 3.5 para Windows, através do teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da suposição de normalidade e o teste de Levene para avaliação da igualdade de variâncias. De acordo com os valores dos níveis descritivos para o teste de normalidade ($p=0,137$) e igualdade de variâncias ($p=0,072$), as amostras foram consideradas normais e com variâncias iguais ($p>0,05$), satisfazendo os critérios para a aplicação da análise de variância (ANOVA).

O teste ANOVA de dois fatores para medidas repetidas foi selecionado por considerar como desenho experimental um estudo com dois fatores de variação (Tratamentos e Momentos da análise) e a vinculação dos dados, uma vez que foram

realizadas três mensurações em cada uma das 80 unidades experimentais. A comparação entre os grupos para avaliação de diferenças estatísticas foi realizada pelo teste de Tukey. Todos os testes empregados admitiram como nível de significância estatística $\alpha=0,05$.

A análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as médias do ΔQ para o Fator Momentos da análise ($p<0,001$) e para a Interação Tratamentos x Momentos da análise ($p=0,006$). As variáveis contínuas foram expressas como a média (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 – Valores médios do ΔQ do esmalte em $\%.mm^2$ obtidos para os tratamentos nos três momentos da análise das amostras

O teste de Tukey para a interação dos Tratamentos x Momentos da análise (Tabela 5.2) mostrou diferenças estatisticamente significativas na comparação do ΔQ dos tratamentos após 6 dias (final) para o tratamento com G1-Pro-Argin™+NaMFP em relação ao tratamento com G7- NaF ($p=0,018$) e G8- saliva ($p=0,048$); o G2- Recaldent™+NaF em relação ao G6- NovaMin®+NaMFP ($p=0,024$),

G7- NaF ($p<0,001$) e G8- saliva ($p<0,001$) e o G3- ACP+NaF em relação ao G7- NaF ($p=0,037$).

O teste de Tukey para a interação Momentos da análise por Tratamentos demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa na comparação da média do ΔQ inicial de todos os tratamentos em relação ao ΔQ após 2 dias de erosão e em relação ao ΔQ após 6 dias de tratamento ($p<0,001$). Na comparação da média do ΔQ das amostras após 2 dias de erosão em relação ao ΔQ após 6 dias de tratamento, observou-se que os tratamentos com G5- NovaMin[®]+NaF ($p<0,001$), G6- NovaMin[®]+NaMFP ($p=0,009$), G7- NaF ($p<0,001$) e G8-saliva ($p<0,001$) mostraram que houve diferenças estatisticamente significativas nesta comparação das médias. As variáveis contínuas foram expressas como a média $\pm$ desvio-padrão da média (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Valores médios e desvio-padrão ($\pm$) do ΔQ do esmalte em $\%.\text{mm}^2$ obtidos na interação Tratamentos x Momentos da análise das amostras

<i>Tratamentos</i>	<i>Momentos da análise</i>		
	Inicial	Após 2 dias de erosão	Após 6 dias de tratamento
G1- Pro-Argin TM +NaMFP	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.10 (± 0.05) ^{a B}	-0.15 (± 0.07) ^{a B}
G2- Recaldent TM +NaF	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.09 (± 0.04) ^{a B}	-0.11 (± 0.08) ^{a c B}
G3- ACP+NaF	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.12 (± 0.10) ^{a B}	-0.16 (± 0.08) ^{a c e B}
G4- CaGP+KF	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.14 (± 0.10) ^{a B}	-0.17 (± 0.14) ^{a c e B}
G5-NovaMin [®] +NaF	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.08 (± 0.08) ^{a B}	-0.21 (± 0.11) ^{a c e C}
G6- NovaMin [®] +NaMFP	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.14 (± 0.10) ^{a B}	-0.23 (± 0.09) ^{a d e C}
G7- NaF	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.14 (± 0.05) ^{a B}	-0.27 (± 0.13) ^{b d f C}
G8- Saliva (C-)	-0.01 (± 0.00) ^{a A}	-0.10 (± 0.05) ^{a B}	-0.26 (± 0.14) ^{b d e C}

Diferentes letras minúsculas sobrescritas (colunas) indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos em um mesmo momento de análise ($p<0,05$).
Diferentes letras maiúsculas sobrescritas (linhas) indicam diferenças estatísticas entre os momentos da análise para um mesmo tratamento ($p<0,05$).

5.3 Correlação entre os resultados do método do QLFTM e o teste de microdureza Knoop

O teste de correlação linear de Pearson foi utilizado para verificar o grau de associação entre as duas variáveis, QLFTM e microdureza. Os valores médios do ΔQ de cada grupo (8) nos 3 momentos da análise das amostras (inicial, após erosão e após tratamento) foi correlacionado com os valores médios da microdureza (KHN) e o teste de correlação linear de Pearson demonstrou que houve uma correlação positiva ($r=0,92$, valores próximos de +1) e significativa ($p<0,0001$) entre a variável QLFTM em relação a microdureza, todos apresentando nível descritivo menor que 0,05 (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Teste de Correlação Linear de Pearson para o QLFTM em relação a microdureza

	Microdureza		
	Correlação (r)	p-valor	n
QLF TM	0,92	<0,0001	24

6 DISCUSSÃO

Nas pesquisas “in vitro” sobre erosão dental há uma variabilidade muito grande em relação aos protocolos adotados, por isto, o pesquisador precisa inicialmente definir que tipo de erosão será simulada (inicial ou avançada) e se o método de avaliação é adequado para aquele tipo de erosão. Em seguida deve-se padronizar as possíveis variáveis do experimento, como os espécimes (região, idade ou grau de mineralização do dente bovino ou humano) e as características das soluções des-remineralizantes (tipo de ácido, tipo de saliva, concentração, pH, acidez titulável, viscosidade, temperatura, velocidade de mistura e tempo de exposição (West et al., 2011; Young; Tenuta, 2011).

Nesse experimento foi simulada uma erosão inicial, com a utilização de um protocolo suave de erosão, na qual ocorre a dissolução parcial dos cristais do esmalte, aumento da rugosidade e diminuição da dureza superficial (amolecimento do esmalte) e o teste de microdureza Knoop, assim como o método do QLFTM se mostraram capazes de medir as alterações ocorridas no esmalte bovino comprovadas através dos resultados obtidos neste experimento.

Um fator que poderia interferir no resultado desta pesquisa seria a diferença na preparação dos corpos de prova, pois para o método do QLFTM o esmalte não precisa ser planificado (Andrade, 2009; Cochrane et al., 2012; Elton et al., 2009; Pretty et al., 2004; Shimaoka, 2010), embora exista esta possibilidade nos estudos “in vitro”(Ablal et al., 2009; Nakata et al., 2009) ou “in situ”. Para o teste de microdureza é necessário a obtenção de uma superfície plana e com a remoção da camada mais superficial do esmalte, que é a camada mais mineralizada, o mesmo ficaria mais suscetível a desmineralização. Assim, com o intuito de minimizar o desgaste do esmalte foram usadas apenas três lixas na planificação dos corpos-de-prova. Os resultados obtidos nos dois testes foram praticamente coincidentes, demonstrando que o desgaste do esmalte não influenciou nos resultados da pesquisa.

No teste de microdureza (Tabela 5.1), o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (G2-RecaldentTM+NaMFP, creme tópico) mostrou diferença

estatisticamente significativa em relação ao tratamento com fosfosilicato de cálcio e sódio (G5-NovaMin[®]+NaF, pasta profilática e G6-NovaMin[®]+NaMFP, dentifrício) e fluoreto de sódio + nitrato de potássio (G7-NaF, dentifrício) demonstrando um potencial maior para a recuperação da microdureza do esmalte em relação a estes três tratamentos; este resultado pode ser justificado pela capacidade do fosfopeptídeo de caseína (CPP) de estabilizar o fosfato de cálcio, mantendo-o numa forma amorfa ou solúvel (ACP), fornecendo um reservatório de íons de cálcio e fosfato, que auxiliam a saliva na remineralização do esmalte após um desafio ácido. No método do QLFTM (Tabela 5.2), o bicarbonato de arginina com carbonato de cálcio (G1-Pro-ArginTM+NaMFP, dentifrício) mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com G7-NaF e G8-saliva artificial, demonstrando que esta combinação do aminoácido arginina com o carbonato de cálcio pode auxiliar na remineralização do esmalte; o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (G2-RecaldentTM+NaF) em relação ao tratamento com G6-NovaMin[®]+NaMFP, G7-NaF e G8-saliva; o fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio + nitrato de potássio (G3-ACP+NaF, gel) em relação ao fluoreto de sódio + nitrato de potássio (G7-SCG), demonstrando que o ACP auxiliou na remineralização do esmalte. Assim, o bicarbonato de arginina com carbonato de cálcio (G1-Pro-ArginTM+NaMFP), o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (G2-RecaldentTM+NaF) e o fosfato de cálcio amorfo + nitrato de potássio (G3-ACP+NaF) associados a diferentes fluoretos, demonstraram um potencial maior para a remineralização do esmalte em relação aos demais produtos.

O teste de Tukey para a interação Momentos da análise x Tratamentos (Tabelas 5.1 e 5.2) demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa na comparação da média da microdureza e do ΔQ inicial de todos os tratamentos em relação a microdureza e ΔQ após 2 dias de erosão, indicando que houve o estabelecimento de uma lesão de erosão no esmalte após a exposição ao ácido cítrico por 2 minutos diários (2 dias), demonstrando que mesmo uma rápida exposição diária ao ácido cítrico é capaz de desmineralizar o esmalte; o ácido cítrico apresenta um grande potencial erosivo (baixo pH e acidez titulável alta), que pode ser atribuído a sua dissociação em íons de hidrogênio e citrato, que se ligam ao carbonato e fosfato e seqüestram os íons de cálcio da saliva e da estrutura dentária, respectivamente. Na comparação da microdureza e do ΔQ inicial e após 6 dias de

tratamento, observou-se que nenhum dos tratamentos realizados foi capaz de proporcionar às amostras o retorno à sua microdureza e ΔQ inicial nesta pesquisa “in vitro”, apesar da utilização de materiais contendo compostos bioativos a base de cálcio, fosfato e fluoreto.

Outros fatores que influenciam no processo de remineralização do esmalte são: o tipo de apatita, o tipo e idade do dente (Amaechi et al., 1999; Garone Filho; Silva, 2008; Turssi et al., 2010; White et al., 2010); as características do ácido, como o pH (Venasakulchai et al., 2010), a acidez titulável, as propriedades quelantes (Lussi et al., 2011), a temperatura, o tempo e a frequência de exposição (Amaechi et al., 1999), a viscosidade, o tipo do ácido (Aykut-Yetkiner et al., 2013) e a concentração (Young; Tenuta, 2011).

Na comparação da média da microdureza e do ΔQ das amostras após 2 dias de erosão em relação a microdureza e o ΔQ após 6 dias de tratamento (Tabelas 5.1 e 5.2), observou-se que os tratamentos com bicarbonato de arginina com carbonato de cálcio (G1-Pro-Argin™+NaMFP), fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (G2-Recaldent™+NaF), fosfato de cálcio amorfo + nitrato de potássio (G3-ACP+NaF) e glicerofosfato de cálcio (G4-CaGP+KF) não mostraram diferenças estatisticamente significativas, demonstrando que os tratamentos utilizados com estes produtos que contém cálcio e fosfato, associados a diferentes fluoretos, foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte, demonstrando um potencial maior para auxiliar a saliva na remineralização do esmalte durante os desafios ácidos diários a que os dentes são submetidos. Os tratamentos realizados com fosfosilicato de cálcio e sódio (G5-NovaMin®+NaF e G6-NovaMin®+NaMFP), fluoreto de sódio + nitrato de potássio (G7-NaF) e G8-saliva artificial mostraram que houve diferenças estatisticamente significativas nesta comparação das médias, indicando que os tratamentos não foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte, apesar da presença dos compostos bioativos cálcio, fosfato e fluoreto nestes materiais.

A saliva artificial (G8) foi utilizada como controle negativo em vez de água deionizada, para simular de maneira mais adequada a situação clínica na qual o esmalte é submetido aos desafios erosivos e cabe à saliva a função de proteger o dente através da barreira fornecida pela película adquirida de saliva, pela sua

capacidade de remover, diluir e neutralizar os ácidos, além de fornecer íons de cálcio, fosfato e flúor para atuarem no processo de remineralização do esmalte (Buzalaf et al., 2012; Cheaib; Lussi, 2011; Creanor et al., 2011; Hara et al., 2008). A saliva artificial, apesar de não possuir as proteínas da saliva humana, que fornecem um reservatório de cálcio e fosfato e atuam nas trocas iônicas entre a superfície do dente, a película de saliva e o meio oral, ela é supersaturada em cálcio e fosfato e tem capacidade para repor no esmalte os minerais perdidos (Amaechi et al., 1999; McKnight-Hanes; Whitford, 1992; Rehder Neto et al., 2009; Turssi et al., 2011), mas apesar da existência destes minerais na saliva artificial, nesta pesquisa ela não foi capaz de estabilizar o processo de erosão.

Compostos bioativos como o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (Recaldent™ ou CPP-ACP) e o fosfosilicato de cálcio e sódio (NovaMin® ou CSP) vêm sendo estudados e utilizados na prevenção e tratamento de lesões de cárie, de erosão e de hipersensibilidade dentinária. Estes compostos disponibilizam, na saliva e na superfície do dente, íons de cálcio e fosfato, fundamentais no processo de remineralização do esmalte e podem ou não ser associados ao fluoreto (Burwell et al., 2009; Cochrane; Reynolds, 2012; Wefel, 2009). Outros compostos bioativos como o glicerofosfato de cálcio (CaGP) e a associação de bicarbonato de arginina e carbonato de cálcio (Pro-Argin™) tem sido pouco utilizados nas pesquisas de cárie e erosão, mas muitas pesquisas tem avaliado a ação do Pro-Argin™ na hipersensibilidade dentinária.

Na presente pesquisa, o bicarbonato de arginina + carbonato de cálcio + monofluorofosfato de cálcio (G1-Pro-Argin™ +NaMFP, dentifrício) estabilizou o processo de erosão do esmalte diferindo dos resultados da pesquisa de Faller e Eversole (2013) em que o dentifrício com o composto de bicarbonato de arginina e carbonato de cálcio não mostrou efetividade na proteção do esmalte frente aos desafios erosivos.

O fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo + fluoreto de sódio (G2-Recaldent™+NaF, creme tópico) foi capaz de estabilizar o processo de erosão do esmalte e mostrou os maiores valores médios de microdureza e ΔQ ; neste grupo o valor médio da microdureza após tratamento foi superior ao valor após erosão e o ΔQ apresentou a menor diferença entre os valores após tratamento e após erosão.

Estes resultados corroboram com os achados de outros estudos que também obtiveram menor perda de dureza (Rehder Neto et al., 2009; Srinivasan et al., 2010; Turssi et al., 2011) ou de conteúdo mineral (Hamba et al., 2011; Poggio et al., 2013; Shimaoka, 2010) com o Recaldent™, com ou sem fluoreto de sódio, em comparação aos outros produtos utilizados ou com o grupo controle. Estes resultados positivos observados para o Recaldent™+NaF pode ser justificado pela habilidade da molécula de CPP de estabilizar o ACP, ligando-se 25 íons de cálcio, 15 de fosfato e 5 de flúor, além de ligar-se a todas as estruturas presentes na cavidade oral, como tecidos moles, película de saliva, placa bacteriana, bactérias e hidroxiapatita, disponibilizando um reservatório de cálcio e fosfato durante um ataque cariogênico ou um desafio ácido (Rao; Malhotra, 2011).

A adição do fosfato de cálcio amorfo ao fluoreto de sódio + nitrato de potássio (G3-ACP+NaF, gel) estabilizou a erosão do esmalte, diferente do G7-NaF, em que a associação do fluoreto de sódio + nitrato de potássio não proporcionou ao esmalte a estabilização da erosão, apesar da reconhecida capacidade dos fluoretos para alterar a estrutura dentária, formando a fluorapatita e acelerando o processo de remineralização do esmalte (Garone Filho; Silva, 2008; Naumova et al., 2012; Rao; Malhotra, 2011; Venasakulchai et al., 2010), mas em outras pesquisas o fluoreto demonstrou capacidade para a remineralização do esmalte (Parkinson et al., 2010; Zhi et al., 2013).

O glicerofosfato de cálcio + fluoreto de potássio (G4-CaGP+KF, gel) também estabilizou a erosão, corroborando com os resultados de duas pesquisas anteriores (Barbosa et al., 2012; Puig-Silla et al., 2009) em que o CaGP mostrou resultados positivos na remineralização e proteção do esmalte frente aos desafios ácidos.

O fosfosilicato de cálcio e sódio + fluoreto de sódio (G5-NovaMin®+NaF, pasta profilática) e o fosfosilicato de cálcio e sódio + monofluorofosfato de sódio (G6-NovaMin®+NaMFP, dentifrício) não foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte neste experimento, apesar da sua capacidade de liberação de íons de cálcio e de fosfato, a semelhança dos resultados obtidos em uma pesquisa em que o NovaMin®, assim como o recaldent™ também não demonstraram potencial para a remineralização do esmalte (Wang et al., 2011); mas não podemos desconsiderar os resultados positivos obtidos em outras pesquisas com o produto

NovaMin[®], nas quais foi comprovado a sua eficácia no processo de remineralização do esmalte, apesar de não ter demonstrando resultados superiores ao Recaldent[™] (Rehder Neto et al., 2009; Shimaoka, 2010; Turssi et al., 2011).

Os materiais contendo os compostos bioativos Recaldent[™]+NaF, Pro-Argin[™]+NaMFP, ACP+NaF e CaGP+KF podem ser indicados para uso caseiro ou profissional na prevenção e tratamento das lesões não cariosas erosivas.

Observou-se também nesta pesquisa uma correlação positiva e significativa obtida no Teste de Correlação Linear de Pearson (Tabela 5.3) entre o método do QLF[™] e o teste de microdureza Knoop, demonstrando que os dois métodos são passíveis de comparação e que o método do QLF[™] pode ser considerado como um método válido para os estudos de erosão inicial, com a vantagem de poder ser utilizado em pesquisas clínicas, além dos estudos “in situ” e “in vitro”. Neste tipo de desafio ácido, a preparação dos corpos-de-prova é mais simples e rápida, devendo haver padronização na espessura do esmalte e da dentina para que não haja interferência na fluorescência do esmalte. As leituras podem ser executadas com grande rapidez, desde que seja padronizada a posição do corpo-de-prova na mesa posicionadora, a distância do mesmo em relação a fonte de luz, o tempo de secagem e a iluminação ambiente (Andrade, 2009; Cochrane et al., 2012; Nakata et al., 2009; Shimaoka, 2010). A secagem dos corpos de prova foi realizada com papel absorvente e não com seringa de ar por 30 segundos (Andrade, 2009; Cochrane et al., 2012; Shimaoka, 2010), 15 minutos (Nakata et al., 2009) ou 2 horas (Pretty et al., 2004), com o intuito de evitar a desidratação excessiva do corpo-de-prova e conseguir uma padronização mais confiável na captura das imagens após erosão e após tratamento.

O método do QLF[™] foi desenvolvido originariamente para avaliação de lesões de cárie em associação com o exame clínico de rotina e possivelmente por este motivo foram poucos os estudos encontrados em que o método do QLF[™] foi utilizado para avaliação de lesões de erosão ou foi correlacionado com outros métodos de avaliação e nenhum estudo foi encontrado correlacionando-o com a microdureza. Diante da impossibilidade de comparar com outros experimentos a correlação positiva e significativa dos resultados do QLF[™] com os da microdureza obtida nesta pesquisa, observamos que outras pesquisas que utilizaram o QLF[™]

como método de avaliação de lesões de erosão e o correlacionaram com os resultados obtidos com outros métodos de avaliação como a microradiografia transversal (Cochrane et al., 2012; Pretty et al., 2004), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raio-x por dispersão de energia (Nakata et al., 2009) e fotografia digital (Cochrane et al., 2012) também obtiveram correlação positiva e significativa, demonstrando que o método do QLF™ pode ser considerado como um método válido para os estudos de erosão.

Ablal et al. (2009) encontrou resultados semelhantes para o QLF™ (ΔF), microradiografia transversal e perfilometria de não contato. Apenas uma pesquisa encontrou uma pobre correlação entre os valores do ΔQ (conteúdo mineral em $\%.\text{mm}^2$) obtidos com o QLF™ e a profundidade da lesão medida através da microradiografia transversal, sugerindo que o QLF™ não seria um método adequado para este tipo de comparação nos estudos de erosão avançada (Elton et al., 2009).

Apesar dos resultados positivos encontrados entre o método do QLF™ e da microradiografia transversal (Ablal et al., 2009; Cochrane et al., 2012; Pretty et al., 2004) e perfilometria de não contato (Ablal et al., 2009), Schlueter et al. (2011) sugeriu que estes dois últimos métodos seriam mais adequados para estudos de erosão avançada e o teste de microdureza de superfície seria adequado para estudos de erosão inicial.

7 CONCLUSÕES

Após a finalização dos testes e respectivas análises estatísticas, é possível concluir que:

1. Nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de proporcionar ao esmalte o retorno as suas condições iniciais de microdureza ou conteúdo mineral após os 6 dias de tratamento intercalado com protocolo de erosão.
2. No teste de microdureza, o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (Recaldent™+NaF) demonstrou um potencial maior para a recuperação da microdureza do esmalte em relação ao NovaMin®+NaF, NovaMin®+NaMFP e NaF.
3. No método do QLF™, o bicarbonato de arginina com carbonato de cálcio (Pro-Argin™+NaMPF) demonstrou um potencial maior para a recuperação do ΔQ do esmalte em relação ao NaF e saliva; o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (Recaldent™+NaF) em relação ao NovaMin®+NaMFP, NaF e Saliva e o fosfato de cálcio amorfo (ACP+NaF) em relação ao NaF.
4. Os tratamentos realizados com Pro-Argin™+NaMPF, Recaldent™+NaF, ACP+NaF e CaGP+KF foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte.
5. Os tratamentos realizados com NovaMin®+NaF, NovaMin®+NaMFP, NaF.e Saliva não foram capazes de estabilizar o processo de erosão do esmalte.
6. O método do QLF™ demonstrou ter correlação positiva e significativa com os resultados do teste de microdureza de superfície Knoop, além de apresentar na análise estatística uma coincidência de resultados quase total entre os dois métodos de análise, podendo ser considerado como um método válido para os estudos de erosão inicial.

REFERÊNCIAS¹

Ablal MA, Kaur JS, Cooper L, Jarad FD, Milosevic A, Higham SM, Preston AJ. The erosive potential of some alcopops using bovine enamel: an in vitro study. *J Dent*. 2009 Nov;37(11):835-9.

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

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *J Oral Rehabil*. 1999 Aug;26(8):624-30.

Andrade AP. Monitoramento do processo de desmineralização e remineralização do esmalte dental humano durante e após o clareamento dental [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Bollhalder A, Becker K, Attin T. Effect of acidic solution viscosity on enamel erosion. *J Dent Res*. 2013 Mar;92(3):289-94.

Barbosa CS, Montagnolli LG, Kato MT, Sampaio FC, Buzalaf MA. Calcium glycerophosphate supplemented to soft drinks reduces bovine enamel erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Aug;20(4):410-3.

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

Barlow AP, He J, Tian C, Jeffery P, Mason SC, Tai BJ, Jiang H, Rees GD, Du MQ. A comparative evaluation of the efficacy of two novel desensitising dentifrices. *Intl J Dent*. 2012;2012:896143.

Borcic J, Anic I, Urek MM, Ferreri S. The prevalence of non-carious cervical lesions in permanent dentition. *J Oral Rehabil*. 2004 Feb;31(2):117-23.

Burwell AK, Litkowski LJ, Greenspan DC. Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin): remineralization potential. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):35-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012 Sep-Oct;20(5):493-502.

Caglar E, Sandalli N, Panagiotou N, Tonguc K, Kuscu OO. Prevalence of dental erosion in Greek minority school children in Istanbul. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011 Oct;12(5):267-71.

Cheaib Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res.* 2011;45(2):107-12.

Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):41-7.

Cochrane NJ, Walker GD, Manton DJ, Reynolds EC. Comparison of quantitative light-induced fluorescence, digital photography and transverse microradiography for quantification of enamel remineralization. *Aust Dent J.* 2012 Sep;57(3):271-6.

Corrêa FNP, Cristina M, Carvalho TS, Corrêa MSNP. Diagnóstico, prevenção e tratamento clínico da erosão dentária. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2011;65(1):12-9.

Creanor S, Creanor S, Alharthy N. A comparison of in vitro erosion-like mineral loss between continuous and intermittent acidic exposure with and without human saliva. *Arch Oral Biol.* 2011 Jul;56(7):703-8.

Cummins D. Clinical evidence for the superior efficacy of a dentifrice containing 8.0% arginine and calcium carbonate in providing instant and lasting relief of dentin hypersensitivity. *J Clin Dent.* 2011;22(4):97-9.

Cummins D. Recent advances in dentin hypersensitivity: clinically proven treatments for instant and lasting sensitivity relief. *Am J Dent.* 2010 May;23 Spec No A:3A-13A.

Donassollo TA, Romano AR, Demarco FF, Della-Bona A. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). *Rev Odonto Ciênc.* 2007 out.-dez.;22(58):311-6.

Elias CN, Lopes HP. Materiais dentários: ensaios mecânicos. São Paulo: Santos; 2007.

Elton V, Cooper L, Higham SM, Pender N. Validation of enamel erosion in vitro. *J Dent*. 2009 May;37(5):336-41.

Faller RV, Eversole SL. Enamel protection from acid challenge--benefits of marketed fluoride dentifrices. *J Clin Dent*. 2013;24(1):25-30.

Ferreira MC. Preparo de amostras para a realização do teste de microdureza. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Faculdade de Odontologia; 2004. p. 32.

Fu Y, Li X, Que K, Wang M, Hu D, Mateo LR, DeVizio W, Zhang YP. Instant dentin hypersensitivity relief of a new desensitizing dentifrice containing 8.0% arginine, a high cleaning calcium carbonate system and 1450 ppm fluoride: a 3-day clinical study in Chengdu, China. *Am J Dent*. 2010 May;23 Spec No A:20A-7A.

Gambon DL, Brand HS, Veerman EC. Dental erosion in the 21st century: what is happening to nutritional habits and lifestyle in our society? *Br Dent J*. 2012 Jul;213(2):55-7.

Garone Filho W, Silva VA. Lesões não cariosas: o novo desafio da Odontologia. São Paulo: Santos; 2008.

Grippio JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004 Aug;135(8):1109-18; quiz 63-5.

Gurgel CV, Rios D, Buzalaf MA, da Silva SM, Araujo JJ, Pauletto AR, de Andrade Moreira Machado MA. Dental erosion in a group of 12- and 16-year-old Brazilian schoolchildren. *Pediatr Dent*. 2011 Jan-Feb;33(1):23-8.

Gurunathan D, Somasundaram S, Kumar S. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J*. 2012 Dec;57(4):404-8.

Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography. *J Dent*. 2011 Jun;39(6):405-13.

Hanashiro FS. Avaliação in vitro do efeito do laser de CO² associado ou não à aplicação tópica de flúor, na redução de desmineralização de superfícies radiculares [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Zero DT. The effect of human saliva substitutes in an erosion-abrasion cycling model. *Eur J Oral Sci.* 2008 Dec;116(6):552-6.

Hara AT, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res.* 2009;43(1):57-63.

He T, Cheng R, Biesbrock AR, Chang A, Sun L. Rapid desensitizing efficacy of a stannous-containing sodium fluoride dentifrice. *J Clin Dent.* 2011;22(2):40-5.

Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion--a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater.* 2010 Apr;26(4):326-36.

Huew R, Waterhouse PJ, Moynihan PJ, Maguire A. Dental erosion among 12 year-old Libyan schoolchildren. *Community Dent Health.* 2012 Dec;29(4):279-83.

Iijima Y. Early detection of white spot lesions with digital camera and remineralization therapy. *Aust Dent J.* 2008 Sep;53(3):274-80.

Kakar A, Kakar K, Sreenivasan PK, DeVizio W, Kohli R. Comparison of the clinical efficacy of a new dentifrice containing 8.0% arginine, calcium carbonate, and 1000 ppm fluoride to a commercially available sensitive toothpaste containing 2% potassium ion on dentin hypersensitivity: a randomized clinical trial. *J Clin Dent.* 2012;23(2):40-7.

Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2010;44(2):85-9.

Lachowski KM, Matos AB. Teste de microdureza. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009. p. 23.

Lavender SA, Petrou I, Heu R, Stranick MA, Cummins D, Kilpatrick-Liverman L, Sullivan RJ, Santarpia RP 3rd. Mode of action studies on a new desensitizing dentifrice containing 8.0% arginine, a high cleaning calcium carbonate system and 1450 ppm fluoride. *Am J Dent*. 2010 May;23 Spec No A:14A-9A.

Lussi A. Dental erosion: from diagnosis to therapy. Basel: Karger; 2006.

Lussi A. Dental erosion: novel remineralizing agents in prevention or repair. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):13-6.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:2-12.

Maggio B, Guibert RG, Mason SC, Karwal R, Rees GD, Kelly S, Zero DT. Evaluation of mouthrinse and dentifrice regimens in an in situ erosion remineralisation model. *J Dent*. 2010 Nov;38 Suppl 3:S37-44.

Markowitz K. A new treatment alternative for sensitive teeth: A desensitizing oral rinse. *J Dent*. 2013 Mar;41 Suppl 1:S1-S11.

McKnight-Hanes C, Whitford GM. Fluoride release from three glass ionomer materials and the effects of varnishing with or without finishing. *Caries Res*. 1992;26(5):345-50.

Mello SV, Arvanitidou E, Vandeven M. The development of a new desensitising mouthwash containing arginine, PVM/MA copolymer, pyrophosphates, and sodium fluoride-A hydraulic conductance study. *J Dent*. 2013 Mar;41 Suppl 1:S20-5.

Moimaz S, Araujo P, Chiba F, Garbin C, Saliba N. Prevalence of deciduous tooth erosion in childhood. *Int J Dent Hyg*. 2013 Aug;11(3):226-30.

Nahas Pires Correa MS, Nahas Pires Correa F, Nahas Pires Correa JP, Murakami C, Mendes FM. Prevalence and associated factors of dental erosion in children and adolescents of a private dental practice. *Int J Paediatr Dent*. 2011 Nov;21(6):451-8.

Nakata K, Nikaido T, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Relationship between fluorescence loss of QLF and depth of demineralization in an enamel erosion model. *Dent Mater J*. 2009 Sep;28(5):523-9.

Naumova EA, Niemann N, Aretz L, Arnold WH. Effects of different amine fluoride concentrations on enamel remineralization. *J Dent*. 2012 Sep;40(9):750-5.

Parkinson CR, Shahzad A, Rees GD. Initial stages of enamel erosion: An in situ atomic force microscopy study. *J Struct Biol*. 2010 Sep;171(3):298-302.

Pinheiro HB. Influência de géis clareadores e de um gel remineralizante sobre a ultra-estrutura e microdureza do esmalte e da dentina de dentes humanos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Poggio C, Lombardini M, Vigorelli P, Ceci M. Analysis of Dentin/Enamel Remineralization by a CPP-ACP Paste: AFM and SEM Study. *Scanning*. 2013 Feb 20.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The validation of quantitative light-induced fluorescence to quantify acid erosion of human enamel. *Arch Oral Biol*. 2004 Apr;49(4):285-94.

Puig-Silla M, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Comparison of the remineralizing effect of a sodium fluoride mouthrinse versus a sodium monofluorophosphate and calcium mouthrinse: an in vitro study. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal*. 2009 May;14(5):E257-62.

Que K, Fu Y, Lin L, Hu D, Zhang YP, Panagakos FS, DeVizio W, Mateo LR. Dentin hypersensitivity reduction of a new toothpaste containing 8.0% arginine and 1450 ppm fluoride: an 8-week clinical study on Chinese adults. *Am J Dent*. 2010 May;23 Spec No A:28A-35A.

Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent*. [Review]. 2011 Jul-Aug;32(6):26-33; quiz 4, 6.

Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent*. 2009 Oct;37(10):786-90.

Schiff T, Mateo LR, Delgado E, Cummins D, Zhang YP, DeVizio W. Clinical efficacy in reducing dentin hypersensitivity of a dentifrice containing 8.0% arginine, calcium carbonate, and 1450 ppm fluoride compared to a dentifrice containing 8% strontium acetate and 1040 ppm fluoride under consumer usage conditions before and after switch-over. *J Clin Dent*. 2011;22(4):128-38.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:13-23.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):68-71.

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

Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. *Arch Oral Biol.* 2010 Jul; 55(7):541-4.

Turssi CP, Maeda FA, Messias DC, Neto FC, Serra MC, Galafassi D. Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. *Am J Dent.* 2011 Jun;24(3):165-8.

Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J.* 2010;21(4):332-6.

Venasakulchai A, Williams NA, Gracia LH, Rees GD. A comparative evaluation of fluoridated and non-fluoridated mouthrinses using a 5-day cycling enamel erosion model. *J Dent.* 2010 Nov;38 Suppl 3:S21-9.

Wang X, Megert B, Hellwig E, Neuhaus KW, Lussi A. Preventing erosion with novel agents. *J Dent.* 2011 Feb;39(2):163-70.

Wefel JS. NovaMin: likely clinical success. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):40-3.

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:43-52.

West NX, Macdonald EL, Jones SB, Claydon NC, Hughes N, Jeffery P. Randomized in situ clinical study comparing the ability of two new desensitizing toothpaste technologies to occlude patent dentin tubules. *J Clin Dent.* 2011;22(3):82-9.

White AJ, Gracia LH, Barbour ME. Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. *Caries Res.* 2011;45(1):13-20.

White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *Eur J Oral Sci.* 2010 Dec;118(6):604-9.

Young A, Tenuta LM. Initial erosion models. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:33-42.

Xiong ZH, Xia L, Mei L, Han GZ, Chen YM. [Occluding effects of three new calcium desensitizers on dentinal tubules in vitro]. [Article in Chinese]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2011 Apr;46(4):214-7.

Zhi QH, Lo EC, Kwok AC. An in vitro study of silver and fluoride ions on remineralization of demineralized enamel and dentine. *Aust Dent J.* 2013 Mar;58(1):50-6.