KAREN MÜLLER RAMALHO

**Prevenção da erosão em esmalte dental irradiado com laser de CO₂:
estudo *in situ***

São Paulo

2010

KAREN MÜLLER RAMALHO

**Prevenção da erosão em esmalte dental irradiado com laser de CO₂:
estudo *in situ***

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

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo

São Paulo

2010

Ramalho KM. Prevenção da erosão em esmalte dental irradiado com laser de CO₂: estudo *in situ*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À Deus pelo dom da vida e por iluminar meu caminho durante a realização dessa etapa e desse sonho.

Aos meus pais, Helaine e Luiz, pelo apoio incondicional, incentivo e dedicação, por ser minha referência de determinação, perfeccionismo e por ser meu porto seguro sempre. As minhas irmãs Erika e Karina, pelo apoio, carinho e por serem meus exemplos.

Aos voluntários que participaram desse estudo, pelo sacrifício, confiança e ajuda. Sem vocês esse trabalho não teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, meu orientador, pelo exemplo de determinação, empreendedorismo, amor e dedicação a profissão, pelos ensinamentos, pelas tantas oportunidades, pelo exemplo de profissionalismo como pesquisador, cirurgião dentista e gestor, pelo grande exemplo como ser humano e principalmente a amizade. Muito obrigada pela sua determinação e esforço durante todo o meu Doutorado até a concretização do duplo diploma entre a Universidade de São Paulo e RWTH. Com certeza todos os seus ensinamentos seguirão comigo por toda minha vida.

Ao **Prof. Dr. Friedrich Lampert** pela oportunidade de desenvolver minha tese de doutorado no Uniklinikum – RWTH, Aachen, pela orientação do meu trabalho, pela atenção, pelo carinho com o qual me recebeu, pela ajuda nos momentos difíceis da pesquisa, pelo grande empenho e dedicação para a concretização da co-tutela entre a Universidade de São Paulo e RWTH, possibilitando a concretização do duplo diploma.

Ao **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, inicialmente meu orientador, logo após o ingresso no programa de pós graduação, pela oportunidade de realizar meu doutorado no departamento de estomatologia, área de concentração em clínica integrada. Muito obrigada pela confiança e pelo carinho com o qual sempre me recebeu.

À **Prof^a. Dr^a. Marcella Esteves Oliveira**, minha amiga e co-orientadora pela amizade tão especial e de tantos anos, que se iniciou em Aachen, pela oportunidade de poder desenvolver minha tese de doutorado na RWTH e poder aprender tanto com você durante esse período. Admiro muito sua determinação, inteligência e perfeccionismo com o qual realiza tudo o que faz, o carinho com o qual trata sua equipe, seus colegas e seus amigos de Aachen. Esses seis meses em Aachen foram inesquecíveis.

Ao **Professor Christian Apel** e a sua família, pelos ensinamentos desde a primeira vez que estive em Aachen, pelas opiniões e ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pela amizade e carinho com o qual sempre me receberam.

Aos Professores do Departamento de Estomatologia – Disciplina de Clínica Integrada: **Mário Sérgio Soares, Waldyr Antonio Jorge, Carlos Alberto Adde, Flávio Eduardo Guillin Perez, Inês Aparecida Buscariolo, Isabel Peixoto Tortamano, José Leonardo Simone, Marcelo Munhões Romano, Maria Aparecida Borsatti, Sibeles Sarti Penha e Carina Domaneschi**

Às funcionárias Departamento de Estomatologia: **Vilminha e Verinha** por terem me recebido tão bem no departamento. Muito obrigada pelos ensinamentos e bons momentos.

As Professoras **Ana Cecília C. Aranha e Patrícia Moreira de Freitas** pela amizade, pelo carinho, pelas oportunidades, conselhos, troca de experiência e aprendizados.

Ao Professor **Décio dos Santos Pinto Junior** do Departamento de Patologia, pela ajuda nas microscopias de polarização.

Aos **voluntários** desse estudo, o meu mais sincero agradecimento, pela cooperação, confiança e ajuda.

Ao **Vinicius** pelo carinho, compreensão durante minhas ausências e ao apoio nessa etapa final.

A **Patricia Butler**, da RWTH pela sua grande ajuda nesse estudo, pela sua amizade tão especial, pelas conversas descontraídas.

A amiga **Marina Bello**, pela amizade, por dividir comigo todas as dificuldades que encontrávamos, pelo carinho e ajuda.

Aos amigos da pós-graduação: **Ana Carolina, Helana, Renata, Bauer, Maurício e Kazue** pelos momentos, risadas e convívio.

As queridas funcionárias do LELO: **Liliane** e **Eugênia (Ge)**, pelo carinho e ajuda sempre que precisei.

As funcionárias da Pós-Graduação: **Alessandra** e **Katia** pela imensa ajuda e cooperação

Ao Dr. **Sergio Guerra Sartor**, Subgerente de Serviços de Saúde (COVISA), pela imensa ajuda e apoio sempre que precisei, e aos meus amigos de equipe, **Ciro** e **Alessandra**, pela compreensão, ajuda e carinho.

A todos os queridos amigos do LELO e da FOUSP pelo carinho, apoio e convívio

Em especial, agradeço a Agência de Fomento Forschungsgemeinschaft (FGD) dental pelo apoio financeiro durante minha estadia em Aachen e as Faculdades de Odontologia da Universidade de São Paulo e faculdade de Odontologia da RWTH (Aachen, Alemanha) pela oportunidade.

“Tudo o que um sonho precisa para ser
realizado é alguém que
acredite que ele possa ser
realizado”.

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Ramalho KM. Prevenção da erosão em esmalte dental irradiado com laser de CO₂: estudo *in situ*. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

A incidência de lesões dentais não cariosas vem aumentando nos últimos anos, entre outros fatores devido a mudanças de hábitos alimentares da população, assim como ao aumento na frequência de indivíduos que apresentam distúrbios gastro-esofágicos ou doenças como bulimia. Esse estudo teve como objetivo avaliar se o *laser* de CO₂ associado ou não ao flúor poderia prevenir a erosão ácida causada por ácido cítrico em esmalte. 10 voluntários participaram desse estudo *in situ* e cruzado, onde 4 tratamentos foram testados: G1 – controle, sem tratamento; G2 – irradiação com *laser* de CO₂ através dos parâmetros: 0.3J/cm²-5µs-226Hz; G3 – aplicação tópica de flúor (1.25% - 3 minutos); G4 – aplicação tópica de flúor + *laser* de CO₂). Durante cada tratamento os voluntários utilizaram durante o dia e noite, exceto durante as refeições e higiene bucal, dispositivo palatino removível contando amostras de esmalte bovino esterilizadas. A desmineralização das amostras foi realizada através da imersão do dispositivo palatino contendo as amostras em 80 ml de ácido cítrico (0.05M – pH 2.3) durante 20 minutos 2 vezes ao dia (entre 6:00 e 9:00 horas a primeira imersão e entre 18:00 e 21:00 horas na segunda imersão). Durante toda a pesquisa a higiene bucal foi realizada pelos voluntários com pasta dentifrícia sem flúor e sem o dispositivo palatino *in situ*. Antes e durante os tratamentos o intervalo de 7 dias foi mantido. Duas amostras foram coletadas do dispositivo palatino de cada voluntário nos dias 1, 3 e 5 (n=20/dia/tratamento). A perda de estrutura foi medida utilizando-se um perfilômetro digital. Mensurações da quantidade de flúor através da técnica de biópsia e espectroscopia de fluorescência de Raios-X por energia dispersiva (EDX) e análises morfológicas foram realizadas nos grupos nos dias 1, 3 e 5. Nos testes realizados *in vitro*, os mesmos tratamentos foram realizados durante os mesmos tempos, no entanto, ao invés das amostras estarem presas ao dispositivo palatino na cavidade bucal dos voluntários, as mesmas foram armazenadas em água deionizada em temperatura ambiente (n=12/dia/tratamento). Os resultados mostraram que os grupos *laser* e flúor + *laser* apresentaram uma redução significativa (p<0.05) na perda de estrutura de esmalte

em todos os tempos tanto no modelo *in situ* quanto *in vitro*. O grupo flúor apresentou uma redução significativa apenas no modelo *in vitro* ($p < 0.05$). A análise por EDX mostrou que o grupo flúor + *laser* apresentou um aumento significativo quantidade de flúor comparado aos outros grupos, assim como as mensurações de flúor através da técnica de biópsia revelaram que apenas no dia 1 os grupos flúor + *laser* e flúor apresentaram uma quantidade significativa de flúor ($p < 0.05$). A irradiação com *laser* de CO₂ com os parâmetros de baixa fluência (0.3J/cm², 5µs e 226Hz), associada ou não ao flúor, deixou a superfície de esmalte mais resistente a erosão do causada por ácido cítrico tanto *in situ* quanto *in vitro*.

Palavras-chave: Esmalte. Erosão. *Laser*. Flúor.

ABSTRACT

Ramalho, KM. Prevention of enamel erosion through CO₂ laser irradiation. An *in situ* study. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Dental erosion is increasing as consequence of changing habits from the population, as well as increase of prevalence gastric reflux or vomiting. The possibility of making dental enamel more resistance to erosion is the objective of this study. 10 volunteers participated in the *in situ* study, in a crossover design with 4 treatments (G1 – control, no treatment; G2 – CO₂ laser irradiation; 0.3J/cm²-5μs-226Hz; G3 – topical fluoride treatment – 1.25% - 3 min; G4 - CO₂ laser + fluoride treatment). For each treatment the volunteers used palatal appliances containing fixed sterilized bovine enamel samples during day and night except for meals. For erosive demineralization the mouth appliances were immersed extra-orally in 80ml of 0.05M citric acid (pH 2.3) for 20 minutes twice daily. Individual oral hygiene was performed with fluoride-free products and without the appliance *in situ*. Before and between the treatment periods, a 1 week wash out period was included. Two samples were collected from the appliances for analysis on days 1, 3 and 5 (n=20/day/treatment). Surface loss was measured by digital profilometer. Additional fluoride measures, morphological analyses and EDX analyses were performed. For the *in vitro* model all the procedures were repeated, but instead of maintaining the samples in oral cavity, they were maintained for the same time in deionized water (n=12/day/treatment) and the surface loss was analyzed by digital profilometer. The results showed that the groups laser and fluoride + laser presented significant lower surface loss in all times both *in situ* and *in vitro* models. Fluoride presented significant surface loss only in the *in vitro* model. The EDX analysis, showed that fluoride + laser group presented significant more fluoride than the others groups, and the fluoride measurements of the samples showed that only in the first day the groups fluoride and fluoride + laser presented significant more fluoride than the other groups. CO₂ laser irradiation at 0.3J/cm² (5μs, 226Hz) associated or not with fluoride decreases enamel erosive surface loss caused by citric acid, *in situ* and *in vitro*.

Keywords: Enamel. Erosion. Laser. Fluoride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Teste Salivar.....	48
Figura 4.2 - Procedimentos realizados pelos voluntários em 24 horas.....	51
Figura 4.3 - Preparo das amostras	52
Figura 4.4 - Montagem do dispositivo palatino	53
Figura 4.5 - Foto do dispositivo palatino	53
Figura 4.6 - Laser de CO ₂	55
Figura 4.7 - Modelo da análise profilométrica.....	57
Figura 5.1 - Imagens das amostras do modelo <i>in situ</i>	64
Figura 5.2A - Perfilometria 3D das amostras no dia 1	71
Figura 5.2B - Perfilometria 3D das amostras no dia 3.....	72
Figura 5.2C - Perfilometria 3D das amostras no dia 5.....	73
Figura 5.3 - Imagens por microscopia de luz polarizada	74
Figura 5.4A - Microscopia de polarização no dia 1	75
Figura 5.4B - Microscopia de polarização no dia 3.....	76
Figura 5.4C - Microscopia de polarização no dia 5	77
Figura 5.5 - Micrografias e análise de flúor, cálcio e fosfato	78

Figura 5.6 - Micrografias da superfície das amostras no modelo *in situ* no dia 183

Figura 5.7 - Micrografias da superfície das amostras no modelo *in situ* no dia 384

Figura 5.8 - Micrografias da superfície das amostras no modelo *in situ* no dia 585

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Análise do pH salivar dos voluntários.....	62
Gráfico 5.2 - Análise do fluxo salivar dos voluntários.....	63
Gráfico 5.3 - Análise da capacidade tampão da saliva dos voluntários.....	63
Gráfico 5.4 - Análise profilométrica da profundidade das lesões das amostras no modelo <i>in situ</i>	65
Gráfico 5.5 - Análise profilométrica da profundidade das lesões das amostras no modelo <i>in vitro</i>	67
Gráfico 5.6 - Análise do conteúdo do flúor das amostras no modelo <i>in situ</i>	69
Gráfico 5.7 - Análise do conteúdo de flúor nas amostras analisadas através de EDX.....	80
Gráfico 5.8 - Análise do conteúdo de fosfato nas amostras analisadas através de EDX.	81
Gráfico 5.9 - Análise do conteúdo de cálcio nas amostras analisadas através de EDX.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - pH, quantidade de base necessária para elevar o pH para 7,0, quantidade de fósforo, cálcio, concentração de flúor e microdureza de superfície (MD) de diferentes bebidas.....	23
Tabela 2.2 - Resumo dos estudos avaliando diferentes compostos fluoretados e diferentes concentrações a partir de 2007.....	35
Tabela 4.1 - Distribuição das amostras (<i>in situ</i>)	49
Tabela 4.2 - Distribuição das amostras (<i>in vitro</i>)	55
Tabela 5.1 - Médias e desvio padrão da profundidade das lesões no modelo <i>in situ</i>	66
Tabela 5.2 - Diferenças significantes no modelo <i>in situ</i>	66
Tabela 5.3 - Médias e desvio padrão da profundidade das lesões no modelo <i>in vitro</i>	67
Tabela 5.4 - Diferenças significantes no modelo <i>in vitro</i>	68
Tabela 5.5 - Médias e desvio padrão da quantidade de flúor no modelo <i>in situ</i>	69
Tabela 5.6 - Diferenças significantes na quantidade de flúor no modelo <i>in situ</i>	70
Tabela 5.7 - Médias e desvio padrão na quantidade de flúor, cálcio e fosfato após análise por EDX	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	alfa
α -TCP	Alfa-tri-calcio-fosfato
β	beta
β -TCP	Beta-tri- calcio-fosfato
cm^2	Centímetro quadrado
SnCl_2	Cloreto de estanho
CO_2	dióxido de carbono
Er:YAG	erbium:yttrium-aluminum garnet
NaF	fluoreto de sódio
APF	fúor fosfato acidulado
SnF_2	Fluoreto de estanho
CaF_2	Fluoreto de cálcio
AmF	Fluoreto de amina
AF	fluorapatita
$^{\circ}\text{C}$	graus centígrados
Hz	Hertz
HA	hidroxiapatita
OH^-	Ion hidroxil
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
J	joule
λ	Lambda
μm	micrometros
ms	milisegundos
μs	microsegundos
mJ	milijoule
min	minutos
<	menor que
>	maior que
Nd:YAG	Neodymium: yttrium aluminium garnet

KNO_3	Nitrato de potássio
ppm	Parte por milhão
%	porcentagem
TCP	Tri-cálcio-fosfato
TiF_4	Tetrafluoreto de titânio
TET	Tetra-cálcio-fosfato
W	watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Eventos químicos que envolvem a erosão dental.....	22
2.2 Fatores biológicos modificadores	25
2.3 Métodos de controle da erosão dental	28
2.4 Papel da alta concentração de flúor na prevenção da erosão dental ..	31
2.5 Fatores relevantes para o desenvolvimento do processo de erosão dental	38
2.6 Lasers de alta potência na prevenção da desmineralização	39
2.7 Interação do esmalte com o laser de CO ₂	40
2.8 Prevenção da desmineralização com laser de CO ₂	41
2.9 Prevenção da erosão dental com o laser de CO ₂ (10.6 µm)	44
3 OBJETIVOS	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Modelo in situ	48
4.2 Teste Salivar	49
4.3 Grupos.....	51
4.4 Modelo experimental	52
4.5 Preparo das amostras	53
4.7 Aplicação tópica de Flúor	56
4.8 Irradiação com laser	57
4.9 Modelo <i>in vitro</i>	58
4. 10 Fotos das amostras	59
4. 11 Análise profilométrica	59
4.12 Análise profilométrica em 3D.....	60
4.13 Análise de Flúor	61
4. 14 Microscopia eletrônica de varredura	62
4. 15 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X.....	62
4. 16 Microscopia de polarização	63
4.17 Análise estatística	64

5 RESULTADOS.....	65
5.1 Resultados dos testes salivares	65
5.2 Imagens das amostras do modelo <i>in situ</i> após 1, 3 e 5 dias	67
5.3 Análise da profundidade de lesão através de profilometria	68
5.4 Análise da concentração de flúor	71
5.5 Análise por perfilometria em 3D	73
5.6 Imagens por microscopia de luz polarizada	77
5.7 Imagens por microscopia de luz polarizada.	78
5.8 Microscopia eletrônica de varredura e EDX.....	81
5.9 Microscopia eletrônica de varredura	86
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÕES	109
REFERENCIAS.....	110
ANEXO	129

1 INTRODUÇÃO

A incidência das lesões não cariosas vem aumentando nas últimas décadas, devido ao aumento de distúrbios alimentares como bulimia, distúrbios gastro-esofágicos como refluxo e a mudanças de hábitos alimentares da população. Atualmente a um consumo muito maior de bebidas ácidas pela população e sabe-se que o consumo de bebidas ácidas quatro ou mais vezes ao dia está diretamente relacionado ao desenvolvimento de erosão dental.

Diversos fatores biológicos estão relacionados ao desenvolvimento da erosão dental. Os mais relevantes são a proteção exercida pela saliva e película adquirida. A saliva exerce papel na diluição, tamponamento dos ácidos assim como a remineralização da superfície do esmalte previamente submetido à desmineralização ácida. A película adquirida se comporta como uma barreira mecânica impedindo a difusão dos ácidos e protegendo a superfície dental. O modelo *in situ*, adotado nesse estudo, permite a atuação desses importantes fatores biológicos na progressão da erosão dental.

Alguns modos de prevenção de erosão dental já foram descritos na literatura, dentre eles a redução/eliminação no consumo de bebidas ácidas, evitar hábitos como bochechar ou manter a bebida ácida por períodos prolongados na cavidade bucal, evitar escovar os dentes antes e imediatamente após o consumo de bebidas ácidas, diagnóstico e tratamento de refluxo gastro-esofágico, entre outros. No entanto até o presente momento não existe nenhum tratamento ou mesmo terapia preventiva completamente eficiente para a erosão dental.

A fim de tornar o esmalte mais resistente a desmineralização ácida ou promover uma remineralização eficiente do mesmo, diversos estudos foram realizados avaliando o efeito de variados compostos fluoretados, altas concentrações de flúor como componente de pastas dentífricas, gel, vernizes e bochechos na prevenção da erosão associada ou não a abrasão dental tanto *in situ* quanto *in vitro*. A adição em bebidas ácidas de componentes minerais (cálcio e

fosfato), assim como a adição de flúor já foram propostos na literatura como meios de prevenção da erosão dental. As bebidas ácidas modificadas por minerais apresentaram resultados significantes na prevenção da erosão, no entanto, não previnem completamente seu desenvolvimento. A utilização de flúor, também parece apresentar uma eficiência parcial na prevenção da erosão e remineralização de tecido previamente submetido à erosão ácida. No entanto, a literatura se mostra muito controversa com relação ao efeito do flúor na prevenção da erosão dental.

Alguns *lasers* de alta potência mostraram efeitos significantes na prevenção de cárie, especialmente o *laser* de CO₂. O *laser* de CO₂ apresenta alta absorção em esmalte e dentina e já foi demonstrada sua capacidade de alteração na composição química e alteração morfológicas em esmalte e dentina, levando a uma superfície menos solúvel. A irradiação utilizando-se largura de pulso mais curta demonstrou várias vantagens como maior aumento de temperatura localizado na superfície de esmalte, oferecendo vantagens como menor propagação de calor gerado na superfície para o interior da estrutura dental e também pela a possibilidade de se atingir efeitos preventivos, com menor fluência.

Poucos estudos na literatura avaliaram o efeito do *laser* de CO₂ na prevenção da erosão dental *in vitro*, não obtendo resultados positivos. No entanto, esses estudos utilizaram energias altas e larguras de pulsos maiores. Nenhum estudo *in situ* foi realizado utilizando o *laser* de CO₂ com pulso curto e fluências baixas na prevenção da erosão dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A incidência de lesões não cariosas vem aumentando nas últimas décadas, devido ao declínio da perda de dentes por doenças infecciosas e mudanças de hábitos alimentares da população, entre outros fatores (1).

A perda de tecido dental está relacionada à perda patológica através de outros processos não relacionados ao processo de cárie (2). As lesões dentais não cariosas podem ser classificadas em atrição, erosão, abrasão e abfração (3). Atrição é definida como a perda de esmalte, dentina ou materiais restauradores através do contato entre dentes, por exemplo, durante a deglutição e fonação (3). Erosão é definida como a dissolução de tecido dental por ácidos sem o envolvimento de microrganismos. Abrasão é a perda patológica de tecido dental decorrente de processos mecânicos (3). O termo abfração é usado para descrever uma forma especial de defeito em forma de cunha na região cervical de um dente, resultado de forças aplicadas excêntrica (3). Autores sugerem que a forma das lesões está relacionada à sua etiologia (4). Lesões com margens bem definidas seriam causadas por fatores abrasivos, as lesões de erosão envolveriam áreas mais amplas e bordas menos definidas (5).

A prevalência de lesões não cariosas já foi reportada variando de 5 a 85% (5-10). Essa ampla variação reflete os poucos estudos epidemiológicos publicados, reportando a prevalência de lesões não cariosas isoladamente, assim como a larga variação na população analisada (3). No município de Diadema, no estado de São Paulo, Brasil, um estudo avaliou a prevalência de erosão dental em 967 crianças e verificou que 51,6% apresentavam a patologia. A maioria das lesões acometia apenas o esmalte (82,5%) (11). Através desses estudos pode-se concluir que a perda de estrutura dental é quase que uma condição universal, sendo que a perda severa de dentina é condição menos prevalente, variando de 2 a 4%. Todos os estudos epidemiológicos mostram uma tendência de aumento da incidência desse tipo de lesão com a idade (12).

Um dos primeiros estudos que introduziram o conceito que a abrasão dental é acelerada após redução da dureza e/ou dissolução do esmalte quando em contato com diversos ácidos foi realizado em 1980 (13). Esse estudo foi então suportado por numerosos outros estudos laboratoriais subseqüentes mostrando que o dano ao tecido dental causado pela associação entre erosão e abrasão é muito maior do que quando ambos atuam isoladamente (13-15).

Nos dias atuais, devido a mudança de hábitos da população, o diagnóstico da erosão dental nos consultórios odontológicos está sendo muito mais frequente. A erosão dental pode ser causada por inúmeros fatores dentre eles intrínsecos e extrínsecos (16).

Fatores extrínsecos incluem o consumo de alimentos e bebidas ácidos, bebidas carbonatadas, bebidas esportivas, vinhos branco e tinto, frutas cítricas, e em menor frequência, exposição ocupacional a ambientes ácidos (1, 16). O consumo de bebidas ácidas nos EUA aumentou 300% nos últimos 20 anos (17). Atualmente existe um consenso que o consumo de quatro ou mais bebidas ácidas por dia está associado com o risco de desenvolvimento de erosão dental (18). Os fatores intrínsecos mais comuns incluem as desordens gastro-esofágicas, bem como problemas de saúde como anorexia e bulimia, onde regurgitação e vômitos freqüentes são comuns (1, 19, 20).

2.1 Eventos químicos que envolvem a erosão dental

O potencial erosivo de uma substância não é exclusivamente dependente do valor do seu pH ou tipo de ácido, mas também diretamente relacionada a sua capacidade quelante, conteúdo mineral, temperatura, acidez titulável e adesão da substância a superfícies dental (21-23).

Zero e Lussi (1) descreveram as propriedades químicas de diferentes bebidas e alimentos (Tabela 2.1). O pH, a quantidade (titulável) de base necessária para elevar o pH para 7, a concentração de cálcio, fosfato e fluoreto e análise de alteração da microdureza de superfície do esmalte. As medições de microdureza foram realizadas antes e após a imersão por seis minutos em determinado alimento ou bebida. Um valor positivo indica um aumento da microdureza da superfície, enquanto um valor negativo representa amolecimento (1).

Tabela 2.1 - pH, quantidade de base necessária para elevar o pH para 7,0, quantidade de fósforo, cálcio, concentração de flúor e microdureza de superfície (MD) de diferentes bebidas (1)

Alimento/ Bebida	pH	OH ⁻ para pH 7 mmol/l	P mmol/l	Ca mmol/l	Flúor ppm	MD antes de imersão	MD após imersão (6min)	Diferença na MD
Suco de maçã	3.00	102	1.7	2.3	0.220	352	151	- 201
Suco de laranja natural	3.64	136	5.7	2.1	0.030	353	209	- 144
Suco de laranja	3.74	124	2.9	1.9	0.125	348	289	-59
Iogurte de laranja	4.08	101	43.0	32.0	0.050	354	355	+ 1
Chá gelado	3.00	26	0.1	0.6	0.825	338	187	- 151
Cola-cola (sem gás)	2.60	34	5.4	0.8	0.131	349	186	- 163

Os eventos que levam à erosão química são complexos. Quando uma solução entra em contato com a superfície do esmalte dental, ela primeiramente tem que sofrer difusão através da película adquirida, que é um filme de componentes orgânicos principalmente de proteínas e glicoproteínas salivares que cobrem a superfície dos dentes. Após difusão pela película a substância ácida irá interagir com a fase mineral do dente (1). Uma vez em contato com o esmalte, os íons hidrogênio (que podem apresentar também capacidade quelante) iniciam o processo de

dissolução do conteúdo mineral. A forma ionizada do ácido, então, difunde-se para as áreas de esmalte interprismático, levando à dissolução do conteúdo mineral (24), através da perda de íons minerais do dente (cálcio e fosfato) culminando com um aumento no pH na superfície do tecido afetado.

Esse processo de dissolução mineral é interrompido quando nenhum ácido e/ou substância quelante entra em contato novamente com a estrutura dental. O processo de agitação, quando, por exemplo, há bochecho da substância ácida na cavidade bucal, irá potencializar o processo de dissolução, uma vez que a solução adjacente ao esmalte será rapidamente renovada, sempre levando a um estado de subsaturação mineral da substância em contato com a superfície do esmalte. Esse estado levará à perda mineral do esmalte para o meio (24).

Adicionalmente, a quantidade de bebida na cavidade bucal em relação ao montante de saliva irá regular positivamente ou negativamente o processo de dissolução do tecido dental. Uma quantidade de saliva ideal, além de promover a diluição da bebida também poderá reduzir o valor do seu pH através da capacidade tampão inerente à saliva (24).

O ácido cítrico, comumente encontrado em diversas bebidas, apresenta propriedade quelante para o cálcio. Essa capacidade de ligação ao cálcio aumenta o estado de sub-saturação do meio em relação à superfície de esmalte, favorecendo ainda mais a desmineralização (1). Meurman e Frank (25) verificaram que entre os ácidos málico, fosfórico e cítrico, o ácido cítrico foi o primeiro a causar erosão no esmalte bovino após 15 minutos em solução (25).

Em uma bebida, o valor do pH, da concentração de cálcio e fosfato, além da concentração de flúor em menor grau, são fatores importantes para determinação do seu potencial erosivo (26, 27). O conteúdo mineral de uma bebida determina o seu grau de saturação em relação à porção mineral do dente, que é a força motriz para dissolução do conteúdo mineral do dente (28). Soluções supersaturadas com relação ao tecido dental não levam a dissolução mineral do dente. A deposição de cálcio e fosfato salivares pode levar a remineralização do esmalte dental previamente desmineralizado (29, 30).

Outros fatores como temperatura da bebida também influenciam seu potencial erosivo (31). A ingestão de uma bebida ácida gelada (4°C) aparentemente reduz seu potencial erosivo (21). A capacidade de adesão à superfície dental da substância ácida também é um fator a ser considerado no processo erosivo. Parece haver diferenças na capacidade de bebidas para aderir ao esmalte com base em suas propriedades termodinâmicas (32).

2.2 Fatores biológicos modificadores

Os fatores biológicos que modificam o processo de erosão incluem a saliva, a composição e estrutura do dente, a anatomia dental e oclusão, a anatomia dos tecidos moles bucais em relação aos dentes e os movimentos fisiológicos, como por exemplo, o padrão de deglutição (33, 34). A associação de todos estes fatores é fundamental para entender o favorecimento individual de algumas pessoas para desenvolver erosão, mesmo que expostas ao mesmo desafio ácido (22, 35).

Destas, as propriedades de proteção da saliva e sua contribuição para a formação da película adquirida podem ser consideradas de maior importância. As funções protetoras da saliva são: diluição e depuração de substâncias erosivas da boca; neutralização dos ácidos e tamponamento; manutenção de um estado mineral supersaturado próximo à superfície do dente devido à presença de cálcio e fosfato, fornecimento de cálcio, fosfato e, possivelmente, flúor necessários para a remineralização da estrutura dental. Tanto a quantidade como a qualidade da saliva podem ser responsáveis por algumas das diferenças observadas na susceptibilidade de diferentes pacientes à erosão (1).

Alguns componentes da saliva, em especial a mucina, uma glicoproteína, parecem oferecer certa proteção contra erosão ácida. A mucina é a mais comum proteína da saliva (36), um componente importante da película adquirida, e o principal componente lubrificante da saliva (37-39). Na secreção gástrica, a mucina

tem um importante papel de proteção da mucosa gástrica contra o ácido clorídrico (HCl).

Hara et al. (40) testaram o efeito de substitutos da saliva humana, especialmente a mucina, em um modelo de ciclagem de erosão/abrasão em esmalte e dentina radicular. Os espécimes foram distribuídos em três grupos ($n = 8$): saliva artificial (SA), saliva artificial + mucina (SA + M), água deionizada (AD, controle negativo), e saliva humana coletada (SH). Cada grupo foi submetido a um ciclo de 5 minutos em ácido cítrico a 1%, seguido de 30 minutos nas soluções de teste e escovação dentária (esmalte, 500 cursos de escovação; dentina, 150 cursos, 200 g de carga) de dentifrício fluoretado (1100 ppm NaF). Esse ciclo foi repetido três vezes por dia, durante 3 dias. A perda de substrato foi medida diariamente através de perfilômetro. No final do experimento, o desgaste do esmalte para cada grupo foi classificado como: (SA) < (SA + M) e (SH) < (AD), com SA + M não diferindo de SH. Para a dentina, os grupos SA e SA + M não diferem entre si, ou de AD, mas apresentaram maior desgaste do que o SH. A saliva artificial com mucina mostrou resultados satisfatórios como substituta da saliva humana no modelo de erosão/abrasão do esmalte. Para a dentina, nenhum dos grupos apresentou resultados satisfatórios.

Outro papel importante da saliva está relacionado com a formação da película adquirida (41-47). Esta película a base de proteínas se comporta como uma barreira de difusão ou uma membrana semi-seletiva, evitando o contato direto entre os ácidos e a superfície do dente e, assim, inibindo a desmineralização (44, 45). Qualquer procedimento que remova ou reduza a espessura da película pode comprometer a sua capacidade de proteção e acelerar o processo de erosão. Procedimentos como escovação com dentifrícios abrasivos, limpeza profissional com pasta profilática, entre outros, irá remover a película e pode tornar os dentes mais suscetíveis à erosão (33).

O tempo de maturação da película é um fator importante relacionado à sua capacidade de proteger a superfície dental contra um agente erosivo. Uma película recém formada dificilmente será uma barreira de difusão eficiente a um agente erosivo. Somente quando a película amadurece e atinge uma determinada

espessura pode retardar o processo de difusão de substâncias ácidas (1). A película adquirida torna-se detectável na superfície dental após alguns minutos de exposição ao ambiente oral (48-50). O tempo necessário de formação para a película proporcionar proteção contra erosão ácida não é ainda elucidado. Alguns estudos relatam efeitos protetores de película adquirida formada por após 3 minutos (46), enquanto outros relatam 7 dias (43). Skjorland et al. (50) verificaram em seu estudo *in vivo* que a película adquire uma espessura inicial em cerca de 2 a 3 minutos, em que permanece nos 30 minutos subseqüentes. A espessura da película adquirida então triplica de espessura, permanecendo do mesmo tamanho durante todo o período experimental (10 horas) (50). O tempo mais comum de formação de uma película adquirida encontrado na literatura até que ela atinja o equilíbrio é de 2 horas (51).

Hata et al. (52) verificaram *in situ* o efeito de película adquirida (com duas horas de formação) na prevenção da erosão ácida causada por diversos tempos (0, 10, 20 e 30 minutos). Os resultados mostraram que as amostras de esmalte dental com película adquirida mostraram percentual de alteração de microdureza menor, apenas após 10 minutos de desafio ácido. Nenhuma proteção foi encontrada para a dentina. Concluiu-se que o efeito protetor da película adquirida era limitado a menores tempos de desafio ácido na superfície do esmalte. O autor sugeriu que uma maior proteção ao esmalte pode ser encontrada com tempos de formação de película maiores de 2 horas (51). Maiores tempos de maturação da película adquirida levam à maior proteção do esmalte frente a um desafio ácido (53, 54). Segundo o autor, a ingestão de 400 ml de suco de laranja com 10 a 20 minutos de exposição ao ácido cítrico pode representar a ingestão de um copo de bebida regular em condições reais. O autor também acrescentou que a repetição do protocolo para 2 a 3 vezes consecutivas, simulando o consumo de 2 e 3 copos de bebida ácida, não permite a re-organização da película adquirida ou que a remineralização possa ocorrer. Nesse caso não há interferência da película adquirida no desenvolvimento de erosão ácida (52).

Além disso, quanto maior acidez titulável de uma bebida ou alimento ácido, maior o tempo necessário para a saliva neutralizar o ácido. Para o suco de laranja natural, uma quantidade de 124mmol/l de base é necessária para elevar o pH a 7,

ao passo que para a Coca-Cola (sem gás) a quantidade de 34mmol/l é necessária. No entanto, uma vez desmineralizada, a superfície dental tem mostrado uma capacidade limitada de remineralização em um curto período de tempo de exposição à saliva (48, 55, 56).

2.3 Métodos de controle da erosão dental

A erosão é um processo lento, no qual os pacientes só adquirem consciência quando a erosão dental já se encontra em um estágio avançado. Dessa forma a detecção precoce por cirurgiões dentistas é de grande importância nesse tipo de patologia (31). É evidente que a maneira mais eficaz de prevenir a erosão é eliminar os fatores etiológicos, sejam de origem intrínseca ou extrínseca. Uma análise cuidadosa da história médica do paciente, de seus hábitos alimentares e de fatores predisponentes é essencial (57).

A avaliação da função das glândulas salivares é de grande importância, devido à forte associação entre diminuição do fluxo salivar e a susceptibilidade à erosão dental (1). Em muitos casos, pode se tornar difícil isolar um fator devido à natureza multifatorial das lesões de erosão dental. A educação é a primeira etapa no tratamento da maioria dos pacientes que apresentam erosão dental (1).

As recomendações mais comuns encontradas na literatura são:

- Encaminhamento dos pacientes para atendimento médico especializado quando da presença de fatores intrínsecos como anorexia, bulimia ou doença gastro-esofágica, com ou sem refluxo aparente (1).
- Redução ou eliminação da exposição freqüente a bebidas ácidas (1).
- Alteração de hábitos como bochechar bebidas ácidas ou mantê-las na cavidade bucal por períodos prolongados antes da deglutição (1).
- Evitar escovar os dentes imediatamente antes do contato da estrutura dental com ácidos extrínsecos provenientes de bebidas, ou intrínsecos como vômito, por exemplo. A película adquirida fornece proteção contra a erosão ácida, e escovar os dentes, principalmente com dentífrico abrasivo, irá remover essa proteção (1).
- Evitar escovação dos dentes imediatamente após o consumo de bebidas ácidas ou contato da estrutura dental com qualquer tipo de substância ácida. Após o contato com o ácido o esmalte apresenta dureza reduzida e maior susceptibilidade à perda de estrutura dental. Deve-se aguardar no mínimo 1 hora para escovação dos dentes (48, 56, 58). Deve-se preconizar apenas bochecho com água.
- Utilizar escova dental macia, não exercendo força sobre a mesma e utilização de dentífricos com baixa abrasividade (59).
- Fazer uso ou ingerir após erosão ácida, soluções ou alimentos que apresentam potencial de remineralização e/ou neutralização que podem conter flúor, bicarbonato de sódio, leite, ou comidas como queijo, iogurte sem açúcar (1, 59).
- Estimular o fluxo salivar com, por exemplo, gomas de mascar sem açúcar ou pastilhas desenvolvidas para esse propósito. O uso de pastilhas é mais indicado visto que a goma de mascar pode ter um efeito abrasivo adicional em tecidos com a dureza alterada (1).
- Evitar o consumo de bebidas ou alimentos ácidos antes de dormir (1).
- Terminar uma refeição com algum alimento rico em cálcio ou fosfato como, por exemplo, queijo.

- Considerar a utilização de bebidas modificadas que apresentam menos potencial de desenvolvimento de erosão (1).

Baseado no conhecimento de que as propriedades químicas de um agente ácido, como o pH, tipo de ácido, conteúdo mineral, acidez titulável afetam seu potencial erosivo, a modificação da composição de bebidas tem sido proposta ao longo dos últimos anos. A adição de sais de cálcio e fosfato em bebidas erosivas tem mostrado resultados promissores. Vários refrigerantes enriquecidos com cálcios são encontrados no mercado em outros países e podem oferecer algum benefício na prevenção da erosão dental. O cálcio pode ser encontrado em bebidas na forma de gluconato de cálcio, lactato de cálcio, malato de cálcio, fosfato de cálcio, cloreto de cálcio e citrato de cálcio (60). A seleção por um determinado sal afetará a solubilidade da bebida (61), bem como seu sabor e cor (60). Portanto, a adição de diferentes sais em diferentes concentrações, pode não só reduzir o potencial erosivo, mas também alterar as características originais da bebida (60, 61).

Hara e Zero (60) testaram dez bebidas disponíveis comercialmente, sendo que cinco continham suplementação de cálcio e cinco sem suplementação, em duas fases. Na primeira fase, o pH e as concentrações de cálcio, fósforo e flúor foram analisadas. Na segunda fase, o potencial erosivo das bebidas foi testado, com diferentes tempos em solução (0, 5, 10, 30, 60 e 120 min.). Dentre as propriedades químicas testadas, o pH e a concentração de cálcio apresentaram uma forte correlação com a desmineralização e a perda de estrutura do esmalte. Os níveis mais baixos da desmineralização do esmalte e menor perda de estrutura do mesmo foram encontrados para a maioria das bebidas que contêm cálcio. Aparentemente, as bebidas suplementadas com cálcio apresentam menor capacidade de desmineralização do esmalte (60).

Somente uma mudança relativamente pequena no grau de saturação por adição de cálcio e / ou fosfato, sem alterar o pH, pode reduzir o potencial erosivo das bebidas *in vitro* (62, 63). Há, no entanto, algumas implicações clínicas para os pacientes e profissionais de saúde, uma vez que embora a erosão possa ser retardada, não foi completamente prevenida *in vivo* através de aditivos minerais em bebidas. Essas bebidas ainda causam redução da dureza do esmalte (64, 65).

O iogurte é um bom exemplo de alimento mostrando o benefício das altas concentrações de minerais na prevenção de erosão dental. Apesar de ser um alimento com um pH baixo (≤ 4.0), apresenta um reduzido potencial erosivo devido ao seu alto teor de cálcio e fosfato, o que o torna supersaturado em relação ao esmalte (23).

O flúor adicionado nas bebidas também tem sido descrito como um possível meio de reduzir o potencial erosivo de bebidas ácidas (61, 66). Sua capacidade de reduzir a desmineralização do esmalte tem sido demonstrada em alguns estudos, mas o efeito foi limitado e dependente da concentração (67, 68). Mahoney et al. (69) encontraram *in vitro* uma correlação inversa do potencial erosivo com o conteúdo de flúor de diferentes bebidas. No entanto, dado o baixo pH, a quantidade de flúor necessária para reduzir o potencial erosivo de bebidas, seria considerada inviável. Apesar do flúor na concentração viável não impedir totalmente a erosão dental, tem sido demonstrado que pequenas quantidades de flúor, além de sais de cálcio e fosfato, poderiam ser eficazes na redução do desenvolvimento de erosão (66, 67).

Também já foi demonstrado *in situ* que alimentos que contém alta concentração de cálcio, como queijo, levam à significativa remineralização do esmalte (70). A ingestão de leite também mostrou resultados positivos (29).

2.4 Papel da alta concentração de flúor na prevenção da erosão dental

Apesar dos benefícios da aplicação tópica de flúor na prevenção da cárie já estarem bem estabelecidos, a capacidade de flúor para prevenir a erosão dental não é estabelecida, uma vez que os ácidos que levam a erosão dental são mais fortes. Diferentes formas de fornecimento de flúor na prevenção da erosão têm sido descritos, tais como: aplicação tópica, gel, verniz, soluções. Recentes evidências de estudos *in vitro* e de estudos *in situ* sugerem que altas concentrações de flúor são

capazes de limitar o progresso da erosão e melhorar a remineralização (34, 57, 71-73), entretanto, os resultados precisam ser confirmados em estudos clínicos.

Mesmo que a superfície dental perdida por um ataque erosivo não possa ser recuperada, estudos sugerem que a superfície parcialmente desmineralizada possa ser remineralizada na presença de flúor, prevenindo ou reduzindo a perda de superfície adicional (74). No entanto a utilização de flúor não foi comprovada na prevenção da erosão (75).

Como dentifrícios são excelentes veículos para a distribuição de flúor devido à sua disponibilidade e utilização generalizadas (76), alguns estudos foram propostos a fim de se verificar diferentes composições de dentifrícios na prevenção de lesões de erosão. Apesar de alguns estudos mostrarem efeito benéfico limitado de dentifrícios fluoretados sobre a erosão e abrasão dental (77, 78), outros estudos não mostraram qualquer efeitos preventivo (79, 80).

Alguns estudos realizados *in vitro* e *in situ* com diferentes compostos de flúor: NaF, SnF₂, TiF₄, KNO₃, AmF têm demonstrado diferentes níveis de proteção contra a erosão (81, 82). Hara et al. (83) testaram diferentes pastas dentifrícias com diferentes componentes, mas com o mesmo conteúdo de flúor (1450 ppm NaF, com ou sem, KNO₃ a 5%) e concluíram que ambos os dentifrícios contendo flúor apresentaram remineralização estatisticamente superior e resistência à erosão superior que o grupo controle (creme dental sem flúor). Entre os dois dentifrícios fluoretados testados houve uma recuperação significativa da microdureza de superfície com dentifrício contendo KNO₃, mas não houve diferença significativa entre os dois dentifrícios na resistência em relação ao desafio erosivo (76). A menor redução da dureza do esmalte no grupo tratado com flúor pode ser devido à formação de um substrato menos solúvel, pela precipitação de minerais contendo flúor.

Os depósitos de fluoreto de cálcio (CaF₂) que podem se formar na superfície do esmalte (84), podem se dissociar durante a queda de pH, liberando flúor (85). A presença de íons flúor na solução pode também diminuir a desmineralização, reduzindo a solubilidade ácida da superfície do dente (57). No entanto, no estudo de

Hara et al. (76) os resultados refletem o efeito remineralizador de uma única aplicação de dentifrício no esmalte que sofreu erosão ácida. A ação mecânica da escova dental pode levar à abrasão da camada de esmalte desmineralizada, não permitindo tempo suficiente para a remineralização com flúor. Zero et al. (86), testou em um modelo de remineralização *in situ*, a habilidade de um dentifrício de baixa abrasão contendo fluoreto de nitrato de potássio no aumento da remineralização do esmalte que foi previamente submetido a erosão ácida. Treze pacientes participaram desse estudo cruzado, com quatro dentifrícios testados contendo cada um: 0 ppm F; 250 ppm F; 1100 ppm F; 1150 ppm F + 5% de KNO₃. Cada indivíduo usou um dispositivo palatino contendo oito blocos de esmalte bovino, que foram previamente expostas a um desafio erosivo *in vitro* com suco de toranja (*grapefruit*) por 25 minutos. A microdureza de superfície foi determinada antes e após o desafio erosivo, e após a remineralização *in situ*. O dentifrício com maior concentração de flúor e 5% de KNO₃ foi o que apresentou maior capacidade de remineralização do esmalte (86).

Rios et al. (158) realizaram um estudo *in situ*, duplo-cego, cruzado, que consistia em três fases de sete dias cada. Em cada fase, os autores testaram um dos dentifrícios contendo 5.000 ppm F; 1.100 ppm F; sem F. Eles realizaram desafios erosivos com o uso de bebida ácida (Coca-Cola) durante 60 segundos, quatro vezes ao dia e escovação (30 segundos, quatro vezes ao dia). Os autores analisaram a perda de esmalte através de perfilometria. Os resultados mostraram que os grupos que sofreram abrasão por escovação mostraram uma perda de estrutura de esmalte maior que os grupos submetidos apenas a erosão dental. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os dois dentifrícios contendo flúor sobre o desgaste do esmalte. Nas condições realizadas nesse estudo, os autores concluíram que o dentifrício contendo alto teor de flúor, não tem um efeito protetor sobre o esmalte contra a erosão e erosão mais abrasão. Apesar do flúor minimizar os efeitos da desmineralização causada pela erosão, até mesmo o dentifrício com alto teor de flúor não parece impedir totalmente a erosão do esmalte (87).

Na pasta dentifrícia, além do flúor, os abrasivos também parecem interferir na erosão e abrasão. Hara et al. (83) testaram a influencia do flúor e abrasividade de

dentifrícios na modulação e desenvolvimento de lesões de erosão e abrasão. Amostras de esmalte e dentina radicular foram submetidas a ciclos de desmineralização (120 ml de ácido cítrico a 1% por 2min), remineralização (120 ml de saliva artificial -1,45 mM, por 60 minutos, 100 rpm) e escovação (500 e 150 ciclos de escovação para esmalte e dentina, respectivamente), utilizando seis dentifrícios formulados com três níveis de abrasividade: baixo (B), médio (M) e alto (A), com (F+) e sem (-F) flúor. A perda de superfície foi quantificada por perfilometria. O efeito de proteção pela película adquirida contra a abrasão (88) e erosão (52) foi parcialmente reproduzida, por meio de mucina contida em saliva artificial.

O flúor reduziu a perda de estrutura do esmalte em todos os níveis da abrasividade. Em dentina, o mesmo efeito do fluoreto foi observado, mas apenas para a formulação de baixa abrasividade. Tanto a presença de flúor quanto a abrasividade foram importantes moduladores da perda de superfície do esmalte, enquanto a abrasividade teve um impacto maior do que o flúor na dentina. O autor concluiu que tanto a presença de fluoreto quanto a abrasividade foram importantes moduladores da perda de superfície do esmalte, enquanto a abrasividade teve um impacto maior do que o flúor na dentina.

Aplicações de alta concentração de flúor contidas em enxagüatórios bucais, géis e vernizes, têm sido consideradas como as mais eficazes na redução do desenvolvimento da erosão do esmalte (74). Os fluoretos investigados na maioria dos estudos *in vitro* sobre erosão dental são aqueles que têm sido utilizadas ao longo dos anos para a prevenção da cárie: fluoreto de sódio (NaF), flúor fosfato acidulado (FFA), fluoreto estanhoso (SnF₂) e fluoreto de amina (AmF). Mais recentemente, o efeito preventivo de outros agentes fluoretados, como a solução de tetrafluoreto de titânio a 4% (TiF₄), têm sido investigadas em ensaios de erosão (81, 82, 89-96). Enquanto alguns estudos mostraram um efeito inibitório sobre a erosão do TiF₄ (81, 82, 89, 90, 92-94), outros estudos não encontraram um efeito protetor (91, 95, 96). O baixo pH da solução TiF₄ (cerca de 1.2), favorece a ligação entre titânio e oxigênio do grupo fosfato, levando à formação de uma camada de dióxido de titânio, na superfície do esmalte (89, 93). Esta camada de esmalte, está associada à redução da solubilidade do esmalte. Especula-se que os íons de titânio podem desempenhar um papel importante, já que podem substituir o cálcio na

estrutura da apatita (97, 98). Além disso, sugere-se que o titânio pode interagir com a superfície do esmalte devido ao baixo pH do agente, levando a uma absorção de flúor pelo esmalte (99).

Além dos mais comuns compostos de flúor utilizados, compostos contendo flúor e cátions metálicos polivalentes têm sido recentemente investigados com relação ao seu potencial de inibição da erosão. Neste contexto, o estanho (cloreto de estanho) apresenta para o esmalte uma redução na perda de mineral promissora em torno de 50-90% (81, 100-104). Alguns estudos *in situ* também verificaram esses efeitos (101, 105, 106). Uma limitação da maioria destas soluções é que essas não se encontram regulamentadas para serem utilizadas como produtos de higiene dental e cosméticos (devido à alta concentração de agentes ativos ou elevada acidez). Schlueter et al. (107) testaram em um estudo *in situ* uma solução de fluoreto de estanho, com concentração e pH regulamentados como produto de higiene oral. Três soluções foram testadas: controle, controle positivo, 409 + Sn_2 ppm, 250 ppm F, pH 4,2) e uma solução experimental (pH 4,5) contendo 1.900 ppm Sn_2 + (SnCl_2) e 1.000 ppm F (NaF AMF). A perda de tecido foi determinada através de perfilometria. A solução experimental foi especialmente eficaz para o esmalte, mas foi menos eficaz para a dentina. A tabela 2.2 resume os estudos que avaliaram os diferentes compostos fluoretados na prevenção da erosão dental no período de 2007 – 2010.

Tabela 2.2 Resumo dos estudos avaliando diferentes compostos fluoretados e diferentes concentrações a partir de 2007

Autor	Ano	Modelo	Composto e concentração	Desafio ácido e Abrasão	Remineralização	Mensuração	Resultado + prevenção significativa - resultado negativo
SA = Saliva Artificial AP = Análise do Perfil FFA = Flúor Fosfato Acidulado FN = Flúor Neutro VF = Verniz de Flúor IS = In situ IV = In vitro							
Schlueter	2010	IS	Solução contendo fluoreto (250ppm; 1000ppm) e estanho (409ppm ; 1900ppm) 30 seg. após desmineralização	Ácido cítrico 5min - 6x/dia 7 dias		AP	(+) para ambas, mas as maiores concentrações mostraram melhores resultados.
Wiegand	2009	IV	TiF ₄ (1% F) AmF (1% F) Associado ou não ao laser de CO ₂	Sprite Zero® (4/dia-90s) 5 dias Sem abrasão	SA	AP	(+) AmF + AmF + CO ₂ laser (-) TiF ₄ (+) TiF ₄ + CO ₂ laser
Wiegand	2009	IV	TiF ₄ (1,5%) - pH 3.5; NaF (2,02%) - pH 3.5; TiF ₄ (1,5%) - pH 1.2 NaF (2,02%) - pH 1.2	HCl 10 X 60 seg Sem abrasão	SA	AP Liberação de cálcio	(+) apenas nos compostos com pH 1.2
Steiner-Oliveira	2009	IV	FFA (1,23%) pH 3.5 Associado ou não ao laser de CO ₂	Ácido cítrico 3/dia - 5min 3 dias Sem abrasão	SA	AP + Ca, F, P	(+) FFA (+) FFA + CO ₂ laser
Sobral	2009	IV	FFA (1,23%) pH 5.3 Associado ou não ao laser de Nd:YAG	Ácido cítrico 30 min. ou 90 min. Sem abrasão	Não	Dureza e Perda de Peso	(+) para FFA + Nd:YAG laser
Hara	2009	IS	1450ppm NaF 1450ppNaF +5%KNO ₃	Suco de Toranja 25min Fase intraoral - 4 horas		Dureza	(+) para todos os grupos com NaF. NaF +5%KNO ₃ apresentou melhor resultado

Continuação ...							
Autor	Ano	Modelo	Composto e concentração	Desafio ácido e Abrasão	Remineralização	Mensuração	Resultado + prevenção significativa - = negativo
Hara	2009	IV	Dentifrício 0ppm NaF 1100ppm NaF	Ácido cítrico (2min) 5000 ciclos de escovação para esmalte. Dentifrício usado durante os ciclos	SA	AP	(+) para dentifrício com NaF. Reduziu perda de tecido.
Magalhães	2009	IS	TiF ₄ (4%)	Coca cola® 5min - 4x/dia 4 dias Sem abrasão		Dureza	(+)
Rios	2009	IV	FFA (1,23%) VF (2,26%) Associado ou não ao laser de Nd:YAG	Sprite Light® 1min - 4/dia 5 e 10 dias Sem abrasão	SA	AP	(+) todos os grupos. Melhor resultado obtido FFA + Laser
Rios	2008	IS	Dentifrícios placebo 5000ppm F 1100ppm F	Coca cola® 60 seg - 4x/dia 7 dias Abrasão 30 seg. escovação, 4/dia		AP	(-) para os dentifrícios fluoretados
Wiegand	2008	IV	TiF ₄ ; ZrF ₄ ; HfF ₄ (0.401%) AmF (1.25%)	HCl (25min)	Não	Liberação de cálcio	(-) AmF (esmalte) (+) Apenas TiF ₄ 1%
Hove	2008	IS	TiF ₄ - SnF ₂ - NaF	HCl - 2min - 2x/dia 9 dias		AP	(+)TiF ₄ - SnF ₂
Lussi	2008	IV	Dentifrícios 1100ppm - 1450ppm NaF ou SnF (3min - agitação)	Ácido cítrico 3 min	SA	Dureza	Não houve diferenças entre os dentifrícios. Quando aplicado antes do ácido, efeito +
Magalhães	2008		TiF ₄ (4%)	Coca cola® 5min 4x/dia - 4 dias		Dureza	(-)
Vlacic	2007	IV	FN (1,23%) Associado ou não a diferentes lasers	HCl (1M) 5 min Sem abrasão	Não	Dureza	(+) todos os grupo associando FN e laser

							Conclusão....
Autor	Ano	Modelo	Composto e concentração	Desafio ácido e Abrasão	Remineralização	Mensuração	Resultado + prevenção significativa - = negativo
Magalhães	2007	IS	Dentífricos 1098ppm F placebo	Coca cola® 5 min - 4x/dia 7 dias Abrasão por escovação (30 ciclos)		Dureza	(+) Amostras escovadas com pasta fluoretada apresentou efeito positivo
Vieira	2007	IS	Verniz de flúor (0.1%F)	Sprite® 5min - 3x/dia Abrasão por escovação 5seg após cada desafio ácido		AP	(+) Verniz de flúor é efetivo na prevenção de erosão e abrasão.
Ganss	2007	IS	Dentífrico com (0.125%F) ou sem flúor + Aplicação tópica de FFA (1.25%) + Fluoride solution (0.025%F) (grupo fluoretação intensa)	Ácido Cítrico 20 min - 2x/dia 5 dias Abrasão por escovação 30 seg		AP	(+) Grupo de fluoretação intensa mostrou o melhor resultado (significante)

2.5 Fatores relevantes para o desenvolvimento do processo de erosão dental

Embora se saiba que os ácidos levam à redução da dureza do esmalte, causando uma maior propensão à abrasão, o tempo exato em que a dureza do tecido permanece alterada após contato com ácidos erosivos não é conhecido. Attin al. (48) avaliaram *in situ* o efeito de diferentes períodos de remineralização para diminuir a susceptibilidade do esmalte previamente desmineralizado a abrasão por escovação. Seis espécimes de esmalte humano foram fixados em dispositivos intra bucais, que foram usadas durante 21 dias por 8 voluntários. A desmineralização das amostras foi realizada duas vezes ao dia através da imersão em refrigerante (*Sprite*

Light) por 90 segundos. Posteriormente, as amostras de esmalte foram escovadas em momentos diferentes: A – imediatamente após erosão ácida, B- após 10 minutos; C, 20 minutos, D, 30 minutos, e E, 60 minutos, respectivamente. Grupo F foi submetido apenas a desmineralizada e remineralização, mas não escovado. Após 21 dias, o desgaste do esmalte foi medida com um perfilômetro. Os seguintes valores (média + / - desvio padrão) obtidos foram: A amostra, 6,78 + / -2,71 μm ; B, 5,47 + / -3,39 μm ; C, 6,06 + / -3,18 μm ; D, 5,43 + / -2,58 μm ; E μm 4,78 + / -2,57, F e 0,66 + / -1,11 μm ; m. Análise de variância revelou uma influência significativa do período de remineralização no desgaste abrasivo. No entanto, mesmo após um período de remineralização de 60 minutos o desgaste aumentou significativamente em comparação com grupo que sofreu desmineralização, mas não abrasão por escovação. Conclui-se que a resistência à abrasão do esmalte aumenta com o período de remineralização e pelo menos se deve aguardar 60 minutos antes de escovar os dentes após um ataque erosivo (48).

2.6 Lasers de alta potência na prevenção da desmineralização

Vários estudos já demonstraram o efeito benéfico de *lasers* de alta potência na da prevenção de cáries. A possibilidade de aumentar a resistência à desmineralização do esmalte após a irradiação com *laser* foi demonstrado pela primeira vez em 1965 com um *laser* de rubi (108, 109). Ao longo do tempo e com o crescente conhecimento sobre a interação do *laser* com o tecido duro, o efeito do *laser* de CO_2 foi testado. Como bons resultados relacionados à inibição da cárie incipiente foram observados com este *laser* e, uma vez que ele apresenta uma interação muito eficiente com o tecido, este *laser* tem sido preferencialmente estudado. Poucos estudos foram publicados relacionando o efeito dos *lasers* de alta potência na prevenção da erosão dental. A grande quantidade de informações e especulações dos efeitos do *laser* de alta potência na inibição da desmineralização do dente na literatura está relacionada com a prevenção de cáries (110-118). É

importante salientar que os ácidos que causam a erosão dental apresentaram menor pH quando comparados com os ácidos que leva ao desenvolvimento de cáries.

2.7 Interação do esmalte com o *laser* de CO₂

A interação entre os *lasers* e tecidos é extremamente dependente das propriedades ópticas dos tecidos. Dessa forma a composição do tecido é de grande importância para encontrar comprimentos de onda e parâmetros que levam à resistência ácida do esmalte. O esmalte é composto, em volume por 85% mineral, 12% de água e 3% de componentes orgânicos. A parte mineral é constituída principalmente por cristais de hidroxiapatita carbonatada dispostos em prismas de cerca de 5 mm de diâmetro (115, 119). Devido a sua composição, o esmalte, apresenta alta absorção para comprimentos de onda na região do infravermelho entre 2,7 e 3 µm emitidas pelo *laser* de érbio e os comprimentos de onda entre 9-11 µm emitidos por *lasers* de CO₂. Nessas regiões do espectro o espalhamento é considerado quase nulo e a quantidade de energia depositada é determinada pelo coeficiente de absorção e reflexão (120-124).

As duas regiões do espectro citadas apresentam dessa forma um grande potencial para interagir com esmalte e dentina. No entanto, os quatro principais comprimentos de onda emitida pelo *laser* CO₂ (9.3, 9.6, 10.3, 10.6 µm) têm um coeficiente de absorção maior no esmalte do que o *laser* de érbio, tornando a interação mais eficiente.

A absorção do esmalte pelos diferentes comprimentos de onda emitidos pelo *laser* de CO₂ está associado com a absorção pelas bandas de fosfato da porção mineral do tecido. Entre os quatro principais comprimentos de onda, os dois mais curtos de 9,3 e 9,6 µm apresentam maior absorção e coincidem com a banda de absorção de fosfato. Com os comprimentos de onda mais longos (10,3 e 10,6 µm), a absorção é menor e também o grau de coincidência com a banda de fosfato (123).

O efeito na prevenção de cáries obtido pela irradiação com diversos *lasers* descritos na literatura têm sido relacionados com o aumento da temperatura nos tecidos (125). O aumento da temperatura ocorre somente quando a luz do *laser* é fortemente absorvida pelo tecido. Portanto, quanto maior o coeficiente de absorção de um comprimento de onda, maior é o potencial de causar o aquecimento do tecido (131). O coeficiente de absorção de um dado comprimento de onda é inversamente proporcional à penetração no tecido, como descrito por Beer-Lambert (122). Assim, quanto mais uma radiação eletromagnética é absorvida por um determinado tecido, menor a profundidade de penetração. Portanto, para tempos da interação *laser*-tecido próximos ao relaxamento térmico da estrutura, a espessura da camada aquecida deve ser próxima a profundidade de absorção do comprimento de onda utilizado.

Pode-se deduzir que para os *lasers* de CO₂, utilizando-se uma mesma quantidade de energia e um tempo de interação próximo do tempo de relaxamento térmico do tecido, a irradiação com 9,6 µm causará o maior aumento de temperatura, mas nos 2 µm mais externos. Com o comprimento de onda 10,6 µm, causará um menor aumento na temperatura, porém numa espessura de tecido um pouco maior (12 µm) (126).

2.8 Prevenção da desmineralização com *laser* de CO₂

A prevenção na desmineralização do esmalte dental pode ser conseguida com o *laser* de CO₂ operando em modo contínuo, bem como no modo pulsado. A irradiação do esmalte em modo contínuo com 120 J/cm² pode reduzir a perda mineral e também levar a conversão da fase mineral do esmalte para uma fase de hidroxiapatita significativamente menos solúvel que o esmalte não irradiado (114, 127). Além disso, vários estudos têm demonstrado redução significativa da solubilidade do esmalte em meio ácido (117, 128, 129). No entanto, a grande desvantagem de radiação em modo contínuo é que ela pode causar um grande aumento na temperatura da superfície e maior propagação no tecido. Considerando que o aumento da temperatura de apenas 5,5 ° C na polpa pode causar danos

irreversíveis, a utilização de *lasers* no modo contínuo apresenta maiores riscos para utilização *in vivo* (130). Por esta razão, as pesquisas mais recentes que avaliaram os efeitos dos *lasers* de CO₂ na prevenção da desmineralização, têm sido realizadas utilizando a emissão pulsada. Portanto, considerando o intervalo de tempo entre um pulso e o seguinte, é possível que o relaxamento térmico aconteça e, portanto, a propagação de calor para as camadas interiores possa ser reduzida (131).

Tal como no modo contínuo, a irradiação do esmalte pelo *laser* de CO₂ no modo pulsado também é capaz de inibir significativamente a desmineralização do esmalte. Este efeito foi observado com parâmetros muito diferentes e diferentes condições de irradiação (132-135). Avaliações mais sistemáticas para a irradiação com *lasers* de CO₂ de 10,6 µm foram realizadas pelo grupo de Featherstone e colaboradores. De acordo com este grupo, para a mesma duração do pulso (100 µs), mesmo número de pulsos sobrepostos (25) e mesma taxa de repetição (10 Hz), os maiores percentuais de inibição da perda mineral são observados na densidade de energia em torno de 12 J/cm² (132, 136-138). Uma percentagem bastante elevada de inibição da progressão da cárie também foi observada após irradiação com densidade de energia mais baixo (3,4 J/cm²), mas com uma taxa de repetição de 20 Hz e duração de pulso 50 vezes maior (133, 139).

As reduções de progressão da cárie com *lasers* de CO₂ até agora encontradas na literatura mostram resultados promissores. No entanto, juntamente com o aspecto positivo do tratamento, também foram relatados em alguns estudos efeitos colaterais, que geralmente se referem a danos térmicos na estrutura. A maioria dos parâmetros que apresentaram uma diminuição da perda mineral em torno de 90% também demonstrou danos provocados pelo calor excessivo na superfície, sob a forma de fissuras e trincas e excessivo aumento da temperatura no interior do tecido (133, 136, 140). Rachaduras evidentes em microscopia eletrônica de varredura também foram observados por irradiação com 6, 10 e 11,5 J/cm² com 10 ms de duração de pulso, mas também com maior energia como 83,3 J/cm² e pulsos de 667 µs (141, 142). A largura do pulso do *laser* tem uma influência direta no aumento da temperatura na superfície do esmalte e também na propagação de calor nas camadas mais profundas. Com pulsos mais curtos, um aumento maior da

temperatura da superfície pode ser esperado e com pulsos mais longos um menor aumento, no entanto com maior propagação de calor para o interior do tecido (143).

No caso da irradiação do esmalte com *laser* de CO₂ que emite em 10,6 µm o tempo de relaxamento térmico da estrutura é de 90 µs, dessa forma durações de pulso da mesma ordem de grandeza ou menor do que esse valor tem um elevado potencial para concentrar o aumento da temperatura na superfície, minimizando a difusão de calor nas camadas mais profundas (112, 144). Com uma menor largura de pulso, diminui a quantidade de energia necessária para modificar o tecido e promover o aumento da resistência ácida do esmalte, bem como o limiar de ablação. Portanto, quanto menor a largura de pulso utilizada, menor deverá ser a densidade de energia necessária para permitir efeitos sub-ablativos (116, 123, 124, 144). Apesar das vantagens, em termos de geração de calor em tecidos duros dentais observados pela irradiação com duração de pulso de cerca de 10 µs (que são menores do que o tempo de relaxamento térmico do tecido) com o comprimento de onda de 10,6 µm, não existem muitas investigações com relação ao seu potencial de inibição da desmineralização.

Com o comprimento de 9,6 µm, por outro lado, largura de pulsos menores e menores densidades de energia têm sido recentemente testadas e os resultados mostraram que esses parâmetros são capazes de causar uma inibição considerável de perda mineral. Para pulsos de 100 µs de duração, a menor solubilidade mineral foi encontrada em irradiação com 3 a 5 J/cm² (137). Para pulsos de 8 µs, com apenas 1 J/cm² uma taxa de redução da solubilidade de 50% pode ser alcançado (145). A aplicação do gel de flúor fosfato acidulado sobre a superfície do esmalte antes da irradiação promove uma maior redução (62%) em termos de perda mineral, para os mesmos 1 J/cm², com pulsos de 5µs (146). A quantidade de estudos avaliando a inibição da desmineralização do esmalte promovido pelo *laser* de CO₂ é consideravelmente maior para o comprimento de onda de 9,6µm.

Apesar de haver uma menor absorção na superfície do tecido com o comprimento de onda de 10,6 µm, esse pode levar a uma modificação de uma camada mais espessa de esmalte e, portanto, conter a desmineralização por mais tempo, fator interessante em relação ao processo de erosão dos dentes (114, 147).

Com o comprimento de onda de 10,6 μm , algumas larguras de pulsos já foram testadas (100-50,000 μs). O único estudo com pulsos muito curtos (0,1 a 0,2 μs) foi realizado por Nelson et al ainda no início de 1980, mas somente com uma densidade de energia muito alta (50 J/cm^2), observando-se uma inibição de 50% de perda mineral.

Esteves-Oliveira (176) realizou o primeiro estudo *in vitro* com amostras de esmalte bovino, utilizando o *laser* de CO_2 (10,6 μm) associado a doses baixas de energia e pulsos curtos. O parâmetro que apresentou o melhor efeito na prevenção de cáries com o menor dano térmico foi 0.3 J/cm^2 ; 5 μs ; 226Hz, por 9 segundos. Os resultados mostraram um aumento na resistência ácida do esmalte de até 81% em relação ao controle e também foi significativamente melhor do que a aplicação de flúor (25%). A análise de microscopia eletrônica de varredura não revelou dano térmico causados pela irradiação do *laser* com esses parâmetros.

Considerando que a profundidade da penetração no tecido é aproximadamente 10 μm maior com o comprimento de onda de 10,6 μm , e largura de pulsos mais curta levam a um aumento de temperatura da superfície com menor propagação de calor para as camadas mais profundas, diminuindo assim o risco de danos pulpares, e os resultados promissores na prevenção da cárie com baixas fluências com o *laser* de CO_2 (10,6 μm) (114, 116, 126, 147), existe a hipótese que este comprimento de onda possa também fornecer efeito preventivo na prevenção da erosão dental.

2.9 Prevenção da erosão dental com o *laser* de CO_2 (10.6 μm)

Até o presente momento, apenas dois estudos verificaram o efeito de CO_2 na prevenção da erosão dental. Wiegand et al. (148), testaram o efeito do *laser* de CO_2 (10,6 μm ; 10 μs ; 50Hz) na potencialização do efeito do tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e fluoreto de amina (AmF) na proteção do esmalte e dentina contra a erosão *in vitro*. As amostras foram submetidas durante 5 dias a ciclos de desmineralização e

remineralização usando refrigerante (*Sprite Zero* - pH 2,6) quatro vezes ao dia durante 90 segundos (4 ciclos / dia) para desmineralização. Após a desmineralização as amostras foram lavadas com água corrente e imersas em saliva artificial (20 ml/amostra) por 2 horas. Após o último desafio erosivo do dia, as amostras foram armazenadas em saliva artificial durante a noite. A perda de esmalte e a dentina foram quantitativamente analisadas através de perfilometria. Os resultados mostraram que o AmF diminuiu a erosão em esmalte e dentina, mas a irradiação com *laser* de CO₂ não melhorou a sua eficácia. O tetrafluoreto de titânio (TiF₄) mostrou apenas uma capacidade limitada para prevenir a erosão, mas a irradiação com *laser* de CO₂ aumentou significativamente a sua capacidade de prevenir a erosão em esmalte. Mas, apenas o *laser* não foi capaz de impedir a erosão do esmalte e da dentina.

Steiner-Oliveira et al. (149) avaliaram *in vitro* se o *laser* de CO₂ (10,6 µm; esmalte: 1J/cm²; 3W; duração do pulso de 5ms; dentina - 10Hz: 0.6J/cm² ; 2W; duração do pulso de 5ms,2Hz) com prévia aplicação tópica de flúor poderia aumentar a resistência do esmalte e da dentina à erosão. A erosão foi realizada com ciclos de desmineralização com ácido cítrico a 0,3%, pH 2,45 por 5 minutos e remineralização foi realizada com saliva artificial por 60 minutos. Os ciclos foram realizados 3x/dia durante 3 dias. A perda de superfície, bem como a concentração de cálcio, fósforo e flúor na solução desmineralizadora foram determinados após cada ciclo. Os resultados mostraram que o *laser* sozinho não foi capaz de evitar perdas de esmalte ou dentina superficial submetidas à erosão. Sua combinação com flúor apresentou algum efeito protetor, mas, segundo os autores, este efeito foi devido principalmente ao efeito de flúor.

É importante ressaltar que em ambos os estudos, fez-se uso de diferentes metodologias e parâmetros sugeridos no presente estudo. O presente estudo propõe a metodologia *in situ*, onde as amostras ficam sempre em contato com saliva, propiciando a remineralização. Apesar de saliva artificial ter sido utilizada nos estudos citados acima, para indução de remineralização, essa condição não reproduz o comportamento da cavidade oral, onde a saliva é constantemente secretada e renovada.

Visto que a completa eliminação dos fatores etiológicos causadores da erosão pode por muitas vezes ser difícil (31), uma vez que estão associados a hábitos, estilos de vida, ou fatores individuais que predispõem ao desenvolvimento da erosão dental (87); e visto que tratamentos restauradores não evitam o desenvolvimento da erosão e/ou abrasão (150), os tratamentos preventivos, que consigam transformar a estrutura dental em uma superfície mais resistente à erosão ácida, seriam a melhor opção de tratamento.

3 OBJETIVOS

Esse estudo *in situ* teve como objetivo avaliar, através da perda de estrutura dental e incorporação de flúor, o efeito em esmalte dental da irradiação com *laser* de CO₂ (10,6 µm) utilizado com baixa fluência e pulsos curtos, associado ou não ao flúor, na prevenção da erosão em esmalte dental causada por ácido cítrico em diferentes tempos (1, 3 e 5 dias). Os experimentos de perda de estrutura dental foram realizados também *in vitro* e as particularidades de cada modelo foram comparadas, assim como a duração do possível efeito preventivo do *laser* de CO₂ na erosão dental avaliada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse estudo foi realizado um modelo experimental *in situ* e uma complementação através com um modelo *in vitro*.

4.1 Modelo *in situ*

10 voluntários (4 homens e 6 mulheres) participaram desse estudo, que foi desenvolvido em sua totalidade na RWTH (Rheinisch Westfälischen Technische Hochschule), Aachen de acordo com a Declaração de Helsinski e aprovação do comitê de ética do UNIKLINK, RWTH, Aachen, Alemanha. Aos voluntaries foi fornecido termo de consentimento livre e esclarecido.

A idade média dos voluntários foi de 33.6 (± 7.3).

Os critérios de exclusão dos voluntários para participação no estudo foram: doença sistêmica e ingestão de medicamentos que interfiram no fluxo salivar.

Os critérios de inclusão para participação dos voluntários no estudo foram: boa saúde bucal (sem a presença de placa bacteriana visível, cavidades, gengivite ou doença periodontal); ausência de utilização de próteses removíveis, ou dispositivos ortodônticos; fluxo salivar estimulado >1 ml/min (151), pH salivar dentro da normalidade, consistência e capacidade tampão da saliva adequados (79). OS procedimentos para avaliação dos padrões salivares é descrito abaixo:

4.2 Teste Salivar

O teste salivar utilizado (Saliva-Check Test; GC; corporation; Tokyo, Japan) (Figura 4.1) analisava os seguintes critérios:

- *Consistência salivar:* Visualmente a consistência salivar foi avaliada. A saliva precisa estar com cor clara, e consistência líquida. A saliva muito espessa ou muito pegajosa não é considerada dentro dos padrões de normalidade.
- *Mensuração do pH:* O paciente foi orientado a expectorar uma pequena quantidade de saliva em recipiente de coleta. A tira de teste de pH foi inserida na amostra de saliva em repouso por 10 segundos, e depois foi verificada a cor da tira. A cor foi comparada com a tabela disponível pelo fabricante (Figura 4.1). O pH da saliva poderia ser classificada em alta, moderada ou normal.
- *Teste de fluxo salivar:* Instruções para o paciente mastigar um pedaço de cera foi dada, a fim de estimular o fluxo salivar. Após 30 segundos, o paciente foi liberado para expectorar na pia. Os voluntários eram instruídos para mascar a cera por mais 5 minutos, coletando toda a saliva no recipiente de coleta, em intervalos regulares. A quantidade de saliva foi medida através da verificação das marcações de volume na parte lateral no recipiente de coleta. Se o volume encontrado fosse inferior a 3,5 ml, foi considerado taxa de fluxo salivar muito baixa. Se fosse entre 3,5 - 5,0 ml, a taxa de fluxo salivar foi considerada baixa e se fosse maior do que 5,0 ml foram considerados fluxo salivar normal.
- *Capacidade tampão da saliva:* Com uma pipeta plástica, uma pequena quantidade de saliva foi coletada e uma gota foi colocada sobre cada quadrante do teste (Figura 4.1). O excesso de saliva sobre o teste foi removido colocando a fita analisadora na posição de 90° sobre um papel absorvente. O teste então começa a mudar de cor imediatamente após até 2 minutos. O resultado final pode ser calculado pela soma dos pontos de acordo com a cor final de cada bloco. A tabela de conversão pode ser encontrada no próprio kit. De acordo com o valor da

capacidade tampão da saliva poderia ser classificada como muito baixa, baixa e normal / alta.

Figura 4.1 - Teste salivar **A-** *Saliva-Check Test*, GC Cooperation®, Tokyo, Japan; **B-** Componentes do teste: pipeta plástica, recipiente coletor, cera, fita para mensuração de pH, fita para mensuração da capacidade tampão; **C-** Guia de referência para análise do pH fornecido pelo fabricante; **D-** Resultado de análise de pH; **E-** Resultado da análise do fluxo salivar; **F-** Análise da capacidade tampão; **G-** Resultado da capacidade tampão e guia de referência para análise da capacidade tampão fornecido pelo fabricante.

4.3 Grupos

Para o estudo *in situ*, um total de 240 amostras de esmalte dental bovino foram utilizadas, em um estudo cruzado, onde foram testados 4 tratamentos em diferentes tempos: 1, 3 e 5 dias. Algumas amostras foram analisadas no dia 1, outras no dia 3 e o restante no dia 5, conforme ilustrado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Distribuição das amostras (*in situ*)

Dia	Grupo Controle Amostras submetidas apenas a erosão ácida	Grupo CO₂ Laser Amostras irradiadas com <i>laser</i> de CO ₂ - Rofin SC x 30, Rofin-Sinar Laser, GmbH, Hamburg, Germany	Grupo Flúor Amostras foram submetidas à aplicação tópica de flúor por 3 min. (Elmex® Gel, Switzerland, 1.25% F, ph 4.8-6.0)	Grupo CO₂ Laser + Flúor
Dia 1	n= 20	n= 20	n= 20	n= 20
Dia 3	n= 20	n= 20	n= 20	n= 20
Dia 5	n= 20	n= 20	n= 20	n= 20
Total	n= 60	n= 60	n= 60	n= 60

Os voluntários receberam instruções por escrito para realizar todos os procedimentos relativos à pesquisa. Um dispositivo palatino (descrito mais adiante) foi utilizado pelos voluntários durante o dia e noite, com exceção das refeições. Após as refeições os voluntários eram instruídos a esperar 15 minutos para reinserção do dispositivo palatino na cavidade bucal.

4.4 Modelo experimental

Para induzir erosão ácida, os voluntários inseriam o dispositivo palatino, com as amostras fixadas, duas vezes ao dia em 80 ml de solução de ácido cítrico 0.05M (Ácido cítrico monohidratado – $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; $M=210,14g/mol$ - E. Merck, Darmstadt, Germany); pH 2.3 em temperatura ambiente por 20 minutos (entre 6:00 - 9:00 horas a primeira imersão e 18:00 – 21:00 a segunda imersão). As soluções ácidas eram renovadas a cada utilização e o pH monitorado. Previamente à reinserção do dispositivo na cavidade bucal, o dispositivo palatino era lavado em água de torneira por 15 segundos (Figura 4.2).

Parte das amostras foram removidas do dispositivo palatino no dia 1 ($n=2/voluntário$) após serem submetidas a 2 desafios ácidos. Outras amostras foram removidas no dia 3 ($n=2/voluntário$), após serem submetidas a 6 desafios ácidos e o restante das amostras foram removidas no dia 5 ($n=2/voluntário$) após serem submetidas a 10 desafios ácidos. Os procedimentos realizados pelos voluntários em 1 dia da pesquisa são ilustrados na figura 4.2.

A higiene bucal dos voluntários foi realizada com pasta dentífrica sem flúor (Calendula – Zahncreme; Weleda®; D-Schwäbisch Gmünd; A-Wien) e sem o dispositivo palatino na cavidade bucal. 7 dias antes do início da pesquisa, os voluntários já passaram a utilizar a pasta dentífrica sem flúor (*lead-in*). Um período de mínimo de 7 dias foi mantido entre a execução de um grupo e outro pelos voluntários (*wash out*).

Figura 4.2 - Procedimentos realizados pelos voluntários em 24 horas

4.5 Preparo das amostras

Os blocos de esmalte foram cortados a partir de incisivos bovinos (Isomet, Buehler, Ollinois, E.U.A.), apresentando as dimensões: 5 x 5 x 2 mm. A superfície do esmalte foi polida com lixa de carbeto de silício com granulação de 800, 1200 e 4000 (Buehler, Illinois, E.U.A.), seguido de polimento da superfície do esmalte com solução diamanta de 1 μ m de granulação (Buehler, Illinois, E.U.A.). Entre cada série

de polimento, as amostras foram lavadas em água deionizada por 3 minutos. As amostras foram devidamente limpas e observadas em lupa estereoscópica para garantir a ausência de defeitos estruturais e armazenados em água deionizada.

No centro das amostras foi colado disco de fita adesiva (Scotch 3M) com um diâmetro de 2,5 milímetros. Todas as superfícies de repouso das amostras foram pintadas com verniz ácido-resistente (Figura 4.3). Depois da secagem, a fita adesiva foi removida e a superfície foi limpa com algodão embebido com água deionizada para remover qualquer adesivo aderido.

Figura 4.3 - Preparo das amostras: **A** – Amostras após serem cortadas e polidas; **B** – Disco de adesivo com diâmetro de 2,5mm colados no centro da superfície de esmalte; **C** – As superfícies das amostras foram cobertas com verniz ácido-resistente e após secagem, o adesivo foi então removido

4.6 Preparo do dispositivo intra-oral (palatino)

Após moldagem da cavidade bucal dos voluntários e confecção de modelo de estudo, foi confeccionado dispositivo palatino individualizado. Foi utilizado placa de resina rígida, transparente (2 milímetros x 125 milímetros - $\neq$ catálogo 3419-Duran, Iserlohn, Alemanha) para confecção dos dispositivos. Foi feito com uma fresa duas pequenas cavidades de cada lado da placa palatina onde foi presa a placa de policarbonato onde eram fixadas as amostras de esmalte. As unidades de policarbonato têm uma espessura de 2 milímetros, com dimensões de 5 x 28

milímetros e quatro câmaras presentes para a fixação de amostras. As amostras de esmalte foram presas nas unidades de polycarbonato através de fios ortodônticos e cera e as unidades de polycarbonato foram fixadas no dispositivo palatino.

Dois grampos de retenção eram incluídos durante a confecção do aparelho palatino, sendo que a fixação era estabelecida na região de ameiias de maior retenção de cada voluntário. A figura 4.4 ilustra os componentes do dispositivo palatino:

Figura 4.4 Montagem do dispositivo palatino

Figura 4.5 - Foto do dispositivo palatino montado

4.7 Aplicação tópica de Flúor

As amostras do grupo 2 e 4 incluíam o tratamento com flúor. Essas amostras foram secas com papel absorvente e submetidos à aplicação tópica por 3 minutos com flúor (Elmex® Gelée, Wybert, Lörrach, na Alemanha, 1,25% de flúor na forma de fluoreto de amina, pH 4,8-6,0) e, em seguida, lavada com água destilada, durante 10 segundos e secos com papel absorvente. Nas amostras do grupo 2, foi realizado uma única aplicação tópica de flúor previamente à inserção inicial do dispositivo palatino na cavidade bucal dos voluntários. Nas amostras do grupo 4, a aplicação de flúor foi feita previamente à irradiação com *laser* e ambos os procedimentos realizados previamente à inserção inicial do dispositivo palatino na cavidade bucal dos voluntários.

4.8 Irradiação com *laser*

A Irradiação foi realizada com um *laser* pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10.6µm (modelo Rofin SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburgo, Alemanha pertencente ao Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva, RWTH, Aachen, Alemanha). A distância de irradiação foi de 19,8 cm, o diâmetro do feixe de 2,5 mm na superfície da amostra. A energia emitida pelo *laser* foi mensurada antes da irradiação de cada grupo e em um intervalo entre duas amostras, utilizando um medidor de energia (Coherent Detector FieldMaster GS + LM45, coerente, EUA). Antes da irradiação, as amostras foram secas com papel absorvente. Os parâmetros utilizados foram: 0.3J/cm², 226Hz, 5 µ s / pulso.

Figura 4.6 - *Laser* de CO₂ (Rofin model SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburg, Germany)

4.9 Modelo *in vitro*

Para o modelo *in vitro*, 144 amostras de esmalte foram preparadas do mesmo modo descrito anteriormente no modelo *in situ*. As amostras foram armazenadas em água deionizada e divididas conforme descritos na tabela 4.2

Tabela 4.2 - Distribuição das amostras *in vitro*

Dia	Grupo Controle Amostras submetidas apenas a erosão ácida	Grupo CO₂ Laser Rofin SC x 30, Rofin-Sinar Laser, GmbH, Hamburg, Germany	Grupo Flúor Amostras foram submetidas à aplicação tópica de flúor por 3 min. (Elmex® Gel, Switzerland, 1.25% F, ph 4.8-6.0)	Grupo CO₂ Laser + Flúor
Dia 1	n= 12	n= 12	n= 12	n= 12
Dia 3	n= 12	n= 12	n= 12	n= 12
Dia 5	n= 12	n= 12	n= 12	n= 12
Total	n= 36	n= 36	n= 36	n= 36

Para induzir erosão ácida *in vitro*, as amostras foram inseridas duas vezes ao dia (às 8:00 horas a primeira imersão e as 20:00 horas a segunda imersão) em 80 ml de solução de ácido cítrico 0.05M (Ácido cítrico monohidratado – C₆H₈O₇ · H₂O; M=210,14g/mol - E. Merck, Darmstadt, Germany); pH 2.3 em temperatura ambiente por 20 minutos. Após a imersão no ácido, as amostras eram lavadas em água de torneira por 15 segundos e armazenadas em água deionizada em temperatura ambiente.

Parte das amostras foram analisadas no dia 1 (n=12) após serem submetidas a 2 desafios ácidos. Outras amostras foram analisadas no dia 3 (n=12), após serem submetidas a 6 desafios ácidos e o restante das amostras foram removidas no dia 5 (n=12) após serem submetidas a 10 desafios ácidos (Tabela 4.2).

4.10 Fotos das amostras

Fotos com ampliação de 4x das amostras *in situ* foram realizadas após 1, 3 e 5 dias em todos os grupos através de um microscópio (MZ6, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemanha - pertencente ao Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva, RWTH, Aachen, Alemanha), acoplado a uma câmera digital (Hitachi HV - C2A - Wetzlar, Alemanha), e programa Diskus 4.2 (Hilgers, Königswinter, Alemanha)

4.11 Analise profilométrica

Após os tratamentos, as amostras foram armazenadas em água deionizada (4°C). As amostras foram coladas em uma lamina de plástico de 50 x 100 x 2 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha), utilizando adesivo para fixação transparente (Technovit 7230VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). O verniz ácido-resistente foi removido da superfície do esmalte com removedor apropriado. A superfície do esmalte foi analisada através de um perfilômetro digital (Konturenmessgerät MarSurf XC2, Hersteller Firma Mahr GmbH, Mahr GmbH, Göttingen, Alemanha – pertence ao instituto WZL – *Werkzeugmaschinenlabor* – Aachen, Alemanha) e do software - MarSurf XC2 (GmbH, Göttingen, Alemanha). O leitor de superfície apresentava ponta de carboneto de tungstênio com raio de 25 µm e força aplicada de 0,7 mN.

Foi realizada a leitura em cada amostra em três linhas paralelas com distância de 100µm entre elas (Figura 4.7). Em cada linha 6 medidas foram tomadas no centro, 6 na esquerda e 6 na direita, totalizando 18 medidas por linha.

Figura 4.7 – Modelo da análise profilométrica

4.12 Análise profilométrica em 3D

Após os tratamentos, 1 amostra por grupo foi reservada para a análise de perfilometria em 3D. As amostras foram coladas em lamina de plástico de 50 x 100 x 2 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha), utilizando adesivo para fixação (Technovit 7230VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). O verniz ácido-resistente foi removido da superfície do esmalte com remover apropriado. A superfície das amostras foi analisada através de um perfilômetro digital 3D (Hommeltester T8000, Hersteller Hommel-ETAMIC GmbH, Hommel-ETAMIC GmbH, VS-Schwenningen, Alemanha Deutschland, – pertence ao instituto WZL –

Werkzeugmaschinenlabor – Aachen, Alemanha) e o software Wave Turbo und Hommel Mapa Expert (Hersteller Hommel-ETAMIC GmbH, Hommel- ETAMIC GmbH, VS Schwenningen, Alemanha). O equipamento realizou a leitura da linha paralela mais profunda da lesão e quantificou a distância, acima da linha, construindo as medidas em uma imagem 3D. A leitura foi realizada por uma ponta de diamante, com um formato cônico e com 2 μ m de raio.

4.13 Análise de Flúor

Depois de medições da superfície das amostras pelo perfilômetro, 15 amostras/grupo foram selecionadas e um disco de fita adesiva (Scotch 3M) com um diâmetro de 2,5 milímetros foi novamente colado sobre a superfície desmineralizada da amostra (exatamente sobre a lesão de erosão). Todas as superfícies das amostras foram pintadas com verniz ácido-resistente. Depois da secagem, a fita adesiva foi removida e a superfície foi limpa com algodão embebido com água deionizada para remover qualquer adesivo aderido à superfície. Em seguida, as amostras foram colocadas individualmente em tubos de plástico, ao qual foi adicionado 0,5 ml de HCl 0,5 M. Em seguida, os frascos contendo os blocos foram agitados durante 90 segundos em agitador. Após agitação, foi adicionado 0,5 ml de TISAB II (contendo NaOH 20.0g / L), com o objetivo de neutralização imediata de reação (152). A solução total foi dividida em dois tubos de plástico contendo 0,5 ml de cada um. A quantidade de flúor em solução foi analisada com eletrodo específico (Orion 920A, Research Inc. - Boston, E.U.A.). As curvas de calibração foram preparados a partir de 0019 a 3,8 ppm de flúor. Cada amostra foi medida duas vezes, e foi feita uma média das leituras.

4. 14 Microscopia eletrônica de varredura

A fim de se observar as alterações de superfície do esmalte causadas pelos tratamentos propostos, duas amostras, para cada grupo no modelo *in situ* foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram lavadas três vezes de cinco minutos cada em tampão fosfato 0,1 M. A desidratação das amostras foram realizadas com a seguinte seqüência de alcoóis: duas lavagens de 30 minutos em etanol 70%, duas lavagens de 30 minutos em etanol 96%, quatro lavagens de 30 minutos em etanol 100%. As amostras foram coladas em suportes metálicos, identificados e cobertos por uma fina camada de ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura, pertencente *UNIKLINIKUM*, RWTH, Aachen. As fotos foram tiradas sob aumento de 300, 2000 e 6000.

4.15 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X

A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (EDX) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura, pertencente ao *UNIKLINIKUM*, RWTH, Aachen. Foi utilizado para mensurar a quantidade de Cálcio, Fosfato e Flúor nas amostras. A leitura dos componentes foi sobre uma linha determinada no centro da amostra. A profundidade de suas medidas é de 3-5 μm na superfície devido ao padrão na tensão de aceleração utilizado (20 kV). Duas amostras de cada grupo foram analisadas após o respectivo tratamento. Um total de 810 pontos foram avaliados em cada linha. Somente os pontos decimais (10, 20, 30, 40, 50,...,800) foram escolhidos e usados para realização do gráfico e estatísticas.

4.16 Microscopia de polarização

As amostras de esmalte foram seccionadas longitudinalmente no centro das lesões usando uma fita de diamante sob refrigeração com água (E 300, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha). Uma metade foi armazenada a outra foi desidratado em uma sequência de álcool (70%, 80%, 90%, 96% e 100%) e embebida em resina acrílica especial para cortes histológicos (K-Plast, média Histotechnologie GmbH, Giessen, Alemanha). Os blocos de resina obtidos foram então colados em lamina de plástico de 50 x 100 x 2 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha), utilizando adesivo para fixação (Technovit 7230VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) e mantendo-se a face que continha a lesão exposta para cima. Após fixadas, o excesso de resina foi cortado em cortadora a fio diamantado, a fim de expor a lesão de desmineralização. Esta superfície foi então polida com lixas de óxido de alumínio com granulação de 800 e 4000 sob refrigeração com água e foi colada em uma lamina de plástico de 1,5 x 75 x 25 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha) utilizando-se adesivo transparente (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). A fim de manter o paralelismo entre as duas lâminas, a polimerização do adesivo foi feita em dispositivo fotopolimerizador de precisão, contendo uma fonte de luz azul e um suporte para manutenção do paralelismo entre as duas lâminas (Exakt 402, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha).

Após a polimerização, as amostras foram fixadas no sistema de vácuo da cortadora e cortadas com fio diamantado sob refrigeração de modo que se obtivessem lâminas a de 500 µm de espessura. Para reduzi-los a 100µm (± 10 mm), as lâminas foram polidas em equipamento de polimento especial para cortes histológicos contendo controlador digital de espessura (modelo CS401 Exakt 400, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha). Depois de armazenamento em água destilada (pH = 7) por 24 horas, as lâminas foram com lamínula de vidro para observação em microscópio de luz polarizada Axio Imager A1 (Carl Zeiss, NY, EUA Zeiss) com lente de ampliação de 10x e 25x. As imagens foram transmitidas a um

computador conectado ao microscópio através de uma câmera digital (AX10 cam HRC, Carl Zeiss microfilmagem, Thornwood, NY, EUA) e software Axio Vision (Carl Zeiss, NY, EUA), pertencentes ao Departamento de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

4.17 Análise estatística

Os valores relativos à perda de estrutura dental e quantidade de flúor incorporado ao tecido foram analisados estatisticamente através de análise de variância ANOVA. A comparação de valores entre grupos foi realizada através de contraste, sendo considerado nível de significância de 5% para os testes utilizados. As análises foram realizadas através do programa SAS versão 9.1.3 (*SAS Institute, Cary, NC, USA*). A análise estatística foi realizada pelo Departamento de Estatística do *Universitätsklinikum Aachen*, Alemanha

5 RESULTADOS

5.1 Resultados dos testes salivares

Todos os voluntários selecionados no estudo apresentaram padrões salivares dentro da normalidade. Os resultados dos testes salivares de cada voluntário são descritos abaixo. O gráfico 5.1 descreve o pH salivar de cada voluntário. Os valores de pH encontram-se entre 6,8 e 7,6, considerados dentro da normalidade. O gráfico 5.2 mostra o valor de fluxo salivar estimulado de todos os voluntários. Todos os valores estavam dentro da janela de normalidade maior do que 1 ml/minuto. O gráfico 5.3 mostra a capacidade tampão dos voluntários. Todos os voluntários apresentaram o valor de 12, considerado normal / alta de acordo com o teste de saliva utilizado.

Gráfico 5.1 - Análise do pH salivar dos voluntários

Gráfico 5.2 - Análise do fluxo de salivar dos voluntários

Gráfico 5.3 - Análise da capacidade tampão da saliva dos voluntários

5.2 Imagens das amostras do modelo *in situ* após 1, 3 e 5 dias

Na figura 5.1, as fotos das amostras do modelo *in situ* após 1, 3 e 5 dias de tratamento mostraram que a lesão de erosão desenvolvida pela imersão em ácido cítrico pode ser identificada em todas os dias avaliados (1, 3 e 5 dias) em todos os grupos. Pode-se observar que quanto mais tempo de tratamento, maior a profundidade das lesões. Visualmente, o grupo controle apresentou sempre maior profundidade da lesão. O grupo de flúor + *laser* no dia 1 parece apresentar a lesão menos profunda.

Figura 5.1 - Imagens das amostras do modelo *in situ* (barra=500µm)

5.3 Análise da profundidade de lesão através de profilometria

As amostras dos modelos *in situ* e *in vitro* foram analisadas após 1, 3 e 5 dias de tratamento, e a profundidade das lesões de erosão analisadas por um profilômetro. A profundidade da perda estrutural de esmalte aumentou com o tempo, em ambos os modelos (*in situ* e *in vitro*) (Gráficos 5.4 e 5.5).

O modelo *in vitro* mostrou em todos os tempos diferença significativa no tamanho da lesão entre todos os grupos (Gráfico 5.5).

No modelo *in situ*, os grupos *laser* e flúor + *laser* mostraram uma diferença significativa no tamanho da lesão de erosão em relação ao grupo controle (**C**) nos dias 1, 3 e 5, indicada através de um asterisco (*). O grupo Flúor + *laser* (**FL**) apresentou em todos dos tempos (dia 1 ,3 e 5) também diferença significativa em relação ao grupo flúor (**F**) (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 - Análise profilométrica da profundidade das lesões das amostras no modelo *in situ*. (**C** – Controle; **L** – Laser; **FL** – Flúor + Laser; **F** – Flúor). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle; (+) indica diferença significativa entre o grupo flúor; (++) indica diferença significativa entre grupo *laser* (Resultados detalhados entre os grupos detalhado na Tabela 5.2)

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão da profundidade das lesões no modelo *in situ*

Grupo	Média ($\pm$ Desvio Padrão)
DIA 1	
C	16.52 ($\pm$ 5.31)
L	8.56 ($\pm$ 2.07)
FL	4.34 ($\pm$ 2.15)
F	12.82 ($\pm$ 3.79)
DIA 3	
C	40.18 ($\pm$ 9.87)
L	22.73 ($\pm$ 6.19)
FL	22.07 ($\pm$ 11.05)
F	32.87 ($\pm$ 12.3)
DIA 5	
C	67.79 ($\pm$ 15.20)
L	46.70 ($\pm$ 14.48)
FL	33.60 ($\pm$ 12.77)
F	57.14 ($\pm$ 20.86)

Tabela 5.2 - Diferenças significativas entre os grupos no modelo *in situ*

DIA 1				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)	(p<0.01)	
L	(p<0.01)		(p<0.01)	(p<0.05)
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		(p<0.01)
F		(p<0.05)	(p<0.01)	
DIA 3				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)	(p<0.01)	
L	(p<0.01)			(p<0.05)
FL	(p<0.01)			(p<0.05)
F		(p<0.05)	(p<0.05)	
DIA 5				
	C	L	FL	F
C		(p<0.05)	(p<0.01)	
L	(p<0.05)		(p<0.01)	
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		(p<0.01)
F			(p<0.01)

Gráfico 5.5 - Análise perfilométrica da profundidade das lesões das amostras do modelo *in vitro*. (C – Controle; L – Laser; FL – Flúor + Laser; F – Flúor). Existe diferença significativa entre todos os grupos em todos os tempos analisados (Tabela 5.4)

Tabela 5.3 - Média e desvio padrão da profundidade das lesões no modelo *in vitro*

Grupo	Média ($\pm$ Desvio Padrão)
DIA 1	
C	11.02 ($\pm$ 1.85)
L	5.26 ($\pm$ 1.38)
FL	3.03 ($\pm$ 1.03)
F	7.99 ($\pm$ 1.20)
DIA 3	
C	30.82 ($\pm$ 4.98)
L	21.05 ($\pm$ 2.88)
FL	13.84 ($\pm$ 1.91)
F	23.45 ($\pm$ 2.06)
DIA 5	
C	56.75 ($\pm$ 5.10)
L	35.21 ($\pm$ 4.01)
FL	24.64 ($\pm$ 3.84)
F	40.43 ($\pm$ 4.79)

Tabela 5.4 - Diferenças significantes entre os grupos no modelo *in vitro*

DIA 1				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)	(p<0.01)	(p<0.01)
L	(p<0.01)		(p<0.01)	(p<0.01)
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		(p<0.01)
F	(p<0.01)	(p<0.01)	(p<0.01)	
DIA 3				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)	(p<0.01)	(p<0.01)
L	(p<0.01)		(p<0.01)	(p<0.05)
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		(p<0.01)
F	(p<0.01)	(p<0.05)	(p<0.01)	
DIA 5				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)	(p<0.01)	(p<0.01)
L	(p<0.01)		(p<0.01)	(p<0.01)
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		(p<0.01)
F	(p<0.01)	(p<0.01)	(p<0.01)	

5.4 Análise da concentração de flúor

O conteúdo de flúor nas amostras do modelo *in situ* foram analisado após 1, 3 e 5 dias de estudo (Gráfico 5.6, Tabelas 5.5 e 5.6). O grupo flúor + *laser* (FL) apresentou um aumento significativo na concentração de flúor no dia 1. O grupo flúor (F) apresentou diferença nos dias 1 e 3. O grupo *laser* (L) apresentou sempre o menor nível de flúor e mostrou uma diferença significativa para o grupo de flúor e dia 1, 3 e 5, indicado com uma cruz (+).

Gráfico 5.6 - Análise do conteúdo de flúor das amostras no modelo *in situ*. (C – Controle; L – Laser; FL – Flúor + Laser; F – Flúor). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle; (+) indica diferença significativa entre o grupo flúor; (++) indica diferença significativa entre grupo laser (Tabela 5.9)

Tabela 5.5 - Média e desvio padrão da quantidade de flúor no modelo *in situ*

Grupo	Média ($\pm$ Desvio Padrão)
DIA 1	
C	0.08 ($\pm$ 0.03)
L	0.06 ($\pm$ 0.03)
FL	0.13 ($\pm$ 0.07)
F	0.15 ($\pm$ 0.06)
DIA 3	
C	0.08 ($\pm$ 0.03)
L	0.06 ($\pm$ 0.02)
FL	0.10 ($\pm$ 0.05)
F	0.13 ($\pm$ 0.06)
DIA 5	
C	0.15 ($\pm$ 0.05)
L	0.09 ($\pm$ 0.06)
FL	0.12 ($\pm$ 0.04)
F	0.15 ($\pm$ 0.05)

Tabela 5.6 - Diferenças significativas na quantidade de flúor no modelo *in situ*

DIA 1				
	C	L	FL	F
C			(p<0.01)	(p<0.01)
L			(p<0.01)	(p<0.01)
FL	(p<0.01)	(p<0.01)		
F	(p<0.01)	(p<0.01)		
DIA 3				
	C	L	FL	F
C		(p<0.01)		(p<0.01)
L	(p<0.01)		(p<0.01)	(p<0.01)
FL		(p<0.01)		
F	(p<0.01)	(p<0.01)		
DIA 5				
	C	L	FL	F
C		(p<0.05)		
L	(p<0.05)			(p<0.01)
FL				(p<0.05)
F		(p<0.01)	(p<0.05)	

5.5 Análise por perfilometria em 3D

Nas imagens 3D realizadas por perfilometria, pode-se observar que em todos os grupos em todos os dias houve o desenvolvimento de uma lesão de erosão (Figuras 5.2 A, B, C). De acordo com a escala visual de cor, o ponto considerado zero é relacionado a cor amarela. Quanto mais azul a lesão, maior a sua profundidade. Pode-se observar que nos grupos *laser* e flúor + *laser*, as lesões aparecem mais amarelas, ou seja, menos profundas, especialmente no centro da lesão. As amostras pertencentes ao grupo Controle (C) sempre apresentaram-se mais azuis, assim como o grupo Flúor (F).

Figura 5.2A - Perfilometria em 3D das amostras no dia 1. A escala de cor a direita da figura indica a profundidade da lesão. Quanto mais próximo ao ponto zero, mais amarela. Quanto mais azul, mais profunda a lesão

Figura 5.2B - Perfilometria em 3D das amostras no dia 3. A escala de cor a direita da figura indica a profundidade da lesão. Quanto mais próximo ao ponto zero, mais amarela. Quanto mais azul, mais profunda a lesão.

Figura 5.2C - Perfilometria em 3D das amostras no dia 5. A escala de cor a direita da figura indica a profundidade da lesão. Quanto mais próximo ao ponto zero, mais amarela. Quanto mais azul, mais profunda a lesão

5.6 Imagens por microscopia de luz polarizada

As imagens por secção transversal, através de microscopia de luz polarizada mostram a lesão de erosão em uma visão transversal. Pode-se observar a progressão da lesão dos dias 1 a 5 em cada grupo. A área central das lesões está indicada por uma seta.

Figura 5.3 - Corte transversal das lesões de erosão; **C1** – Grupo Controle dia 1; **C3** – Grupo Controle dia 3; **C5** – Grupo Controle dia 5; **L1** – Grupo Laser dia 1; **L3** – Grupo Laser dia 3; **L5** – Grupo Laser dia 5; **FL1** – Grupo Flúor + Laser dia 1; **FL3** – Grupo Flúor + Laser dia 3; **FL5** – Grupo Flúor + Laser dia 5; **F1** – Grupo Flúor dia 1; **F3** – Grupo Flúor dia 3; **F5** – Grupo Flúor dia 5; barra = 1000µm

5.7 Imagens por microscopia de luz polarizada.

A microscopia de polarização das amostras do modelo *em situ* mostra a profundidade de desmineralização das amostras em todos os dias (Figuras 5.4 A, B, C). No dia 1 (Figura 5.4A), o grupo controle (**C**) apresentou uma maior profundidade de desmineralização. No dia 3 (Figura 5.4B), não foram evidentes as diferenças entre os grupos, assim como no dia 5 (Figura 5.4C).

Figura 5.4A - Microscopia de polarização no dia 1; **C1** – Grupo Controle dia 1; **L1** – Grupo Laser dia 1; **FL1** - Grupo Flúor + Laser dia 1; **F1** - Grupo Flúor dia 1; **barra = 200µm** (A seta indica região desmineralizada)

Figura 5.4B - Microscopia de polarização no dia 3: **C3** – Grupo Controle dia 3; **L3** – Grupo Laser dia 1; **FL3** - Grupo Flúor + Laser dia 3; **F3** - Grupo Flúor dia 3; **barra = 200µm** (A seta indica região desmineralizada)

Figura 5.4C - Microscopia de polarização no dia 5; **C5** – Grupo Controle dia 5; **L5** – Grupo Laser dia 5; **FL5** - Grupo Flúor + Laser dia 5; **F5** - Grupo Flúor dia 5; **barra = 200µm** (A seta indica região desmineralizada)

5.8 Microscopia eletrônica de varredura e EDX

As microscopias eletrônicas de varredura da figura 5.5 mostram a superfície de esmalte imediatamente após os respectivos tratamentos dos grupos: controle, *laser*, *laser* + flúor e de flúor. Os grupos irradiados com *laser* não mostraram nenhuma evidência de ablação, rachaduras ou danos de irradiação do esmalte nos grupos em que foi aplicado *laser*. A linha onde foi mensurada a concentração de flúor (F), cálcio (Ca) e fosfato (P) corresponde a uma linha branca no centro na imagem. O gráfico correspondente da análise de flúor, cálcio e fosfato estão ilustrados abaixo da imagem correspondente.

Figura 5.5 – Micrografias e análise de F, Ca e P (2 amostras/grupo) (**C** – Grupo Controle; **L** – Grupo Laser)

Figura 5.5 – Micrografias e análise de F, Ca e P (2 amostras/grupo) (**FL** – Grupo Flúor + Laser ; **F** – Grupo Flúor)

A medida de flúor, cálcio e fosfato nas amostras analisadas são mostrados no gráficos 5.7, 5.8 e 5.9. As análises de cálcio e fosfato não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Gráficos 5.8 e 5.9). A análise do conteúdo de flúor mostrou que o grupo flúor + *laser* (**FL**) apresentou maior concentração de flúor que os demais grupos, estatisticamente significante e indicado através de um asterisco(*)

Gráfico 5.7 - Conteúdo de flúor nas amostras analisadas através de EDX, imediatamente após os tratamentos: **C** – Controle; **L** – Laser; **FL** – Flúor + Laser; **F** – Flúor. (*) indica diferença significativa entre o grupo controle ($p < 0.05$)

Gráfico 5.8 - Conteúdo de fósforo nas amostras analisadas através de EDX, imediatamente após os tratamentos: **C** – Controle; **L** – Laser; **FL** – Flúor + Laser; **F** – Flúor

Gráfico 5.9 - Conteúdo de cálcio nas amostras analisadas através de EDX, imediatamente após os tratamentos: **C** – Controle; **L** – Laser; **FL** – Flúor + Laser; **F** – Flúor

Tabela 5.10: Médias e desvio padrão da quantidade flúor, cálcio e fosfato após análise por EDX (**C** – Controle; **L** – *Laser*; **FL** – Flúor + *Laser*; **F** – Flúor)

Grupo	Média ($\pm$ Desvio Padrão)		
	Flúor	Fosfato	Cálcio
C	0.29 (± 0.51)	7.83 (± 3.11)	11.75 (± 3.90)
L	0.29 (± 0.64)	8.57 (± 3.33)	12.58 (± 4.23)
FL	0.64 (± 0.82)	8.41 (± 3.30)	12.54 (± 4.30)
F	0.41 (± 0.70)	7.88 (± 3.32)	12.8 (± 4.57)

5.9 Microscopia eletrônica de varredura

A análise da superfície de esmalte das amostras do modelo *in situ*, após 1, 3 e 5 dias de tratamentos com magnificações de 300, 2000 e 60.000x mostraram características típicas de superfície desmineralizada e clássicas de padrão erosivo descritos na literatura. O grupo Flúor + Laser apresentou superfície mais irregular em todos os dias, provavelmente em decorrência da manutenção do corpo dos prismas de esmalte e perda da bainha dos mesmos, observado no aumento de 2000x. Os demais grupos apresentaram superfície mais plana, provavelmente devido à perda de todo o corpo dos prismas de esmalte, também observado no aumento de 2000x. Nas figuras 5.6, 5.7 e 5.8, as fotos das micrografias dos grupos nos dias 1, 3 e 5, respectivamente, podem ser vistos

Figura 5.6 - Micrografias da superfície das amostras no modelo in situ no dia 1; **C1** – Grupo Controle dia 1; **L1** – Grupo Laser dia 1; **FL1** - Grupo Flúor + Laser dia 1; **F1** - Grupo Flúor dia 1.

Figure 5.7 - Micrografias da superfície das amostras no modelo *in situ* no dia 3; **C3** – Grupo Controle dia 3; **L3** – Grupo Laser dia 3; **FL3** - Grupo Flúor + Laser dia 3; **F3** - Grupo Flúor dia 3

Figure 5.8 - Micrografias da superfície das amostras no modelo *in situ* no dia 5 **C5** – Grupo Controle dia 5; **L5** – Grupo Laser dia 5; **FL5** - Grupo Flúor + Laser dia 5; **F5** - Grupo Flúor dia 5.

6 DISCUSSÃO

Existem evidências de que a frequência da erosão dental vem aumentando na população e, paralelamente, estudos investigando a etiologia, epidemiologia e possíveis tratamentos também vem crescendo nos últimos anos (34). Nos anos setenta menos que cinco estudos relacionados ao tema eram publicados por ano, já nos anos oitenta esse número subiu para dez trabalhos publicados por ano e atualmente existe uma média de cinquenta trabalhos publicados por ano (153).

O consumo de bebidas ácidas é um dos fatores relacionados ao aumento da erosão dental observada na população. O consumo de bebidas ácidas aumentou 300% nos últimos 20 anos (17). Em 1995, entre 56 e 85% das crianças na escola nos EUA consumiram pelo menos um refrigerante por dia, com a maior quantidade ingerida por adolescentes do sexo masculino. Atualmente há um consenso de que o consumo de quatro ou mais bebidas ácidas por dia está associado com alto risco de desenvolvimento de erosão dental (18).

Entre a grande variedade de bebidas ácidas encontradas comercialmente, o ácido cítrico dos sucos é mais prejudicial para a superfície do dente, uma vez que apresenta dupla ação. Além do efeito dos íons de hidrogênio, os ânions (citrato) podem se ligar ao cálcio, reduzindo a supersaturação da saliva e levando a dissolução da superfície do cristal por um tempo prolongado (22, 23). No presente estudo, a erosão ácida foi promovida por imersão dos dispositivos palatinos contendo as amostras de esmalte em ácido cítrico durante 20 minutos duas vezes ao dia, como descrito no estudo de Ganss et al. (154).

No estudo de Ganss et al. (154) foram utilizadas amostras de esmalte dental humanos derivados de terceiros molares. O período experimental do estudo foi de 5 dias, e a perda de esmalte foi determinada através de perfilometria. As amostras de esmalte foram fixadas na região lingual de dispositivos mandibulares, diferentemente

do presente estudo, que fixou as amostras de esmalte bovino na região lateral do palato de dispositivos palatino. O grupo submetido apenas à erosão, não submetido à abrasão por escovação do estudo, que seria o grupo que mais se assemelha ao grupo controle realizado no presente estudo, apresentou em torno de 45µm de perda de estrutura de esmalte após os 5 dias. No presente estudo verificou-se que após os mesmos 5 dias com os mesmos tratamentos (2 desafios/dia com ácido cítrico por 20 minutos cada), a média da perda de estrutura de esmalte se encontrava próximo a 68 µm. Provavelmente a diferença na origem do esmalte dental utilizado: bovinos neste estudo e esmalte dental humano no estudo de Ganss *et al.* 2007, (154) bem como a posição das amostras na boca, poderiam ser fatores responsáveis por essa diferença na perda de esmalte encontrada. O esmalte bovino tem sido amplamente utilizado em pesquisas odontológicas como um modelo de esmalte dental humano.

Uma das vantagens da utilização de dentes bovinos para pesquisas é a possibilidade de obtenção de áreas maiores de esmalte plano. Outra vantagem de sua utilização é a maior facilidade de aquisição em relação tecido dental humano. Além disso, as propriedades ópticas dos dentes bovinos, assim como sua composição é muito similar aos dentes humanos (155). No entanto, a taxa de progressão da desmineralização no esmalte bovino parece ser maior. Rios *et al.* (156) verificaram que o esmalte humano apresentou maior percentual de microdureza na superfície e menor desgaste em relação ao esmalte bovino, quando as amostras foram submetidas *in situ* à erosão (5 minutos em 150 ml de refrigerante – Coca cola- 4 vezes por dia), seguido pela escovação. Featherstone e Mellberg (157) já descreveram que a progressão de cárie artificial foi 3 vezes maior em esmalte bovino do que em esmalte humano. O esmalte humano é mais compacto do que o bovino, que é mais poroso e apresenta menor conteúdo mineral (25, 157).

A erosão dental é influenciada por diversos fatores descritos na literatura (21-23, 26, 27, 32, 35). Dessa forma as pesquisas devem levar em consideração esses fatores, para reproduzir da forma mais fiel os resultados. Recentemente, muitos estudos relacionados à erosão dental estão sendo desenvolvidos através do modelo *in situ* (52, 56, 65, 76, 78, 86, 99, 101, 107, 158, 159). Neste modelo as amostras permanecem no ambiente bucal, sofrendo influência de diversos fatores biológicos,

dentre eles a saliva. Os resultados obtidos, dessa forma reproduzem de forma mais fiel possível o que ocorreria *in vivo*.

Nesse estudo, os voluntários permaneceram utilizando o dispositivo palatino com as amostras fixadas durante 1, 3 e 5 dias. Todos os voluntários apresentaram pH salivar, capacidade tampão e fluxo salivar estimulado, dentro dos padrões de normalidade. As amostras foram fixadas nas regiões laterais do dispositivo palatino. Apesar da existência na literatura de estudos controversos a respeito do papel da saliva na progressão da erosão dental, estudos comprovaram que o modelo *in situ* é a condição mais próxima do que realmente ocorre *in vivo*. O papel da saliva no processo de prevenção ou remineralização de erosão ácida no tecido dental não é totalmente compreendido. A saliva tem sido fortemente considerada o fator biológico mais importante que influencia a erosão dental (52).

A saliva atua de diversos modos na proteção da estrutura dental frente a um agente erosivo, dentre eles: diluição e remoção do agente erosivo da boca, neutralização e tamponamento dos ácidos, diminuição da taxa de dissolução do esmalte, pela presença de íons de cálcio salivar e fosfato (22). Na metodologia *in situ* adotada neste estudo, alguns desses fatores não atuaram no processo de erosão do esmalte, uma vez que o desafio ácido foi realizado fora da cavidade bucal. Desses fatores podem ser citados: diluição, remoção do agente erosivo da boca, neutralização e tamponamento dos ácidos.

Há evidências de que o esmalte com a microdureza reduzida após desafio erosivo pode ser remineralizado após a exposição à saliva (29, 160, 161). Foi mostrado por Rio *et al.* (2006), que a saliva estimulada por uma goma de mascar pode prevenir ou reduzir o desgaste e a variação percentual na microdureza do esmalte bovino e humano submetidos a erosão seguido de abrasão por escovação imediatamente ou após 1 hora (156). Outros estudos também verificaram um aumento da resistência à abrasão do esmalte dental após erosão ácida e contato com saliva *in situ* (56, 162).

Outros estudos não encontraram um efeito benéfico significativo da saliva na prevenção ou remineralização da superfície dental após erosão ácida *in situ* (48, 56, 163-165).

Apesar dos resultados controversos na literatura, uma prova concreta da importância da saliva no desenvolvimento de erosão dental, é de que a erosão dental está diretamente associada a baixa taxa de fluxo salivar e capacidade tampão da saliva (22). Além disso, os produtos substitutos de saliva que contêm cálcio e fosfato se mostram relevantes na remineralização do esmalte após erosão ácida (30).

Além disso, há um consenso na literatura sobre a importância da película adquirida na prevenção da erosão ácida (41-47). A película adquirida pode se comportar como uma barreira de difusão ou uma membrana semi-permeável, evitando o contato direto entre ácidos e a superfície do dente e, assim, inibindo a desmineralização (44, 45). No modelo *in situ* desenvolvido neste estudo, a película provavelmente desempenhou um papel na prevenção parcial do processo de desmineralização do esmalte. Os voluntários utilizaram o dispositivo palatino durante dia e noite, dessa forma, houve tempo suficiente para a formação de uma película adquirida madura. Os voluntários podiam inserir o dispositivo palatino na solução de ácido cítrico entre 6:00 – 9:00 horas da manhã e entre 18:00 - 21:00 horas da tarde/noite. Portanto, havia sempre um tempo mínimo de 15 horas para o desenvolvimento de uma película madura, entre os 2 desafios ácidos de cada dia. O tempo de desenvolvimento da película é um fator importante relacionada à sua capacidade de proteger a superfície dental contra o ataque ácido. Uma película com pouco tempo de formação, considerada jovem, dificilmente será uma barreira de difusão a um agente erosivo. Somente uma película madura e com determinada espessura poderá retardar o processo de difusão de um ácido (1).

Assim, a película adquirida irá mostrar uma maior proteção a um agente erosivo quando apresentar-se madura. O consumo freqüente de bebidas ácidas ou fatores intrínsecos, como vômito ou regurgitação, em intervalos curtos, não propiciam tempo suficiente para a reorganização da película. No presente estudo, a metodologia utilizada consentiu tempo suficiente para o desenvolvimento de uma

película adquirida madura entre os desafios ácidos realizados nas amostras. Os voluntários foram instruídos para não tocar as amostras em qualquer momento, a fim de manter intacta a película adquirida.

A posição da língua, também está diretamente relacionada com a erosão dental (22). O papel da língua como agente de abrasão em superfícies que sofreram erosão ácida tem sido especulado na literatura (166). Holst e Lange (166) consideram o papel de abrasão da língua potencializador na perda de estrutura dental na face palatina de dentes de indivíduos que apresentam vômitos freqüentes. Em estudos realizados em animais, também se observou um maior padrão de desgaste na face lingual de dentes após erosão ácida induzida com bebidas.

No presente estudo desenvolveu-se o mesmo protocolo em dois modelos experimentais diferentes: *in situ* e *in vitro*. Entre um desafio ácido e outro, no modelo *in situ*, as amostras foram mantidas na cavidade bucal dos voluntários, ao passo que no modelo *in vitro* as amostras foram armazenadas em água deionizada em temperatura ambiente. Curiosamente, apesar do efeito remineralizador da saliva sobre as amostras no modelo *in situ*, o modelo *in situ* sempre apresentou maior perda de tecido em relação ao *in vitro*, em todos os momentos e grupos (Gráficos 5.4 e 5.5). Essa diferença ocorreu provavelmente devido à abrasão exercida pela língua dos voluntários no modelo *in situ*. Como as amostras foram fixadas nas laterais de dispositivos palatinos, a língua exerceu abrasão direta nas amostras. Este achado está de acordo com outros estudos onde se constatou que a língua exerce um papel modificador no processo de desgaste dental (22, 166, 168).

Nos resultados do presente estudo, no modelo *in situ* pode-se observar um maior desvio padrão dos valores da perda de estrutura nas amostras quando comparado ao modelo *in vitro* (Gráficos 5.4 e 5.5), apesar dos dois modelos terem sido submetidos aos mesmos tratamentos. Esse aumento na variação dos resultados do modelo *in situ* deve-se principalmente a variação encontrada entre os voluntários. Todos os voluntários apresentaram propriedades salivares (fluxo, pH, capacidade tampão), dentro dos padrões de normalidade, porém, dentro da janela de normalidade, existe uma variação entre eles (Gráficos 5.1 e 5.2). Além disso, há uma variação entre a força da língua dos voluntários. Alguns deles apresentaram

uma maior força neste músculo em comparação com outros, de modo a levar uma maior abrasão das amostras, conseqüentemente, maior a perda de tecido. Dessa forma, as amostras do modelo *in situ* nesse estudo foram submetidas a uma força de abrasão, diferentemente das amostras do modelo *in vitro* deste estudo, que foi submetido apenas à erosão, e nenhuma força abrasão.

Atualmente, muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de desenvolver um protocolo de prevenção ou tratamento da erosão dental. Um possível modo de prevenção seria tornar o esmalte resistente aos ácidos causadores da erosão. O flúor tem sido o principal fator estudado visando à prevenção da erosão dentária. Como os *lasers* de alta potência têm mostrado resultados promissores na prevenção de cáries (110, 126, 129, 132, 169, 170), recentemente foram realizados alguns estudos avaliando o efeito dos *lasers* de alta potência na prevenção da erosão dental (148, 171-174). Estudos demonstraram que os *lasers* de CO₂ ($\lambda = 10.6\mu\text{m}$) são capazes de alterar a composição química e a morfologia do tecido dental, levando a inibição de desmineralização do esmalte e dentina, tanto *in vitro* quanto *in situ* (126, 132-135, 141, 159, 170, 175-178). Os comprimentos de onda emitidos pelos *lasers* de CO₂ são apropriados para serem utilizados nos tecidos dentais, devido a sua alta absorção em esmalte e dentina. Dessa forma, esse estudo testou o *laser* de CO₂, emitindo comprimento de onda na faixa de 10,6 μm na prevenção da erosão dental, revelando resultados promissores.

Nos modelos testados, pode se observar que as lesões de erosão decorrentes da imersão em ácido cítrico se tornam mais profundas a cada dia (Gráficos 5.5, 5.6, Figuras 5.1 e 5.3).

No modelo *in situ*, o tratamento com *laser* com os parâmetros: 0.3J/cm²; 5 μs ; 226Hz mostrou redução de **48%**, **43%** e **31%** na perda de esmalte comparado ao grupo controle (100%) nos dias 1, 3 e 5, respectivamente. O grupo flúor + *laser* mostrou redução de **74%**, **45%** e **50%** nos dias 1, 3 e 5, respectivamente. O grupo flúor apresentou redução de **23%**, **18%** e **15%** nos dias 1, 3 e 5, respectivamente. Os grupos: *laser* e flúor + *laser* apresentaram uma diferença significativa entre o grupo controle, tornando o esmalte mais resistente à erosão ácida.

Pode-se observar também, no modelo *in situ* desenvolvido neste estudo, que o efeito do tratamento com *laser*, seja ele utilizado sozinho ou associado ao flúor, na prevenção da erosão ácida foi mantido durante todos os dias de tratamento (5 dias). O tratamento com flúor quando utilizado isoladamente, apresentou a menor capacidade de prevenção de perda de esmalte, e seu efeito preventivo não foi significativo.

A análise visual da profundidade de desmineralização do tecido através de microscopia de polarização das amostras do modelo *in situ* mostrou que no dia 1, o grupo controle apresentou uma maior profundidade de desmineralização em comparação aos demais grupos, ao passo que nos dias 3 e 5 não houve diferença visual na profundidade de desmineralização entre os grupos (Figuras 5.4 A, B e C).

No modelo *in vitro* desenvolvido, embora a perda de esmalte tenha sido proporcionalmente sempre reduzida em comparação com o modelo *in situ*, devido a vários fatores descritos anteriormente, o comportamento dos grupos mantiveram o mesmo comportamento do modelo *in situ*. O tratamento com *laser* mostrou **52%**, **31%** e **37%** de perda de esmalte em comparação ao grupo controle (100%) em 1, 3 e 5 dias, respectivamente. O grupo flúor + *laser* mostrou **73%**; **55%** e **57%** em 1, 3 e 5 dias, respectivamente, e o grupo flúor **28%**, **24%** e **29%** em 1, 3 e 5 dias, respectivamente. Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle em todos os tempos analisados.

No modelo *in vitro*, a capacidade do *laser*, seja ele utilizado sozinho ou associado ao flúor, na prevenção da erosão ácida também foi mantido durante todos os dias de tratamento (5 dias). O grupo de flúor + *laser* apresentou os melhores resultados. O grupo flúor apresentou a menor capacidade de prevenção da perda de esmalte, no entanto, no modelo *in vitro* essa diferença foi significativa.

Os resultados encontrados podem ser confirmados e facilmente visualizados no modelo de análise profilométrica em três dimensões (Figuras 5.2 A, B e C). No grupo Flúor, onde o menor efeito preventivo foi encontrado, as lesões de erosão apresentam-se mais azuladas; e segundo a escala visual que acompanha a imagem, significa lesões mais profundas. O grupo Flúor + *Laser* que apresentou

menores valores de perda de estrutura, apresentou lesões mais amareladas, principalmente no centro da lesão. A cor amarela indica lesões menos profundas, mais próximas ao ponto zero.

Assim, nos dois modelos testados, pode-se verificar que o *laser* apresentou capacidade de prevenção da erosão ácida em esmalte. Muitos estudos já demonstraram o efeito da irradiação com diversos *lasers* na diminuição da solubilidade do esmalte dentário, mas mecanismo como essa redução ocorre não é totalmente compreendido.

Três diferentes teorias têm sido propostas para explicar as mudanças no esmalte que resultam na diminuição de sua solubilidade, e todas elas estão relacionados ao aumento da temperatura no tecido. Até agora, não está claro qual delas é predominante, mas parece que as diferentes alterações acontecem ao mesmo tempo e que a soma dos seus efeitos resulta na inibição da desmineralização.

A primeira teoria associa a redução da solubilidade do esmalte dental com o seu derretimento e fusão. Como em vários estudos, a fusão e recristalização da superfície do esmalte foram observadas após irradiação, foi postulada a teoria de que a camada derretida levaria a uma diminuição da permeabilidade de íons ácidos e, portanto, a redução da dissolução de minerais (108, 109, 179, 180). Mas, as evidências atualmente disponíveis indicam que a fusão do esmalte não é necessariamente obrigatória para que ocorra a inibição da desmineralização e que as alterações no esmalte fundido não são os mais interessantes para reduzir a sua solubilidade.

Borggreven et al. (181) através da medição da penetração de um marcador iônico e não iônico no esmalte, mostraram um aumento na permeabilidade do esmalte nas regiões onde a fusão ocorreu após a irradiação com *laser* de CO₂. Nelson et al. (175) observaram em espectroscopia a formação de fosfato tetra-cálcio, que é uma fase menos solúvel que o esmalte e fusão de superfície, após a irradiação com 50 J/cm².

As outras duas teorias que tentam explicar o efeito dos *lasers* na redução da desmineralização do esmalte são relacionadas à: mudanças cristalográficas que fazem o mineral menos solúvel e da teoria de bloqueio da difusão de íons a partir da decomposição da matriz orgânica. O aquecimento do esmalte provoca alterações na sua composição e estrutura, e mudanças de fase da hidroxiapatita. Estas mudanças são diferentes em diferentes temperaturas e também as alterações na dissolução são diferentes de acordo com o aumento da temperatura. De acordo com Fowler e Kuroda (125) na faixa de 100-650 °C o aquecimento do esmalte leva à diminuição do teor de água, decomposição de proteínas, a perda parcial do carbonato de cálcio e formação de pirofosfatos. Entre 650 - 1000 °C são observados: o crescimento de cristais, a formação de α -e β -TCP, redução de OH⁻ e eliminação de carbonato. Entre 1100-1600 °C, as fases α -TCP e Tet-TCP podem ser observadas com uma redução adicional de OH⁻. Nas duas temperaturas mais altas, as fases de hidroxiapatita formada apresentam um produto de solubilidade maior do que o esmalte natural, o que aumenta sua solubilidade. Entre 100 e 650 ° C, as fases mais solúveis não são produzidas e a redução da formação de carbonato e pirofosfato são conhecidas por diminuir a solubilidade do esmalte, portanto, essa faixa foi descrita como mais interessante. No entanto, os mesmos autores mostraram evidências de que na faixa de 650-1000 ° C ocorre a formação de uma segunda fase de β -TCP, que é mais similar à hidroxiapatita e contém menos impurezas que o esmalte natural. Ao mesmo tempo, o conteúdo de carbonato e água é reduzido e ocorre o aumento de OH⁻. Estas mudanças também podem tornar os cristais mais puros e provavelmente levará à redução da solubilidade do esmalte (111, 125, 182-184). A hidroxiapatita carbonatada presente no esmalte contém impurezas e a redução destas impurezas reduzirá a sua solubilidade. Portanto, quando só a redução de carbonato é levada em consideração, o aumento da temperatura do esmalte ideal deve estar entre 800-900 ° C, intervalo onde se pode encontrar uma maior remoção de impurezas (123).

Uma terceira teoria descreveu a influência da decomposição da matriz orgânica na redução da solubilidade do esmalte. Após o aquecimento do esmalte entre 400 e 500°C, foi observada a diminuição da sua permeabilidade e uma redução de 8 vezes a sua solubilidade em relação ao esmalte natural (185, 186). Considerando que a decomposição da proteína do esmalte ocorre em 350°C, existe

a hipótese de que os produtos orgânicos da decomposição da matriz levam ao selamento do esmalte poroso e bloqueiam a entrada dos íons ácido (125, 187). Este efeito foi demonstrado no estudo de Hsu et al. (133) onde a irradiação com *laser* de CO₂ foi realizada em amostras de esmalte com matriz orgânica e também em amostras de esmalte na qual a matriz orgânica foi removida. Nas amostras contendo matriz orgânica, a inibição da desmineralização foi maior. A análise de birrefringência mostrou que a temperatura não foi maior que 400°C. Neste intervalo de temperatura, a água é eliminada do tecido, e os poros obstruídos foram observados. Através da espectrometria de ressonância paramagnética a presença de produtos de decomposição da matriz orgânica foram observados em 400°C (184). Suportando esta teoria, a irradiação com *laser* de Er: YAG, também demonstrou a redução dos poros em amostras contendo matriz orgânica, e não em amostras onde a matriz orgânica foi removida (188).

No presente estudo, foi realizada microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2000 vezes imediatamente após irradiação com *laser* de CO₂. Com os parâmetros utilizados (0.3J/cm², 5 μ s, 226Hz) não foi observada nenhuma região com fusão ou recristalização do esmalte. Dessa forma, os resultados obtidos na prevenção da erosão dental nesse estudo provavelmente estão relacionados às duas últimas teorias descritas.

Dessa forma, existem evidências que suportam todas as teorias e é provável que o efeito seja o resultado da combinação entre elas. A presença de carbonato, uma impureza de cristais de hidroxiapatita no esmalte pode ser removida da estrutura após o aquecimento entre 400 e 800°C. Como a duração do pulso tem uma influência direta sobre o aumento da temperatura, sua influência na eliminação de carbonato é esperada. Essa influência existe, e com o comprimento de onda de 10,6 μ m a redução da duração do pulso de 100 para 2 μ s reduziu 50% a energia necessária para a remoção do carbonato de estrutura. Na irradiação com 100 μ s, a eliminação acontece com 6 J/cm² e com 2 μ s com 3 J/cm² (123, 143).

Para comprimentos de onda altamente absorvidos pelo esmalte, com duração de pulso menor que o tempo de relaxamento térmico, como as utilizadas nesse estudo, permite-se que a deposição de calor seja localizada na superfície, causando

um mínimo dano térmico no tecido adjacente (123). Fica então evidente que a irradiação com larguras de pulsos curtas têm maior potencial para promover o aumento da temperatura necessária para deixar a hidroxiapatita menos solúvel, e também propiciar menor aumento de temperatura nas camadas mais profundas e próximas a polpa dental.

Vários estudos demonstraram que a irradiação com *lasers* de alta potência podem aumentar a resistência do esmalte à perda mineral quando em contato com ácidos que levam a cárie dental. Poucos e recentes estudos testaram o uso de *lasers* de alta potência na prevenção da erosão dental. O primeiro autor que testou diferentes *lasers* de alta potência na prevenção da erosão dentária *in vitro* foi Vlacic et al. (174). O autor testou a fluência de $15\text{J}/\text{cm}^{-2}$ *in vitro* com diferentes *lasers* (Argônio: 488, 514nm, KTP: 532nm, diodo de *laser*: 633, 670, 830nm e *laser* Nd: YAG 1064nm) associado a aplicação de gel neutro de fluoreto de sódio (1,23%). As amostras de esmalte foram então expostas a um desafio erosivo (HCl 1,0 M) por 5 minutos. A microdureza das amostras foi mensurada. O autor verificou que todos os comprimentos de onda utilizados, quando associados ao flúor mostraram um efeito protetor significativo da desmineralização do esmalte em comparação com as superfícies do grupo controle. No entanto, as amostras não sofreram nenhum tipo de abrasão e o autor não avaliou o aumento de temperatura durante a irradiação com a fluência utilizada. Pode-se sugerir que os resultados obtidos pelo autor estão diretamente relacionado com a ausência de abrasão submetida no esmalte, onde o efeito preventivo se torna mais fácil de ser alcançado, conforme observado no presente estudo, onde todos os tratamentos testados foram satisfatórios no modelo *in vitro*.

Mais recentemente, outros dois estudos também verificaram o efeito do *laser* de Nd:YAG na prevenção de erosão *in vitro*. Magalhães et al. (171) testaram diferentes parâmetros de irradiação com *laser* de Nd: YAG associado ou não ao flúor na redução da erosão em dentina (G1: controle, G2: flúor-fosfato acidulado (FFA) por 4 minutos e G3 : verniz fluoretado (NaF) por 6 horas; G4: 0.5W Nd: YAG pulso 250 μ s, 10Hz, 35J/cm², 30 seg; G5: 0.75W Nd: YAG *laser* 52,5 J/cm²; G6: 1W Nd: YAG 70J/cm² ; G7: 0.75W FFA + *laser* Nd: YAG; G8: NaF + 0.75W *laser* Nd: YAG). As amostras foram tratadas e armazenados em saliva artificial por 24 horas e

submetidos a quatro ciclos erosivos de 1 minuto em Sprite-light®. Entre os ataques erosivos, as amostras foram mantidas em saliva artificial por 59 minutos. O desgaste erosivo foi avaliado por profilometria. Os resultados mostraram que a irradiação com *laser* não foi capaz de reduzir a erosão em dentina e a aplicação de flúor foi capaz de aumentar a resistência da dentina à erosão. Provavelmente, os resultados obtidos no estudo, estão relacionados a pequena absorção do *laser* de Nd:YAG pelo esmalte e dentina. No estudo também não foi utilizado nenhum fotoabsorvedor capaz de aumentar a absorção do *laser* na superfície do tecido. Rios et al. (172) testaram em esmalte dental o *laser* de Nd: YAG com os mesmos parâmetros do estudo de Magalhães et al. (171). Durante 10 dias o ciclo erosivo foi realizado por imersão dos blocos em Sprite-loght ® por 1 minuto, seguido de imersão em saliva artificial por 59 minutos. O procedimento foi repetido 4 vezes por dia. O desgaste foi medido por perfilometria. Quanto ao esmalte, os autores concluíram que a associação entre a FFA e irradiação com Nd:YAG *laser* parece ser uma medida alternativa de prevenção contra a erosão.

Sobral et al.(173) também verificaram o efeito do *laser* Nd:YAG e fluoreto na prevenção de erosão e abrasão em esmalte bovino e humano, utilizando 1W, 100mJ, 10Hz; 141.5J/cm² em esmalte bovino e 1W, 100mJ, 10Hz e 125J/cm² em esmalte humano. O *laser* de Nd:YAG associado ao flúor em esmalte humano e bovino levou a uma redução significativa na perda de tecido dental em esmalte bovino e uma redução na microdureza de superfície em esmalte humano. Nesse estudo, no entanto, os autores utilizaram pigmento foto absorvedor durante a irradiação com *laser* de Nd:YAG.

Como o *laser* de CO₂ apresenta eficiente interação com a hidroxiapatita, quando utilizado com a energia mais adequada, espera-se que ele cause resultados promissores na prevenção da desmineralização do tecido dental. O primeiro estudo que verificou o efeito do *laser* de CO₂ (10.6µm) na prevenção da erosão verificou a sua eficácia quando associado ao tetrafluoreto de titânio (TiF₄) e fluoreto de amina (AmF) na proteção do esmalte e dentina contra a erosão quando aplicado antes ou durante a irradiação do *laser* (148). O autor testou o *laser* CO₂ (10.6µm, 10µs, 50Hz, 28.6J/cm² para o esmalte e 15J/cm² para dentina). Os resultados mostraram que nas condições testadas o AmF (Fluoreto de amina) reduziu a erosão em esmalte e

dentina, mas o *laser* de CO₂ não aumentou sua eficácia. O TiF₄ mostrou apenas uma capacidade limitada para evitar a erosão, mas a irradiação com *laser* de CO₂ aumentou a sua eficácia quando aplicado durante a irradiação. Segundo o autor, a análise de superfície através de microscopia eletrônica de varredura mostrou que a irradiação com *laser* de CO₂ induziu uma fusão de precipitados granulares na superfície, que poderiam resultar em maior absorção e retenção de titânio, flúor, ou ambos, levando a maior resistência ácida do esmalte. Em contraste, a irradiação com *laser* de CO₂ antes da aplicação TiF₄ não levou a mudanças visíveis na superfície. Segundo o autor, a irradiação com *laser* de CO₂ por si só não melhorou a resistência ácida do esmalte ou dentina.

Steiner-Oliveira et al. (149), também avaliaram o efeito do *laser* de CO₂ (10.6μm; 1J/cm²; 3W; 5ms, 10Hz para esmalte e 0.6J/cm², 2W; 5ms, 2Hz para dentina) associado ou não à aplicação de flúor no aumento da resistência à erosão ácida do esmalte e dentina de dentes bovinos, através de sucessivos desafios erosivos. As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (sem tratamento), Flúor, Laser, Laser + flúor. As amostras foram submetidas à desmineralização (0,3% de ácido cítrico, por 5 minutos) e remineralização em saliva artificial por 60 minutos. O ciclo foi repetido 3 vezes ao dia, durante 3 dias. Os autores verificaram que o tratamento com *laser* sozinho não foi capaz de evitar perdas de esmalte ou dentina devido à erosão. A associação entre o flúor e *laser* apresentou alguma proteção, mas segundo o autor devido ao efeito do flúor. Não houve interação sinérgica ou proteção em longo prazo com a associação entre flúor e *laser* de CO₂.

Ambos os estudos citados não verificaram efeito benéfico do *laser* de CO₂, apenas da eficiente interação do comprimento de onda emitido pelo *laser* de CO₂ com o tecido. Provavelmente, os parâmetros adotados pelos autores não são os mais eficientes na prevenção da desmineralização.

Os parâmetros adotados neste estudo foram baseados em estudo anterior (126, 176-178), onde foi verificado que com o *laser* de CO₂ e os parâmetros: 0.3J/cm²; duração do pulso de 5μs e 226Hz levou ao aumento da resistência do esmalte à cárie em 81% sem causar danos térmicos na estrutura dental.

Esse estudo foi o primeiro desenvolvido *in situ* e *in vitro* testando o efeito do *laser* de CO₂ na prevenção de erosão ácida. *In situ*, uma diferença significativa foi obtida nos grupos *laser* e flúor + *laser* em todos os tempos testados. A maior proteção foi obtida através da associação de flúor e *laser*. No modelo testado *in vitro*, todos os grupos, incluindo o flúor apresentaram proteção contra a erosão significativa. As diferenças nos resultados encontradas com relação ao *laser* de CO₂ na prevenção de erosão ácida podem ser explicadas devido à variação dos parâmetros utilizados. Esteves-Oliveira et al. (126) testaram diversos parâmetros do *laser* de CO₂ (10.6µm) na prevenção de cárie e verificaram que não necessariamente uma maior energia ou a duração do pulso maior seria mais eficaz. Com pulsos curtos, um aumento maior da temperatura da superfície pode ser esperado com menor propagação do calor para o interior do tecido (143). Os estudos que não atingiram resultados satisfatórios com *laser* de CO₂ (10.6µm) (148, 149) utilizaram fluências e duração do pulso superior em relação ao presente estudo.

No presente estudo, o flúor quando aplicado previamente à irradiação com *laser* de CO₂ parece aumentar o resultado obtido com o *laser*. Tanto no modelo *in vitro* quanto no modelo *in situ*, o grupo flúor + *laser* apresentou a menor profundidade de lesão quando submetido à erosão ácida (Gráficos 5.4 e 5.5). Em outros estudos, um sinergismo entre *laser* e flúor na redução da solubilidade do esmalte também foram demonstrados (189). No entanto, o mecanismo pelo qual esse sinergismo acontece não é completamente elucidado. Existem pelo menos duas hipóteses relacionadas ao tipo de formação de flúor induzida pelo tratamento com *laser*. Uma delas foi sugerida após análise de superfície por microscopia eletrônica de varredura, que demonstrou que o tratamento com flúor + *laser* (Nd: YAG) produziu numerosos precipitados de forma esférica ou globular que morfologicamente lembravam depósitos de fluoreto de cálcio na superfície radicular (190). Estes precipitados de flúor poderiam servir como reservatórios de flúor, utilizados durante episódios de desmineralização (169). Outra hipótese apontada por alguns autores sugeriu o papel dos *lasers* no aumento da captação de flúor pelos cristais do esmalte na forma de fluoreto firmemente ligado (190-192).

Usando hidroxiapatita sintética, foi demonstrado que o tratamento com *laser* de CO₂ pode transformar a hidroxiapatita (HA) em fluorapatita (FA), na presença de flúor (192). Stephen et al., (2004) também verificaram *in vitro* através de espectrometria de massa secundária (SIMS), que o *laser* aumentou a absorção de flúor em esmalte .

No presente estudo, foi utilizado um eletrodo para íon-específico para análise da concentração de flúor na solução após a dissolução parcial de esmalte com ácido clorídrico (HCL). Somente no dia 1, os grupos: flúor + *laser* e flúor mostraram uma quantidade significativa de flúor em comparação aos demais grupos. No dia 3 esses grupos não apresentam níveis significativamente mais elevados de flúor, e no dia 5, os valores foram muito semelhantes ao grupo controle. Assim, pode-se observar que o aumento de flúor encontrado nesses grupos não foi mantido por períodos longos de tempo.

Tem sido sugerido que a absorção de flúor na estrutura da hidroxiapatita induzida pelo *laser* é dependente de energia (193). Foi reportado que, para a transformação da fase da hidroxiapatita sintética para fluorapatita, a densidade de energia mínima seria 38J/cm² (192). No entanto, Chin-Ying (194) mostraram em seu estudo que a maior energia utilizada não necessariamente irá resultar em uma maior absorção de flúor. Provavelmente os resultados encontrados no presente estudo indicam que apenas uma aplicação tópica de flúor não leva a um tempo de atuação prolongado do flúor na prevenção da desmineralização do esmalte quando esse é submetido a sucessivos tratamentos com ácido cítrico. A análise por EDX nesse estudo foi realizada imediatamente após o tratamento específico realizado em cada grupo. Esta técnica detectou apenas uma quantidade significativa de flúor no grupo flúor + *laser*. Assim, a presença de um nível significativo de flúor pode ser detectado no grupo flúor + *laser* por duas metodologias diferentes em períodos curtos após o tratamento (imediatamente após e 1 dia *in situ*), mas depois de 3 dias esta diferença não foi significativa.

No presente estudo, o flúor utilizado isoladamente foi capaz de impedir de forma significativa a perda de esmalte apenas no modelo *in vitro* (Gráfico 5.5). Na Odontologia, o flúor é o principal agente utilizado para aumentar a remineralização

do esmalte e dentina. No entanto, para controlar a perda mineral causada pela erosão, altas concentrações e frequências parecem ser necessárias (87). O impacto da alta concentração de flúor na progressão da erosão ácida no esmalte tem sido analisado em diversos estudos. A ação do flúor é principalmente atribuída à precipitação de CaF_2 (72, 74). A formação da camada de CaF_2 e seu efeito protetor na desmineralização dependem do pH, da concentração de flúor e tipo de sal do agente (195).

No entanto, o papel do flúor na prevenção da erosão ácida ainda é controverso na literatura (195). Utilizando diferentes abordagens, vários grupos demonstraram maior resistência à erosão ácida após a aplicação de flúor em esmalte (196-198). Também foi verificado *in vitro* que o tratamento com flúor não foi capaz de proporcionar um efeito preventivo contra a erosão ácida, uma vez que a bebida ácida rapidamente dissolveria o fluoreto de cálcio, removendo assim os vestígios do tratamento tópico com flúor (75, 199).

No presente estudo, no modelo *in situ* o flúor isoladamente não apresentou qualquer efeito significativo na prevenção da erosão ácida em qualquer momento avaliado. Pode-se especular que, no modelo experimental desenvolvido no presente estudo, o flúor não pôde evitar a perda de esmalte, quando submetidos à abrasão realizada pela língua. Quando não foi realizada força de abrasão nas amostras, como no modelo *in vitro*, o flúor apresentou uma proteção significativa contra a erosão ácida. Na literatura, ainda não há um consenso sobre o efeito preventivo do flúor na erosão ácida (75).

A morfologia das amostras nas figuras 5.6, 5.7 e 5.8 apresentaram aspecto característico de superfície submetida à erosão ácida como já descrito na literatura (25). Sabe-se que no esmalte prismático, a erosão ácida causa primeiro a desmineralização da bainha dos prismas e depois, com um desafio ácido mais longo, também os núcleos dos prismas (25). No dia 1 (Figura 5.6), todos os grupos apresentaram superfície do esmalte irregular, devido à desmineralização pelo ácido cítrico. No grupo de flúor + *laser* aparentemente houve uma melhor preservação dos núcleos de prismas do esmalte em relação aos os outros grupos (aumento de 2000x). No dia 3 (Figura 5.7), os grupos continuaram apresentando superfície

irregular de esmalte com porosidades, típicas de erosão ácida. Pode-se observar que o grupo de flúor + *laser* pode preservar uma grande quantidade de núcleos de prismas, ao passo que as bainhas dos prismas sofreram dissolução. Neste grupo também pode se observar que a superfície do esmalte apresentou uma maior irregularidade. Considerando que os grupos apresentaram a menor lesão por erosão ácida, analisada através de perfilometria, a superfície mais irregular pode estar diretamente relacionada à resistência à abrasão. Como outros grupos apresentaram menor capacidade de resistência à abrasão e sua superfície não foi tão irregular, pode-se concluir que nesses casos houve remoção da camada superficial de prismas alterado. No dia 5 (Figura 5.8), os grupos *laser* e flúor + *laser* apresentaram as superfícies mais irregulares, provavelmente devido à maior capacidade de resistência à abrasão e também apresentaram padrões de exposição dos núcleos dos prismas mais conservados que os outros grupos.

No entanto, a grande quantidade de estudos que analisaram a morfologia do esmalte após a erosão foi desenvolvida *in vitro*. Poucos foram os estudos desenvolvidos *in situ*, e a metodologia desses estudos foi diferente do presente estudo. Meurman e Frank (25) compararam através de microscopia eletrônica de varredura o padrão de erosão do esmalte humano e bovino *in vitro*. Ambos apresentaram a mesma característica de dissolução, onde a erosão inicial após 15 minutos ou 30 minutos de imersão em ácido cítrico levou à dissolução da bainha dos prismas de esmalte. Um tempo maior de imersão levou à dissolução dos núcleos dos prismas de esmalte.

Lippert et al. (200) verificaram através de microscopia de força atômica, que depois de 2 minutos em ácido cítrico uma estrutura prismática do esmalte com características de granulação foi observada. O autor também pode verificar através da metodologia testada que a exposição à saliva artificial levou à deposição de minerais na superfície do esmalte. Após a abrasão por escovação da superfície do esmalte submetida a erosão ácida, o padrão típico dos prismas observado após a desmineralização foi mantido e alterações mínimas na superfície foram observadas. Já a aparência de granulação do esmalte desmineralizado foi alterada pela abrasão por escovação, confirmando a perda mineral. Uma pesquisa anterior (201) propôs que a aparência dessa superfície granulosa é devido à presença de uma camada

mineral amorfa de fosfato de cálcio, que é formada quando as amostras de esmalte são transformadas a partir de uma solução erosiva. Essa camada mineral é fracamente ligada à superfície do esmalte subjacente, dessa forma a abrasão por escovação tem a capacidade de remover essa camada (201) No presente estudo, não houve diferença entre a superfície dos grupos na maior ampliação (60000X). Nenhuma estrutura granulada mineral pode ser vista no microscópio eletrônico de varredura.

Sauro et al (202) verificaram a superfície do esmalte *in situ* após erosão ácida através de uma técnica de microscopia eletrônica de varredura da réplica do tecido. Os voluntários mantinham 50 ml de bebida contendo ácido cítrico por 4 minutos na cavidade oral. As imagens da microscopia eletrônica de varredura mostraram uma superfície de esmalte desmineralizado com muitas porosidades, e caracterizada pela desmineralização dos núcleos dos prismas de esmalte. O autor relacionou a desmineralização intensa com o potencial erosivo acentuado de ácido cítrico, que apresenta capacidade quelante de cálcio. O estudo, no entanto, não permitiu tempo suficiente para as amostras entrarem em contato com a saliva e sofrerem remineralização. Os voluntários só mantiveram a bebida na cavidade oral durante os 4 minutos, após este tempo a replica do esmalte já foi analisada.

Rios et al. (158), desenvolveram um estudo *in situ*, onde os voluntários imergiam o dispositivo intra-oral por 5 minutos em 150 ml de refrigerante (Coca-cola), 4 vezes ao dia, durante 7 dias. Após o desafio ácido algumas amostras foram escovadas com dentifrício fluoretado. A análise por MEV mostrou a dissolução dos núcleos dos prismas de esmalte nas superfícies submetidas à erosão, enquanto aqueles submetidos à erosão e à abrasão apresentaram uma superfície mais homogênea de esmalte, provavelmente devido à remoção da camada superficial dos prismas alterada. Esse padrão também pode ser visto no presente estudo, especialmente nos dias 3 e 5 (Figura 5.7 e 5.8), no grupo flúor + laser.

Em nenhuma das microscopias eletrônicas de varredura nesse estudo detectou-se depósitos fluoreto de cálcio como outro autor (194). Uma maior ampliação (60000X) também foi realizada a fim de visualizar qualquer precipitado de flúor (203). Provavelmente não foi observado precipitado de flúor, uma vez que foi

realizada uma única aplicação de flúor nos seguintes grupos: *laser* + flúor ou flúor no presente estudo. Em outros estudos foram observadas precipitados globulares de fluoreto com um diâmetro de 4-15 nm até 1µm (204) na superfície das amostras, como resultado de inúmeras aplicações, (205). A densidade de distribuição dos glóbulos na superfície e seu tamanho foi relatada como sendo dependente da concentração de flúor e do pH do agente aplicado (195, 206). Em seu estudo, Duschner et al. (203) pôde verificar glóbulos de fluoreto, no entanto após aplicações realizadas por tempo duradouros. O autor utilizou o tempo de 72h de aplicação de NaF neutro, sendo esse protocolo não viável clinicamente.

7 CONCLUSÕES

- Sob as condições realizadas no modelo *in situ*, no qual diversas variáveis atuam diretamente nas amostras, pode-se concluir que apenas o tratamento com fluoreto de amina (1,25% of F⁻) associado ao *laser* de CO₂ (λ = 10,6 μ m) foi capaz de levar à prevenção significativa da erosão do esmalte em todos os tempos analisados quando comparado ao grupo controle e grupo flúor. O grupo tratado apenas com o *laser* de CO₂ apresentou prevenção significativa em todos os tempos analisados quando comparado ao grupo controle. No modelo *in situ*, o tratamento com fluoreto de amina isoladamente parece não oferecer efeito preventivo para a erosão dental.

- Sob as condições desse estudo realizadas no modelo *in vitro*, é possível concluir que os tratamentos com *laser* de CO₂ (λ = 10,6 μ m) associado ou não ao fluoreto de amina, assim como o tratamento com fluoreto de amina utilizado isoladamente resultaram em prevenção significativa na erosão do esmalte dental em todos os tempos analisados.

- O fluoreto de amina utilizado nesse estudo foi capaz de prevenir a erosão dental apenas no modelo *in vitro*. *In situ*, a aplicação tópica de fluoreto de amina não foi efetiva. Dessa forma, o tratamento com fluoreto de amina parece ter efetividade apenas quando no esmalte dental não atuam forças de abrasão.

REFERÊNCIAS

1. Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005;55(4 Suppl 1):285-90.
2. Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update.* 1982 Aug;9(7):373-4, 376-378, 380-381.
3. Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. *J Dent Res.* 2006 Apr;85(4):306-12.
4. Sognnaes RF, Wolcott RB, Xhonga FA. Dental erosion. I. Erosion-like patterns occurring in association with other dental conditions. *J Am Dent Assoc.* 1972 Mar;84(3):571-6.
5. Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994 Aug;22(4):195-207.
6. Aw TC, Lepe X, Johnson GH, Mancl L. Characteristics of noncarious cervical lesions: a clinical investigation. *J Am Dent Assoc.* 2002 Jun;133(6):725-33.
7. Bergstrom J, Lavstedt S. An epidemiologic approach to toothbrushing and dental abrasion. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1979 Feb;7(1):57-64.
8. 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.
9. Oginni AO, Olusile AO, Udoeye CI. Non-carious cervical lesions in a Nigerian population: abrasion or abfraction? *Int Dent J.* 2003 Oct;53(5):275-9.
10. Piotrowski BT, Gillette WB, Hancock EB. Examining the prevalence and characteristics of abfractionlike cervical lesions in a population of U.S. veterans. *J Am Dent Assoc.* 2001 Dec;132(12):1694-701; quiz 726-7.

11. Murakami C, Oliveira L, Ardenghi T, Bönecker M. Prevalência de erosão dentária em pré-escolares no município de Diadema, SP. *Braz Oral Res.* 2009;23(1):229.
12. Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: a literature review. *J Dent.* 2008 Oct;36(10):759-66.
13. Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *Br Dent J.* 1980 Jun 3-17;148(11-12):253-6.
14. Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The measurement and prevention of erosion and abrasion. *J Dent.* 2001 Aug;29(6):395-400.
15. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res.* 2003 Nov-Dec;37(6):450-5.
16. Zero D, Lussi A. Etiology of enamel erosion - intrinsic and extrinsic factors. In: Addy M, Embery G, Edgar M, Orchardson R, editors. *Tooth Wear and Sensitivity*. London: Martin Dunitz; 2000.
17. Calvadini C, Siega-Riz AM, Popkin BM. US adolescent food intake trends from 1965 - 1996. *Archs Dis Child.* 2000;2000(83):18-24.
18. Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res.* 2000 Mar-Apr;34(2):182-7.
19. Aranha AC, Eduardo C de P, Cordas TA. Eating disorders part II: clinical strategies for dental treatment. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9(7):89-96.
20. Aranha AC, Eduardo C de P, Cordas TA. Eating disorders. Part I: Psychiatric diagnosis and dental implications. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9(6):73-81.
21. Barbour ME, Finke M, Parker DM, Hughes JA, Allen GC, Addy M. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. *J Dent.* 2006 Mar;34(3):207-13.
22. Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12 Suppl 1:S5-13.

23. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44.
24. Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.* 1981;15(5):377-85.
25. Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.* 1991;25(2):81-7.
26. Lussi A, Jaggi T, Scharer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.
27. Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res.* 1995;29(5):349-54.
28. Larsen MJ. Dissolution of enamel. *Scand J Dent Res.* 1973;81(7):518-22.
29. Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. *Am J Dent.* 1991 Jun;4(3):120-2.
30. Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2001 Aug;46(8):697-703.
31. Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent.* 2005 Mar;33(3):243-52.
32. Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M. An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res.* 1995;29(6):470-6.
33. Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104 (2 Pt 2):162-77.
34. Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. *Caries Res.* 2008;42(1):62-7.
35. Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8.

36. Levine MJ. Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):279-86.
37. Aguirre A, Mendoza B, Levine MJ, Hatton MN, Douglas WH. In vitro characterization of human salivary lubrication. *Arch Oral Biol.* 1989;34(8):675-7.
38. Levine MJ, Aguirre A, Hatton MN, Tabak LA. Artificial salivas: present and future. *J Dent Res.* 1987 Feb;66 Spec No:693-8.
39. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):247-53.
40. 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.
41. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res.* 1976 Jul-Aug;55(4):664-70.
42. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res.* 1987;21(4):297-309.
43. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1991;25(1):1-6.
44. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res.* 1999 Dec;78(12):1821-8.
45. Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1999 Sep-Oct;33(5):372-9.
46. Hannig M, Fiebigier M, Guntzer M, Dobert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004 Nov;49(11):903-10.
47. Nekrashevych Y, Hannig M, Stosser L. Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis and scanning electron microscopy. *Oral Health Prev Dent.* 2004;2(1):5-11.

48. Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):216-22.
49. Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 1999 Jun;3(2):88-95.
50. Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995 Dec;53(6):358-62.
51. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.* 2000 Dec;14:22-8.
52. Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):612-6.
53. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005 Feb;113(1):2-13.
54. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, et al. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol.* 2001 Apr;46(4):293-303.
55. Hara AT, Turssi CP, Teixeira EC, Serra MC, Cury JA. Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct;111(5):423-7.
56. Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res.* 1999 Nov-Dec;33(6):455-61.
57. Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions--a review. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(4):245-53.
58. Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Res.* 2004 Jan-Feb;38(1):62-6.
59. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 Pt 2):151-5.

60. Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci.* 2008 Feb;116(1):60-5.
61. Grenby TH. Lessening dental erosive potential by product modification. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr;104(2 Pt 2):221-8.
62. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *J Oral Rehabil.* 2005 Jan;32(1):16-21.
63. Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003 Nov;48(11):753-9.
64. Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent.* 1999 Jul;27(5):345-50.
65. Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ. 1. Comparison with orange juice. *J Dent.* 1999 May;27(4):285-9.
66. Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis.* 2005 Jan;11(1):7-12.
67. Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):229-34.
68. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.
69. Mahoney E, Beattie J, Swain M, Kilpatrick N. Preliminary in vitro assessment of erosive potential using the ultra-micro-indentation system. *Caries Res.* 2003 May-Jun;37(3):218-24.
70. Gedalia I, Davidov I, Lewinstein I, Shapira L. Effect of hard cheese exposure, with and without fluoride prerinse, on the rehardening of softened human enamel. *Caries Res.* 1992;26(4):290-2.

71. Fowler C, Willson R, Rees GD. In vitro microhardness studies on a new anti-erosion desensitizing toothpaste. *J Clin Dent*. 2006;17(4):100-5.
72. Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol*. 2004 Nov;49(11):931-5.
73. Newby CS, Creeth JE, Rees GD, Schemehorn BR. Surface microhardness changes, enamel fluoride uptake, and fluoride availability from commercial toothpastes. *J Clin Dent*. 2006;17(4):94-9.
74. Ganss C, Klimek J, Brune V, Schurmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res*. 2004 Nov-Dec;38(6):561-6.
75. Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res*. 2002 Jan-Feb;36(1):75-80.
76. Hara AT, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, et al. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res*. 2009;43(1):57-63.
77. Davis WB, Winter PJ. Dietary erosion of adult dentine and enamel. Protection with a fluoride toothpaste. *Br Dent J*. 1977 Aug 16;143(4):116-9.
78. Magalhaes AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2007;41(1):77-9.
79. Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J. Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ. *Caries Res*. 2007;41(2):146-51.
80. Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res*. 2006;40(2):148-53.
81. Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF_4 , SnF_2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. *Caries Res*. 2006;40(5):440-3.

82. Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2007;41(2):141-5.
83. Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Parmar M, Eckert GJ, Zero DT. Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion-abrasion. *J Dent.* 2009 Oct;37(10):781-5.
84. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibaczyn W, Perdok WG. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand.* 1988 Dec;46(6):325-36.
85. Lagerlof F, Saxegaard E, Barkvoll P, Rolla G. Effects of inorganic orthophosphate and pyrophosphate on dissolution of calcium fluoride in water. *J Dent Res.* 1988 Feb;67(2):447-9.
86. Zero DT, Hara AT, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, et al. Evaluation of a desensitizing test dentifrice using an in situ erosion remineralization model. *J Clin Dent.* 2006;17(4):112-6.
87. Serra MC, Messias DC, Turssi CP. Control of erosive tooth wear: possibilities and rationale. *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:49-55.
88. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M. The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent.* 2008 May;36(5):360-8.
89. Buyukyilmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci.* 1997 Oct;105(5 Pt 2):473-7.
90. Hove LH, Young A, Tveit AB. An in vitro study on the effect of TiF₄ treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. *Caries Res.* 2007;41(1):80-4.
91. Magalhaes AC, Rios D, Honorio HM, Jorge AM, Jr., Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol.* 2008 May;53(5):399-404.

92. Tezel H, Ergucu Z, Onal B. Effects of topical fluoride agents on artificial enamel lesion formation in vitro. *Quintessence Int.* 2002 May;33(5):347-52.
93. Tveit AB, Hals E, Isrenn R, Totdal B. Highly acid SnF₂ and TiF₄ solutions. Effect on and chemical reaction with root dentin in vitro. *Caries Res.* 1983;17(5):412-8.
94. van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin GJ, Mulder J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2003 Jun;111(3):253-7.
95. Vieira A, Lugtenborg M, Ruben JL, Huysmans MC. Brushing abrasion of eroded bovine enamel pretreated with topical fluorides. *Caries Res.* 2006;40(3):224-30.
96. Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2005 Sep-Oct;39(5):371-9.
97. Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. *J Dent Res.* 1972 Nov-Dec;51(6):1567-71.
98. Ribeiro CC, Gibson I, Barbosa MA. The uptake of titanium ions by hydroxyapatite particles-structural changes and possible mechanisms. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):1749-61.
99. Magalhaes AC, Rios D, Honorio HM, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on the erosion of permanent and deciduous human enamel: an in situ/ex vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2009 Jan-Feb;17(1):56-60.
100. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42(1):2-7.
101. Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent.* 2007 Jun;35(6):476-81.

102. Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Caries Res.* 2009;43(1):10-6.
103. Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2009 May;54(5):432-6.
104. Willumsen T, Ogaard B, Hansen BF, Rolla G. Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid. *Acta Odontol Scand.* 2004 Oct;62(5):278-81.
105. Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res.* 2008;42(1):68-72.
106. Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rolla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci.* 2006 Jun;114(3):180-3.
107. Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. *Clin Oral Investig.* (2010) *Epub ahead of print.*
108. Stern RH, Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. *J Am Dent Assoc.* 1972 Nov;85(5):1087-90.
109. Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res.* 1972 Mar-Apr;51(2):455-60.
110. de Freitas PM, Rapozo-Hilo M, Eduardo Cde P, Featherstone JD. In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-treated enamel demineralization. *Lasers Med Sci.* 2010 Mar;25(2):165-70.
111. Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Laser effects on enamel for caries prevention. *Laser Phys.* 2007;16(5):865-75.
112. Apel C, Franzen R, Meister J, Sarrafzadegan H, Thelen S, Gutknecht N. Influence of the pulse duration of an Er:YAG laser system on the ablation threshold of dental enamel. *Lasers Med Sci.* 2002;17(4):253-7.

113. Featherstone JD, Apel C. Application of laser light for caries prevention. In: Gutknecht N. Proceedings of the first International Workshop of Evidence Based Dentistry on Lasers in Dentistry. Quintessence, Berlin 2007. p. 41-66.
114. Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell G. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. *Caries Res.* 1992;26(5):333-9.
115. Fried D, Glens RE, Featherstone JD, Seka W. Permanent and transient changes in the reflectance of CO₂ laser-irradiated dental hard tissues at $\lambda = 9.3, 9.6, 10.3,$ and 10.6 microns and at fluences of 1-20 J/cm². *Lasers Surg Med.* 1997;20(1):22-31.
116. Fried D, Murray M, Featherstone JDB, Akrivou M, Dickenson KM. Dental hard tissue modification and removal using sealed TEA lasers operating at $9.6\mu\text{m}$ and $10.6\mu\text{m}$. *Lasers in Dentistry V Proceeding of the SPIE Meeting*; San Jose. Washington: Bellingham, 1999.
117. Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Ito M, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by CO₂ laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg.* 1999 Oct;17(5):223-6.
118. Zezell DM, Boari HG, Ana PA, Eduardo Cde P, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2009 Jan;41(1):31-5.
119. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res.* 1993;27(2):81-6.
120. Eduardo CP, Gouw-Soares S, Haypek P. *Utilização clínica dos lasers.* São Paulo: Artes Médicas; 2002.
121. Fried D, Zuerlein MJ, Featherstone JD, Seka W, Duhn C, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl Surf Sci.* 1998;129:852-6.
122. Niemz MH. *Laser tissue interactions: fundamentals and applications.* 1st ed Berlin: Springer-Verlag 1996.

123. Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg Med*. 1999;25(4):335-47.
124. Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD, Seka W. Optical properties of dental enamel in the mid-IR determined by pulsed photothermal radiometry. *Ieee J Sel Top Quant*. 1999;5(4):1083-9.
125. Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int*. 1986 Apr;38(4):197-208.
126. Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, et al. CO₂ Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res*. 2009;43(4):261-8.
127. Wong J, Otsuka M, Higuchi WI, Powell GL, Fox JL. Effect of laser irradiation on the dissolution kinetics of hydroxyapatite preparations. *J Pharm Sci*. 1990 Jun;79(6):510-5.
128. Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Kinoshita J, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg*. 2002 Apr;20(2):77-82.
129. Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. *J Dent*. 2004 Nov;32(8):635-41.
130. Zach L, Cohen G. Pulp Response to Externally Applied Heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Apr;19:515-30.
131. Seka W, Fried D, Featherstone JD, Borzillary SF. Light deposition in dental hard tissue and simulated thermal response. *J Dent Res*. 1995 Apr;74(4):1086-92.
132. Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998 Jun;77(6):1397-403.

133. Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res.* 2000 Sep;79(9):1725-30.
134. Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci.* 2005 Jun;113(3):239-44.
135. Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zezell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. *Dent Mater J.* 2006 Sep;25(3):455-62.
136. Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Lofthouse J, Seka W, editors. Rational choice of laser conditions for inhibition of caries progression. *Lasers in Dentistry Proceedings of the SPIE Meeting*; San Jose. Washington: Bellingham, 1995.
137. Featherstone JD, Fried D, Duhn CW, editors. Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8J/cm² Lasers in Dentistry IV Proceedings of the SPIE Meeting; San Jose. Washington: Bellingham, 1998.
138. Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc.* 1998 May;129(5):585-91.
139. Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. *J Dent Res.* 2001 Sep;80(9):1797-801.
140. McCormack SM, Fried D, Featherstone JD, Glena RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. *J Dent Res.* 1995 Oct;74(10):1702-8.
141. Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. *Caries Res.* 2007;41(1):74-6.

142. Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res.* 2002 Nov-Dec;36(6):423-9.
143. Fried D, Seka W, Glana RE, Featherstone JDB. Thermal response of hard dental tissue to 9- through 11 μ m CO₂ laser irradiation. *Opt Eng* 1996;35(7):1976-84.
144. Fried D, Ragadio J, Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. *Lasers Surg Med.* 2001;29(3):221-9.
145. Gerard DE, Fried D, Featherstone JD, Nancollas GH. Influence of laser irradiation on the constant composition kinetics of enamel dissolution. *Caries Res.* 2005 Sep-Oct;39(5):387-92.
146. Santos MN, Featherstone JDB, Fried D, editors. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on sound enamel and demineralized enamel *Lasers in Dentistry VII Proceedings of SPIE Meeting*; San Jose. Washington: Bellingham, 2001.
147. Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. *J Dent Res.* 1992 Jul;71(7):1389-98.
148. Wiegand A, Magalhaes AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MA, et al. Effect of Titanium Tetrafluoride and Amine Fluoride Treatment Combined with Carbon Dioxide Laser Irradiation on Enamel and Dentin Erosion. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr; 28(2): 219-26.
149. Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO₂ laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. *Arch Oral Biol* 2009 Feb;55(2):127-33.
150. Turssi CP, Hara AT, Domiciano SJ, Serra MC. Study on the potential inhibition of root dentine wear adjacent to fluoride-containing restorations. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jan;19(1):47-51.
151. Birkhed D, Heintze U, editors. Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH. *JO IT.* Boca Raton, CRC Press; 1989.

152. Peres P. Efeito do PMSF na incorporação de flúor e remineralização do esmalte dental [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia; 1997.
153. Young A, Amaechi BT, Dugmore C, Holbrook P, Nunn J, Schiffner U, et al. Current erosion indices--flawed or valid? Summary. Clin Oral Investig. 2008 Mar;12 Suppl 1:S59-63.
154. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2007 Oct;115(5):390-6.
155. Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. Caries Res. 1980;14(4):190-5.
156. Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. Caries Res. 2006;40(3):218-23.
157. Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. Caries Res. 1981;15(1):109-14.
158. Rios D, Magalhaes AC, Polo RO, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. J Am Dent Assoc. 2008 Dec;139(12):1652-6.
159. Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Featherstone JD. In situ mineral loss inhibition by CO2 laser and fluoride. J Dent Res. 2006 Jul;85(7):617-21.
160. Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001 Jul;29(5):371-6.
161. Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. Arch Oral Biol. 1969 Dec;14(12):1407-17.
162. Attin T, Buchalla W, Putz B. In vitro evaluation of different remineralization periods in improving the resistance of previously eroded bovine dentine against tooth-brushing abrasion. Arch Oral Biol. 2001 Sep;46(9):871-4.

163. Collys K, Cleymaet R, Coomans D, Michotte Y, Slop D. Rehardening of surface softened and surface etched enamel in vitro and by intraoral exposure. *Caries Res.* 1993;27(1):15-20.
164. Garberoglio R, Cozzani G. In vivo effect of oral environment on etched enamel: a scanning electron microscopic study. *J Dent Res.* 1979 Sep;58(9):1859-65.
165. Gedalia I, Ionat-Bendat D, Ben-Mosheh S, Shapira L. Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *J Oral Rehabil.* 1991 Nov;18(6):501-6.
166. Holst JJ, Lange F. Perimylolysis. A contribution towards the genesis of tooth wasting from non-mechanical causes. *Acta Odontol Scand.* 1939;1:26-48.
167. Stephan RM. Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals. *J Dent Res.* 1966 Sep-Oct;45(5):1551-61.
168. Dugmore CR, Rock WP. A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. *Br Dent J.* 2004 Mar 13;196(5):283-6; discussion 73.
169. Haider SM, White GE, Rich A. Combined effects of argon laser irradiation and fluoride treatments in prevention of caries-like lesion formation in enamel: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 1999 Spring;23(3):247-57.
170. Nammour S, Renneboog-Squilbin C, Nyssen-Behets C. Increased resistance to artificial caries-like lesions in dentin treated with CO2 laser. *Caries Res.* 1992;26(3):170-5.
171. Magalhaes AC, Rios D, Machado MA, Da Silva SM, Lizarelli R de F, Bagnato VS, et al. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):559-63.
172. Rios D, Magalhaes AC, Machado MA, da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, et al. In vitro evaluation of enamel erosion after Nd:YAG laser irradiation and fluoride application. *Photomed Laser Surg.* 2009 Oct;27(5):743-7.
173. Sobral MA, Lachowski KM, de Rossi W, Braga SR, Ramalho KM. Effect of Nd:YAG laser and acidulated phosphate fluoride on bovine and human enamel submitted to erosion/abrasion or erosion only: an in vitro preliminary study. *Photomed Laser Surg.* 2009 Oct;27(5):709-13.

174. Vlacic J, Meyers IA, Walsh LJ. Laser-activated fluoride treatment of enamel as prevention against erosion. *Aust Dent J.* 2007 Sep;52(3):175-80.
175. Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JD. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. *Caries Res.* 1987;21(5):411-26.
176. Esteves-Oliveira M. Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o laser de CO₂ visando a redução da desmineralização [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia; 2007.
177. Esteves-Oliveira M, Apel C, Gutknecht N, Velloso Jr WF, Cotrin MEB, Eduardo CP, et al. Low fluence CO₂ laser irradiation decreases enamel solubility. *Laser Physics.* 2008;18(4):478-85.
178. Esteves-Oliveira M, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Changes in dental enamel birefringence after CO₂ laser irradiation through fluoride gel - a pilot study. In Aretz A Hermanns-sachweh B, Mayer J. EMC 14th European Microscopy Congress; 2008 Sept 1-5; Aachen, Springer Berlin Heidelberg: 2008.
179. Lenz P, Gilde H, Walz R. [Enamel sealing studies with the CO₂ laser]. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1982 Jun;37(6):469-78.
180. Walsh LJ, Perham SJ. Enamel fusion using a carbon dioxide laser: a technique for sealing pits and fissures. *Clin Prev Dent.* 1991 May-Jun;13(3):16-20.
181. Borggreven JM, van Dijk JW, Driessens FC. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1980;25(11-12):831-2.
182. Evans JR, Robertson WG, Morgan DB, Fleisch H. Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calcif Tissue Int.* 1980;31(2):153-9.
183. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci.* 1991;15:1-201.
184. Bachmann L, Zezell DM. Estrutura e composição do esmalte e da dentina - tratamento térmico e irradiação laser. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005.

185. Sato K. Relation between acid dissolution and histological alteration of heated tooth enamel. *Caries Res.* 1983;17(6):490-5.
186. Hsu J, Fox JL, Higuchi WI, Otsuka M, Yu D, Powell GL. Heat-treatment-induced reduction in the apparent solubility of human dental enamel. *J Dent Res.* 1994 Dec;73(12):1848-53.
187. Holcomb DW, Young RA. Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcif Tissue Int.* 1980;31(3):189-201.
188. Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent.* 2004 Jan;32(1):41-6.
189. Hsu J, Fox JL, Wang Z, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI. Combined effects of laser irradiation/solution fluoride ion on enamel demineralization. *J Clin Laser Med Surg.* 1998 Apr;16(2):93-105.
190. Zhang C, Kimura Y, Matsumoto K. The effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation with fluoride on root surface. *J Clin Laser Med Surg.* 1996 Dec;14(6):399-403.
191. Goodman BD, Kaufman HW. Effects of an argon laser on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium fluoride. *J Dent Res.* 1977 Oct;56(10):1201-7.
192. Meurman JH, Hemmerle J, Voegel JC, Rauhamaa-Makinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO2 laser. *Caries Res.* 1997;31(5):397-400.
193. Hattab FN. In vitro fluoride uptake by lased and unlased ground human enamel. *ASDC J Dent Child.* 1987 Jan-Feb;54(1):15-7.
194. Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO2 laser on fluoride uptake in enamel. *J Dent.* 2004 Feb;32(2):161-7.
195. Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988 Dec;96(6):523-35.
196. Attin T, Deifuss H, Hellwig E. Influence of acidified fluoride gel on abrasion resistance of eroded enamel. *Caries Res.* 1999;33(2):135-9.

197. Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001 Sep-Oct;35(5):325-30.
198. Lussi A, Jaeggi T, Schaffner M. Prevention and minimally invasive treatment of erosions. *Oral Health Prev Dent.* 2004;2 Suppl 1:321-5.
199. Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol.* 2007 Jan;52(1):9-14.
200. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res.* 2004 Sep-Oct;38(5):464-72.
201. Eisenburger M, Hughes J, West NX, Shellis RP, Addy M. The use of ultrasonication to study remineralisation of eroded enamel. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):61-6.
202. Sauro S, Mannocci F, Piemontese M, Mongiorgi R. In situ enamel morphology evaluation after acidic soft drink consumption: protection factor of contemporary toothpaste. *Int J Dent Hyg.* 2008 Aug;6(3):188-92.
203. Duschner H, Gotz H, Ogaard B. Fluoride-induced precipitates on enamel surface and subsurface areas visualised by electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci.* 1997 Oct;105(5 Pt 2):466-72.
204. Saxegaard E, Rolla G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Res.* 1989;23(6):406-11.
205. Nelson DG, Jongebloed WL, Arends J. Crystallographic structure of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: TEM and XRD considerations. *J Dent Res.* 1984 Jan;63(1):6-12.
206. Arends J, Reintsema H, Dijkman TG. 'Calcium fluoride-like' material formed in partially demineralized human enamel in vivo owing to the action of fluoridated toothpastes. *Acta Odontol Scand.* 1988 Dec;46(6):347-53.

ANEXO – PARECER DO COMITE DE ÉTICA DA RWTH- AACHEN, ALEMANHA

**ETHIK-KOMMISSION AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER RHEINISCH-WESTFÄLISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN**
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen - Tel. 0241-80 89 963 – FAX 0241-80 82 012
E-Mail: ekaachen@ukaachen.de

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät
der RWTH Aachen – Pauwelsstr. 30 – D - 52074 Aachen

Frau

Dr. med. Marcella Esteves Oliveira

Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
im Hause

Eing.: 27. Okt. 2009

Aachen, den 27.10.09

Dir. Univ.-Prof. Dr. med. dent. F. Lampert
Kopie an:

nachrichtlich an:

Herrn Prof. Dr. F. Lampert, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und
Präventive Zahnheilkunde, im Hause

Schmal/pre

Betreff:

EudraCT-Nr.: -

Protokoll-Nr.: -

Titel: Intraorale Untersuchung zur Erhöhung der Säureresistenz des
Zahnschmelzes durch CO₂-Laser-Bestrahlung.

Sponsor: -

Antragsteller: Dr. med. Marcella Esteves Oliveira, Klinik für Zahnerhaltung,
Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Pauwelsstr. 30, 52074
Aachen

LKP: -

Lokaler Hauptprüfer: Dr. med. dent. Marcella Esteves Oliveira, s.o.

Internes Aktenzeichen: EK 134/09

Hier: Anschreiben zum Votum

Sehr geehrte Frau Dr. Oliveira,

Sie haben bezüglich der o. g. Studie um eine Beratung durch die Ethik-Kommission an der
hiesigen Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen gebeten.

Als Anlage übersende ich Ihnen das Votum mit der Bitte um Kenntnisnahme.
Für das Forschungsvorhaben wünschen wir Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. G. Schmalzing
Vorsitzender

Anlage

**TRADUÇÃO JURAMENTADA DO PARECER DO COMITE DE ÉTICA DA RWTH- AACHEN,
ALEMANHA**

LUCIA ALT TRADUTORA PÚBLICA E INTÉRPRETE COMERCIAL	
ALEMÃO E PORTUGUÊS RG: 6456.241 • CPF: 033.222.558-59 • CCM: 2.430.920-6 MATRÍCULA NA JUNTA COMERCIAL: Nº 1175 PORTARIA 68/2000 DE 12 DE JULHO DE 2000 RUA JOÃO GOMES JUNIOR, 878 • CEP 05592-001 TEL: (11) 3733 6448 • SÃO PAULO – SP – BRASIL TRADUÇÃO Nº: 293 FOLHA Nº: 373	
Certifico e dou fé, para os devidos fins, que me foi apresentado um documento, em idioma alemão que traduzo para o vernáculo, conforme segue:	
Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Da "Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen" (Universidade Técnica da Renania-Palatinado Aachen) Endereço: Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen – Tel.: 0241-80 89 963 Fax.: 0241-80 82 012 E-Mail: ekaachen@ukaachen.de Carimbo: Clínica Universitária Aachen. Clínica para Manutenção Odontológica, Parodontologia e Odontologia Preventiva. Recebido em 27 de outubro de 2009. Diretor da Clínica Prof. Dr. F. Lampert. Cópia para: -.	
Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Da RWTH Aachen (Universidade Técnica da Renania-Palatinado Aachen)	
Aachen, 27/10/2009	
Sra. Dr. Med. Marcella Esteves Oliveira Clínica para Manutenção Odontológica, Parodontologia e Odontologia Preventiva Nesta Instituição	
Com notificação a: Sr. Prof. Dr. F. Lampert, Diretor da Clínica para Manutenção Odontológica, Parodontologia e Odontologia Preventiva, nesta Instituição	
Schmal/pre	
Assunto: EudraCT-Nº.: - Nº. de protocolo: - Título: Exame intra-oral para aumento da resistência ácida do esmalte por meio de aplicação de laser de CO ₂ . Patrocínio: - Requerente: Dr. Med. Marcella Esteves Oliveira Clínica para Manutenção Odontológica, Parodontologia e Odontologia Preventiva Clínica Universitária da RWTH Aachen (Universidade Técnica da Renania-Palatinado Aachen), Endereço: Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen LKP: - Avaliador principal local: Dr. Med. dent. Marcella Esteves Oliveira, v.a. Nº. de processo interno: EK 134/09	
Aqui: <u>Notificação do voto de aprovação</u>	
Prezada Senhora Dr. Oliveira,	
A Senhora solicitou uma avaliação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da RWTH Aachen (Universidade Técnica da Renania-Palatinado Aachen) com relação à pesquisa mencionada acima. Envio em anexo o voto para que tome conhecimento. Lhe desejamos muito sucesso em sua pesquisa.	
Atenciosamente Assina o Sr. Prof. Dr. med. G.Schmalzing, Presidente. Abaixo, nome e cargo do Prof. Dr. med. G.Schmalzing.	
Anexo Abaixo são relacionados os números de telefone e fax do Presidente e da Diretora, o endereço de e-mail e endereço da página.	
Nada mais constava do documento acima, que devolvo com esta tradução, segundo o meu melhor entender, lavrada em duas (02) laudas, a qual conferi, achei conforme e assino.	
São Paulo, 22 de abril de 2010	
Lucia Alt Tradutora Pública e Interprete Comercial	
Emolumentos - JUCESP 04/2008: R\$ 73,00 – Recibo 09/05	
TRADUÇÃO Nº: 293 LIVRO Nº: 02 FOLHA Nº: 373	

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – REGISTRO Nº 15533 / PROCESSO: 25000.564125/2009-31