UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

AVALIAÇÃO *IN SITU* DO EFEITO INDIVIDUAL E ASSOCIADO DOS DESAFIOS EROSIVO E CARIOGÊNICO EM DENTES HUMANOS

Heitor Marques Honório

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Odontologia, na área de Odontopediatria.

BAURU
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

AVALIAÇÃO *IN SITU* DO EFEITO INDIVIDUAL E ASSOCIADO DOS DESAFIOS EROSIVO E CARIOGÊNICO EM DENTES HUMANOS

Heitor Marques Honório

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Odontologia, na área de Odontopediatria.

ORIENTADOR: Profª Drª Maria Ap. A. Moreira Machado

BAURU
2006

Honório, Heitor Marques

H759a Avaliação *in situ* do efeito individual e associado dos desafios erosivo e cariogênico em dentes humanos./ Heitor Marques Honório.
- Bauru, 2006.

168p ; il. ; 30 cm.

Tese, (Doutorado)-Faculdade de Odontologia de Bauru/USP.

Orientador: Profa. Dra. Maria Ap. Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor: _____

Data: ____ / ____ / ____

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da FOB em 07 de novembro de 2005
Nº do processo: 94/2005

DADOS

Curriculares

Heitor Marques Honório

Nascimento	05 de fevereiro de 1977
Naturalidade	Araçatuba – SP
Filiação	João Honório Suely Aparecida Marques Honório
1997 – 1998	Bolsista de iniciação científica (CNPq) sob orientação da Profa. Dra. Nilce Emy Tomita (Odontologia Social). Faculdade de Odontologia de Bauru -Universidade de São Paulo.
1998 – 1999	Bolsista de iniciação científica (FAPESP) sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Batista Franco (Dentística). Faculdade de Odontologia de Bauru -Universidade de São Paulo.
1996 – 1999	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo-USP.
2001 - 2003	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de mestrado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo-USP.
2003 - 2006	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de doutorado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo-USP.
2006	Professor Assistente da disciplina de Odontopediatria da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.
Associações	•SBPqO- Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica •IADR- International Association for Dental Research

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,
se não tiver amor, sou como um bronze que soa, ou
como um címbalo que tine. E ainda que eu tivesse o
dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda
a ciência, e tivesse toda a fé, até ao ponto de
transportar montanhas, se não tivesse amor, não seria
nada. E, ainda que distribuísse todos os meus bens para
sustento dos pobres, e entregasse o meu corpo para ser
queimado, se não tivesse amor, nada me aproveitaria.

Carta de São Paulo aos Coríntios

É um cientista bem medíocre
aquele que pretende poder
passar sem fé ou sem Deus!

Werner Von Braun

Um dos criadores dos foguetes que levaram o homem à lua

A Deus ,

Obrigado por me mostrar que suas linhas tortas são a melhor forma de se escrever. Por estas linhas pude evoluir e perceber que além de estar certo, sempre estiveste comigo mesmo nos momentos em que me imaginava sozinho. Por tudo o que já me proporcionaste, hoje sou uma pessoa infinitamente realizada e feliz. Transformarei suas bênçãos sobre mim em ferramentas para que eu possa lhe servir de instrumento na busca do bem e da felicidade do próximo.

DEDICATÓRIA

Ao meu amado pai,
Obrigado pelo amor puro e simples que me oferece.
Sempre levarei comigo seus exemplos de trabalho, honestidade e
dignidade. Você é meu maior exemplo.
Te amo com toda a força do meu coração!

À minha amada mãe,
Seu amor me conforta e me dá segurança e todos os momentos.
Sua alegria me faz perceber que o mundo poderia ser bem mais
bonito do que é. Obrigado por me proporcionar uma vida
infinitamente feliz como seu filho.
Te amo com toda a força do meu coração!

Ao meu amado irmão,
Gostaria de encarar a vida com a sua calma e sua simplicidade.
Mesmo a distância não me deixa esquecer que tenho em você,
meu melhor amigo.
Te amo com toda a força do meu coração!

DEDICATÓRIA

À minha amada Daniela,

A luz da minha vida que faz dos meus dias momentos de infinita felicidade. Obrigado pelo amor e apoio constantes em todos os momentos. Você é exemplo de determinação, trabalho, honestidade e perseverança. Fico feliz em saber que juntos construiremos uma bela família, cercada de amor e carinho. Você é a companheira que sempre pedi a Deus. Obrigado por existir em minha vida! Este trabalho não existiria sem você!

Te amo com toda a força do meu coração!

Dedico a vocês este trabalho

AGRADECIMENTOS

Especiais

À Cidinha,

Em 7 anos juntos, cada atitude sua me serviu de exemplo e me trouxe algum aprendizado. Minhas conquistas profissionais e algumas pessoais não teriam sido possíveis se você não tivesse entrado em minha vida. Esforcei-me ao longo destes anos, para que ao final desta trajetória como seu orientado, restassem em você boas lembranças minhas. Quero levar para sempre comigo sua determinação na busca pelos objetivos, Desejo-lhe em dobro tudo o que me proporcionou. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Especiais

Ao meu avô Raul

Exemplo de ser humano, sempre foi minha maior referência e meu maior exemplo na vida profissional. Não por acaso, estou seguindo todos seus passos e assim o farei até o fim da minha vida.

O senhor nunca terá alguém que lhe admire tanto quanto eu.

Obrigado por tudo!

Te amo.

Às minhas avós Emília e Laylda,

Ao lado de vocês o tempo parece não passar e sempre me sentirei aquela criança que sempre adorou visitar a vovó. Obrigado pelo amor incondicional e pelos momentos felizes que sempre tivemos juntos.

Amo vocês!

À família Rios,

(Atair, Marli, Coralli, Wilson, Guilherme e Carol)

Após a aprovação na “avaliação inicial” fui recebido como mais um filho. Obrigado por todos os momentos alegres que passamos juntos e por me permitirem lhes considerar minha segunda família.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

A FOB é a minha casa e tenho muito orgulho desta Faculdade pois minha vida profissional se deve à ela. Amo cada parede, cada laboratório, cada clínica, cada funcionário e cada docente pois este maravilhoso conjunto faz a Faculdade de Odontologia de Bauru a grande instituição que é. Levarei seu nome para sempre comigo, referenciando-a como o melhor centro de ensino que um dia já conheci. Meus sinceros agradecimento à todos da FOB!

Ao Professor Dr. Carlos Ferreira dos Santos pela preciosa ajuda na co-orientação deste trabalho. A seriedade e motivação com que trabalha são contagiantes e sua presença constitui um imenso benefício à FOB. Obrigado por me permitir o prazer de trabalhar a seu lado!

À Professora Marília Afonso Rabelo Buzalaf pelo carinho e atenção com que sempre me atendeu. Abriu as portas de seu laboratório de forma que eu me sentisse em casa. Sua beleza (interior e exterior) fazem e farão com que você tenha cada vez mais sucesso. Obrigado por tudo!

Ao técnico e amigo Thiago Dionísio,
Sua capacidade e determinação o farão o maior cientista que este mundo já viu. Obrigado pelo pronto atendimento e pelas inúmeras orientações que me deste. Serei sempre grato, muito obrigado por tudo!

Aos professores do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, Dr. Aymar Pavarini, Dr. Bernardo Gonzalez Vono, Dr^a. Maria Dr^a. Francisca Thereza Borro Bijella, Dr. Ruy César Camargo Abdo, Dr. José Eduardo de Oliveira Lima e Dr^a. Salete Moura Bonifácio da Silva, pelo empenho e satisfação ao transmitirem seus conhecimentos, sendo também os responsáveis por despertar em mim, o amor pela especialidade.

Aos meus queridos e desprendidos voluntários, Dani, Adriano, Carol Magalhães, Pity, Flávia, Fábio, Luciana, Thelma, Vivi, Carla, Thiemi, Claudinha e Thaís. Sua generosidade tornaram este estudo possível. Além de mim, a ciência será sempre grata a vocês!

Aos amigos da graduação Jefferson, Paulo, Alessandro, Marcelo, Carla, Flávia, Nicole, Ivy, Vittiligo, Rodrigo Cardoso, Márcio Taga e Ricardo Navarro e às colegas da Faculdade Linda, Lívia, Rosa, Luciana Reis, Diego, Léo, Rodrigo, Celso, Rafael meus sinceros agradecimentos pela amizade e companheirismos desde a minha chegada em Bauru.

Aos queridos amigos Renato, Anuradha, Eduardo, Ana Lúiza e Laurinha. Que trouxeram a minha vida muitos momentos de amizade e descontração.

Aos colegas de Pós-Graduação Adriano, Marina, Gládis, Alexandre, Marcelo, Rogério, Glória, Andréa, Sheila, Thaís, Dani, Érika, Lili, Vivien, Thiago, Evaristo, Ana Luíza, Nanda, Pity, Paloma e Zé Vítor pela amizade e companheirismo durante todo o curso.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, Fátima, Lia, Lilian, Maria Estela, Wilma e Cláudia pela atenção, solicitude e principalmente amizade com que sempre me trataram.

Aos funcionários da Pós-graduação, Meg e Giane pela atenção e carinho com que sempre trataram todos os pós-graduandos.

Aos colegas e funcionários da Biblioteca e do Xerox por fazerem de seu local de trabalho uma extensão da nossa própria casa.

Ao professor Dr. José Roberto Pereira Lauris, do Disciplina de Odontologia Social da FOB-USP, pelos esclarecimentos sobre a análise estatística.

Ao professor Dr. Paulo Afonso Silveira Francisconi, Marinelse, Manú e Carol pela amizade durante o período em que fomos vizinhos e por tudo o que fizeram por mim.

À Luciana Favaro Francisconi por me permitir aprender quando tentava te ensinar.

À professora Dra. Nilce Emi Tomita, por me apresentar à pesquisa e me mostrar o quão gratificante e recompensador pode ser a vida de um cientista.

Ao professor Dr. Eduardo Batista Franco, por me orientar durante a graduação, me mostrando uma forma correta, meticulosa e disciplinada de conduzir os trabalhos, sendo um grande incentivador a que eu seguisse a carreira acadêmica. O senhor é uma referência a ser seguida por mim, obrigado por tudo!

À professora Dra. Lucimar Falavinha, por ser e se comportar como uma mãe para mim dentro da FOB.

Aos funcionários da FOB-USP, Edmauro e Neide (Endodontia), Telma e Ovídio (Bioquímica), André (Microbiologia), Tânia (Histologia) e Nelson (Dentística) por serem muito solícitos e estarem sempre prontos e dispostos a ajudar.

Ao Departamento de Dentística da FOB-USP, na pessoa do Prof. Dr. Rafael Lia Mondelli, pela prontidão de empréstimo dos equipamentos para a condução deste trabalho.

À bibliotecária Valéria, pela revisão bibliográfica e aos demais funcionários da biblioteca pela orientação nos demais trabalhos científicos.

À instituição de fomento CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que, ao longo destes sete anos de Bauru, fizeram parte do meu dia a dia, e com um sorriso ou um aceno de mão, tornaram este tempo inesquecível e me deram a certeza de que tudo valeu a pena.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE SIGLAS.....	xxvi
RESUMO.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1. Cárie Dentária.....	09
2.1.1. Cariogenicidade das bebidas ácidas carbonatadas.....	11
2.1.2. Sacarose e o biofilme dentário.....	14
2.2. Erosão Dentária.....	21
2.2.1. Erosividade das bebidas ácidas carbonatadas.....	22
2.2.2. Fatores envolvidos na erosão.....	39
2.2.3. pH e o biofilme dentário.....	51
3. PROPOSIÇÃO.....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1. Aspectos éticos.....	63
4.2. Delineamento experimental.....	63
4.3. Preparo dos espécimes de esmalte.....	69
4.3.1. Obtenção dos dentes humanos.....	69
4.3.2. Obtenção dos espécimes de esmalte humano.....	69
4.3.3. Planificação e polimento dos espécimes de esmalte.....	73
4.4. Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos espécimes de esmalte.....	75
4.5. Proteção de metade dos espécimes.....	78
4.6. Seleção dos voluntários.....	78
4.6.1. Avaliação do fluxo salivar não estimulado.....	79
4.6.2. Avaliação do fluxo salivar estimulado.....	80
4.7. Preparo do dispositivo intrabucal palatino.....	80
4.8. Procedimentos intrabucais.....	82

4.9. Avaliação da microdureza superficial final.....	87
4.10. Avaliação do desgaste.....	87
4.11. Leitura do teor de flúor do biofilme.....	90
4.12. Análise estatística.....	91
5. RESULTADOS.....	93
5.1. Quantidade de biofilme dentário coletado e sua concentração de flúor.....	95
5.2. Microdureza.....	97
5.3. Desgaste.....	99
6. DISCUSSÃO.....	103
6.1. Metodologia.....	105
6.2. Resultados.....	119
6.2.1. Grupo I.....	119
6.2.2. Grupo II.....	121
6.2.3. Grupo IV.....	126
6.2.4. Grupo III.....	127
7. CONCLUSÕES.....	133
ANEXOS.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
ABSTRACT.....	165

LISTA de Figuras

Figura 1-	Esquema ilustrando o estudo do tipo cruzado.....	64
Figura 2-	Grupos experimentais do trabalho.....	66
Figura 3-	Fluxograma do delineamento experimental do estudo.....	68
Figura 4-	Fixação do terceiro molar.....	71
Figura 5-	Máquina de corte.....	71
Figura 6-	Corte cervical mostrando o local do qual foi obtido o bloco de esmalte.....	71
Figura 7-	Esquema de corte para molares superiores.....	72
Figura 8-	Planificação da dentina.....	74
Figura 9-	Politriz para planificação e polimento.....	74
Figura 10-	Microdurômetro acoplado ao computador.....	77
Figura 11-	Ponta penetradora tipo Knoop.....	77
Figura 12-	Imagem em maior aumento de uma endentação feita para avaliação da microdureza no bloco de esmalte com erosão.....	77
Figura 13-	Dispositivo intrabucal palatino contendo os espécimes dos grupos I e II.....	82
Figura 14-	Dispositivo intrabucal palatino contendo os espécimes dos grupos III e IV.....	82
Figura 15-	Kit entregue a cada voluntário para a realização da etapa experimental.....	83

Figura 16-	Imersão dos espécimes do grupo III. A) Boia e dispositivo palatino do segundo período; b) Dispositivo acoplado à bóia para imersão, c) conjunto flutuando sobre a bebida; d) visão aproximada mostrando que somente os espécimes do grupo III ficam imersos na bebida e os espécimes do grupo IV ficam totalmente protegidos de sua ação.....	85
Figura 17-	Frasco de solução de sacarose 20% para gotejamento nos espécimes dos grupos III e IV.....	86
Figura 18-	Rugosímetro.....	88
Figura 19-	Ponta apalpadora realizando a leitura de desgaste.....	88
Figura 20-	Ilustração esquemática mostrando a quantificação do desgaste pelo Rugosímetro.....	89
Figura 21-	Ilustração esquemática mostrando o desgaste dos espécimes testados. (A) início da leitura feita pelo rugosímetro, (B) final da leitura feita pelo rugosímetro e (d) desgaste ocasionado.....	89
Figura 22-	Remoção do biofilme formado no dispositivo palatino.....	91
Figura 23-	Eletrodo específico para leitura de flúor.....	91
Figura 24-	Concentrações de flúor ($\mu\text{g} / \text{g}$) no biofilme dentário dos diferentes grupos.....	97
Figura 25-	Média da % perda de dureza superficial dos diferentes grupos.....	99
Figura 26-	Aspecto macroscópico dos espécimes dos diferentes grupos experimentais. Note o desgaste do espécime do grupo I.....	100
Figura 27-	Média de desgaste (μm) dos diferentes grupos.....	102

LISTA de Tabelas

Tabela 1-	Peso úmido total (mg) do biofilme dentário de acordo com o grupo e voluntário.....	96
Tabela 2-	Concentrações de flúor (μg / g) no biofilme dentário dos diferentes grupos.....	97
Tabela 3-	Perda média de microdureza superficial e desvio padrão nos espécimes de esmalte para os grupos experimentais.....	98
Tabela 4-	Desgaste médio (μm) e desvio padrão nos espécimes de esmalte para os grupos experimentais.....	101

LISTA

de Abreviaturas e Símbolos

® – Marca Registrada

X – média

% – por cento

> – maior

< – menor

$\overline{PDS}$ – média da perda de microdureza superficial

%PDS – porcentagem de perda de dureza superficial

ΔKHN – variação de microdureza

μL – microlitro

ADD – água destilada e deionizada

ANOVA – análise de variância

C – constante aplicada na fórmula para o cálculo da dureza Knoop

C – carga usada no microdurômetro

Ca – cálcio

CaF_2 – fluoreto de cálcio

d – comprimento da diagonal maior da indentação

dp – desvio padrão

EM – estreptococos mutans

F – flúor

Fe – ferro

g – grama

h – horas

HCl – ácido clorídrico

In situ (latim) – em sítio, no local (no caso, cavidade bucal)

In vitro (latim) – em laboratório

In vivo (latim) – no ser humano

KHN – Knoop hardness number (número de dureza Knoop)

Kg/mm² – quilograma por milímetro quadrado

L – litro

M – mol / L

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MFP – monofluorofosfato de sódio

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – mili mol / L

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

M – molar

mmol – milimol

mV – milivoltagem

n – número da amostra

N – Normal

NaF – fluoreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

P – fósforo

PO₄ – fosfato

p – nível de significância

pH – potencial hidrogeniônico

P_i – polissacarídeos insolúveis

ppm – parte por milhão

rpm – rotações por minuto

r – linearidade

s – segundos

SM – *Streptococcus mutans*

TISAB – tampão de ajuste de força iônica total

W – watts

WHU – Unidade de Dureza de Wallace

µm – micrometro

°C – graus centígrados

FEB USP

O único lugar onde o sucesso vem
antes do trabalho é no dicionário.

Albert Einstein

RESUMO

Resumo

RESUMO

Este estudo *in situ* avaliou o resultado de um ataque erosivo com a presença de biofilme dentário, e o efeito da associação entre desafio erosivo e cariogênico, sobre o esmalte dentário humano por meio da aferição do desgaste e da porcentagem de perda de microdureza superficial (%PDS). Durante duas fases cruzadas de 14 dias, 11 voluntários previamente selecionados utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo espécimes de esmalte humano, os quais foram submetidos a quatro grupos com tratamentos distintos: (GI) bebida a base de cola, (GII) bebida a base de cola com acúmulo de biofilme dentário, (GIII) bebida a base de cola mais sacarose a 20% com acúmulo de biofilme dentário, (GIV) sacarose a 20% com acúmulo de biofilme dentário. Desta forma, no GI os espécimes foram fixados no nível do dispositivo palatino, já nos GII, GIII e GIV eles foram fixados 1,0 mm abaixo do nível do aparelho e cobertos por uma tela plástica para acúmulo do biofilme dentário. Em uma das fases (na qual GI e GII foram estudados), os voluntários imergiram o dispositivo palatino em 200 ml da bebida a base de cola por 5 minutos, 3 vezes ao dia. Na outra fase, uma solução de sacarose a 20% foi gotejada 8 vezes ao dia nos espécimes dos GIII e GIV, e apenas metade do aparelho, com os espécimes correspondentes ao GIII, foi imersa na bebida como mencionado acima. A concentração de flúor no biofilme, o desgaste e a %PDS foram mensurados. Os dados foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Os valores médios de desgaste (μm) e %PDS foram respectivamente: GI- 4,82^A; 87,45^a; GII- 0,14^B;

13,47^b; GIII- 0,34^B; 68,87^c; GIV- 0,41^B; 86,12^a. A bebida a base de cola com acúmulo de biofilme dentário (GII) promoveu maior concentração de flúor no biofilme. Os resultados sugerem que a presença de biofilme dentário pode diminuir o ataque ácido de uma bebida erosiva e que a associação entre desafio erosivo e cariogênico produz menores alterações no esmalte (desgaste e %PDS).

Palavras-chave: Cárie Dentária, Erosão de Dente, Esmalte Dentário, Desmineralização do Dente, Biofilme Dentário.

FAB USP

Pela rua do já vou
chega-se à casa do nunca.

Miguel Cervantes

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial^{10, 13, 19, 70, 116, 150}, cuja etiologia é influenciada pela ação de microrganismos bucais presentes no biofilme dentário^{147, 150, 154}. Deste modo, os microrganismos bucais formadores de um biofilme cariogênico, apresentam essencial importância na patogênese da cárie, pois atuam como seu fator primário, colonizando seletivamente o esmalte^{81, 116, 150}. Esta colonização seletiva é importante, pois determinará um metabolismo acidogênico e/ou acidúrico, que resultará em perdas de tecido mineralizado do dente¹⁵⁰, ou seja, os microrganismos cariogênicos irão produzir ácidos orgânicos através do metabolismo de substratos carboidráticos^{116, 150}. Os ácidos, por sua vez, em contato com a superfície do dente iniciam uma série de reações em nível bioquímico, que envolvem a perda de íons minerais, resultando na dissolução da estrutura inorgânica do esmalte especialmente na interface biofilme-superfície dentária.

Além disso, entre os fatores relacionados ao desenvolvimento da cárie, destaca-se o consumo de açúcares, principalmente a sacarose, que assume um papel de extrema importância na adesão e colonização bacterianas, por ser substrato para a enzima glicosiltransferase (GTF), que forma a partir dela polissacarídeos de cadeia longa. O papel da sacarose na etiologia da cárie dental não se resume à facilitação da formação de biofilme dentário e produção de ácidos. CURY et al.²² (1997) mostraram *in situ* que uma exposição freqüente do biofilme dentário à sacarose (8 vezes ao dia) reduziu significativamente sua concentração de

cálcio, flúor e fósforo e aumentou a concentração de polissacarídeos álcali-solúveis, sugerindo que a cariogenicidade não seria atribuída ao aumento da porosidade, mas à baixa concentração desses íons.

Contudo, a instituição e prática de medidas preventivas direcionadas ao controle da cárie dentária vêm alterando o contexto odontológico atual. Nos últimos vinte anos tem havido um decréscimo da prevalência de cárie, principalmente nos países desenvolvidos¹²⁵ e simultaneamente tem-se observado uma maior ocorrência de outra alteração bucal, o desgaste dentário^{3, 12, 28, 40, 68, 92, 111, 112, 118}.

Uma das subdivisões do desgaste dentário é a erosão dentária que se constitui na perda superficial de estrutura dentária devido a uma ação química, sem envolvimento de microrganismos^{30, 67, 89, 108, 158}, podendo ocorrer por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos.

A erosão intrínseca é o resultado da ação de ácidos produzidos pelo próprio organismo, originados por vômitos, como parte da anorexia ou bulimia, regurgitação do conteúdo gástrico e refluxos recorrentes^{120, 132, 135}. Já a extrínseca ocorre por meio de ácidos de origem exógena, incluindo substâncias ácidas, bebidas, alimentos ou exposição ambiental a agentes ácidos^{30, 158}.

Os fatores extrínsecos são bastante freqüentes, estudos de prevalência e relatos de casos clínicos têm demonstrado a associação dos hábitos dietéticos com a erosão dentária^{30, 31, 32, 33, 112, 118}. A dieta que sabidamente causa erosão inclui todos tipos de alimentos e bebidas ácidas com baixa concentração de cálcio e fosfato. Os agentes erosivos caracterizam-se por serem altamente subsaturados de cálcio, fósforo e flúor quando comparados à hidroxiapatita e fluoridroxiapatita¹¹. Isto assegura a dissolução dos prismas de esmalte superficiais sem a formação de uma superfície de fluoridroxiapatita, ou seja, sem a formação de uma lesão subsuperficial

como ocorre na cárie dentária^{68, 90, 108}. A erosão quando clinicamente detectada já é irreversível, podendo resultar em sensibilidade dentinária, dor e má aparência, sendo difícil o tratamento restaurador do esmalte e/ou da dentina perdidos, além de oneroso e requerer acompanhamento contínuo^{55, 78, 118, 156}. Estas informações fazem com que seja dada maior atenção ao consumo de bebidas ácidas tais como os refrigerantes, sucos de frutas, chás e bebidas isotônicas^{107, 113, 126}.

O consumo de refrigerantes aumentou drasticamente desde 1950^{139, 158} e o marketing das indústrias de bebidas geralmente é direcionado para a camada mais jovem da população, sendo os refrigerantes associados à aceitação social, à beleza e ao sucesso⁶⁴. Inclusive o mercado infantil não foi desconsiderado pelas propagandas e importunamente, o uso prolongado dos sucos infantis em mamadeiras tem sido relacionado à destruição superficial do esmalte decíduo^{7, 138}. Dentre os refrigerantes mais consumidos estão os à base de cola. Deste modo, têm-se verificado na literatura recente, a preocupação em se tentar encontrar medidas preventivas que possam minimizar os efeitos deletérios da erosão sobre a estrutura dentária, como a estimulação do fluxo salivar^{127, 128, 129} e a alteração de formulação das bebidas ácidas.

No entanto, embora cientificamente tenha se verificado a constante busca por métodos preventivos efetivos para o controle da cárie e da erosão dentária, ambos são estudados apenas de forma isolada, como se na prática não houvesse uma interação entre estes dois fenômenos. Não é incomum imaginar que indivíduos que tenham uma dieta altamente cariogênica, também possam consumir bebidas com elevado potencial erosivo, resultando possivelmente em um efeito deletério cumulativo sobre a estrutura dentária. Além disso, deve-se considerar que os refrigerantes ácidos apresentam potencial erosivo^{88, 128, 129, 139, 140} e são ricos em

sacarose^{16, 17, 99, 100} o que pode contribuir para o desenvolvimento da cárie dentária. Por outro lado essas bebidas apresentam baixos valores de pH, geralmente em torno de 2,5¹⁶. Tendo em vista que o *S. mutans* e o *S. sobrinus* (bactérias intimamente relacionada à cárie dentária), apesar de acidogênicos e acidúricos, sofrem inibição de seu crescimento em pH abaixo de 4,2 e podem ser mortos em valores abaixo de 3,0^{144, 145}, as bebidas ácidas podem apresentar razoável potencial antimicrobiano sobre o biofilme dentário.

Assim sendo, apesar de comprovado o potencial erosivo das bebidas ácidas que contém sacarose, a literatura ainda não esclareceu seu papel sobre o biofilme dentário, ainda não se sabe se a ação destas bebidas irá resultar em um efeito potencializador ou inibidor entre a cárie e erosão dentária.

Sendo assim, a realização de estudos que possam elucidar a associação do efeito erosivo e cariogênico de uma bebida ácida contendo sacarose sobre o esmalte dentário, se justifica para que medidas preventivas e terapêuticas possam ser estabelecidas para uma melhora no padrão de saúde, sobretudo da população que mais consome as bebidas carbonatadas com sacarose, ou seja, crianças, adolescentes e jovens.

FEB USP

Se quiseres que uma coisa se faça,
encarrega-a a uma pessoa ocupada.

Provérbio chinês

2

REVISÃO
da Literatura

2 REVISÃO da Literatura

Com a finalidade de tornar este capítulo mais didático, ele foi dividido em dois tópicos: cárie dentária e erosão dentária, respectivamente.

- **Cárie Dentária**
 - Cariogenicidade das bebidas ácidas carbonatadas
 - Sacarose e o biofilme dentário
- **Erosão Dentária**
 - Erosividade das bebidas ácidas carbonatadas
 - Fatores envolvidos na erosão
 - pH e o biofilme dentário

2.1. Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença multifatorial cujos principais fatores etiológicos estão relacionados à susceptibilidade do hospedeiro, a presença de uma microbiota cariogênica e uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, que após interagirem por um determinado período de tempo determinarão a ocorrência desta doença^{19, 70, 116, 150}. A multifatorialidade da cárie significa que nem a dieta tampouco os

microrganismos atuando de forma isolada sobre o hospedeiro, podem ser responsáveis pela sua ocorrência. Desta forma, para que microrganismos acidogênicos e acidúricos produzam algum efeito deletério sobre a estrutura dentária, faz-se necessária a presença de uma dieta cariogênica rica em carboidratos^{15, 16, 17, 19, 38, 65, 70, 81, 97, 116, 123, 130, 141, 149, 150}.

A dieta influencia o tipo e quantidade de biofilme dentário formado, a seleção de microorganismos e conseqüentemente a produção de ácidos. O grau de cariogenicidade dos alimentos está intimamente relacionado com sua composição, consistência e frequência de ingestão¹⁴¹. Vários carboidratos (monossacarídeos glicose e frutose, os dissacarídeos sacarose, maltose e lactose) podem ser fermentados pelo biofilme, dando origem a ácidos capazes de influenciar na quantidade e qualidade e, conseqüentemente na cariogenicidade dos agregados microbianos sobre a estrutura dentária^{70, 116, 123, 150}.

Dentre os carboidratos fermentáveis, a sacarose tem sido universalmente indicada como a mais cariogênica^{15, 19, 22, 38, 65, 93, 123, 150, 160}. O papel crucial da sacarose como substrato no processo da cárie é verificado em uma série de reações químicas, que explicam tanto o processo de adesão bacteriana, quanto a produção de ácidos^{19, 48}. Inicialmente a sacarose sofre ação da enzima glicosiltransferase que provocará hidrólise desta e atuará na molécula de glicose, formando polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis⁴⁸. Os primeiros podem servir como um reservatório nutricional transitório de carboidratos. Os glucanos insolúveis podem atuar como componentes estruturais da matriz do biofilme e participar da adesão intercelular, favorecendo a formação de colônias bacterianas. Os dois tipos de glucanos parecem favorecer a cariogenicidade destas bactérias. A frutose originada

da hidrólise da sacarose irá para via glicolítica, originando ácidos orgânicos que ajudarão na queda do pH do meio^{38, 65, 97, 116, 149}.

Outra enzima, a frutotransferase, também provocará “lise” da sacarose, e atuará na frutose, originando outro polissacarídeo, o frutano. Este, como os glucanos solúveis, é degradado pela flora do biofilme, atuando também como reserva de carboidratos, prolongando, assim, a produção de ácidos. A glicose originada nesta reação metabólica poderá tanto entrar na via glicolítica, como formar um polissacarídeo intracelular, o glicogênio. Durante os períodos do dia nos quais nenhum carboidrato é suplementado pela dieta para a microbiota dos dentes, estes polissacarídeos intracelulares podem ser utilizados como fonte de energia e ácidos serão excretados^{19, 38, 48, 49, 65, 97, 116, 149, 150}.

Os ácidos formados devido a fermentação de carboidratos no metabolismo anaeróbico bacteriano podem causar subsaturação do cálcio e do fosfato na fase fluida ao redor do dente, ocasionando o processo de desmineralização dos tecidos dentários, que se ocorrer com grande frequência culminará em uma lesão de cárie^{19, 38, 48, 49, 65, 97, 116, 130, 141, 149, 150, 160}.

2.1.1. Cariogenicidade das bebidas ácidas carbonatadas

Apesar de grande ênfase ser dada atualmente ao efeito erosivo das bebidas ácidas, muitos estudos têm correlacionado seu consumo com a cárie dentária, principalmente em função das elevadas concentrações de carboidratos fermentáveis presentes em sua composição, como a sacarose por exemplo^{16, 17, 99, 100}.

BOWEN e LAWRENCE¹⁷ (2005) realizaram um estudo para determinar e comparar a cariogenicidade de vários fluidos freqüentemente consumidos por bebês, uma vez que alguns deste itens têm sido diretamente associados ao desenvolvimento da cárie precoce da infância. Os fluidos testados foram sacarose, refrigerante a base de cola, mel, leite humano, leite de vaca e água. Foram utilizados ratos previamente infectados por culturas de *S. mutans* e também submetidos a uma cirurgia que inibia totalmente o fluxo salivar dos animais, para se aproximar, segundo os autores, das condições reais dos bebês que sugam a mamadeira com uma fisiológica obstrução do fluxo salivar na cavidade bucal. Desta forma, o único fluido em contato com a cavidade bucal dos animais, foi o testado em seu respectivo grupo. Os animais foram divididos em 6 grupos de 12 e receberam diariamente 3 mL do líquido ao longo de 14 dias, sendo a cariogenicidade diretamente relacionada ao número de lesões de cárie originadas durante o período experimental. Os resultados mostraram que o refrigerante a base de cola, a sacarose e o mel foram os fluidos mais cariogênicos e os autores concluem dizendo que o uso destes em mamadeiras deve ser evitado.

Em 1984, **BIRKHED¹⁶** analisou a concentração de frutose, glicose e sacarose, além do pH em diversas bebidas como: suco de frutas, bebidas a base de frutas, bebidas carbonatadas e bebidas esportivas. Além do mais, foi estudado o efeito destas bebidas na alteração do pH do biofilme dentário em grupos de adolescentes. O conteúdo dos açúcares foi determinado pela cromatografia gás-líquido e sua concentração foi expressa em porcentagem de peso. Os sucos de fruta, as bebidas a base de frutas e as bebidas carbonatadas continham em média um total de açúcares (glicose + frutose + sacarose) que variava entre 9,3 a 9,8%. A Coca-Cola[®] apresentou um valor médio de $7,4 \pm 2,4\%$ de sacarose em sua composição. O

conteúdo de sacarose foi maior nos sucos de fruta e nas bebidas carbonatadas com uma semana de produção, mas caiu por hidrólise espontânea a valores relativamente mais baixos quando armazenados em temperatura ambiente por 5 meses. Segundo os autores o pH médio nas várias bebidas testadas variou entre 3,1 e 3,6. O bochecho com suco de laranja, bebidas a base de frutas e Coca-Cola® resultaram no mesmo baixo valor de pH do biofilme dentário (5,0). Quando a Coca-Cola® foi consumida tanto no copo como com canudo, a queda de pH foi significativamente menor comparada com o bochecho feito com o mesmo produto ($p < 0,001$). Os resultados deste estudo indicam que estas bebidas, normalmente consumidas, possuem a mesma cariogenicidade quando consideradas a concentração de açúcares, sua acidez e seu efeito no pH do biofilme dentário.

Considerando escassos os trabalhos que avaliassem o conteúdo de açúcares em bebidas, visto que seu consumo pode estar associado ao aparecimento de lesões de cárie, diabetes, obesidade, distúrbios cardiovasculares e síndromes de má absorção de carboidratos, **MARTIN-VILLA et al.**⁹⁹ em 1981 publicaram um estudo realizando a medição cromatográfica do conteúdo de carboidratos de algumas bebidas comumente consumidas. Uma análise qualitativa foi realizada utilizando-se a cromatografia de camada fina e a do gás-líquido. A determinação quantitativa foi feita pela cromatografia de coluna e por espectrofotometria, sendo que os resultados obtidos por ambas as análises foram semelhantes. As bebidas examinadas foram: Pepsi-Cola®, Tab®, Fanta limão®, Tônica Schweppes® e Schweppes Laranja®. Na maioria das bebidas analisadas, o conteúdo de frutose e glicose variou entre 0,5 e 1,5 g por 100 mL, enquanto que a sacarose variou entre 7 e 10 g por mL. A média do teor de sacarose na Pepsi-Cola® ficou em $8,77 \pm 2,01$ g/100 mL.

No mesmo ano (1981), **MARTIN-VILLA et al.**¹⁰⁰ avaliaram novamente a composição de carboidratos solúveis em 16 bebidas freqüentemente consumidas. A metodologia utilizada foi a mesma empregada em sua publicação anterior, no entanto, desta vez as bebidas analisadas em quadruplicata (4 garrafas) foram as seguintes: Casera-Cola[®], Coca-Cola[®], Pepsi-Cola[®] e Tab[®]; Casera-limão[®], Fanta-limão[®], Scheppes limão[®] e Trinaranjus[®]; Casera-laranja[®], Fanta laranja[®], Scheppes laranja[®] e Trinaranjus[®]. Para algumas destas bebidas, o conteúdo de carboidratos variou de garrafa para garrafa, em função do processo hidrolítico normal que ocorre devido ao armazenamento. A média do teor da sacarose na Coca-Cola[®] foi de 8,25 g/100 mL e este valor se manteve constante nas 4 garrafas testadas. Os autores concluíram que o conteúdo total de carboidratos solúveis das bebidas analisadas é muito alto, podendo influenciar fortemente na etiologia da cárie dentária.

2.1.2. Sacarose e o biofilme dentário

Em uma extensa revisão de literatura sobre o papel do açúcar na cárie dentária, **ZERO**¹⁶⁰ em 2004 comentou que inúmeras evidências comprovam o papel dos açúcares na etiologia da cárie dentária e sua importância como principal substrato proveniente da dieta. Enquanto alguns carboidratos surgem como pequenos modificadores do potencial acidogênico da dieta, a sacarose possui especial importância, como o único substrato capaz de gerar a síntese de glucanos extracelulares. Os glucanos insolúveis podem aumentar o acúmulo de Streptococos do grupo mutans em superfícies lisas do dente e aumentam a virulência pelo aumento da porosidade do biofilme, resultando em uma maior produção de ácido, principalmente na interface com a estrutura dentária.

Em 1997, **CURY, REBELLO, DEL BEL CURY**²² avaliaram a composição do biofilme dentário de acordo com a exposição à sacarose. Doze voluntários participaram de um estudo *in situ* cruzado, feito em quatro fases distintas de 28 dias, nas quais um aparelho de acrílico palatino foi construído para cada voluntário. Em cada dispositivo foram fixados quatro blocos de esmalte humano protegidos por uma tela plástica. Durante as fases, os voluntários gotejaram uma solução de sacarose a 20%, variando o número de aplicações por dia (zero, duas, quatro e oito), utilizaram dentífrico sem flúor e beberam água com 0,7 ppm de flúor. Após cada fase, foram determinadas as concentrações de flúor, cálcio, fósforo e carboidratos totais no biofilme dentário. A análise estatística mostrou que aplicações freqüentes de sacarose reduziram significativamente as concentrações de flúor, cálcio e fósforo no biofilme, mas aumentaram a concentração de carboidratos alcali-solúveis. Os resultados sugerem que a cariogenicidade do biofilme dentário formado na presença de sacarose não pode ser atribuída somente à sua alta porosidade, mas a baixa concentração inorgânica também é importante.

DUGGAL et al.²⁹, em 2001, realizaram um estudo *in situ* para comparar a extensão da desmineralização do esmalte em função da freqüência de consumo de sacarose e do uso de dentífrico fluoretado ou não. Oito voluntários utilizaram aparelhos inferiores removíveis, com blocos de esmalte obtidos de pré-molares humanos, previamente desmineralizados em gel e cobertos com gaze para permitir o acúmulo de biofilme dentário. Os voluntários utilizaram o aparelho continuamente por sete dias, sendo os dois iniciais sem aplicação de sacarose e os cinco subseqüentes com ingestão de solução de sacarose a 12% (uma, três, cinco, sete ou dez vezes por dia), a qual era mantida na cavidade bucal por 2 minutos antes de ser engolida. Foram realizadas duas fases, sendo uma com dentífrico fluoretado e

outra com dentifrício não fluoretado. Os voluntários escovaram seus dentes duas vezes ao dia, por 2 minutos, com o aparelho *in situ* (escovando todas as superfícies, exceto os blocos). Os espécimes foram removidos, seccionados e avaliados por meio de microradiografia transversa para avaliar ganho ou perda mineral. Os resultados indicaram que, mesmo quando o dentifrício fluoretado foi usado, uma desmineralização adicional foi evidenciada com a ingestão de solução de sacarose sete ou dez vezes por dia, porém não significativa. Com ingestões menos freqüentes houve remineralização, que foi significativa somente com ingestão de sacarose uma vez por dia. Já com o uso de dentifrício sem flúor, a desmineralização foi significativa quando a ingestão de sacarose foi maior que três vezes por dia.

Em 2003, **TENUTA et al.**¹⁴⁷ avaliaram o efeito de alguns fatores salivares e da composição do biofilme dentário na progressão de cárie *in situ*. Inicialmente, foram determinados o fluxo salivar, a capacidade tampão e os níveis de estreptococos *mutans* (EM) na saliva de 13 voluntários. Durante três períodos distintos de quatro, sete e dez dias, eles utilizaram um dispositivo palatino contendo quatro blocos de esmalte bovino, gotejaram uma solução de sacarose a 20% dez vezes por dia e utilizaram um dentifrício não fluoretado. Em todos os períodos houve acúmulo de biofilme dentário e um alto desafio cariogênico. Os EM, cálcio e polissacarídeos insolúveis (PI) foram quantificados no biofilme formada sobre os blocos após cada período. A desmineralização do esmalte foi avaliada pela porcentagem de perda da microdureza superficial (%PDS) em relação aos valores iniciais. Houve desmineralização do esmalte em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$) e a %PDS aumentou com o tempo de uso (de 13,8 para 48,3%). As concentrações de cálcio e PI no biofilme dentário não foram diferentes entre os tempos experimentais, mas houve correlação negativa significativa entre a

concentração de cálcio e %PDS e correlação positiva significativa entre a concentração de PI e %PDS. Os fatores salivares avaliados inicialmente e os níveis de EM no biofilme não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a %PDS. Os resultados mostraram que a desmineralização do esmalte depende do tempo e está mais relacionada com a composição de biofilme dentário formado do que com os fatores salivares estudados.

Ainda em 2003, **CURY et al.**²¹ realizaram um estudo *in situ* para avaliar se as baixas concentrações de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dentário formado na presença de sacarose poderiam ser atribuídas simplesmente pela fermentação deste açúcar. Participaram deste estudo onze voluntários, em duas fases de 30 dias cada, que utilizaram dispositivos palatinos contendo seis blocos de esmalte humano, cobertos por tela plástica para acúmulo de biofilme dentário. Em cada fase foram gotejadas soluções de sacarose a 20% ou água destilada, oito vezes ao dia, sobre todos os blocos. Durante o período experimental os voluntários realizaram a higiene bucal com dentífrico sem flúor, mas ingeriram água fluoretada. Após 28 dias de cada fase, o biofilme dentário acumulado sobre dois blocos foi coletado, o tratamento foi invertido e, após um tempo adicional de 24 e 48 horas, o biofilme acumulado nos outros blocos foi coletada. As concentrações de íons flúor, cálcio e fósforo inorgânico solúveis em ácido foram analisadas no biofilme dentário, além da concentração de polissacarídeos insolúveis (PI). Foram observadas concentrações estatisticamente menores dos íons e uma concentração maior de PI no biofilme de 28 dias formada na presença de sacarose do que na sua ausência. Após a inversão do tratamento a mudança nas concentrações dos íons não foi significativa, mas a concentração de PI mudou significativamente. Os autores

concluíram que a mudança na concentração de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dentário não é devida à fermentação da sacarose.

PECHARKI et al.¹²⁴, em 2005, avaliaram *in situ*, o efeito do ferro (Fe) co-cristalizado com sacarose (Fe - sacarose) topicamente aplicado *in vitro* na acidogenicidade, composição química e microbiológica do biofilme dentário formado *in vivo*, e na desmineralização do esmalte. Durante duas fases de 14 dias cada, 16 voluntários usaram um dispositivo palatino contendo dois grupos de três blocos de esmalte humano. Cada grupo de três blocos foi submetido a um dos tratamentos: água destilada e deionizada (T1); solução de sacarose a 20% (T2); solução de sacarose a 20% mais 18 µg Fe / mL (T3); solução de sacarose a 20% mais 70 µg Fe / mL (T4). As soluções foram gotejadas sobre os blocos oito vezes por dia e os voluntários utilizaram dentífrico fluoretado. O biofilme formado sobre os blocos foi analisada com respeito à acidogenicidade no 13º dia de experimento (antes e 5 minutos após o gotejamento da solução) com microeletrodo. Dez horas após a última exposição ao tratamento, o biofilme dentário foi coletado para avaliação microbiológica e bioquímica (Fe, F, Ca, fósforo inorgânico e polissacarídeos insolúveis). Para avaliação da desmineralização foram avaliadas a porcentagem de perda de dureza superficial e microdureza longitudinal. O pH inicial e final do biofilme dos grupos T2, T3 e T4 não apresentou diferenças significativas entre si, mas foram inferiores ao grupo T1. A quantidade de biofilme formada sobre os blocos e seu número de lactobacilos foram significativamente menores no grupo T1, em comparação aos demais grupos, que não diferiram entre si. As populações de estreptococos mutans dos grupos T3 e T4 foram semelhantes a do grupo T1. Já o grupo T2 apresentou contagem maior que os grupos T1 e T4, mas não foi diferente do grupo T3. Os grupos T2, T3 e T4 apresentaram concentrações de cálcio

significativamente menores e de polissarídeos insolúveis significativamente maiores que o grupo T1. Houve menor desmineralização no grupo T4 do que no T2. O grupo T1 apresentou menor perda de dureza superficial que o grupo T4, mas a perda mineral não foi diferente. Os autores concluíram que o Fe foi capaz de diminuir a desmineralização do esmalte, provavelmente por reduzir a população de estreptococos mutans no biofilme formada.

Em 2006, **AIRES et al.**² avaliaram a relação entre concentração de sacarose e potencial cariogênico, em um estudo *in situ* cruzado duplo cego, que envolveu a participação de 12 voluntários adultos. Os participantes usaram aparelhos palatinos removíveis com quatro blocos de esmalte humano, fixados 1 mm abaixo do nível da resina acrílica e protegidos por uma tela plástica para acúmulo de biofilme dentário. O estudo avaliou a resposta obtida pela aplicação extrabucal dos tratamentos (água destilada e deionizada – ADD, solução de sacarose a 1%, 5%, 10%, 20% ou 40%) oito vezes por dia. Em cada uma das 3 fases experimentais, dois tratamentos foram testados. Ao final dos períodos foi avaliada a cariogenicidade (pH), composição inorgânica e conteúdo de polissacarídeos insolúveis do biofilme formado sobre os blocos, além da microdureza do esmalte. Os resultados mostraram que os menores níveis de pH após 5 minutos de exposição à sacarose foram obtidos com as soluções a 10, 20 e 40%. As maiores concentrações de flúor foram achadas nos grupos ADD e sacarose a 1%, que não diferiram estatisticamente entre si, mas foram significativamente maiores que os grupos que receberam sacarose a 10, 20 e 40%. A concentração encontrada com a solução a 5% foi estatisticamente diferente somente da solução a 40%. As concentrações de cálcio e fósforo em ADD e sacarose a 1% não diferiram entre si, mas foram estatisticamente superiores do que os outros tratamentos. A concentração de polissacarídeos insolúveis foi

estatisticamente menor no grupo ADD do que nos outros grupos. A %PDS nos grupos ADD e sacarose a 1% não foram diferentes entre si, mas foram significativamente menores do que as observadas com as outras concentrações de sacarose. A partir da concentração de 5% não foi observada diferença entre os grupos quanto à porcentagem de perda de dureza superficial. Os autores concluíram que a concentração de sacarose limiar para formação de um biofilme dentário com propriedades de acidogenicidade e composição bioquímica capaz de promover a cárie dentária é ao redor de 5%.

MARTINHON et al.¹⁰¹, em 2006, avaliaram, *in situ*, o efeito do ferro na composição do esmalte e na formação do biofilme dentário, sob alto desafio cariogênico. Participaram da pesquisa 12 voluntários, em duas etapas de 14 dias cada. Em cada etapa os voluntários receberam dispositivos palatinos contendo quatro blocos de esmalte bovino e escovaram seus dentes com dentifrício não fluoretado. Oito vezes ao dia, seis voluntários gotejaram uma solução de sulfato ferroso 15 mM sobre os espécimes, enquanto os outros seis gotejaram água deionizada. Cinco minutos depois, uma solução de sacarose a 20% foi gotejada sobre os espécimes. Foi realizada a análise da microdureza superficial antes e após do experimento (carga de 50 g por 10 s) e coletado o biofilme dentário para avaliação de flúor, cálcio, fósforo, ferro e carboidratos alcali-solúveis. Também foi avaliada a microdureza em secção longitudinal (carga de 25 g por 10 s) e flúor, cálcio e ferro do esmalte. No biofilme tratado com sulfato ferroso houve aumento significativo apenas das concentrações de fósforo e ferro. O grupo que recebeu sulfato ferroso apresentou porcentagem de perda de dureza superficial e perda mineral menores que o grupo controle. Quanto à composição do esmalte, não houve diferença entre os grupos. Concluiu-se que o ferro causa um aumento na

concentração de fósforo no biofilme dentário, bem como reduz a perda mineral, tanto na superfície como no interior do esmalte.

2.2. Erosão dentária

A erosão dentária constitui a perda de estrutura por um processo químico sem envolvimento de microrganismos^{30, 31, 66, 108, 158}. Este processo químico está relacionado a ácidos de origem intrínseca ou extrínseca. Alguns autores^{39, 66, 85} consideram também a origem idiopática, neste caso constata-se uma lesão dentária semelhante à erosão, mas testes e história clínica não são capazes de diagnosticar a origem do ácido. Segundo **MOSS**¹¹⁴ (1998), na maioria dos casos citados na literatura como erosão idiopática, ocorre aparentemente uma etiologia multifatorial não elucidada.

A origem intrínseca está relacionada às doenças e alterações anatômicas que resultam em ácidos endógenos, representados pelas secreções gástricas^{32, 85, 114, 135}. Desordens alimentares de origem psicossomática como vômito nervoso, anorexia nervosa ou bulimia causam regurgitação ou vômito auto-induzido^{132, 135}. Causas de origem somática como gravidez, diabetes, alcoolismo e desordens gastro intestinais, na qual se enquadram disfunção gástrica, úlcera, obstipação crônica e doença do refluxo gastroesofágico, também podem originar ácidos endógenos¹³⁵. A doença do refluxo gastroesofágico por sua vez pode ocorrer por diversos fatores: incompetência do esfíncter esofágico decorrente da gravidez, dieta, drogas, álcool e hérnia de hiato; aumento da pressão gástrica devido à obesidade e gravidez; e aumento no volume gástrico após as refeições¹³⁵. A erosão associada a ácidos endógenos, que recebeu a terminologia de perimólise, apresenta um aspecto clínico característico,

de depressões côncavas nas superfícies palatinas e oclusais dos dentes superiores, e linguais e oclusais dos dentes inferiores posteriores^{66, 85}.

A erosão de origem extrínseca apresenta aspecto clínico semelhante à intrínseca, mas afetam também as superfícies vestibulares dos dentes. As lesões são lisas, arredondadas, polidas e geralmente livres de cárie³². Nas superfícies vestibulares afetam, em ordem decrescente de severidade, os incisivos centrais, laterais, caninos e pré-molares³². Em situações onde a dentina foi afetada, o dente apresenta translucidez na mesial, distal ou incisal³². A erosão nas superfícies palatinas dos dentes superiores, devido à dificuldade de diagnóstico, quando detectada, já apresenta a dentina exposta e possui um aspecto côncavo, limitado por linhas brancas de esmalte desmineralizado³². Algumas vezes atingi-se a dentina secundária ou até mesmo a polpa³². As bordas incisais e as cúspides também podem estar envolvidas, apresentando uma perda de dentina maior do que do esmalte, resultando em áreas côncavas³².

O processo químico de origem extrínseca, onde se incluem ácidos provenientes da contaminação do ar em ambientes de trabalho, da água de piscinas com cloro, de bebidas, alimentos e medicamentos, é o mais citado e relatado na literatura^{32, 66, 85, 114, 139, 158}.

2.2.1. Erosividade das bebidas ácidas

Os estudos clínicos mostram evidências diretas de que o consumo de sucos de frutas ácidas e refrigerantes, em grande frequência, exerce função causal na erosão dentária^{7, 33, 83}.

Com o objetivo de estudar *in vitro* o potencial erosivo de bebidas consumidas no mercado sul-africano, **GROBLER e van der HORST**⁴⁵ (1982) testaram 23 bebidas quanto ao pH, à capacidade tampão e quantidade de cálcio, fosfato e flúor. As metodologias utilizadas foram pH-âmetro para aferição do pH, potenciômetro com eletrodo específico para flúor, espectrofotometria de absorção atômica para quantificação do cálcio e fosfato e análise da capacidade tampão pela medição do volume de hidróxido de sódio necessário para aumentar o pH em uma unidade. Dentre as bebidas, as conhecidas no mercado brasileiro eram a Pepsi[®] convencional e diet, Fanta laranja[®] convencional e diet, Coca-Cola[®] e sucos de limão e laranja. O menor pH foi apresentado pela Pepsi[®] convencional (2,43) e o maior pelo suco de uva (3,58). A concentração de flúor variou 0,008 a 0,056 ppm F para todas as bebidas. A Fanta[®] (108 ppm Ca) e a Pepsi[®] diet (107 ppm Ca) apresentaram maior quantidade de cálcio, e a Pepsi[®] convencional (345 ppm P) maior quantidade de fosfato. De forma geral, a capacidade tampão dos sucos de frutas foi maior em relação à dos refrigerantes. Para os autores, a capacidade de uma bebida provocar erosão no esmalte dentário, depende não somente de seu pH, mas principalmente de seu efeito tampão. A capacidade tampão se refere à quantidade de ácido ou base que necessita ser adicionada à solução tampão sem provocar mudança em seu pH. Quanto maior for a habilidade da bebida em resistir a mudança em seu pH, se este for baixo, mais tempo a saliva leva para regularizá-lo e maior será seu efeito a favor da erosão.

SOBRAL et al.¹⁴⁰ (2000) compararam o pH de 10 sucos de frutas naturais e 6 outras bebidas, com o intuito de estabelecer qual delas teria o maior potencial erosivo. A bebida que apresentou menor pH foi o suco de limão (2,16) seguido da Coca-Cola[®] (2,36). Todas bebidas e sucos analisados mostraram valores de pH

abaixo do pH crítico para dissolução do esmalte (5,5), portanto foram consideradas potencialmente erosivas.

O pH e a capacidade tampão de bebidas ácidas também foi medido por **EDWARDS et al.**³⁴ (1999). Estes autores encontraram que o valor inicial de pH não dava indicações de como seria a capacidade tampão da bebida. O pH foi menor para os refrigerantes sem frutas em sua composição (2,81) e a capacidade tampão pôde ser ordenada da seguinte forma: sucos de frutas > refrigerantes a base de frutas > refrigerantes sem frutas em sua composição. O refrigerante a base de cola foi enquadrado nesta última classificação.

GOUVEIA et al.⁴³ (2000) realizaram um estudo para determinar o pH, a capacidade tampão (NaOH 1 N - pH 5,5) e o teor de flúor de sucos de frutas industrializados de uma mesma marca comercial (Del Valle®) destinados ao mercado infantil. Sete sabores (laranja, manga, goiaba, damasco, abacaxi, pêssego e maçã) foram testados, sob a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que o pH dos sucos variou de 3,46 a 3,26 (laranja e pêssego respectivamente). Em todos os sucos a concentração de flúor ficou abaixo de 1 ppm, sendo que o suco de maçã apresentou valores significativamente maiores (0,53 ppm). O suco de laranja mesmo com o pH mais alto, apresentou a mais elevada capacidade tampão. Este fenômeno foi justificado pelos autores pelo fato da capacidade tampão fornecer a acidez total da bebida, medindo também a quantidade de ácido não dissociado, que também exerce forte influência sobre a erosão dentária.

Outros autores além de estudar as características químicas da bebida, avaliaram *in vitro* a sua ação sobre o esmalte dentário.

RYTÖMAA et al.¹³³ (1988) compararam o efeito erosivo de 11 bebidas utilizando um modelo *in vitro*, com espécimes de esmalte bovino. Cinco espécimes

por bebida tiveram metade de suas superfícies protegidas e posteriormente foram imersos uma única vez, em 50 mL de bebida por 4 minutos. Através da análise de perfilometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV) não se encontrou desgaste nos espécimes submetidos à cerveja, café com açúcar, café, iogurte de morango, leite de manteiga e água com gás. Já a bebida de cola, bebida de laranja, bebidas isotônicas, bebida de cola diet e suco de laranja provocaram um desgaste no esmalte (MEV), de respectivamente 26, 14, 14, 9 e 8 μm . Concluiu-se que o pH da bebida exerceu influência no processo erosivo, pois as bebidas com pH por volta de 4 nada provocaram, em contrapartida, bebidas com pH abaixo de 4 provocaram distinta erosão.

Algumas bebidas brasileiras foram testadas em esmalte decíduo e analisadas em estereomicroscópio e em MEV. Os dentes foram divididos em grupos e imersos por diferentes tempos (15 minutos, 45 minutos ou 12 horas) em suco de limão industrializado (Limonjal[®]), bebida do tipo cola (Coca-Cola[®]) a refrigerante de guaraná (Guaraná Antártica[®]). No estereomicroscópio todos os dentes apresentaram perda de brilho e alteração de cor. Diferentes graus de solubilização dos prismas de esmalte, afetando primeiramente a bainha dos prismas, depois a cabeça e a calda foram observados por meio da MEV. Quanto maior o tempo de exposição à bebida, maior foi a erosão observada⁴⁴.

Em estudo semelhante, foram analisadas as possíveis alterações ocorridas na superfície de esmalte bovino, hígido ou desmineralizado, exposto por 40 minutos à Coca-Cola[®], ao suco de limão diluído em água destilada na razão 1:5 e ao suco de laranja natural integral (Parmalat[®]). O pH de cada solução foi medido em dois momentos distintos: antes do início e ao final dos experimentos, e não houve alteração nos valores de pH das 3 soluções estudadas. Vinte blocos de esmalte

bovino (16 mm^2) foram artificialmente desmineralizados, 20 permaneceram hígidos e 2 foram utilizados para caracterizar a estrutura de esmalte controle. Após 40 minutos de imersão nas bebidas os espécimes foram analisados em MEV (5000X). Tanto o suco de limão diluído quanto a Coca-Cola® e o suco de laranja foram capazes de produzir alterações superficiais no esmalte bovino após 40 minutos. No entanto o suco de limão foi o responsável por padrões de erosão mais acentuados, seguido pela Coca-Cola® e pelo suco de laranja, tanto no esmalte hígido quanto no desmineralizado. Houve potencialização da perda de estrutura superficial, no esmalte previamente desmineralizado⁹⁶.

LARSEN e NYVAD⁷⁹, em 1999, compararam o pH, a concentração de cálcio, fosfato e flúor e a capacidade tampão, ao efeito erosivo e à solubilidade da apatita, utilizando 18 bebidas. A capacidade tampão foi determinada por titulação com NaOH. Três dentes humanos, com uma janela de 3 x 4 mm de esmalte sem proteção, foram expostos a cada bebida (1,5 L) por 7 dias. A profundidade da lesão foi analisada por meio de microrradiografias com secções longitudinais. As bebidas que provocaram maior erosão foram os refrigerantes e o suco de laranja. A dissolução do esmalte aumentou inversamente ao pH da bebida. O suco de laranja suplementado com cálcio (40 mmol/L) e fosfato (30 mmol/L), apesar de sua alta capacidade tampão e baixo pH, não causou erosão no esmalte, mostrando que estes dois minerais possuem influência no processo erosivo. Geralmente quanto menor o pH, maior foi a quantidade de NaOH necessária para trazer o pH à neutralidade. Para todas as bebidas, a baixa concentração de flúor não exerceu efeito sobre a erosão. A bebida à base de cola apresentou pH 2,4, efeito tampão de 25 mmol/L para pH 7 e até 2 mm de profundidade da lesão de erosão.

Os sucos de fruta indicados ao público infantil têm sido comercializados e consumidos. **SMITH e SHAW**¹³⁸ (1987) testaram 5 sucos infantis, medindo os valores de pH, no momento da abertura das embalagens e após suas diluições de 1 para 10. A análise do desgaste foi realizada expondo espécimes de dentes decíduos ao suco de fruta não diluído, a temperatura ambiente, por 15 horas. Posteriormente foram preparadas secções dentárias de 100-microns e observadas sob microscopia de luz polarizada. O valor de pH encontrado variou de 3,22 a 3,65, para os sucos concentrados e 3,64 a 4,12, para os sucos diluídos. A imersão do dente causou lesão de mancha branca macroscópica. Na microscopia de luz polarizada observou-se apreciável destruição do esmalte.

LUSSI, JÄGGI, SCHÄRER⁹⁰ (1993) estudaram o pH, a capacidade tampão e a quantidade de cálcio, fosfato e flúor de diferentes substâncias e avaliaram seus potenciais erosivos no esmalte humano por meio de microdureza e permeabilidade ao iodo. Entre as bebidas testadas o refrigerante a base de cola provocou diminuição na dureza do esmalte e aumento na permeabilidade ao iodo. No entanto, a bebida mais erosiva com relação a dureza foi a Sprite light[®] seguida do suco de uva ($p < 0,05$) e com relação à permeabilidade foi o suco de uva ($p < 0,05$) pois a Sprite light[®] não foi testada. A análise de múltipla regressão linear revelou com significância estatística que a capacidade erosiva de diferentes bebidas está associada com seus valores de acidez, pH, quantidade de cálcio, fosfato e flúor, assim como com valores iniciais de dureza e permeabilidade ao iodo, referentes ao esmalte exposto.

Alguns autores^{109, 138} afirmam que a erosão dentária associada ao consumo de bebidas provavelmente resulta da combinação dos ácidos contidos nas formulações. O valor do pH é uma importante variável nas formulações, mas não é

necessariamente o único fator. Baseados nisso, **HUGHES et al.**⁶² (2000) imergiram durante 10 minutos, 5 espécimes de esmalte humano em cada uma das seguintes soluções: ácido láctico, cítrico ou maleico em diferentes concentrações e pH, e mediram o desgaste pelo perfil. Os resultados demonstraram que tanto o pH quanto a concentração ácida são relevantes para ocorrência da erosão, quanto menor o pH e maior a concentração ácida, maior foi a erosão produzida. O ácido láctico em baixos valores de pH foi mais erosivo e o ácido maleico foi o menos erosivo em altos valores de pH. O mesmo grupo de pesquisadores utilizando a mesma metodologia, mas com um tempo de 30 minutos de imersão, compararam a ação de soluções de ácido cítrico, clorídrico ou fosfórico. O ácido fosfórico, com valor de pH semelhante ao dos outros ácidos, produziu menor erosão. Sugeriu-se que as bebidas do tipo cola, que normalmente contém 0,1% de ácido fosfórico, podem ser menos erosivas do que as bebidas à base de ácido cítrico. Além disto, as soluções de ácido cítrico apresentaram maior capacidade tampão, o que potencialmente aumenta a taxa de erosão em relação às bebidas de cola¹⁵¹.

Além do tipo de ácido, assim como na cárie dentária, o flúor poderia exercer influência na desmineralização do fenômeno erosivo. Em 2002 foi conduzido um estudo comparando a capacidade erosiva de algumas bebidas de frutas, frescas ou saturadas com CaF_2 , com resultados prévios de algumas bebidas carbonatadas. Além disso, foi medido o grau de dissolução do CaF_2 em algumas bebidas carbonatadas, não carbonatadas e a água. Para determinar a solubilidade do fluoreto de cálcio, 0,5 g do sal foi suspenso, em 1 L de cada uma das 8 bebidas com sabor de frutas, e mantido por 72h sob agitação. As bebidas foram centrifugadas para remoção do sal e analisadas. Paralelamente, dois dentes permanentes foram expostos continuamente a 500 mL de cada bebida, e outros dois, a 500 mL da

bebida previamente equilibrada (saturada) com CaF_2 , sob agitação constante por 48h. Após a exposição os dentes foram seccionados a 150 μm , polidos, e a profundidade da erosão foi medida por meio de microrradiografia. O grau de dissolução inicial do CaF_2 foi medido pela dissolução de 0,5 g do sal em 0,5 litros das bebidas por 2, 10 e 60 min, seguido pela análise de cálcio, flúor e fosfato da solução. Para determinar o conteúdo ácido total, 3 mL das bebidas foram tituladas com 1,0 mol/L de NaOH usando um eletrodo de pH. O pH das bebidas foi de 2,83-3,51. A quantidade de NaOH necessária para trazer o pH a 5,5 variou de 12-42 mmol/L, a qual é maior que a quantidade necessária para a maioria dos refrigerantes, algumas das bebidas necessitaram de 3-7 vezes mais NaOH do que a Coca-Cola[®]. O equilíbrio com CaF_2 resultou em uma concentração de flúor de 3-8 ppm. A profundidade da lesão induzida pelas bebidas esteve diretamente relacionada com o pH da bebida, nas bebidas sem adição de flúor, a lesão foi de 625 μm enquanto nas bebidas equilibradas com CaF_2 foi de 350-625 μm . A taxa inicial de dissolução do fluoreto de cálcio variou bastante entre as bebidas. A saturação com CaF_2 reduziu em 28% o desenvolvimento de erosão *in vitro* em bebidas com pH acima de 3; em bebidas com pH abaixo de 3, a erosão não foi afetada pelo pH, apesar da concentração total de CaF_2 acima de 20 ppm. A dissolução de CaF_2 foi mais rápida em bebidas carbonatadas (Coca-Cola[®]) e em água do que em bebidas não carbonatadas. Conclui-se que tanto as bebidas carbonatadas quanto as não carbonatadas, não são apenas erosivas, mas também capazes de dissolver e remover o fluoreto de cálcio depositado pela aplicação tópica de flúor. Este estudo mostrou que o flúor é incapaz de promover efeito preventivo contra a erosão, tanto na forma de fluoreto de cálcio no esmalte, quanto como parte na formulação da bebida⁸⁰.

Alguns autores fizeram uma análise da erosividade das bebidas ácidas sobre a estrutura dentária com experimento *in situ*. Os modelos *in situ* envolvem aparelhos ou dispositivos que criem condições definidas dentro da cavidade bucal humana e simulem o fenômeno em estudo¹⁵⁹. Idealmente servem como uma ponte entre a situação clínica, naturalmente não controlada e a situação laboratorial, altamente controlada¹⁵⁹. O objetivo deste modelo é simular o que ocorre no processo natural da cavidade bucal, fornecendo informações clínicas relevantes, em um curto período de tempo, sem causar mudanças irreversíveis nos dentes naturais do indivíduo¹⁵⁹. Possui vantagens tais como a realização do estudo dentro da cavidade bucal, a facilidade de controle das variáveis experimentais e flexibilidade do desenho experimental, a facilidade de integração entre várias metodologias de análise e o curto período de duração. No entanto, também apresenta desvantagens pelo pequeno número de voluntários e pela dependência da colaboração dos mesmos¹⁵⁹.

Os primeiros estudos *in situ* relacionados à erosão foram de rápida duração e simularam apenas um ataque erosivo. **GEDÁLIA et al.**⁴² em 1991, investigaram *in situ* o efeito remineralizador da saliva e do leite bovino, sobre o esmalte humano previamente erodido por bebida ácida. A desmineralização e remineralização foram definidas pela alteração entre dureza inicial e final da superfície do esmalte. A leitura da microdureza (Vickers, 300 g) foi realizada antes e após a exposição intrabucal ao refrigerante e após exposição à saliva ou leite. Fotos de MEV dos espécimes foram feitas inicialmente e após o experimento. Desta forma, 14 voluntários saudáveis e com boa condição bucal utilizaram aparelhos ortodônticos, contendo 1 espécime de dente humano polido. Durante uma hora os voluntários foram instruídos a bochechar a bebida a base de cola (Coca-Cola®, pH 2,3) e depois engolir. Após realização da dureza, o aparelho foi recolocado na boca e permaneceu sob ação salivar ou foi

bochechado leite, durante uma hora. A exposição do esmalte *in situ*, à bebida ácida durante uma hora, resultou em sua desmineralização, comprovada pela diminuição significativa da microdureza ($p < 0,01$) e pelas irregularidades das superfícies erodidas. O efeito remineralizador do leite ($p < 0,02$) ou da saliva ($p < 0,05$) foi evidente pela significância estatística. Morfologicamente poucas alterações foram encontradas após exposição ao leite ou saliva. Não houve diferença estatística entre a média de dureza inicial e a dureza após o esmalte remineralizado pelo leite ou saliva. Os autores concluíram que a saliva tem habilidade em remineralizar superfícies de esmalte erodido, no entanto, neste trabalho ela foi menos eficiente do que o leite.

Este mesmo grupo de pesquisadores⁸⁴, em 1993, investigou *in situ* o efeito remineralizador de 3 tipos de queijos (*soft cheeses*) sobre espécimes de esmalte humano, desmineralizados *in vitro*, pela exposição à uma bebida cítrica (pH 3,3) por 30 minutos. Novamente, foi utilizado o método de microdureza (Vickers, 300 g), antes e após exposição à bebida ácida, e após exposição aos queijos. Dez voluntários utilizaram biofilmes palatinas com um espécime já desmineralizado, e durante 5 minutos mastigaram 125 g de queijo ou apenas realizaram movimentos simulando mastigação para expor os espécimes à ação da saliva. Os 3 queijos (não adoçado, pH 4,5; adoçado com sacarose pH 4,25; e com sabor de morango, pH 4,0) foram testados no mesmo dia, nos mesmos voluntários, com intervalo de 20-30 minutos entre os testes. O esmalte submetido à bebida cítrica sofreu diminuição significativa da dureza ($p < 0,001$). O efeito remineralizador da saliva foi menor que dos queijos, mas foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$). O potencial de remineralização dos queijos foi significativamente maior do que o da saliva, mas não diferiu estatisticamente entre si. Foi concluído que apesar do pH ácido destes

queijos, o efeito remineralizante provavelmente se deu por meio da absorção de íons Ca e PO₄, advindos destes alimentos, pela superfície de esmalte desmineralizada.

RUGG-GUNN et al.¹³¹ (1998) realizaram um estudo *in situ*, com maior duração, onde se alternou o ataque da bebida ácida com a ação da saliva. O objetivo do estudo foi comparar o potencial erosivo de um suco de laranja adicionado de citrato de cálcio, com um suco de laranja normal, com um controle positivo (refrigerante *diet* à base de cola) e outro negativo (água). Onze adultos utilizaram continuamente uma biofilme removível palatina durante 6 dias e, neste período o aparelho só foi removido nas refeições. Quatro vezes ao dia o aparelho, contendo 2 espécimes de esmalte bovino (4 x 3 x 2 mm), foi removido e cada lado do aparelho foi imerso em diferentes soluções, por 15 minutos. Foram realizadas 4 etapas de 6 dias, em que o aparelho foi imerso respectivamente às seguintes duplas de solução: refrigerante *diet* à base de cola x água; refrigerante *diet* à base de cola x suco de laranja experimental; suco de laranja normal x suco de laranja experimental; água x suco de laranja experimental. As bebidas foram utilizadas sob temperatura ambiente. Durante o experimento, para evitar o acúmulo de biofilme dentário, os espécimes foram escovados, uma vez ao dia, com escova macia sem dentífrico. A análise do desgaste foi realizada pela comparação dos perfis iniciais e finais, obtidos por meio de modelos dos espécimes. O refrigerante *diet* à base de cola provocou a maior perda de esmalte dos espécimes ($p < 0,001$), sendo que as outras bebidas provocaram um desgaste similar ao controle negativo, a água. As ilustrações realizadas com MEV demonstraram, para os espécimes submetidos ao refrigerante à base de cola, uma superfície rugosa, característica de uma superfície de esmalte atacada.

WEST et al.¹⁵³ em 1998 preconizaram um outro modelo *in situ* para medir erosão. Para validação deste modelo testou-se a ação de um suco de laranja em comparação à água. Os espécimes (8 x 5 x 2 mm), obtidos a partir de terceiros molares inclusos, foram polidos para permitir a utilização do método de perfilometria, e tiveram suas superfícies protegidas nas extremidades por fita adesiva para exposição de uma área central de apenas 2 mm. Os voluntários deveriam ter entre 18 e 60 anos, com boa saúde geral, não poderiam estar tomando medicamentos, não poderiam usar aparelhos dentários, e não poderiam apresentar aftas recorrentes, gengivite excessiva ou desgaste dentário. Dez voluntários selecionados, utilizando biofilmes palatinas contendo um espécime, ingeriram 250 mL da bebida, por 10 minutos às 9h, 11h, 13h e 15h, por 15 dias. A bebida foi consumida em temperatura ambiente e sob supervisão. Os voluntários utilizaram a biofilme das 9 da manhã às 5 da tarde, sendo removida apenas por uma hora para o almoço. Não era permitido o consumo de alimentos no período de utilização do aparelho, apenas chá, café e água. Após a remoção diária do aparelho, este era embebido em digluconato de clorexidina a 0,2% por 3 minutos, para remoção do biofilme dentário, e posteriormente armazenado em solução salina. Durante o experimento os voluntários utilizaram dentífrício fluoretado. Todos os dias, a fita adesiva foi removida e foi realizado o perfil das extremidades passando pela área central exposta. O desgaste foi calculado pelas médias das distâncias, em altura, das interfaces entre o centro e as extremidades. Ao final do estudo foram realizadas 5 endentações na área hígida e 5 na área teste, a microdureza superficial (Vickers, 300 g) foi expressa em unidade de dureza de Wallace (WHU). Caso algum voluntário apresentasse um desgaste maior que 20 µm nos espécimes, ele seria eliminado do estudo, como norma de segurança. As bebidas foram testadas em duas etapas cruzadas, com um

intervalo de uma semana entre elas. Paralelamente ao estudo *in situ*, foi realizada uma investigação laboratorial, sem a presença de saliva. Os espécimes foram imersos em 250 mL da bebida, sob agitação, 4 vezes ao dia por 15 dias. Entre os períodos de imersão e durante a noite, os espécimes foram mantidos em solução salina. O desgaste e a diferença de microdureza entre área hígida e exposta, tanto *in situ* como *in vitro*, foram significativamente maiores para os espécimes sob ação do suco de laranja. A água não provocou alterações no esmalte. Os resultados de desgaste do trabalho laboratorial foram 10 vezes maiores do que os resultados do modelo *in situ*. Concluiu-se que o método descrito possuía várias aplicações para estudar a erosão dentária sob condições controladas e por períodos de tempos que condiziam com a realidade.

Posteriormente vários estudos foram conduzidos utilizando a metodologia de **WEST et al.**¹⁵³ (1998). Em 1999 **HUGHES et al.**⁶¹ realizaram um estudo cego, randomizado, cruzado de 5 fases, onde participaram 15 voluntários, com o objetivo de comprovar o baixo potencial erosivo do suco de groselha modificado, tanto em formulação pronta para consumo, como concentrado para diluição. Um segundo objetivo foi avaliar se o posicionamento anterior ou posterior dos espécimes influenciava a quantidade de desgaste. Para tal, utilizou-se a metodologia preconizada por **WEST et al.**¹⁵³ (1998), com a modificação de uma biofilme palatina com 4 espécimes, 2 anteriores e 2 posteriores. Os sucos concentrados foram consumidos com diluição 50 mL para 200 mL de água. Após a análise do perfil, foi constatado que todas as bebidas, com exceção da água, provocaram perda progressiva de esmalte até o décimo quinto dia. A ordem crescente das bebidas causadoras de desgaste foi: água, concentrado de suco de groselha com cálcio, suco de groselha com cálcio, concentrado de suco de groselha e maçã e

concentrado de suco de laranja. Houve diferença estatística entre as bebidas, com exceção das groselhas com cálcio, concentrada ou não. O desgaste da água foi muito pequeno, em torno de 0,08 μm . Houve uma pequena diferença da quantidade de erosão nas diferentes localizações dos espécimes, no entanto sem significância estatística. Baseados nas evidências clínicas e laboratoriais que indicam que a erosão provoca não apenas perda irreversível de uma porção do esmalte, mas também uma desmineralização superficial subjacente^{66, 146}, neste mesmo estudo os autores, utilizaram o método ultra-sônico idealizado por **EISENBURGER et al.**³⁵ (2000), para determinar esta superfície desmineralizada. Neste método, os espécimes após medição do desgaste provocado por um processo de erosão, são colocados em um ultrasom com potência de 100W e frequência de 38 kHz por 5 segundos, para remoção do esmalte desmineralizado (“amolecido”) nas lesões erosivas. Em seguida é realizado o perfil da diferença entre o perfil após o ultrasom e o perfil da erosão, que corresponde à estrutura alterada do esmalte pela erosão, que é sujeita à remineralização ou remoção por forças mecânicas³⁵. A profundidade desta superfície foi estatisticamente maior para o suco de laranja (2,02 μm), sendo que os outros grupos apresentaram mínima quantidade de superfície desmineralizada (<0,2 μm).

HUNTER et al.⁶⁴ (2000) empregando o modelo idealizado por **WEST et al.**¹⁵³ (1998) avaliaram por meio de perfilometria, diferenças de comportamento entre esmalte e dentina de espécimes de dentes decíduos e permanentes, quando submetidos à erosão. Além disso, a frequência de 2 vezes ao dia, de consumo de bebida (suco de laranja), foi comparada à frequência de 4 vezes ao dia. Foi encontrada uma variação de desgaste significativa entre os 16 voluntários. Em todos os tecidos, a erosão foi progressiva com o tempo, sendo que o padrão foi mais linear

no esmalte do que na dentina. Em geral, a erosão do esmalte decíduo foi maior que do permanente, sendo que esta diferença só foi significativa para os espécimes expostos 4 vezes ao dia, à bebida. Em contrapartida, a erosão da dentina foi maior no dente permanente, apesar das diferenças raramente atingirem níveis convencionais de significância estatística. O aumento da frequência da bebida resultou em aumento da perda de tecido, mas essa diferença não foi proporcional nem estatisticamente significativa. Foi concluído que diferenças estatísticas na susceptibilidade do esmalte decíduo e permanente à erosão pareceu surgir com o tempo e com o aumento da frequência de consumo. Sendo este fato importante clinicamente, devido às dimensões reduzidas dos dentes decíduos e o abuso de refrigerantes pela população infantil.

A comparação dos modelos *in situ* e *in vitro* não foi conduzida apenas para avaliar novas formulações de bebidas, outros fatores associados ao fenômeno erosivo também foram estudados. **HALL et al.**⁴⁶ (1999) compararam a habilidade da saliva *in vitro* e *in situ*, em prevenir a perda superficial de minerais do esmalte, quando exposto à desafio erosivo. No estudo *in vitro*, durante 14 dias, 96 espécimes foram imersos em 25 mL de solução de ácido fosfórico (pH 3,1) por 5 minutos, sendo que entre as imersões 60 espécimes foram mantidos em saliva estimulada e 32 em água deionizada. A saliva foi coletada dos voluntários do estudo *in situ*, congelada e utilizada individualmente. Quinze voluntários participaram do experimento *in situ*, utilizando um aparelho palatino removível, com 4 espécimes. O aparelho foi utilizado por 14 dias, sendo removido apenas duas vezes ao dia, para imersão em 100 mL da solução por 5 minutos. As análises por meio de microrradiografia demonstraram que a saliva *in vitro* e *in situ* protegeu o esmalte contra a perda mineral superficial, quando comparada à água deionizada ($p < 0,05$). O modelo *in situ* promoveu menor

perda mineral do esmalte do que o modelo *in vitro* ($p < 0,05$). Concluiu-se que a saliva realmente exerce proteção em relação à erosão e que os estudos *in vitro* sob mesmas condições do *in situ*, resultam em maior erosão.

FUSHIDA e CURY³⁹, em 1999, realizaram uma avaliação intrabucal do efeito erosivo de refrigerante à base de cola no esmalte e dentina, e a capacidade da saliva em reverter as alterações, considerando a adequação do modelo e a inexistência de pesquisas em relação à dentina. Para tanto, foram utilizados dentes bovinos, a partir dos quais prepararam-se blocos de esmalte e dentina radicular, adequados para a determinação de microdureza superficial. Nove voluntários, utilizando dispositivos intrabucais palatinos, contendo 4 blocos de esmalte e 4 de dentina, participaram deste estudo de 4 etapas, nas quais o refrigerante foi ingerido de 1 a 8 vezes ao dia. O consumo da bebida foi padronizado pela ingestão de 4 copos de 50 mL por 10 segundos cada. Duas horas antes do experimento, o aparelho foi colocado na boca, para formação da película adquirida. Foram feitas determinações de microdureza superficial utilizando-se um microdurômetro com ponta Knoop, e cargas de 50,0 e 15,0 g, respectivamente para esmalte e dentina, durante 5,0 segundos. Os resultados mostraram que, em função da frequência da ingestão de Coca-Cola®, a porcentagem de perda de dureza foi de 18,7 a 27,9 para o esmalte e de 24,6 a 32,6 para a dentina. Estas reduções foram estatisticamente significativas a 5% (teste “t” pareado). A porcentagem de recuperação de dureza pela ação da saliva foi parcial, porém significativa ($p < 0,05$), variando de 43,6 a 35,6 para o esmalte e de 40,5 a 34,6 para a dentina. Houve também uma correlação significativa entre frequência de ingestão do refrigerante e porcentagem de perda de dureza, sendo de 0,97 para o esmalte e de 0,72 para a dentina. Por outro lado, em termos de recuperação de dureza, a correlação foi negativa, -0,70 para o esmalte e -

0,74 para a dentina. Concluiu-se que em função da frequência de ingestão de Coca-Cola® houve perdas proporcionais e irreversíveis da estrutura superficial, tanto do esmalte como da dentina.

Em estudo *in situ*, **KIM et al.**⁷³ (2001), objetivaram avaliar a capacidade de reendurecimento, pela saliva, do esmalte dentário previamente erodido. Para tal 8 blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm) foram preparados, polidos e tiveram sua microdureza inicial avaliada. Em seguida foram submetidos à erosão *in vitro*, em 100 mL de uma bebida carbonatada (Pepsi-Cola®), por 5 minutos, e a microdureza foi novamente medida. Posteriormente 4 voluntários saudáveis e sem lesões intrabucais utilizaram um aparelho palatino removível com 1 espécime em cada região de 1º molar permanente. Os voluntários só retiraram os aparelhos durante as refeições e higiene bucal, e nesses períodos os espécimes foram mantidos em 100% de umidade. A microdureza dos espécimes foi avaliada após 1h, 24h e 48h de permanência na cavidade bucal. Os autores constataram diminuição significativa da dureza dos espécimes após a imersão na bebida por 5 minutos. A exposição intrabucal de 1h para 24h resultou em aumento significativo da dureza ($p < 0,05$); no entanto, não houve diferença significativa de dureza dos espécimes entre as exposições de 24h e 48h, e a microdureza final (após 48h) não atingiu os valores de dureza iniciais ($p < 0,05$).

Tendo em vista que a determinação da ação salivar está relacionada ao seu fluxo e composição, e estas propriedades variam dentro da cavidade bucal e entre indivíduos, **AMAECHI e HIGHAM**⁴ (2001) desenvolveram um estudo *in situ* para avaliar a capacidade de remineralização da saliva no esmalte submetido à erosão, localizado em diferentes locais da boca e em diferentes indivíduos. Os espécimes, obtidos a partir de pré-molares humanos, foram imersos por uma hora em suco de

laranja, para provocar erosão. Posteriormente, em cada um dos 10 voluntários, foi fixado um espécime na palatina do incisivo lateral superior direito e outro espécime na lingual do incisivo lateral inferior direito. O grupo controle foi composto por espécimes desmineralizados que permaneceram fora da boca. Durante 28 dias, os voluntários mastigaram chiclete por 20 minutos, quatro vezes ao dia. A perda mineral e a profundidade da lesão, quantificadas utilizando microrradiografias, foram significativamente menores, para o grupo dos espécimes posicionados por palatino ($p < 0,001$) e por lingual quando comparado ao grupo controle e, para o grupo posicionado por lingual, quando comparado ao grupo posicionado por palatino ($p < 0,001$). Os autores observaram que na lesão de erosão havia uma cratera e uma desmineralização subsuperficial do esmalte. Concluiu-se que a saliva foi capaz de remineralizar a erosão inicial do esmalte e o grau de remineralização variou de acordo com o local intrabucal, sendo que esta variação pôde ser responsável pela diferença de susceptibilidade à erosão dentro do arco dentário.

2.2.2. Fatores envolvidos na erosão dentária

A maioria dos estudos *in vitro* avalia apenas o potencial erosivo e as características químicas de alimentos e bebidas, e não levam em consideração outros fatores envolvidos no processo erosivo. Um estudo do tipo caso controle encontrou que alguns indivíduos saudáveis possuem dieta semelhante aos indivíduos com erosão e não apresentam a lesão, sugerindo a existência de fatores biológicos capazes de interferir na erosão¹²².

Para **MOSS**¹¹⁴ (1998), **LUSSI, JAEGGI, ZERO**⁸⁹ (2004) e **LUSSI**⁸⁷ (2006) o desenvolvimento da erosão é influenciado por fatores dietéticos, comportamentais e

biológicos. Os fatores dietéticos estão relacionados aos alimentos e bebidas ácidas, suas características de pH, capacidade tampão, tipo de ácido e concentração de cálcio e fosfato.

Os fatores comportamentais dizem respeito aos hábitos da população, que por sua vez podem ser determinados pelo nível sócio econômico¹¹¹ e pelo estilo de vida. Um exemplo de fator comportamental é a ingestão de líquidos durante a noite, aumentando o risco à erosão¹¹².

Os fatores biológicos podem ser divididos em composição dentária, anatomia dentária, anatomia e fisiologia dos tecidos moles e ações salivares.

MEURMAN e FRANK¹⁰⁵ (1991) descreveram os aspectos morfológicos do esmalte humano e bovino sob condições de erosão. Espécimes de esmalte humano e bovino, polidos e não polidos, com superfícies prismática e aprismática, foram imersos em 10 mL de bebida à base de cola contendo ácido fosfórico (pH 2,6) ou bebidas isotônicas contendo ácido cítrico ou maleico (pH 2,8 e 3,4 respectivamente) por 15, 30, 60, 120 ou 180 minutos a 20°C, sob agitação constante. Posteriormente os espécimes foram preparados e estudados em MEV (JEOL 35C). Na superfície de esmalte aprismática foi observada uma dissolução irregular, com áreas severamente afetadas adjacentes a áreas menos afetadas. Espécimes bovinos e humanos prismáticos apresentaram dissolução característica, onde na erosão inicial, após 15 minutos de imersão, observou-se o envolvimento específico da calda dos prismas. A imersão prolongada causou a dissolução da cabeça dos prismas seguida pelas áreas interprismáticas. No esmalte bovino o ácido maleico afetou menos a ultra-estrutura superficial em comparação ao ácido cítrico e fosfórico após 15 e 30 minutos de imersão, no entanto após estes tempos nenhuma diferença foi observada entre as erosões causadas pelos ácidos. O esmalte polido foi mais

susceptível à erosão do que o esmalte não polido. O polimento inevitavelmente removeu a camada externa da superfície do esmalte que por sua vez é mais resistente do que as camadas internas. Desta forma, a estrutura do esmalte modificou a progressão da erosão causada *in vitro*, sendo que estruturalmente não foi encontrada diferença entre esmalte humano e bovino.

Além da composição^{69, 91, 105}, a forma e o contorno do dente e seu posicionamento na boca pode torná-lo mais susceptível ao contato com a bebida e este contato também é influenciado pelos movimentos dos tecidos moles. **JARVINEN et al.**⁶⁸ (1992) observaram que a erosão mais severa ocorreu nas superfícies palatinas dos dentes tocados pela língua.

A saliva é o mais importante fator biológico, exercendo função protetora em relação à erosão, devido às seguintes propriedades: diluição e lavagem de agentes potencialmente erosivos; manutenção de um estado super saturado próximo ao dente, devido à presença de cálcio e fosfato; neutralização e tamponamento de ácidos; e formação da película adquirida¹¹⁴.

HOLLOWAY et al.⁵⁶ (1958) alimentaram ratos normais e dessalivados com 20 mL de diferentes bebidas, diariamente. A erosão provocada foi avaliada por escores. Os sucos de frutas provocaram maior erosão em relação aos refrigerantes e os ratos sem saliva apresentaram um aumento de 60% na erosão. Concluiu-se que a saliva exerce proteção contra a erosão.

SANCHEZ e PRELIASCO¹³⁴ (2003) realizaram um estudo caso controle com o objetivo de medir o fluxo salivar; pH e a capacidade tampão antes e após o consumo de bebidas ácidas em crianças com erosão e comparar esses dados com valores equivalentes em crianças saudáveis (controle), para estabelecer quais fatores predispõem à erosão dentária. Para tal participaram do estudo 30 crianças

de 4 a 10 anos de idade apresentando erosão dentária, e outras 30 crianças com mesma idade, sem erosão ou cáries. A metodologia utilizada para medir o fluxo salivar foi a coleta da saliva após 2 horas de jejum. Para a saliva não estimulada, os pacientes se sentaram confortavelmente em cadeiras odontológicas e após engolir, cuspiram em um tubo graduado, a cada 30 segundos, por 5 minutos. A saliva estimulada foi coletada também em um tubo graduado, por 5 minutos, sendo que as crianças mastigaram um pedaço de parafina, durante este período. Os resultados foram convertidos em mL por minuto. O pH de ambos tipos de saliva foi medido utilizando-se um pH-âmetro e a capacidade tampão da saliva estimulada foi medida pelo método colorimétrico utilizando-se o kit da Vivadent® (Schaan, Liechtenstein). Quatro bebidas foram testadas (Coca-Cola®, Sprite®, ADES® de laranja e achocolatado) quanto a sua influência no pH salivar 1,5; 10; 15; 20; 25; 30; 45 e 60 minutos após o consumo de 80 mL destes produtos, utilizando-se um microeletrodo de pH localizado na interproximal dos incisivos superiores dos pacientes. O fluxo (mL/min) e o pH da saliva não estimulada e estimulada foram respectivamente: 0,43; 6,55 e 0,60; 6,72 para os indivíduos com erosão e 0,73; 7,12 e 1,12; 7,21 para o controle. Os resultados demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) de pH salivar, fluxo salivar e capacidade tampão entre as crianças com erosão quando comparadas às crianças saudáveis. No grupo controle apenas o suco de laranja à base de soja (ADES®) e a Sprite® provocaram uma queda no pH menor que 6,2, mas nenhuma atingiu pH menor que 5,5. No outro grupo, todas bebidas, com exceção do achocolatado, proporcionaram uma queda no pH abaixo de 6,2 por aproximadamente 3 minutos e apenas o suco de laranja de soja atingiu pH 5,5 por 1 minuto. A bebida que provocou maior queda de pH foi o suco de laranja à base de soja (ADES®) seguido pela Sprite®, Coca-Cola® e achocolatado, sendo que houve

diferença significativa entre todas bebidas ($p < 0,05$). Os autores concluíram que todos fatores estudados estavam envolvidos na erosão dentária.

A saliva, além de exercer proteção pelo seu fluxo e capacidade tampão, também contribui para a formação da película adquirida, que apresenta função fundamental no desenvolvimento da erosão.

A película adquirida do esmalte é um filme orgânico que recobre a superfície dentária. Inicialmente pensava-se que esta era de origem embriológica, mas no meio deste século, esclareceu-se que sua formação de dava após a erupção dentária⁸². Sua composição e estrutura ainda não foram totalmente esclarecidas, sabe-se que a película se forma pela adsorção seletiva de proteínas no esmalte e que se constitui em grande parte, por proteínas salivares e não salivares, e também possui carboidratos, em menor quantidade⁸². Alguns trabalhos sugerem que a película atinge equilíbrio em relação à adsorção de proteínas, após duas horas de exposição do esmalte ao meio bucal¹³⁷. A espessura da película varia de 0,5 a 1,0 μm ⁷⁶, sendo que sua composição parece alterar-se com o passar do tempo⁸². A principal função da película adquirida é proteger o esmalte, através da diminuição da desmineralização, diante de desafios ácidos⁸². Segundo **DAWES**²⁶ (1989) o ácido se difunde e se acumula na película adquirida, que irá diminuir o ritmo do ataque ácido e a taxa de dissolução de íons de cálcio e fosfato. **ZAHRADNIK, MORENO, BURKE**¹⁵⁷ (1976) utilizando um modelo *in vitro*, demonstraram que a película é semipermeável, com mínimo efeito sobre o transporte de moléculas neutras e ação retardadora sobre o fluxo iônico. Outra propriedade da película adquirida é a diminuição da fricção entre dente e mucosa bucal, contribuindo para a diminuição da abrasão durante a mastigação⁸².

O papel protetor da película adquirida vem sendo demonstrado em diversos estudos. **MEURMAN e FRANK**¹⁰⁶ (1991) estudaram o efeito da película adquirida em relação à erosão dentária, utilizando um modelo *in vitro*. Vinte blocos de esmalte bovino, com metade de suas superfícies protegidas com esmalte de unha (controle) foram imersos em uma bebida ácida à base de cola (pH 2,6) por 120 minutos. Previamente, alguns espécimes foram imersos em um *pool* de saliva humana por 7 dias para formação de película adquirida. Na amostra total, metade dos espécimes se apresentou polido e a outra metade não polido e, todos foram igualmente divididos entre os grupos com e sem película adquirida. Após a imersão na bebida ácida, a película de alguns espécimes foi removida com hipoclorito de sódio a 10% (20h a 20 °C) para possibilitar a visualização da erosão. Todos os espécimes foram preparados para análise em MEV. Os espécimes sem película (controle +) apresentaram erosão com dissolução generalizada do corpo dos prismas e distinção da margem entre área hígida e erodida. No grupo submetido à saliva, a película foi vista como uma fina camada dispersa, cobrindo parcialmente a superfície. Nos espécimes onde a película foi removida, observou-se uma erosão menor quando comparada ao controle. O esmalte polido apresentou maior erosão em relação ao esmalte natural. Os autores concluíram que a película adquirida foi capaz de proteger o esmalte subjacente contra erosão *in vitro*, servindo assim como uma barreira para a difusão dos ácidos da bebida utilizada.

NEKRASHEVYCH e STÖSSER¹¹⁵ (2003) avaliaram *in vitro* a erosão originada por ácido cítrico, utilizando diferentes métodos, e estudaram o potencial protetor de uma película adquirida experimentalmente formada (24 horas *in vitro*). Cento e quarenta dentes bovinos foram cortados e polidos. A microdureza inicial (Vickers) foi realizada em 120 espécimes, com cinco endentações em cada. Posteriormente

metade dos espécimes foi imerso em um *pool* de saliva estimulada, por 24 horas, para formação da película adquirida. Em seguida, 10 espécimes com película e 10 sem película foram imersos em 5 mL de ácido cítrico a 0,1% ou 1% por 1, 5 ou 10 minutos, formando 12 subgrupos. A microdureza final foi realizada e 1 mL do ácido cítrico, após a imersão dos espécimes, foi utilizado para determinar a quantidade de cálcio por meio de espectroscópio de absorção atômica. Para observação da morfologia da superfície foram selecionados 5 espécimes de cada subgrupo e examinados por MEV. Um segundo experimento foi realizado em 20 espécimes, com e sem película adquirida, submetendo-os a 1 minuto de erosão (0,1% ou 1% de ácido cítrico). A perda de dureza foi dependente do tempo e da concentração da solução. A película adquirida inibiu significativamente a perda de microdureza, exceto após 10 minutos de imersão em 1,0% de ácido cítrico. No entanto, não houve diferença significativa quanto à liberação de cálcio, entre os espécimes com e sem película adquirida. Concluiu-se que a película adquirida protege mecanicamente a superfície do esmalte contra erosão por curtos períodos em ácidos orgânicos.

AMAECHI et al.⁶ (1999) estudaram a espessura da película adquirida em diferentes locais do arco dentário e investigaram a relação entre sua espessura e severidade da erosão. Espécimes de esmalte bovinos foram fixados nas superfícies vestibulares e linguais dos dentes: incisivos centrais inferiores e superiores e primeiros molares superiores e inferiores. Cinco voluntários permaneceram com os espécimes *in situ* por uma hora, para formação da película adquirida. Posteriormente esta foi retirada, corada e sua espessura medida por um microscópio de varredura confocal a laser. Esses espécimes, juntamente com outros sem película (controle) sofreram uma ciclagem de desmineralização *in vitro* durante 6 vezes ao dia, com imersão em suco de laranja por 5 minutos seguido do armazenamento em saliva.

Após 4 dias de ciclagem, a erosão foi quantificada por microrradiografias. Na superfície vestibular dos incisivos anteriores inferiores (0,48 μm) e superiores (0,46 μm) a espessura da película foi semelhante, assim como na vestibular dos molares inferiores (0,58 μm) e superiores (0,56 μm). As superfícies linguais dos incisivos inferiores (0,96 μm) e molares inferiores (1,06 μm) apresentaram películas significativamente maiores do que as das superfícies vestibulares. Já para os dentes superiores a película das superfícies linguais dos incisivos (0,3 μm) e molares (0,38 μm) foram significativamente menores do que as das superfícies vestibulares. A espessura na superfície lingual foi significativamente maior nos dentes inferiores do que nos superiores. A variação da espessura da película entre os voluntários foi estatisticamente significativa. Os espécimes com película apresentaram um nível de erosão significativamente menor do que os espécimes sem película. O coeficiente de correlação de Pearson indicou uma associação inversa entre perda mineral ($r = -0,96$) e profundidade da lesão ($r = -0,97$) com a espessura da película adquirida de diferentes locais. Os autores discutiram que as diferenças da espessura da película adquirida poderiam resultar do tipo de saliva no local e do tipo de ação dos tecidos moles. Por exemplo, os incisivos inferiores possuem espessa película por serem constantemente banhados por saliva das glândulas sublingual e submandibular e por sofrerem menos abrasão pela língua, pois seu dorso queratinizado, que entra em contato com os incisivos superiores, é mais abrasivo do que seu ventre.

A influência da película adquirida, formada pelo contato com a saliva de diferentes glândulas, na erosão do esmalte dental humano, foi estudada por **NIEUW AMERONGEN, ODERKERK, RIESSEN**¹¹⁷ (1987). A película foi formada *in vitro* por meio da imersão de dentes humanos em várias soluções de ácido cítrico a 1%, por períodos de até 6 dias. A película originada da saliva total não estimulada

proporcionou aproximadamente 45% de inibição da desmineralização e a película da saliva da parótida 25% de inibição. Por outro lado, a película formada, em 60 minutos, pela mistura da saliva das glândulas submandibular e sublingual preveniu completamente a formação de lesão. No entanto, quando as mucinas foram removidas da saliva das glândulas submandibular/sublingual, a proteção contra o desmineralização pela película formada foi de apenas 30%. O aumento do período de maturação da película resultou em aumento da proteção. No entanto, a proteção da película das glândulas parótidas foi atingida após 1 dia de incubação, enquanto que a das glândulas submandibular/sublingual, apenas após 60 minutos. O efeito da película adquirida formada por meio de mucinas salivares isoladamente também foi estudado. A película formada em 3 dias de exposição às mucinas salivares *in vitro* proporcionou uma proteção de 100% contra a desmineralização ocasionada pelo ácido. Os autores concluíram que as mucinas, que compõem 7 a 26% das proteínas salivares, secretadas principalmente pelas glândulas mucosas (submandibular/sublingual), apresentam grande contribuição para o efeito protetor da película contra o ataque ácido à superfície dentária.

Estudo semelhante foi realizado por **HANNIG e BALZ⁵¹** (2001), que investigaram o efeito protetor e a ultra-estrutura da película adquirida, formada *in vivo*, próxima aos ductos das glândulas parótida e submandibular/sublingual. A película foi formada após a exposição de blocos de esmalte bovino ao ambiente bucal na vestibular de primeiros molares superiores e na lingual de incisivos inferiores, em 3 voluntários, durante 24 horas. Espécimes de esmalte com e sem película adquirida (24 horas) foram imersos em ácido cítrico (0,1% e 1%) por períodos de 30s, 1 e 5min e, posteriormente foram realizadas a microdureza superficial e a microscopia eletrônica de transmissão. Os espécimes com película

adquirida apresentaram menor diminuição da dureza superficial quando comparados aos espécimes sem película. A película formada na vestibular dos molares superiores foi menos efetiva, do que a da lingual dos incisivos inferiores, na proteção do esmalte contra a erosão, apenas no tempo de 5min de exposição a 1% de ácido cítrico. A análise da microscopia de transmissão demonstrou que as camadas da película adquirida vão continuamente dissolvendo, devido à exposição ácida. Entretanto, mesmo após 5 minutos de exposição a 1% de ácido cítrico, uma camada residual de película pôde ser detectada na superfície do esmalte. Concluiu-se que a diferença das películas das regiões vestibulares e linguais formadas por 24 horas *in vivo* tem pouca importância em relação à sua ação preventiva contra o fenômeno erosivo.

Segundo **LENDENMANN, GROGAN, OPPENHEIM**⁸² (2000), a película atinge sua espessura após duas horas de formação, contudo o processo de maturação parece ser necessário para transformar a película recém-formada, sem capacidade protetora, em uma película velha capaz de proteger o dente contra a desmineralização. **ZAHRADINIK et al.**¹⁵⁷ (1976) sugerem que o conteúdo de constituintes salivares e também mudanças estruturais da película adquirida contribuem para sua propriedade protetora.

MAUPOMÉ et al.¹⁰² (1999) estudaram *in vitro* o efeito erosivo de um refrigerante à base de cola, em espécimes de esmalte com película adquirida. As variáveis de estudo foram frequência de imersão na bebida ácida (1, 5 ou 10 vezes/dia) e período de formação da película adquirida (20min, 6 ou 24h). A imersão foi realizada por 5min durante 8 dias. O método de análise foi a microdureza superficial (Vickers 100 g por 15s). A microdureza diminuiu de acordo com a

freqüência de imersão. Os autores relataram que o intervalo de incubação da película adquirida, não interferiu na erosão provocada.

HANNIG e BALZ⁵⁰ em 1999 avaliaram o efeito protetor contra a erosão, da película adquirida formada *in vivo* por 24 horas ou 7 dias. Três voluntários saudáveis utilizaram uma biofilme palatina com espécimes de esmalte bovino para formação da película. Setenta e oito espécimes possibilitaram a formação de uma película de 24 horas e outros 78, a formação de uma película de 7 dias. Durante a fase intrabucal, de 4 em 4 horas (exceto durante a noite) os espécimes foram escovados por alguns segundos com água morna, sem dentífrício, para evitar o acúmulo de biofilme dentário. Posteriormente 144 espécimes com película e 18 sem, foram imersos em ácido cítrico a 0,1 ou 1% por 30, 60 e 300 segundos. As análises foram feitas por meio de imagens de microscópio eletrônico de varredura e transmissão e pela microdureza superficial. Os espécimes com película adquirida apresentaram menor extensão de desmineralização pela erosão, quando comparados aos espécimes sem película. Os resultados da microdureza e da MEV indicaram não haver diferença entre a ação protetora da película formada por 24 horas ou 7 dias. As imagens da microscopia eletrônica de transmissão revelaram que ambas películas são caracterizadas por uma camada basal eletrodensa coberta por uma estrutura granular pobremente arranjada. A exposição ao ácido foi capaz de dissolver parcialmente a camada da película adquirida, entretanto, seus resíduos puderam ser detectados em todos espécimes, mesmo após 5 minutos de exposição a 1% de ácido cítrico. Foi concluído que a película adquirida formada *in vivo* pode resistir à ação ácida por determinada extensão e proporcionar proteção do esmalte contra a erosão causada pela ação do ácido cítrico.

HANNIG et al.⁵² em 2004 realizaram um estudo para avaliar o efeito protetor da película adquirida formada *in situ* após períodos de 3, 60 e 120 minutos. Para isso, seis voluntários utilizaram um dispositivo intrabucal contendo 12 blocos de esmalte bovino fixados na região vestibular e palatina dos segundos premolares e primeiros molares de ambos os lados. Os dispositivos foram inseridos na cavidade bucal entre as 8:00 e 8:30 da manhã logo após a higiene bucal convencional com dentífrico não flueretado. Este procedimento foi triplamente realizado por cada voluntário para cada período de formação da película adquirida. Após a etapa *in situ*, cada espécime foi cuidadosamente removido do dispositivo intrabucal e foi imerso por 60 segundos em uma solução de ácido cítrico 1% sob agitação. A dureza superficial Knoop (KHN) no esmalte hígido foi medida como valor inicial, sendo feita uma nova medida imediatamente após o tratamento erosivo, refletindo assim a perda de microdureza (Δ KHN). O total de cálcio dissolvido da superfície do esmalte erodido foi analisado por espectroscopia de absorção atômica e classificado em mg/L por 10mm² de área superficial de esmalte. Foi realizada também a microscopia eletrônica de varredura para a análise micromorfológica das alterações erosivas sofridas pelo esmalte dentário. Os valores médios de perda de microdureza após a erosão do esmalte com película vestibular/palatina formada foram: 139,1/144,9 Δ KHN para a película de 3 minutos, 145,9/146,9 Δ KHN para a película de 60 minutos e 141,7/138,6 Δ KHN para a película de 120 minutos. Os valores de liberação de cálcio para as películas vestibular/palatina foram: 15,0/14,9; 16,5/15,9 e 15,3/17,4 mg/L por 10mm² para as películas de 3, 60 e 120 minutos respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi relacionada ao tempo de formação da película e o local da cavidade bucal (vestibular ou palatino) em todos os testes (ANOVA, $p < 0,05$). No entanto, foi observada uma significativa proteção da

película adquirida em comparação aos espécimes sem a formação desta (liberação de cálcio: 25,6 mg/L por 10mm²; perda de microdureza 187,0 ΔKHN). Estes dados estiveram de acordo com as alterações morfológicas causadas pelo ácido cítrico nos espécimes com e sem a formação da película adquirida. Os autores concluíram que mesmo a película adquirida formada por apenas 3 minutos pode oferecer proteção ao esmalte frente ao ataque com ácido cítrico, no entanto, sua formação não inibiu completamente a ação erosiva.

2.2.3. pH e o biofilme dentário

As principais características fisiológicas associadas à virulência dos microrganismos cariogênicos são a sua acidogenicidade e sua acidurosidade, que são respectivamente a sua capacidade de produzir ácidos orgânicos como produto final da glicólise e a capacidade de sobreviver em baixos valores de pH, compatíveis com a desmineralização dentária. Os efeitos das quedas de pH sobre a sobrevivência e atividade glicolítica das bactérias cariogênicas tem sido investigada por inúmeros estudos^{24, 25, 47, 48, 49, 103, 144, 145}.

DASHPER e REYNOLDS²⁵ (1992) publicaram um trabalho esclarecendo o sistema de regulação de pH dos *Streptococcus mutans* (SM). Neste estudo os autores afirmam que o valor ótimo de pH intracelular para a glicólise nos SM é 7,0 e a atividade glicolítica cai a zero assim que o pH chega até 5,0. No entanto, o pH extracelular ótimo para a quebra da glicose pelos SM é 6,0. Neste trabalho, verificou-se que a adição de fluoreto em SM que estavam realizando a glicólise resultou em uma queda do pH intracelular e este resultado corrobora com a hipótese de que o flúor atua como um ácido fraco membrana-permeável que transporta prótons através

da membrana celular. Esta queda do pH intracelular pode resultar em diminuição da produção de ácido pelos SM. Assim sendo, em pH externo 5,0, a queda do pH intracelular pode levar a uma diminuição de 40% da produção de ácido, sendo geralmente aceita a hipótese de que os fluoretos possuem grande efeito inibitório no metabolismo dos estreptococos bucais em baixos valores de pH. Desta forma, para sustentar uma máxima atividade glicolítica, os SM devem manter o pH intracelular próximo do neutro.

SVENSÄTER et al.¹⁴⁵ em 1997 utilizaram 21 bactérias bucais acidogênicas para determinar se o pH limitante do seu crescimento exponencial é relacionado com a habilidade dos organismos em gerar uma tolerância ácida que resulte em um aumento da sobrevivência em valores ainda mais baixos de pH. A hipótese deste trabalho era de que organismos com maiores valores de pH-limite para crescimento são incapazes de responder em ambientes com valores letais de pH, enquanto que os organismos mais acidúricos podem adquirir uma tolerância a estes baixos valores de pH. Os valores mais baixos de pH-limite para crescimento bacteriano foram para os *Streptococcus mutans* (4,14) e para os *Lactobacillus casei* (3,81) e os mais baixos valores letais de pH foram para as mesmas amostras: *Streptococcus mutans* (3,0) e para os *Lactobacillus casei* (2,3). Os resultados mostraram que uma exposição destas amostras a valores de pH entre 6,0 e 3,5 por um período aproximado de 90 a 120 minutos, resulta em uma tolerância ácida que aumenta os índices de sobrevivência destas amostras em valores de pH abaixo de 3,5.

MCNEILL e HAMILTON¹⁰³ em 2003 determinaram laboratorialmente a tolerância ácida de biofilmes de *S. mutans* crescidos por 1 até 7 dias, assim como verificaram a capacidade destes biofilmes de 2 e 5 dias, crescidos em baixos valores de pH (5,5), em induzir uma resposta à tolerância ácida, que poderia aumentar os

índices de sobrevivência em valores letais de pH (3,5). Os biofilmes mais antigos foram mais resistentes ao pH letal por 2 horas, tendo um índice de sobrevivência das células de 41,8% no biofilme de 1 dia e 63,9% nas células do biofilme de 7 dias. A incubação dos biofilmes por 2 e 5 dias em pH 5,5 por períodos maiores de 6 horas induziu uma forte resposta à tolerância ácida que aumentou a sobrevivência durante a subsequente exposição aos valor letal de pH (3,5).

Sabendo que os estreptococos bucais produzem grande quantidade de ácidos orgânicos como produto final da fermentação de carboidratos, **DASHPER e REYNOLDS**²⁴ (2000) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de ácidos orgânicos como o lactato e o acetato no crescimento, glicólise e pH intracelular de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. O crescimento foi determinado como a máxima densidade da cultura na presença de ácidos orgânicos em valores de pH 7,1; 6,7; 6,3 e 6,1; e o efeito destes ânions na atividade glicolítica e no pH intracelular foi determinado em pHs 7,0 e 5,0. Em pH 7,1, os ânions dos ácidos orgânicos tiveram pequeno efeito no crescimento de ambos espécimes bacterianos. Em valores mais baixos de pH, todos os ânions reduziram a máxima densidade da cultura para ambas bactérias. Os ácidos orgânicos tiveram pequeno ou nenhum efeito na atividade glicolítica em pH 7,0, no entanto, reduziram a atividade glicolítica em pH 5,0. Os ânions dos ácidos orgânicos diminuíram o pH intracelular, de forma que a redução na atividade glicolítica causada pelos ácidos pode ser diretamente atribuída à queda do pH intracelular. Os autores concluíram que a produção de ácido láctico no biofilme pode não só diminuir o pH intracelular, mas também pode trazer efeitos desvantajosos para os estreptococos do biofilme dentário.

MARQUIS, CLOCK, MOTA-MEIRA⁹⁸ (2003) fizeram uma abrangente revisão de literatura sobre a influência do flúor e de ácidos fracos como moduladores da

fisiologia microbiana. Segundo os autores, o flúor pode se mover para dentro e para fora dos estreptococos simplesmente variando o pH do meio e estes níveis de flúor no biofilme são suficientes para promoverem efeitos significantes na redução do metabolismo bacteriano quando o pH do biofilme cai para valores mínimos abaixo de 4,0. Existem também evidências que os ácidos fracos possuem uma ação anticariogênica, pois estes reduzem a tolerância ácida das bactérias bucais. Assim sendo, a ação anticárie mais importante dos fluoretos está em reduzir a tolerância ácida de células intactas do biofilme e como resultado, a produção de ácido é paralisada antes que o pH caia a valores que levem a uma rápida desmineralização. O processo da cárie é resultado da atividade glicolítica de bactérias sem crescimento em valores de pH abaixo de 5,0. O potencial do flúor ou de ácidos orgânicos fracos em inibir a glicólise é totalmente pH-dependente e aumenta radicalmente quando o pH cai. Assim, os ácidos fracos parecem ser um agente anticariogêncio ideal, com efeitos mínimos em valores de pH mais elevados não cariogênicos e efeitos mais consideráveis nos pHs mais baixos.

Com o intuito de comparar a tolerância ácida inerente de bactérias de amostras de biofilme provenientes de locais com e sem lesões iniciais de cárie, **SVENSÄTER et al.**¹⁴⁴ (2003) coletaram o biofilme dentário de superfícies proximais que apresentavam lesões iniciais de cárie e de superfícies híginas em um mesmo indivíduo, assim como de superfícies de esmalte de indivíduos sem cárie. Estas amostras foram semeadas diretamente em ágar não seletivo tamponados com valores de pH de 7,0; 6,0; 5,5; 5,9; 4,5 e 4,0 para evitar alguma perda de adaptação ao ácido durante o isolamento primário das bactérias do biofilme. Os resultados mostraram que aproximadamente 50% da microbiota total do biofilme cultivado das lesões de cárie e dos dentes híginos foi capaz de crescer em pH 5,5 e apenas 1%

em pH 5,0, valor considerado crítico para a desmineralização do esmalte. Em pH 5,0 membros do grupo estreptococos foram dominantes, mas os *Streptococcus mutans* totalizaram menos da metade dos estreptococos viáveis contabilizados. A análise dos resultados indicou que os *Streptococcus mutans* do biofilme dentário são muito variáveis com respeito a tolerância ácida e os locais sadios e com cárie possuíam significativo número de *Streptococcus* que não eram ácido-tolerantes.

Apesar da crescente preocupação verificada em relação à cárie e à erosão dentária, constatada na revisão da literatura, há necessidade de se explorar as consequências sobre as estruturas dentárias de situações nas quais fatores de risco a cárie e a erosão podem ocorrer associados, devido aos hábitos de dieta modernos, como o consumo freqüente de bebidas ácidas com sacarose.

FEB USP

A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in situ* se propôs a analisar o fenômeno da erosão provocada por um refrigerante a base de cola com e sem a formação de biofilme dentário e sua associação ao fenômeno da cárie, pelo desafio cariogênico com sacarose, por meio do estudo da microdureza superficial, perfilometria e análise de concentração de flúor no biofilme dentário.

As hipóteses nulas consideradas foram:

- ✓ Não há diferença na perda de microdureza e no desgaste do esmalte dentário exposto à ação de um refrigerante a base de cola, com ou sem a formação de biofilme dentário;
- ✓ Não existe diferença na perda de microdureza e no desgaste do esmalte dentário resultante de um desafio cariogênico ou de um desafio cariogênico associado à ação de uma bebida a base de cola;
- ✓ Não existe diferença na concentração de flúor no biofilme formado pela exposição a um refrigerante a base de cola, pela exposição frequente à sacarose ou pela associação de ambos.

FEUP USP

Se todos nós fizéssemos as coisas de
que somos capazes, ficaríamos
espantados conosco mesmos.

Thomas Edison

4

MATERIAL e Métodos

4 MATERIAL e Métodos

4.1. Aspectos éticos

O presente estudo foi inicialmente submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, processo número 94/2005, recebendo parecer favorável (Anexo 1). Após a aprovação pelo CEP houve um encontro entre os pesquisadores responsáveis e os sujeitos da pesquisa para o esclarecimento dos objetivos e da metodologia a ser empregada no estudo, ficando claro também que a qualquer momento estes poderiam desistir de participar do experimento. Os sujeitos da pesquisa assinaram um consentimento livre esclarecido, concordando em participar do experimento.

4.2. Delineamento experimental

Este estudo *in situ* do tipo cruzado (Figura 1) e cego envolveu um desenho aleatorizado em blocos (voluntário), sendo realizado em dois períodos de 14 dias, durante os quais voluntários utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo 4 espécimes de esmalte.

FIGURA 1- Esquema ilustrando o estudo do tipo cruzado.

Foi estudado 1 substrato dentário – esmalte humano de dentes permanentes (1 nível) sob 4 condições– erosão somente, erosão associada ao acúmulo de biofilme dentário por 14 dias, erosão associada ao acúmulo de biofilme dentário mais desafio cariogênico por 14 dias e somente desafio cariogênico por 14 dias (4 níveis). Um total de 128 espécimes de blocos de esmalte humano permanente, após um ordenamento planejado conforme a dureza, foram aleatoriamente divididos entre 16 voluntários e entre 4 grupos de estudo (divididos em dois períodos iguais). No entanto, 4 voluntários foram eliminados por não concluírem os dois períodos experimentais, sendo desta forma, considerados neste estudo um total de 88 espécimes divididos entre os 11 voluntários da amostra final. Desta forma para cada grupo foram utilizados 2 blocos de esmalte humano permanente por voluntário (Figura 2). No 1º Período, foram testados os grupos I e II e no 2º Período foram testados os grupos III e IV. Portanto, os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

1º PERÍODO:

- **Grupo I** – apenas efeito da bebida ácida por 14 dias (espécimes ao nível do aparelho);
- **Grupo II** - efeito da bebida ácida associada ao acúmulo de biofilme dentário por 14 dias (espécimes 1mm abaixo do nível do aparelho com tela plástica);

2º PERÍODO:

- **Grupo III** - efeito da bebida ácida associada ao acúmulo de biofilme dentário mais desafio cariogênico por 14 dias (espécimes 1mm abaixo do nível do aparelho com tela plástica);
- **Grupo IV** - efeito do acúmulo de biofilme dentário mais desafio cariogênico por 14 dias (espécimes 1mm abaixo do nível do aparelho com tela plástica).

FIGURA 2- Grupos experimentais do trabalho.

Após o período experimental *in situ*, foram analisados o bloco dentário e o biofilme dentário formado nos diferentes grupos experimentais. A análise quantitativa da alteração de dureza e do desgaste dos blocos foi realizada por meio de testes de microdureza e perfilometria, desta forma as variáveis de resposta foram porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) e perfil de desgaste. A referência de esmalte hígido, cuja medida foi necessária para realização desta análise, apresentava-se no próprio espécime, pois todos blocos de esmalte apresentavam metade de suas superfícies protegidas por esmalte de unha. O biofilme dentário foi analisado pela dosagem do seu teor de flúor (F). Com o intuito de facilitar o entendimento da metodologia apresentada, o fluxograma a seguir esquematiza o delineamento experimental do trabalho (Figura 3).

FIGURA 3- Fluxograma do delineamento experimental do estudo.

4.3. Preparo dos espécimes de esmalte

4.3.1. Obtenção dos dentes humanos

Foram utilizados aproximadamente 80 terceiros molares hígidos inclusos ou irrompidos com indicação para extração. Os dentes foram coletados no Centro de Urgência da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Os terceiros molares foram limpos com curetas (Duflex 55G/SS, White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) em associação com jato de bicarbonato (Dabi Atlante Indústrias Médico Odontológicas Ltda) e esterilizados em solução de formol a 2%, pH 7,0 (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo), preparado com tampão fosfato, onde ficaram imersos durante todo o período de preparo dos espécimes de esmalte. A solução foi trocada periodicamente e o período mínimo de imersão dos dentes foi de 30 dias.

4.3.2. Obtenção dos espécimes de esmalte humano

Os terceiros molares, separados em superiores e inferiores, foram fixados com godiva termoativada no centro de uma placa de acrílico cristal (40 x 40 x 5 mm) (Figura 4). A placa de acrílico foi acoplada em um aparelho de corte de precisão Isomet Low Speed Saw (Bulher Ltda, Lake Bluff, IL, USA) (Figura 5) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face (XLI 2205, “hight concentration”, 102 x 0,3 x 12, 7 mm / Extec Corp., Enfield, CT, USA / Ref: 12.205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre

os discos (Figura 5) com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram feitos dois cortes ligeiramente acima da junção amelocementária (Figura 6).

Devido às irregularidades e angulações do esmalte as áreas planas e sem sucros, que possibilitavam a obtenção de blocos, foram demarcadas com lápis grafite nº5 (A. W. Faber-Castell S. A.), para facilitar a análise de como seriam feitos os cortes de modo a obter o maior número de blocos de esmalte dentre as faces da fatia do dente.

Geralmente os dentes inferiores originaram espécimes de esmalte das faces vestibular, lingual, mesial e distal da coroa, totalizando 4 blocos por dente. Nestes casos as fatias da porção coronária foram fixadas com a dentina voltada para a placa de acrílico cristal e executou-se um corte duplo de mesial para distal com dois discos diamantados dupla face com espaçador de 4 mm entre eles. Esse corte, realizado de uma só vez sobre duas marcações foi possível pois as regiões planas das faces mesial e distal dos dentes inferiores eram sempre paralelas. Como resultado obtiveram-se 2 blocos 4 x 4 mm unidos entre si e, com apenas um disco diamantado dupla face acoplado à máquina de corte estes foram separados. Portanto, da fatia original, restaram duas porções correspondentes às faces vestibular e lingual da coroa possibilitando a obtenção de mais dois espécimes. Então, estas porções foram fixadas uma ao lado da outra com as áreas de esmalte demarcadas posicionadas para cima e paralelas entre si, em seguida, com dois discos diamantados dupla face com espaçador de 4 mm, realizou-se um corte sobre as demarcações, obtendo-se mais 2 espécimes de 4 x 4 mm (Figura 6).

FIGURA 4- Fixação do terceiro molar.

FIGURA 5- Máquina de corte.

FIGURA 6- Corte cervical mostrando o local da qual foi obtido o fragmento de esmalte.

Os dentes superiores, com frequência, originaram 3 espécimes de esmalte, e como para os inferiores, após as demarcações, as fatias da porção coronária foram fixadas com a dentina voltada para a placa de acrílico. No entanto, o corte foi realizado com apenas um disco diamantado dupla face para separação da área de uma das demarcações, pois o corte duplo (2 discos simultaneamente) atingiria o meio de outra região demarcada impossibilitando a obtenção de maior quantidade de espécimes. Posteriormente, a porção restante foi fixada da mesma forma e também com um disco separaram-se as outras duas demarcações. Ao final, as três porções menores obtidas foram fixadas lado a lado com as demarcações paralelas entre si e por meio de um corte duplo com dois discos diamantados dupla face com espaçador de 4 mm obteve-se 3 espécimes de 4 x 4 mm (Figura 7).

FIGURA 7- Esquema de corte para molares superiores.

Para os dentes maiores, onde havia a possibilidade de se obter 5 blocos de esmalte, também foi importante a demarcação das possíveis áreas aproveitáveis, sendo necessário mesclar cortes simples e duplos, seguindo o mesmo raciocínio da obtenção dos espécimes de dentes superiores.

Nova seleção de espécimes foi feita e aqueles que continham rachaduras ou manchas foram eliminados, permanecendo ao final, 140 blocos de esmalte humano.

4.3.3. Planificação e polimento dos espécimes de esmalte

Com o intuito de realizar a planificação da dentina os blocos foram posicionados no centro de um disco acrílico cristal (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a maior área plana de esmalte voltada para o disco e com auxílio de um instrumento PKT (Duflex 55G/SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, SP) foram fixados colocando-se cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP) ao redor do espécime (Figura 8). Cuidado especial foi tomado para que a cera não fluísse entre o esmalte e o acrílico. O conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP), com sistema de polimento múltiplo, capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova (Figura 9), permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico onde são fixados os espécimes. Neste procedimento de planificação (Figura 8), utilizou-se uma lixa de silicone carbide de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler), com refrigeração de água deionizada, até que os blocos ficassem com espessura de aproximadamente 4 mm. Assim, a politriz foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86 g, durante 30 segundos a 2 minutos. O tempo não pôde ser exatamente especificado porque com o uso, a lixa se desgastava e, era necessário mais tempo para que se alcançasse a espessura desejada.

FIGURA 8- Planificação da dentina. **FIGURA 9-** Politriz para planificação e polimento.

Posteriormente, os espécimes foram removidos do disco de acrílico e limpos com xilol (Merck, Darmstadt, Germany) para retirar todo resíduo de cera. Em seguida, foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico desta vez, com o esmalte voltado para cima. Nesta fase também foi importante evitar que a cera fluísse entre a dentina e a placa de acrílico, o quê poderia alterar o paralelismo entre o esmalte e a dentina. O conjunto foi adaptado na politriz (Figura 9) e inicialmente o esmalte foi desgastado com uma lixa de silicone carbide de granulação 600 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-600, Buehler), com refrigeração a água deionizada, durante 30 segundos a 7 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta para remoção das ondulações superficiais. Em seguida, foi feito o polimento do esmalte com lixa de silicone carbide de granulação 1200 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-1200, Buehler), com refrigeração a água deionizada, durante 2 minutos e 30 segundos, com 2 pesos, em velocidade alta, após o qual já pôde-se observar uma superfície de aspecto vítreo. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Polishing Cloth Buehler 40-7618) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Extec I Water based diamond permanent polishing suspension Extec Corp. 1 micron 16.587), durante 3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta. Este

tratamento teve por objetivo planificar e remover ranhuras do bloco de esmalte, para permitir a aferição do desgaste e microdureza no local.

Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa do polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner Mod USC 750, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, SP), com frequência de 40 kHz, durante 2 minutos, com água destilada deionizada. Ao final do polimento os espécimes ficaram imersos por 10 minutos em água deionizada sob ação do ultra-som.

A partir do início dos procedimentos de planificação e polimento, os espécimes passaram a ser guardados em refrigerador a aproximadamente 4°C. Durante este período e até o final do experimento foram armazenados fixados nos discos de acrílico numerados, em recipientes plásticos com tampa, separados por folhas de papel absorvente (Softy's, Melhoramentos, São Paulo, SP), umedecidos em água deionizada.

4.4. Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos espécimes de esmalte

A microdureza superficial inicial do esmalte foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (HMV-2000/ Shimadzu Corporation, Japan.) acoplado a um microcomputador e um software específico para a análise das imagens (Cams-Win-New Age Industries/ USA) (Figura 10). Utilizou-se um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga estática de 25 g, aplicada por 5 segundos (Figura 11). Em cada corpo de prova foram realizadas 5 endentações aleatoriamente,

englobando diferentes áreas da superfície com mais de 1000 µm da lateral do bloco. Para medir as endentações realizadas, duas marcas pontilhadas que apareciam na tela do computador se sobrepunham aos vértices agudos do losango correspondente à endentação, determinando o comprimento da maior diagonal (Figura 12) e, conseqüentemente, os resultados da dureza KNOOP através do cálculo automático feito pelo software da seguinte equação:

$$KHN = \frac{C \cdot c}{d^2}$$

Sendo: KHN= valor de dureza Knoop

C (constante)= 14,230

c = 25 gramas

d= comprimento da maior diagonal da endentação.

FIGURA 10- Microdurômetro acoplado ao computador.

FIGURA 11- Ponta penetradora tipo Knoop.

FIGURA 12- Imagem em maior aumento de uma endentação feita para avaliação da microdureza no bloco de esmalte com erosão.

A média do comprimento da diagonal maior das cinco endentações foi utilizada para excluir blocos com microdureza fora do padrão. Foram desprezados os blocos com um valor médio de microdureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos e, aqueles com desvio-padrão do comprimento das endentações acima de 10% do valor de sua própria média. A média da microdureza de todos os espécimes humanos foi de 356 KHN e os espécimes selecionados apresentaram dureza mínima de 320 KHN e máxima de 391 KHN. Alguns espécimes foram descartados por apresentarem trincas ou por não estarem totalmente paralelos após o polimento. Ao final, foram selecionados 88 blocos de esmalte humano, sendo descartados um total de 32 blocos.

4.5. Proteção de metade dos espécimes

O esmalte de unha (Colorama Maybelline – Ultra duração, Cosbra Cosméticos Ltda, São Paulo, SP) foi utilizado para proteger uma área dos blocos necessária para realização dos testes de perfilometria. Uma fita adesiva (Scotch, 3M do Brasil Ltda, Sumaré, SP) foi posicionada na diagonal da superfície do espécime, promovendo a proteção de uma porção e expondo a área a ser pintada. Em algumas ocasiões a planificação e polimento não abrangiam toda a superfície, nestes casos foi necessário adaptar a proteção, colocando a fita adesiva em uma reta paralela a um dos lados da superfície, englobando metade da área polida.

4.6. Seleção dos voluntários

Onze voluntários adultos jovens, 9 do gênero feminino e 2 do gênero masculino, com idade entre 21 e 32 anos (média de 27 anos) foram selecionados para participar da pesquisa.

Os critérios de exclusão considerados na anamnese para composição da amostra foram: fumar; apresentar lesões de cárie ativa no estágio de cavitação; apresentar desgaste dentário acentuado; ter recebido aplicação tópica de flúor gel pelo menos duas semanas antes do estudo; ter utilizado nos últimos 2 meses ou utilizar medicamentos que afetam o fluxo salivar (antidepressivos, narcóticos, diuréticos ou anti-histamínicos); ter sofrido irradiação ou quimioterapia; ter atividades aquáticas (cloro presente em piscinas proporcionam ao indivíduo contato com água de baixo pH) ou trabalhar em ambientes poluídos por compostos de baixo pH (Fábricas de baterias); apresentar doenças sistêmicas tais como as auto-imunes,

xerostomia, menopausa, diabetes tipo I, má nutrição, problemas gastro-esofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito; apresentar fluxo salivar estimulado menor que 1 mL/min e não estimulado menor que 0,1 mL/min.

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, segundo a resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da saúde, DF) os voluntários selecionados tomaram ciência do experimento através da “CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA” (Anexo 2) e assinaram o “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO” (Anexo 3).

Os voluntários foram submetidos a um exame clínico, realizado com espátula de madeira sob luz natural, para detecção de cárie ativa em estágio de cavitação e/ou desgaste dentário, e a testes salivares. Todas as coletas de saliva foram realizadas ao final da tarde, tendo sido orientado aos voluntários que ficassem em jejum nas duas horas que antecederem a coleta.

4.6.1. Avaliação do fluxo salivar não estimulado

A avaliação do fluxo salivar não estimulado foi realizada individualmente. O voluntário foi acomodado em uma cadeira localizada em lugar tranquilo sem estímulos olfativos ou visuais onde permaneceu em repouso com a cabeça levemente inclinada para baixo. Durante 15 minutos a saliva foi dispensada passivamente em béquer de 100 mL (Pyrex, USA) previamente pesado em uma balança eletrônica de precisão (AND, GR-202, A&D Company Limited C.E., Japan). Após a coleta o peso do recipiente foi novamente aferido. Considerando-se a densidade da saliva como 1, dividiu-se a diferença entre os pesos inicial (béquer) e

final (béquer + saliva) pelo tempo de 15 minutos, resultando na determinação do volume e velocidade de liberação da saliva (mL/min – fluxo normal > 0,1mL/min).

4.6.2. Avaliação do fluxo salivar estimulado

Os voluntários mascaram um pedaço de aproximadamente 1 cm de um tubo de látex, nº 203 (Auriflex, São Roque, SP), previamente esterelizado, para estimular a produção de saliva. A saliva produzida durante os primeiros 30 segundos foi deglutida, sendo subsequente coletada por 5 minutos em um béquer de 100 mL previamente pesado. Os voluntários foram instruídos a movimentar constantemente o tubo de látex na cavidade bucal.

A saliva coletada no béquer foi pesada de forma semelhante à saliva não estimulada, o fluxo salivar estimulado foi expresso em mililitros por minuto (mL/min). Foi considerado normal um fluxo maior que 1 mL/min.

4.7. Preparo do dispositivo intrabucal palatino

Moldes do arco superior dos voluntários foram obtidos com alginato (Ezact Kromm, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ) e vazados em gesso pedra (Durant, Chaves S.A. Mineração e Indústria, Fortaleza, CE). Dois dispositivos intrabucais palatinos, por voluntário, um para cada período, foram confeccionados em resina acrílica (Jet, Artigos Odontológicos Clássicos, São Paulo, SP). Cada dispositivo continha 2 fileiras verticais com 2 cavidades de 5 x 5 x 4 mm, uma no lado direito e outra no esquerdo, onde cada uma delas serviu para fixação de 1 espécime, com cera pegajosa. Os dispositivos foram polidos mecanicamente no torno (NEVONI, São Paulo/Ref: 344)

com pedra-pomes (SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil/Ref: 05505) e quimicamente, pela imersão, por 5 segundos, em monômero de resina acrílica aquecido.

Primeiramente foi feita uma seleção planejada dos espécimes conforme os valores de microdureza inicial de forma que, em todos os grupos e voluntários houvessem espécimes com microdureza mais baixa e mais alta. Posteriormente houve uma distribuição aleatória, utilizando-se o programa Microsoft Excel. Os 88 espécimes de esmalte humano foram separadamente ordenados no sentido crescente de microdureza e utilizando a função “ALEATÓRIO” da categoria matemática, 8 sorteios aleatórios foram realizados para dividir os espécimes entre os 11 voluntários. Em seguida, os voluntários foram ordenados no sentido crescente de microdureza e 22 sorteios aleatórios dos 4 grupos experimentais foram realizados. No total, para cada voluntário foram destinados 4 espécimes, para cada período experimental.

A localização das fileiras verticais correspondentes aos grupos experimentais foi planejada de forma que os grupos estivessem igualmente distribuídos em todas as 2 fileiras do aparelho nos diferentes voluntários.

Os 22 espécimes do grupo I foram fixados no dispositivo intrabucal com cera pegajosa Kota, sendo cuidadosamente adaptados, ao nível da superfície de resina do aparelho, evitando-se fendas laterais entre os blocos e as cavidades que possibilitariam o indesejável acúmulo de biofilme dentário (Figura 13). Para que o biofilme dentário fosse formado sobre os blocos de esmalte, os 66 espécimes dos grupos II, III e IV foram fixados com cera pegajosa 1mm abaixo do nível do dispositivo palatino e recobertos por uma tela plástica fixada na superfície do acrílico para proteger os espécimes de distúrbios mecânicos (Figuras 13 e 14).

FIGURA 13- Dispositivo intrabucal palatino contendo os espécimes dos grupos I e II.

FIGURA 14- Dispositivo intrabucal palatino contendo os espécimes dos grupos III e IV.

4.8. Procedimentos intrabucais

Os voluntários foram aleatoriamente divididos em 2 grupos. Cada grupo iniciou o uso do dispositivo intrabucal em diferentes períodos experimentais por 14 dias. Decorrido um dos períodos, após um intervalo de 7 dias, os indivíduos utilizaram outro dispositivo por mais 14 dias, correspondendo ao outro período experimental (Figura 1).

Cada voluntário recebeu uma pasta com uma lista de instruções e um formulário para relatório; 28 garrafas de 600 mL de Coca-Cola®; uma maleta plástica contendo (Figura 15 a): um estojo plástico para guardar o dispositivo intrabucal; uma bisnaga de dentífrico a base de sílica (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio LTDA., Osasco-SP) com monofluorofosfato de sódio-MFP, 1450 ppm; um copo de vidro tipo americano (Nadir Figueiredo do Brasil LTDA.) para imersões com volume padronizado da bebida (200mL- volume exato da demarcação superior do copo);

Avaliação in situ do efeito individual e associado dos desafios erosivo e cariogênico em dentes humanos

duas “bóias” de E.V.A. para imersão exclusiva do grupo III e proteção do grupo IV; um frasco de solução de sacarose 20% para ser gotejada nos espécimes dos grupos III e IV; uma escova de dentes para ser utilizada durante o experimento (ORAL-B Indicator Plus- Gillette do Brasil Ltda.); além de porções de gaze (Cremer S.A. Ind. Brás., Blumenau, SC) (Figura 15 b). A gaze, o dentifrício e a sacarose foram repostos quando necessário. As instruções escritas foram reforçadas verbalmente.

FIGURA 15- Kit entregue a cada voluntário para a realização da etapa experimental.

O aparelho foi instalado um dia antes do início da primeira fase experimental, à noite, após a última higiene, para permitir a formação da película adquirida.

Os voluntários foram orientados a utilizar o dispositivo intrabucal continuamente (24 h/dia) exceto durante as refeições (3 refeições diárias de no máximo 1h), sendo que nestes períodos os dispositivos foram mantidos no estojo

plástico, envolto em gaze umedecida em água de abastecimento (Bauru – 0,7 ppm F). Foi permitido aos voluntários realizar a higiene bucal normalmente, após as refeições, sem o dispositivo, e este pôde ser limpo com escova dentária, dentífrico e água, sendo terminantemente proibida a escovação da área que continha os espécimes. Os voluntários também foram orientados a não ingerirem bebidas, exceto água (com a retirada do dispositivo), durante o experimento, a não ser nos horários das refeições quando não estavam utilizando o dispositivo.

Durante o primeiro período experimental (grupos I e II), os voluntários foram orientados a, três vezes ao dia, 5 minutos após cada refeição e posterior higiene bucal, imergirem completamente o dispositivo palatino em um copo contendo 200 mL de refrigerante a base de cola (Coca-cola[®]), pH 2,5 por 5 minutos. No segundo período experimental (grupos III e IV), apenas a metade do aparelho correspondente ao grupo III (grupo identificado com a cor vermelha) foi imersa conforme descrito no primeiro período experimental. Para a correta execução deste procedimento, foi confeccionado um dispositivo próprio para este fim (Figura 16 a). Dois discos de E.V.A. (um vermelho e um azul) de 6 cm de diâmetro foram cortados e colados, confeccionando-se uma “bóia” que após a realização de um corte em sua porção central, permitia o encaixe do dispositivo palatino (Figura 16 b) que quando imerso na bebida, expunha os espécimes do grupo III à ação da bebida e protegia os espécimes do grupo IV, pois estes ficavam longe do contato com o refrigerante utilizado (Figura 16). Esta “bóia” possuía um lado vermelho e um lado azul, pois como os espécimes do grupo III foram identificados com cera vermelha e os espécimes do grupo IV com cera azul, o encaixe do dispositivo deveria seguir a correspondência de suas cores com as cores da “boia”, evitando-se a confusão dos

voluntários e a imersão equivocada dos lados, visto que estes foram orientados a sempre imergirem o lado vermelho (grupo III) (Figura 16).

FIGURA 16- Imersão dos espécimes do grupo III. A) Boia e dispositivo palatino do segundo período; b) Dispositivo acoplado à bóia para imersão, c) conjunto flutuando sobre a bebida; d) visão aproximada mostrando que somente os espécimes do grupo III ficam imersos na bebida e os espécimes do grupo IV ficam totalmente protegidos de sua ação.

Além disso, 8 vezes ao dia, os voluntários gotejaram uma solução de sacarose a 20% fresca (trocada a cada 2 dias) sobre todos os blocos (GIII e GIV), com o intervalo mínimo de 1 hora entre cada gotejamento. Para evitar que os voluntários falhassem no número diário de gotejamentos e intervalo entre cada um

deles, cada frasco de sacarose continha etiquetas com horários que permitiam a marcação exata pelos voluntários dos gotejamentos realizados (Figura 17 e Anexo 5). A cada dia, foi utilizada uma nova garrafa de 600 mL da bebida utilizada, mantida em temperatura ambiente.

FIGURA 17- Frasco de solução de sacarose 20% para gotejamento nos espécimes dos grupos III e IV.

Não foi exigido dos voluntários horários rígidos para a realização das refeições e posterior imersão, sendo permitida uma variação, desde que fossem feitos intervalos mínimos de 2 horas entre elas.

Após a finalização de cada período os aparelhos foram identificados como será descrito adiante neste capítulo. O biofilme dentário formado foi cuidadosamente removido para ser utilizado na leitura de flúor e o esmalte de unha, responsável pela proteção de metade da área dos blocos, foi retirado com o auxílio da ponta de um Lê

cron, levantando delicadamente a película do esmalte pelos vértices do espécime, para não danificar a região experimental.

4.9. Avaliação da microdureza superficial final

Ao final do experimento, foi realizada a microdureza superficial dos espécimes utilizando o mesmo microdurômetro com as mesmas especificações (25g por 5s) (Figuras 10 e 11).

Na área submetida aos grupos experimentais foram realizadas 5 endentações, com distância aleatória entre elas, englobando toda a superfície do espécime. A média das endentações (microdureza final) foi utilizada para avaliar a porcentagem de perda de microdureza de superfície (%PDS) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%PDS = \frac{\text{microdureza inicial} - \text{microdureza final} \times 100}{\text{microdureza inicial}}$$

4.10. Avaliação do desgaste

O desgaste da superfície de esmalte foi avaliado a partir de um Rugosímetro Hommel Tester T 1000 (Hommelwerke, GmbH, Alte Tuttinger Strebe 20.D-7730 VS-Schwenningen) (Figura 18), com uma ponta apalpadora esférica (Figura 19), que percorre a superfície, acoplada a uma unidade que tem como função processar e interagir as informações quantitativamente, fornecendo os resultados.

FIGURA 18- Rugosímetro. **FIGURA 19-** Ponta apalpadora realizando a leitura de desgaste.

Para este estudo, o rugosímetro foi conectado a um microcomputador que processava e armazenava todas as informações pertinentes aos ensaios. Com o auxílio de um software específico do equipamento (Turbo Datawin-NT Version 1.34, Copyright© 2001), além dos dados específicos de rugosidade, foram obtidos também os perfis das superfícies testadas, sendo estes importantes para a ilustração e quantificação do desgaste. O perfil traçado pelo rugosímetro percorreu a superfície dos espécimes passando por áreas de esmalte hígido (protegido) e afetado, e como o esmalte polido não tratado (protegido – área de referência) se assemelhava muito a uma linha reta, tornava-se fácil a identificação da região submetida aos grupos experimentais (Figuras 20 e 21).

FIGURA 20- Ilustração esquemática mostrando a quantificação do desgaste pelo Rugosímetro.

FIGURA 21- Ilustração esquemática mostrando o desgaste dos espécimes testados. (A) início da leitura feita pelo rugosímetro, (B) final da leitura feita pelo rugosímetro e (d) desgaste ocasionado.

Assim sendo, após a determinação do perfil, a medida do desgaste foi obtida pela distância em micrometros entre a linha média do gráfico correspondente á área protegida do espécime (superfície de referência) e o pico de desgaste (Figura 21).

Para cada espécime foram feitas cinco medições em diferentes áreas da interface entre esmalte hígido e desgastado.

4.11. Leitura do teor de flúor do biofilme

A tela que recobria os espécimes foi cortada com tesoura e removida (Figuras 22a e 22 b). O biofilme foi coletado com auxílio de espátula plástica Jon (Jon - Com. de produtos odontológicos Ltda., São Paulo – SP, Brasil), pesado em balança de precisão Mettler Toledo (modelo AT 261, Delta Range, Suíça), e armazenado em tubos para microcentrifuga previamente pesados, com aproximadamente 10 mg de biofilme por tubo. A seguir, foi adicionado HCl 0,5 M, na proporção de 0,5 mL/10 mg de biofilme (peso úmido). O conjunto foi homogeneizado em aparelho agitador de tubos (modelo 251, Fanem, São Paulo, Brasil) e, em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação constante (mesa agitadora orbital plana – Nova Técnica, modelo NT 145, Piracicaba, São Paulo, Brasil), durante 3h à temperatura ambiente. Após este procedimento, um mesmo volume de TISAB II (tampão de ajuste de força iônica total) foi adicionado ao tubo e centrifugado por 1min a 11000 g (centrífuga modelo A14, Jovan S.A., Herblain, França). O sobrenadante foi coletado para análise da concentração de flúor.

O flúor foi analisado com o eletrodo íon específico combinado Orion (modelo 96-09, Orion, MA, EUA) (Figura 23) e um analisador de íons Orion (modelo EA 940, Orion). O conjunto foi calibrado utilizando os padrões de concentração de flúor de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 ppm (Anexo 6), obtidos por diluição seriada de um estoque de 100 ppm de flúor (Orion).

FIGURA 22- Remoção do biofilme formado no dispositivo palatino.

FIGURA 23- Eletrodo específico para leitura de Flúor.

Para a análise das amostras foram utilizados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de TISAB II e sempre que possível, as leituras foram feitas em duplicata. As leituras foram realizadas em mV, sendo transformadas em $\mu\text{g F / g}$ por meio de planilha gerida no programa Microsoft Excel. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.12. Análise estatística

Foi aplicada Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas ($p < 0,05$) para cada uma das variáveis (%PDS, desgaste e concentração de flúor). O teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$) testou cada fator individualmente dentro de cada variável. O programa estatístico utilizado foi o SAS System 6.11 Software.

FEB USP

Se queres vencer na vida,
consulta três velhos.

Provérbio Chinês

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1. Quantidade de biofilme dentário coletado e sua concentração de flúor

A Tabela 1 apresenta o peso úmido do biofilme dentário de cada voluntário nos diferentes grupos.

Observou-se uma grande variação no peso de biofilme entre os voluntários, mas o teste ANOVA e teste de Tukey mostraram não haver diferença estatisticamente significativa na quantidade de biofilme formado entre os grupos ($p < 0,05$).

TABELA 1 – Peso úmido total (mg) do biofilme dentário de acordo com o grupo e voluntário.

Voluntário	GRUPO					
	GII		GIII		GIV	
	1	2	1	2	1	2
1	36,72	34,00	74,21	83,55	72,50	59,92
2	7,43	31,99	78,73	96,54	90,33	96,75
3	30,38	27,70	111,61	115,61	105,58	95,58
4	61,21	29,78	39,76	27,10	58,35	49,43
5	20,70	36,91	2,52	27,70	25,52	21,80
6	15,33	38,62	29,46	22,89	0,60	24,97
7	21,61	46,04	12,66	21,04	45,72	22,11
8	22,93	41,06	53,30	64,00	52,40	44,00
9	47,42	54,10	71,47	91,58	29,44	32,49
10	16,94	12,29	43,84	5,98	7,88	20,30
11	16,02	31,74	44,90	38,80	44,00	40,30
média±dp*	30,95 ± 10,49^a		52,60 ± 33,38^a		48,38 ± 28,28^a	

*Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à concentração de flúor no biofilme dentário (Tabela 2 e Figura 24), o teste ANOVA revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$). O Teste de Tukey mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, exceto entre os grupos III e IV.

TABELA 2 – Concentrações de flúor ($\mu\text{g} / \text{g}$) no biofilme dentário dos diferentes grupos.

[F] ($\mu\text{g} / \text{g}$)	GRUPO		
	GII	GIII	GIV
Média*	27,91 ^a	1,82 ^b	3,39 ^b
dp	19,81	0,51	1,13

*Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Figura 24 – Concentrações de flúor ($\mu\text{g} / \text{g}$) no biofilme dentário dos diferentes grupos.

5.2- Microdureza

Cada grupo experimental foi representado por dois espécimes por voluntário. A porcentagem de perda de microdureza dos diferentes grupos, apresentada na Tabela 3 e na Figura 25 foi obtida a partir da média da perda de cada um deles.

Os resultados da Análise de Variância de medidas repetidas revelaram haver diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O teste de comparação de médias

de Tukey testou cada grupo individualmente, mostrando haver diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos ($p < 0,05$), exceto entre os grupos I e IV.

TABELA 3- Perda média de microdureza superficial e desvio padrão nos espécimes de esmalte para os grupos experimentais.

Grupos	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
Voluntário	PDS (%) $\pm$ dP	PDS (%) $\pm$ dP	PDS (%) $\pm$ dP	PDS (%) $\pm$ dP
1	83,75 $\pm$ 1,27	9,62 $\pm$ 7,09	69,28 $\pm$ 1,05	87,56 $\pm$ 2,14
2	84,23 $\pm$ 1,97	5,02 $\pm$ 4,26	63,43 $\pm$ 1,71	89,30 $\pm$ 2,23
3	88,55 $\pm$ 1,66	20,14 $\pm$ 2,85	69,24 $\pm$ 3,65	85,50 $\pm$ 3,27
4	88,64 $\pm$ 0,67	17,05 $\pm$ 1,09	69,58 $\pm$ 2,71	82,52 $\pm$ 4,71
5	90,19 $\pm$ 0,87	13,46 $\pm$ 9,87	68,25 $\pm$ 0,11	86,36 $\pm$ 7,09
6	81,46 $\pm$ 2,06	17,27 $\pm$ 1,62	70,56 $\pm$ 5,08	79,27 $\pm$ 0,67
7	82,46 $\pm$ 0,04	15,11 $\pm$ 2,86	67,63 $\pm$ 3,56	91,47 $\pm$ 0,18
8	90,29 $\pm$ 0,59	14,45 $\pm$ 2,72	68,81 $\pm$ 2,22	90,02 $\pm$ 1,08
9	88,39 $\pm$ 4,19	12,87 $\pm$ 4,34	69,72 $\pm$ 3,66	77,76 $\pm$ 2,73
10	91,32 $\pm$ 4,00	9,16 $\pm$ 0,36	70,70 $\pm$ 3,22	89,57 $\pm$ 0,18
11	92,66 $\pm$ 2,40	14,06 $\pm$ 1,73	70,38 $\pm$ 2,72	88,00 $\pm$ 4,01
média $\pm$ dp*	87,45 $\pm$ 3,82 ^a	13,47 $\pm$ 4,25 ^b	68,87 $\pm$ 2,04 ^c	86,12 $\pm$ 4,49 ^a

PDS = média da perda de microdureza superficial

*Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 25 – Média da % perda de dureza superficial dos diferentes grupos.

5.3- Desgaste

Antes da aferição do desgaste dos espécimes dos diferentes grupos, foi feita uma análise visual do aspecto final destes. Os espécimes do grupo I, ao contrário de todos os demais, apresentavam na área exposta, um nítido desgaste com perda de brilho e polimento superficial e aparente aumento de rugosidade. Os espécimes do grupo II tinham um aspecto idêntico ao apresentado antes do período experimental, com total manutenção do brilho e polimento superficial e sem nenhuma desmineralização aparente na forma de mancha branca. Os blocos dos grupos III e IV tiveram um aspecto semelhante entre si, não apresentando nenhum desgaste aparente, mantendo totalmente o brilho e polimento superficial, mas uma característica marcante: mostravam uma nítida e bem delimitada lesão desmineralizada na forma de mancha branca (Figura 26).

FIGURA 26- Aspecto macroscópico dos espécimes dos diferentes grupos experimentais. Note o desgaste do espécime do grupo I.

Assim como para a microdureza, para os testes de desgaste cada grupo experimental foi representado por dois espécimes por voluntário. A média de desgaste (μm) dos diferentes grupos, apresentada na Tabela 4 e na Figura 27 foi obtida a partir da média da perda de cada um deles.

Os resultados da Análise de Variância de medidas repetidas revelaram haver diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O teste de comparação de médias de Tukey testou cada grupo individualmente, mostrando haver diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e todos os demais grupos, não havendo diferença entre os grupos II, III e IV ($p < 0,05$).

TABELA 4- Desgaste médio (μm) e desvio padrão nos espécimes de esmalte para os grupos experimentais.

<i>Grupos</i>	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
<i>Voluntário</i>	$\bar{X} (\mu\text{m}) \pm \text{dP}$	$\bar{X} (\mu\text{m}) \pm \text{dP}$	$\bar{X} (\mu\text{m}) \pm \text{dP}$	$\bar{X} (\mu\text{m}) \pm \text{dP}$
1	$2,369 \pm 1,23$	$0,127 \pm 0,08$	$0,444 \pm 0,27$	$0,649 \pm 0,09$
2	$2,375 \pm 0,81$	$0,100 \pm 0,01$	$0,363 \pm 0,04$	$0,475 \pm 0,05$
3	$3,403 \pm 0,99$	$0,129 \pm 0,00$	$0,603 \pm 0,57$	$0,760 \pm 0,16$
4	$5,253 \pm 0,76$	$0,118 \pm 0,02$	$0,195 \pm 0,01$	$0,233 \pm 0,05$
5	$5,553 \pm 2,11$	$0,117 \pm 0,05$	$0,181 \pm 0,02$	$0,290 \pm 0,11$
6	$7,631 \pm 0,72$	$0,173 \pm 0,03$	$0,236 \pm 0,05$	$0,209 \pm 0,10$
7	$3,342 \pm 0,62$	$0,111 \pm 0,00$	$0,407 \pm 0,00$	$0,309 \pm 0,10$
8	$6,494 \pm 0,76$	$0,108 \pm 0,00$	$0,357 \pm 0,03$	$0,319 \pm 0,07$
9	$6,571 \pm 0,24$	$0,200 \pm 0,12$	$0,371 \pm 0,08$	$0,440 \pm 0,06$
10	$4,326 \pm 0,00$	$0,112 \pm 0,02$	$0,229 \pm 0,01$	$0,310 \pm 0,03$
11	$5,716 \pm 1,79$	$0,201 \pm 0,02$	$0,364 \pm 0,02$	$0,573 \pm 0,10$
média $\pm$ dp*	$4,821 \pm 1,780^a$	$0,136 \pm 0,037^b$	$0,341 \pm 1,124^b$	$0,415 \pm 1,180^b$

$\bar{X}$ = média de desgaste entre os espécimes dos grupos experimentais

*Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 27 – Média de desgaste (μm) dos diferentes grupos.

FED USP

A maior recompensa do nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele, mas
aquilo em que ele nos transforma.

John Ruskin

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A fim de tornar este capítulo didático serão discutidos a metodologia e os resultados separadamente.

6.1. Metodologia

Para o estudo da cárie e da erosão dentária, inumeros modelos já foram propostos, no entanto os mais utilizados são os modelos *in vitro* e *in situ*. Os modelos *in vitro* são muito importantes para determinar as interações químicas que ocorrem na cárie e na erosão dentária^{5, 11, 18, 34, 37, 44, 45, 62, 69, 79, 80, 88, 91, 96, 102, 107, 126, 133, 138, 140, 151, 158}, mas não são capazes de simular fielmente os vários fatores que agem na boca, tais como a saliva e a película adquirida.

Diante destas constatações os modelos *in situ*, idealizados por KOLOURIDES et al.⁷⁵ em 1974, para estudos dos fenômenos que envolvem o processo da cárie dentária, foram adaptados para o estudo também da erosão, apresentando grandes vantagens em relação aos estudos laboratoriais. Os modelos *in situ* envolvem o uso de dispositivos, os quais criam condições definidas na cavidade bucal humana, por simular processos comuns da cavidade bucal, servindo de ponte entre a situação clínica natural descontrolada e a situação laboratorial altamente controlada¹⁵⁹.

FEATHERSTONE; ZERO³⁶ (1992) e ZERO¹⁵⁹ (1995) citam as principais vantagens e desvantagens dos estudos *in situ*. Relatam como vantagens: a) realização na cavidade bucal humana, diferentemente dos estudos *in vitro* ou daqueles realizados em animais; b) facilidade no controle de variáveis experimentais e a flexibilidade do desenho experimental, difíceis de serem obtidos nos trabalhos clínicos; c) permitem a integração de várias técnicas de avaliação das ciências básicas, aumentando a sensibilidade e a validade científica da metodologia; d) seu curto tempo operacional supera muitos problemas éticos associados aos estudos envolvendo seres humanos e, e) há geralmente um custo menor comparado aos estudos clínicos longitudinais. Há, porém, desvantagens: a) limitação do número de participantes devido à própria natureza do estudo *in situ*; b) alta dependência da colaboração dos participantes, c) a condução de um estudo *in situ* de alta qualidade é muito exigente, requerendo grande perícia clínica e analítica e d) a localização dos espécimes e sua relação anatômica com um dente normal geralmente não são reproduzidas^{71, 72}.

HALL et al.⁴⁶ comprovaram que os estudos *in situ* sobre erosão dentária promovem diferentes resultados quando comparados ao *in vitro* utilizando saliva e película adquirida no experimento. Testando a mesma bebida em desafios erosivos em um mesmo intervalo de tempo, os espécimes do modelo *in situ* apresentaram desgaste significativamente menor quando comparados aos espécimes do modelo *in vitro*.

Para realização do presente estudo os voluntários foram selecionados a partir de critérios descritos por WEST et al.¹⁵³ (1998) e ZERO¹⁵⁹ (1995), associando aspectos de ambos, para que fosse possível em um mesmo estudo respeitar os critérios de exclusão para cárie e erosão dentária. Não existe um consenso universal

quanto à necessidade de padronização dos voluntários, no entanto segundo ZERO¹⁵⁹ (1995), estes devem ser selecionados para permitir uma correta interpretação dos resultados. Uma das maiores dificuldades relatadas dos modelos *in situ* é a colaboração e seguimento do protocolo pelos voluntários¹⁵⁹. Com a finalidade de minimizar esta limitação, os voluntários selecionados para este estudo eram alunos de graduação e pós-graduação do curso de odontologia, para que se buscasse uma maior responsabilidade e comprometimento com o estudo.

Além disso, para garantir a execução correta do experimento pelos voluntários, foi-lhes entregue um formulário para relato diário dos horários de imersão no refrigerante e gotejamento de sacarose, além dos horários de retirada do aparelho para alimentação (Anexo 4). Apesar de todos esses cuidados, dois voluntários iniciaram o estudo, mas precisaram viajar durante o período experimental e foram eliminados; um voluntário foi excluído por acusar infecção das tonsilas palatinas no segundo dia de uso do dispositivo palatino, e mais dois voluntários foram excluídos por terem executado apenas o primeiro período experimental. Ao final do estudo restaram 11 voluntários dos 16 que iniciaram.

Não existem regras rígidas quanto ao número de voluntários para um estudo *in situ*¹⁵⁹. Geralmente a quantidade varia entre 5 e 40 participantes, sendo a análise estatística a responsável pela confirmação do número correto da amostra¹⁵⁹. Com base em outros trabalhos de cárie e erosão^{1, 2, 20, 21, 22, 23, 54, 73, 84, 127, 128, 129, 153}, nos quais foi utilizado modelo semelhante, adotou-se uma amostra de 16 indivíduos considerando-se que, principalmente em função do longo tempo do período experimental, desistências e falhas na execução do protocolo poderiam acontecer, de forma que se ao final do estudo restassem 10 voluntários, ter-se-ia um número considerado ideal. No entanto, os resultados deste trabalho foram obtidos a partir de

11 voluntários, ultrapassando o valor estabelecido como ideal, tornando grande a confiabilidade dos resultados³⁹.

Há uma grande variabilidade nos tipos de dispositivos para a realização de estudos *in situ*, bem como na localização dos espécimes nestes dispositivos. Estes fatores influenciam o acúmulo de biofilme e seu potencial cariogênico, além da ação da saliva e da dieta, resultando em uma resposta diferente do processo de des e remineralização, tanto relacionados à cárie quanto à erosão dentária¹⁰⁰. Neste estudo foram confeccionados dispositivos intrabuciais palatinos, como usado em outros trabalhos^{2, 14, 20, 21, 22, 23, 74, 123, 124, 127, 128, 129, 147, 148}, com o cuidado de que todos os grupos estivessem igualmente distribuídos em ambos os lados do aparelho, para que a variável posição no dispositivo não interferisse nos resultados. Outros dispositivos relatados são a prótese inferior parcial^{75, 77}, aparelho removível inferior^{29, 71} e a fixação, na face vestibular do primeiro molar permanente, de uma fatia de esmalte contendo um anel de *nylon* para acúmulo de biofilme^{136, 155}.

O tipo de dispositivo intrabucal também pôde resultar em diferenças no acesso da saliva e formação da película adquirida. A dinâmica salivar na cavidade bucal é bastante complexa. AMAECHI; HIGHAM⁴ avaliaram a capacidade de remineralização da saliva no esmalte submetido à erosão, localizado em diferentes locais da boca, e encontraram que os espécimes posicionados por palatino sofreram menor remineralização do que os espécimes por lingual.

NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; RIESSEN¹¹⁷ testaram a película adquirida proveniente de diferentes glândulas salivares com o objetivo de avaliar se possuíam a mesma capacidade protetora contra a desmineralização. Os resultados mostraram que a película oriunda das glândulas sublingual e submandibular promoveu uma proteção de 100% do esmalte contra a erosão, além disso,

comprovaram que as principais responsáveis por esta propriedade eram as mucinas. Talvez esta característica salivar justifique o motivo pelo qual se relata uma pequena incidência de erosão nos incisivos inferiores. A película da glândula parótida promoveu uma proteção de apenas 20%, justificada pela sua pequena quantidade de mucina. Este aspecto também pode justificar a maior incidência de erosão nos incisivos superiores. Os dados apresentados^{4, 117} suscitam a hipótese de que a saliva da glândula parótida apresenta maior ação sobre os dentes superiores e as glândulas sublingual e submandibular sobre os dentes inferiores. Baseado nisso, pode-se constatar que o presente modelo *in situ* com placa palatina esteve sobre uma ação maior da saliva da glândula parótida, o que pressupõe uma menor capacidade protetora. Desta forma, se o aparelho utilizado fosse posicionado na arcada inferior os resultados poderiam ser diferentes. No entanto, tanto para a erosão como para a cárie dentária, o intuito do trabalho foi simular uma condição de alto risco.

A saliva e a película adquirida são os principais aspectos de um modelo *in situ*. AMAECHI et al.⁵ afirmam que 1 h é o tempo necessário para formação da película. FUSHIDA; CURY³⁹ instalaram os aparelhos nos voluntários 2 horas antes do início do experimento, para formação da película adquirida, contudo, para facilitar o horário de instalação pelos voluntários deste trabalho, os indivíduos foram orientados a dormirem com o aparelho e na manhã seguinte iniciar o experimento, resultando um período de aproximadamente 8 horas. Alguns trabalhos^{4, 50, 115, 117} demonstraram que a maturação da película é importante para que ela exerça ação protetora diante de um ataque erosivo. Esta maturação ocorre em um tempo médio de 24 horas^{4, 50, 115, 117}.

Tendo em vista que o presente estudo não utilizou o tempo apropriado para formação de película adquirida madura, o desgaste obtido nos grupos submetidos à ação da bebida ácida, pode ter sido maior do que o apresentado em outros trabalhos *in situ*, que utilizaram o tempo de 24 horas para sua maturação⁵⁴. Além do mais, HANNING; BALZ⁵⁰ demonstraram que as camadas de película adquirida vão dissolvendo continuamente devido à exposição ácida, mas após 5 minutos de exposição a 1% de ácido cítrico, estas ainda puderam ser detectadas.

Baseados nestes dados presume-se que normalmente nos indivíduos, o tempo promove uma renovação constante da película adquirida, resultando em uma proteção parcial contra os ataques erosivos. O presente estudo foi fiel a esta dinâmica, pois foi utilizado um intervalo mínimo de duas horas para a execução de outro ataque erosivo, possibilitando sua formação, mas não sua maturação.

Segundo NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; RIESSEN¹¹⁷ a película formada *in vitro* em 60 minutos, a partir da saliva das glândulas sublingual e submandibular apresentou uma proteção de 100% contra a erosão, já a película da glândula parótida mesmo após 1 dia de formação *in vitro*, proporcionou apenas 20% de proteção. Ao se misturar as duas salivas, a saliva das glândulas sublingual e submandibular tiveram que competir com a saliva da parótida e o potencial protetor da película diminuiu para 30 a 35%. Os autores concluíram que as mucinas, principais responsáveis pela proteção, na saliva total, não tiveram maior representatividade nas primeiras horas de formação da película adquirida devido à competição com as proteínas salivares das glândulas parótidas. Por outro lado, durante um longo período de incubação, as mucinas poderiam ter maiores oportunidades de aderência à superfície dentária pela degradação progressiva de algumas proteínas da película (maturação).

De qualquer forma neste estudo, os grupos estiveram sujeitos à formação de uma película sobre condições iguais. Assim sendo, a película teve uma ação de proteção igual para todos os grupos e as diferenças entre os grupos ocorreram independentemente disso.

Tanto as pesquisas de cariologia quanto às de erosão, utilizam dentes humanos permanentes ou decíduos e dentes bovinos para obtenção dos espécimes^{69, 91, 105}. As diferenças no desenvolvimento da cárie devido à utilização de diferentes tipos de substratos já estão estabelecidas³⁷. Segundo FEATHERSTONE e MELLBERG³⁷ o esmalte bovino apresenta uma maior porosidade em sua composição, além de um maior grau de solubilidade e a progressão das lesões de cárie ocorre cerca de 3 vezes mais rápida do que no esmalte humano. Já MEURMAN; FRANK¹⁰⁵ estudaram dentes humanos e bovinos, por meio de microscopia eletrônica de varredura e observaram que após a imersão dos dentes em bebida ácida o aspecto da superfície do esmalte humano também era semelhante à superfície do esmalte bovino. RIOS¹²⁷ e RIOS et al.¹²⁸ mostraram que o esmalte humano apresenta uma maior perda de dureza e um menor desgaste em relação ao esmalte bovino quando submetido às condições de erosão. No entanto, independentemente do substrato a ser utilizado e de seus valores absolutos de desgaste e dureza, o que importa neste tipo de estudo é a comparação das variáveis testadas em um mesmo tipo de substrato. Devido à facilidade de obtenção e manipulação de esmalte bovino, este poderia ser utilizado freqüentemente nos modelos *in situ* de erosão e cárie dentária, no entanto, para que se aproximasse o máximo possível dos possíveis resultados de um desafio erosivo e/ou cariogênico sobre a estrutura dentária, optou-se pela utilização de terceiros molares neste trabalho.

Como a proposta deste trabalho não foi estudar as características das bebidas erosivas, tampouco exclusivamente seu papel nos fenômenos erosivos/cariogênicos, optou-se pela utilização de um ácido exógeno, proveniente de uma bebida sabidamente erosiva, que fosse de fácil obtenção e de alto consumo, sobretudo entre a população mais jovem. Inúmeros trabalhos referenciam a bebida a base de cola (Coca-Cola®) como um fluido sabidamente erosivo^{79, 89, 90, 91, 94, 96, 105, 133, 151} e cariogênico^{16, 17, 99, 100}.

As bebidas possuem diferentes potenciais erosivos, devido às características do pH, da capacidade tampão, do tipo de ácido e da concentração de cálcio e fosfato^{34, 45, 79, 89, 137}. Os refrigerantes à base de cola, além de possuírem baixa concentração de cálcio, fosfato e flúor, possuem um dos menores valores de pH, mas em contrapartida, a capacidade tampão é menor quando comparados aos sucos de frutas⁸⁹. O componente ácido de sua formulação é o ácido fosfórico, que possui potencial erosivo, porém menor que o ácido cítrico presente em sucos de frutas¹⁵¹. Todas estas características demonstram claramente o potencial erosivo do refrigerante à base de cola. Da mesma forma, os refrigerantes possuem um grande potencial cariogênico em função de suas altas concentrações de açúcares, principalmente a sacarose^{16, 99, 100}. No entanto, conhecer o ácido e a concentração de sacarose de uma bebida não é suficiente para determinar o desenvolvimento da erosão e da cárie dentária, que ocorrerá diante de um desequilíbrio entre seu consumo e a capacidade protetora do organismo, representada principalmente pela saliva^{66, 89, 114}.

Existem diferenças na literatura na forma de utilização do refrigerante em trabalhos científicos. Os estudos realizados por um grupo de pesquisadores ingleses^{59, 60, 61, 63, 152, 153} adotam a ingestão da bebida ácida por 10 minutos. Porém,

questiona-se o fato da bebida agir sobre os espécimes, mas também sobre os dentes dos voluntários. De certa forma, este questionamento é aceito pelos próprios pesquisadores, pois eles adotam como critério de paralisação do experimento um desgaste maior que 20 μm nos espécimes em estudo, devido ao risco aos dentes dos participantes.

Considerando-se essas informações, optou-se, neste trabalho, pela imersão do aparelho na bebida fora da boca, para garantir maior segurança aos voluntários, o quê também foi realizado por ATTIN et al.⁸ (2001). Sabia-se porém, que esta forma de utilização do refrigerante não seria a mais adequada para simular o que ocorre na cavidade bucal, pois durante a ingestão, há uma diluição da bebida pela saliva e ação do tampão bicarbonato²⁷. Além disso, segundo MILLWARD et al.¹¹⁰, 1997, a bebida ácida gera um aumento do fluxo salivar da glândula parótida, que retorna a níveis normais após 6 minutos e provoca uma queda no pH, abaixo do valor crítico, por aproximadamente 2 minutos.

Apesar de existirem relatos de que não há diferença no comportamento erosivo do refrigerante com ou sem gás⁹⁶, foi utilizada uma nova garrafa de refrigerante a cada dia para garantir que a bebida se mantivesse gaseificada durante o experimento. As garrafas pertenciam ao mesmo lote e foram armazenadas e utilizadas sob temperatura ambiente. AMAESHI; HIGHAM; EDGAR⁵ demonstraram que quanto maior a temperatura da bebida, maior é seu potencial erosivo. Geralmente as pessoas consomem o refrigerante gelado, desta forma a maior temperatura da bebida usada neste estudo, pode ter influenciado na ocorrência de um maior desgaste dos espécimes, que talvez seja menor *in vivo*.

Com relação à frequência diária de imersões do aparelho na bebida ácida, muitos trabalhos o fazem 4 vezes ao dia por 5 minutos^{59, 60, 61, 63, 94, 127, 128, 129, 152, 153}. MEURMAN et al.¹⁰⁹ (1990) demonstraram *in vitro* que o tempo de 5 minutos de imersão do esmalte em bebida a base de cola promoveu uma desmineralização significativa, enquanto o tempo de 1 minuto não causou desmineralização, sendo então o tempo de 5 minutos adotado neste trabalho.

A maioria dos estudos relacionados à erosão foram realizados com períodos experimentais de 7 dias^{94, 127, 128, 129}. Como neste trabalho havia a necessidade de que os períodos experimentais do desafio erosivo e cariogênico fossem os mesmos, constatou-se por meio de testes pilotos que 4 ataques erosivos diários ao longo de 14 dias tornavam a leitura de microdureza muito difícil, em função da grande irregularidade superficial gerada nos espécimes. Desta forma, optou-se por utilizar neste trabalho 3 imersões diárias de 5 minutos ao longo de 14 dias, o que além de permitir uma melhor leitura da perda de dureza ao final do experimento, também facilitou o seguimento do protocolo pelos voluntários, minimizando falhas em sua execução, uma vez que cada imersão estava vinculada às suas 3 refeições diárias.

Uma outra variável dos estudos *in situ* é o tempo de utilização dos dispositivos. Os voluntários deste trabalho usaram por 14 dias, como preconizado por outros autores^{14, 20, 22, 71, 77, 121}, mas os tempos variam de 45 minutos¹⁴⁸ até 45 dias⁷⁴, dependendo do delineamento experimental. Os tempos menores (minutos ou horas) são de pesquisas que empregaram a cobertura do esmalte com biofilme dentário “teste”, obtido de uma colônia de *Streptococcus mutans* produzida em laboratório¹⁴⁸. Desta forma, verificando-se que o tempo de 14 dias para trabalhos de cariologia é bastante aceito e utilizado na literatura, optou-se por este tempo também

para os testes erosivos deste trabalho para que houvesse uma uniformidade de tempo dos desafios cariogênico-erosivos sobre a estrutura dentária.

O acúmulo de biofilme dentário nos espécimes dos grupos II, III e IV foi conseguido pela fixação dos espécimes 1 mm abaixo do nível da resina acrílica e pela cobertura por uma tela plástica, como realizado em outros trabalhos^{2, 20, 21, 22, 101, 123}. A simples fixação dos espécimes 1 mm abaixo do nível da resina acrílica é suficiente para causar desmineralização³⁶ correspondente apenas às áreas com acúmulo parcial de biofilme, resultante de sua remoção por forças abrasivas dos tecidos bucais¹⁵⁹. Cobrindo os espécimes com gaze^{29, 74} ou com tela consegue-se um desafio cariogênico mais uniforme e severo^{36, 159}, compatível com áreas de grande acúmulo de biofilme, como as regiões interproximais ou de fossas e fissuras¹⁵⁹. Optou-se pela tela plástica por ser aparentemente mais higiênica, além da gaze poder atuar como uma superfície adsorvente e permitir a colonização preferencial de algumas bactérias³⁶. Existem outros dispositivos que possibilitam o acúmulo de biofilme dentário, como bandas ortodônticas¹²¹ e o anel de *nylon* fixado em uma fatia de esmalte^{136, 155}.

Além do acúmulo de biofilme, um desafio cariogênico severo foi simulado pela aplicação, com conta-gotas, de solução de sacarose a 20%, oito vezes por dia, como realizado em outros trabalhos^{21, 22, 101, 123, 124}. Embora este esquema não simule o uso regular diário de sacarose, permite que haja um desafio padronizado³⁶. PAES LEME et al.¹²³ (2004), detectaram que um desafio cariogênico provocado por aplicação de solução de sacarose a 20%, oito vezes por dia, mostrou-se mais efetivo para a formação de lesões desmineralizadas que aplicações feitas quatro vezes por dia. Além disso, diminuem as concentrações de flúor e cálcio e aumentam a concentração de polissacarídeos insolúveis no biofilme dentário. AIRES et al.²

(2006) verificaram que quanto maior a concentração de sacarose, menores serão o pH e as concentrações de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme, com maior perda de microdureza superficial e área de perda mineral do esmalte. A concentração mínima de sacarose para a formação de um biofilme dentário cariogênico foi de 5%, a qual provocou um efeito cariogênico semelhante às concentrações de 10 e 20%, quando aplicada oito vezes por dia.

Não existe uma padronização quanto a utilização ou não pelos voluntários de dentifrício fluoretado nos estudos *in situ* de erosão ou de cárie dentária^{2, 14, 22, 94, 121, 127, 128, 129, 147, 148, 155}. Para simular uma situação mais próxima da realidade, os voluntários deste estudo escovaram seus dentes com dentifrício fluoretado três vezes ao dia, sem o dispositivo intrabucal palatino^{123, 124}. O dentifrício adotado continha 1450 ppm de flúor (MFP) e abrasivo à base de sílica, existente no mercado nacional.

Várias metodologias podem ser aplicadas para avaliar quantitativamente a ação de produtos ácidos provenientes de microrganismos ou não sobre o esmalte dentário. As metodologias comumente utilizadas são: microrradiografia, permeabilidade ao iodo, perfilometria e microdureza. Atualmente tem-se preconizado também a microendentação, realizada por meio de microscópio de força atômica e o método ultra-sônico^{35, 95}.

A microdureza avalia a dureza superficial de um espécime, que é diretamente relacionada ao seu conteúdo mineral¹⁶¹. Para possibilitar sua realização, o espécime deve apresentar uma superfície plana e lisa, que permita a leitura correta da marca realizada pela ponta de diamante, pois através da medida da marca, utilizando-se equações matemáticas chega-se, ao valor da dureza.

Muitos autores usaram a microdureza para avaliar a desmineralização provocada em substrato dentário^{39, 42, 73, 84, 88, 90}. No entanto, quando se pretende estudar fenômenos diferentes, como cárie e erosão dentária, a dureza pode levar à interpretações incorretas. Isso pode acontecer, pois como se sabe, a desmineralização causada pela cárie é subsuperficial^{19, 116, 150} e a desmineralização erosiva é superficial^{9, 86, 94, 128, 129} e embora ambas possam apresentar uma mesma perda de dureza lida pelo método da microdureza superficial, certamente o desgaste da lesão de erosão será maior e este não será detectado pelo microdurômetro. Desta forma, para evitar que as limitações metodológicas interferissem nos resultados do trabalho e em sua interpretação, optou-se pela utilização de dois métodos: a microdureza e a perfilometria.

Neste trabalho, para a mensuração do desgaste foi utilizada a perfilometria por meio de um Rugosímetro, equipamento que através de uma pequena ponta apalpadora percorre toda a superfície a ser testada, traçando o seu perfil^{57, 58, 94, 127, 128, 129}. Em função de sua rugosidade natural, o perfil do esmalte humano hígido apresenta-se com um desenho extremamente variável e irregular e caso os testes *in situ* fossem feitos sobre esta superfície, dificilmente o perfil após o tratamento permitiria a visualização da perda estrutural resultante dos desafios ácidos. Assim sendo, após a regularização da superfície através do polimento, o perfil verificado teve o aspecto de uma linha reta, ou seja, qualquer variação encontrada após as etapas experimentais seria inevitavelmente resultado do tratamento realizado.

Esta evidênciação do desgaste resultante do tratamento executado foi quantificada em função da forma como foram preparados os blocos, pois foi pintada metade de sua superfície com esmalte de unha, o que permitiu a proteção da

metade coberta da ação dos agentes erosivos e/ou cariogênicos, tornando nítida a visualização do desgaste^{94, 127, 128, 129}.

Desta forma, quando a ponta apalpadora do Rugosímetro percorreu a superfície do bloco após o tratamento, ela teve contato com superfícies desgastadas e não desgastadas pelo desafio, resultando em um perfil semelhante a uma linha reta com irregularidades compatíveis com o desgaste final.

O tempo de duração do experimento pode interferir na indicação do método. A perfilometria necessita de um determinado desgaste (μm) para que seja possível sua detecção pelo aparelho, pois se o desgaste for muito pequeno, não há como medi-lo por este método. Assim sendo o modelo *in situ* deve ter duração suficiente que possibilite a aferição do desgaste. Por outro lado, a microdureza necessita uma área plana para realização da endentação, e um ataque erosivo muito prolongado pode alterar a superfície, de tal forma que prejudique a realização da endentação, devido ao desnivelamento de espécime⁹⁵. A duração de 14 dias das etapas deste estudo foi considerada adequada para os métodos utilizados, pois possibilitou a correta execução dos testes de perfilometria e microdureza.

É importante relatar que a planificação e o polimento removem a camada superficial do esmalte, mais resistente ao ataque ácido^{41, 105}. Desta forma o desgaste e a perda de dureza deste estudo podem ser maiores do que as que ocorrem normalmente no dente sob condições naturais. Por outro lado, o polimento proporciona uma superfície com composição uniforme¹⁰⁴. GANSS et al.⁴¹ (2000) em estudo *in vitro* expuseram dentes humanos polidos e não polidos à ácido cítrico por 3 horas. Encontraram que o esmalte polido foi mais susceptível à dissolução ácida, sendo que a profundidade da lesão erosiva foi semelhante nas superfícies vestibular, lingual, mesial e distal de um mesmo dente polido, e diferente nos não

polidos. Desta forma, mesmo sabendo que o esmalte polido e planificado seria mais susceptível ao desgaste e à perda de dureza, o que importava neste estudo era a comparação interna das condições testadas, e não os valores absolutos do resultado, principalmente se for considerado o fato de que este procedimento se faz indispensável para os testes de perfilometria e microdureza.

Quanto à leitura e dosagem do flúor presente no biofilme dentário a utilização do eletrodo específico tem sido demonstrado como um método bastante utilizado e eficaz para este fim^{21, 22, 101}, sendo desta forma aquele adotado neste estudo.

6.1. Resultados

Esta parte da discussão não será dividida quanto às diferentes variáveis utilizadas, mas sim quanto aos diferentes grupos experimentais, comparando e analisando seus resultados.

6.1.1. Grupo I

Os espécimes do grupo I correspondiam àqueles ao nível do aparelho palatino, sem o acúmulo de biofilme e que sofriam a ação direta do agente erosivo. Como não houve acúmulo de biofilme, neste grupo não haverá discussão sobre a concentração de flúor no biofilme; sendo discutidos apenas seu padrão de perda de dureza e desgaste.

Os agentes erosivos caracterizam-se por serem altamente subsaturados de cálcio, fósforo e flúor quando comparados à hidroxiapatita e fluoridroxiapatita^{11, 142}. Isto assegura a dissolução dos prismas de esmalte superficiais sem a formação de uma superfície de fluoridroxiapatita, ou seja, sem a formação de uma lesão subsuperficial como ocorre na cárie dentária^{68, 90, 108}. Desta forma, não houveram surpresas nos resultados encontrados deste grupo e eles estiveram de acordo com aqueles apresentados pela literatura em situações semelhantes^{94, 127, 128, 129}, uma vez que foi encontrada uma grande porcentagem de perda de dureza superficial (87,45%) com um desgaste significativo (4,82µm).

No trabalho de Rios et al.¹²⁹ em 2006, espécimes de esmalte bovino foram expostos em um estudo *in situ* à ação de uma bebida a base de cola (Coca-Cola®) 4 vezes ao dia, por 5 minutos durante 5 dias. Os resultados mostraram uma porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) de 91,61 e um desgaste de 2,77µm. Outro trabalho *in situ* do mesmo ano de Rios et al.¹²⁸ avaliou diversas situações, entre elas blocos de esmalte humano imersos na mesma bebida carbonatada 4 vezes ao dia, por 5 minutos durante 7 dias. Desta vez foi encontrada uma %PDS de 91% e um desgaste de 5,2µm.

Se forem comparados os resultados deste trabalho com os dois acima citados, algumas semelhanças serão verificadas. No primeiro estudo, a %PDS foi maior e o desgaste foi menor do que os encontrados no grupo I deste estudo. A maior %PDS provavelmente ocorreu em função do substrato utilizado ser o esmalte bovino, sabidamente mais poroso e menos resistente que o humano¹⁰⁴ e o menor desgaste deve ser resultado de um menor período experimental. No segundo estudo, apesar do período experimental ser menor, tanto a %PDS como o desgaste, foram maiores do que os deste trabalho e isso pode ter ocorrido em função da

freqüência de imersões diárias na bebida, uma vez que uma menor freqüência de imersões proporciona um intervalo maior entre os desafios ácidos e uma maior remineralização do esmalte previamente desmineralizado pela bebida^{87, 146, 158}. Este efeito cumulativo ao longo de vários dias faz com que a exposição mais freqüente à bebida por menos dias possa ter um efeito mais danoso ao esmalte dentário do que uma exposição menos freqüente por mais dias.

6.1.2. Grupo II

Os blocos de esmalte humano deste grupo foram expostos à ação erosiva da bebida ácida testada associada à formação de biofilme dentário. Não há definição na literatura quanto à influência do biofilme dentário no fenômeno erosivo. Talvez isso ocorra pela própria definição de erosão, segundo a qual há uma perda mineral do dente sem a influência de microrganismos^{87, 146, 158}, fazendo com que todos os trabalhos realizados sobre erosão tenham o cuidado e a necessidade de eliminar o biofilme dentário. No entanto, existe na literatura a hipótese de que o próprio biofilme poderia funcionar como barreira de difusão aos ácidos, diminuindo o desenvolvimento da erosão^{50, 51, 52, 53, 87, 119, 120}.

O'SULLIVAN; CURZON¹¹⁹ estudaram a quantidade de *S.mutans* na saliva em indivíduos com e sem cárie, e com erosão, para correlacionar sua presença com estas patologias. Foi observada uma maior contagem desses microrganismos em indivíduos com cárie e com erosão. Os autores formularam a hipótese de que os indivíduos com *S.mutans*, sem cárie e com erosão, deveriam escovar mais os

dentes, eliminando o biofilme, mas aumentando a susceptibilidade ao desgaste dentário.

De qualquer maneira, a maioria dos estudos *in situ*, relacionados à erosão procuram eliminar o biofilme dentário dos espécimes, para que não haja dúvida de que as alterações superficiais resultantes tenham sido provocadas pela erosão e não pela cárie. No entanto, um dos objetivos deste trabalho foi justamente este, visto que a ação erosiva de bebidas ácidas pode ocorrer sobre dentes sem biofilme, mas pode ocorrer também em indivíduos que possuem um pobre controle do biofilme dentário.

Os resultados mostraram que nos espécimes deste grupo, o biofilme formado ofereceu uma grande barreira à ação erosiva da bebida ácida. Ao longo de 14 dias formou-se uma média de massa considerável sobre os espécimes (30,95 mg) que ofereceu uma barreira física muito eficaz na minimização dos efeitos erosivos, com apenas 13,47% de porcentagem de perda de dureza superficial e um desgaste próximo de zero (0,136 μm).

Segundo Hara, Lussi e Zero⁵³ (2006), a película adquirida é uma camada proteica rapidamente formada sobre a superfície dentária após sua remoção pela escovação, profilaxia ou dissolução química. A película adquirida pode proteger os dentes da erosão atuando como uma barreira de difusão ou uma membrana de permeabilidade seletiva que previne o contato direto entre os ácidos e a superfície dentária, reduzindo os índices de dissolução da hidroxiapatita. Esta proteção sobre a superfície dentária já está estabelecida na literatura e foi determinada por uma série de estudos *in vitro* e *in situ*^{6, 46, 50, 51, 52, 53, 115, 119, 137}. Segundo estes autores, o biofilme formado sobre esta película adquirida seria uma barreira adicional de proteção ao esmalte dentário.

Os resultados deste grupo confirmaram as hipóteses da literatura de forma bastante sensata visto que, se uma barreira física, como a película adquirida, que varia de 0,5 a 1 μ m^{6, 76} de espessura pode oferecer *in vitro* uma proteção entre 30 e 100% contra a desmineralização, o que se esperar de uma barreira de 1mm e 30mg? Muito provavelmente a proteção do biofilme sobre o agente erosivo pode ter sido próxima de 100%. Desta forma a perda de dureza final do grupo (13,47%) pode ser atribuída a ocorrência de erosão nos primeiros dias do período experimental em que o biofilme ainda não havia se formado, ou a ocorrência de uma pequena desmineralização devido ao baixo desafio cariogênico produzido pela bebida ácida. Apesar de ter ocorrido desmineralização nos espécimes com biofilme (grupo II), esta foi bem menor em relação aos outros grupos (Grupos I, III e IV).

Uma dúvida que poderia existir sobre o biofilme formado é quanto a sua patogenicidade. Este biofilme dentário foi originado tendo como único substrato a bebida a base de cola, com aproximadamente 8% de sacarose e com uma frequência de 3 vezes ao dia. Em função das características da bebida e de sua frequência de utilização, já se esperava que o desafio não tivesse uma intensidade como a de um desafio cariogênico tradicional (20% sacarose, 8X/dia), uma vez que segundo AIRES et al.² uma concentração menor de sacarose pode representar uma menor perda de dureza e de acordo com CURY; REBELLO; DEL BEL CURY²² (1997) e DUGGAL et al.²⁹ (2001) uma menor frequência de exposições à sacarose também pode levar a uma menor desmineralização.

Outro fator que certamente colaborou para a baixa patogenicidade do biofilme formado sobre os espécimes do grupo II foi o baixo pH da bebida ácida (2,6). Provavelmente em função da pequena concentração e frequência de exposição à sacarose, não foi selecionado um biofilme altamente cariogênico e concentrado em

Streptococcus mutans (SM). Ainda assim, considerando a sua presença no biofilme do grupo II, DASHPER e REYNOLDS²⁵ (1992) afirmam que a atividade glicolítica dos SM cai a zero assim que o pH extracelular chega a 5,0. SVENSÄTER et al.¹⁴⁴ (2003) afirmam que em pH 5,0 constante, apesar dos membros do grupo estreptococos serem dominantes, os *Streptococcus mutans* totalizaram menos da metade dos estreptococos viáveis contabilizados e boa parte destes não eram ácido-tolerantes, podendo estar inativos em estase ou terem sido levados à morte ácida. SVENSÄTER et al.¹⁴⁴ (2003) concluíram que o pH-limite para crescimento dos *Streptococcus mutans* foi de 4,14 e o pH 3,0 era considerado letal para estas amostras.

HAMILTON⁴⁸ (1986) afirma que a sobrevivência de micorganismos durante uma queda de pH é muito mais dependente do tempo em que ela acontece do que da variação de pH em que ocorre. Este autor expôs culturas de *S. mutans* a quedas de pH de 7,0 para 4,8 em 10 minutos e em 24 horas. Os resultados mostraram que nas amostras com queda rápida de pH, as bactérias foram incapazes de se proliferarem e muitas sofreram morte ácida, enquanto que na queda lenta de pH uma significativa população das células iniciais conseguiu sobreviver. Pode-se concluir deste estudo que as últimas células adaptaram sua tolerância ácida durante 24 horas permitindo seu crescimento e a manutenção do metabolismo em pH 4,8, o que não foi possível com a rápida acidificação do meio. Assim sendo, quedas lentas de pH como as que acontecem na cárie dentária, promovem uma adaptação das bactérias do biofilme aos próximos desafios, enquanto que quedas bruscas de pH como a resultante da ação de uma bebida ácida podem promover a morte e estagnação do metabolismo bacteriano.

Desta forma, se a exposição 3 vezes ao dia das bactérias do biofilme do grupo II à bebida ácida com pH 2,6 não provocou sua morte, ela minimamente alterou seu metabolismo, tornando-as praticamente inativas, metabolizando pouco os carboidratos e com um papel pouco patogênico sobre a estrutura dentária.

O desgaste dos espécimes deste grupo foi significativamente menor em relação ao grupo I, podendo ser considerado desprezível (0,136µm), pois como praticamente não houve uma ação direta da bebida sobre o esmalte, não houve perda superficial. Esta característica pôde ser observada visualmente, com espécimes sem linha de desgaste, sem mancha branca e com brilho semelhante ao do esmalte hígido (Figura 26).

Com relação à concentração de flúor no biofilme dos espécimes deste grupo (27,91 µg F/g biofilme) o valor final foi considerado elevado. Isto ocorreu devido ao uso de água e dentifrício fluoretado, que levam a um alto conteúdo de F no biofilme. Embora grande parte do F esteja sob forma não disponível, há aumento significativo de íons F livres, e portanto atuantes, quando dos desafios cariogênicos. Como neste grupo o desafio resultante foi muito baixo, boa parte deste F permaneceu no biofilme, mantendo assim os seu elevados níveis.

Os conceitos necessários para a discussão do grupo IV, facilitam o entendimento dos resultados do grupo III. Desta forma, visando uma discussão mais didática dos resultados destes dois últimos grupos, sua ordem será invertida e primeiramente será analisado o grupo IV.

6.1.3. Grupo IV

Os blocos do grupo IV foram expostos a um alto desafio cariogênico (8 gotejamentos de sacarose a 20% por dia durante 14 dias) como já fora descrito muitas outras vezes na literatura^{2, 21, 22, 23, 101, 123}.

O trabalho de AIRES et al.² (2006) mostrou que com um desafio cariogênico idêntico ao deste trabalho, houve uma %PDS de $58,2 \pm 32,6\%$ e uma concentração de flúor no biofilme de $12,3 \pm 14,8 \mu\text{g/g}$. Também oferecendo aos seus espécimes um desafio cariogênico com as mesmas condições PECHARKI et al.¹²⁴ (2005) apresentaram resultados de %PDS de $57,3 \pm 32,3\%$ e concentração de flúor igual a $28,2 \pm 79,0$.

Ao comparar os resultados deste estudo com os dois anteriormente citados, verificar-se-á que a média da porcentagem de perda de dureza foi maior (86,12%), mas a dosagem de flúor no biofilme foi menor (3,39). Esta relação parece coerente, pois mostra que de alguma forma o desafio cariogênico sofrido pelos espécimes do grupo IV foi maior do que o encontrado nos trabalhos mencionados, uma vez que com uma maior perda de dureza, deveria também haver uma menor quantidade de flúor no biofilme, consumido durante as sucessivas quedas de pH. Ainda assim, em função do grande desvio-padrão apresentado pelos estudos anteriores, certamente alguns voluntários acusaram perdas minerais semelhantes aos espécimes do grupo IV.

Com relação ao desgaste encontrado nos espécimes do grupo IV, não existe comparação possível com os dados da literatura, até mesmo porque com a formação do biofilme dentário, a desmineralização resultante foi subsuperficial, não

permitindo uma perda estrutural tão significativa como a encontrada no grupo I em que não houve a ação protetora do biofilme. De qualquer forma, apesar de detectado pelo rugosímetro ($0,415\mu\text{m}$) os espécimes visualmente, ao contrário dos blocos do grupo I, não apresentavam nenhum degrau na área exposta, e esta apesar de mostrar uma grande e nítida mancha branca de desmineralização não perdeu seu brilho e polimento superficial, confirmando a hipótese da perda subsuperficial de minerais. Também não houve diferença estatisticamente significativa do desgaste encontrado no grupo IV com os espécimes dos grupos II e III, mostrando que quando existe a presença do biofilme, o desgaste é praticamente desprezível.

6.1.4. Grupo III

No grupo III os espécimes foram submetidos ao desafio cariogênico igual ao grupo IV associado a 3 exposições diárias ao refrigerante a base de cola. Seria natural imaginar que o efeito cumulativo dos dois fenômenos sobre o esmalte humano promovesse um efeito deletério maior do que qualquer um dos dois isoladamente, no entanto os resultados não mostraram isso, pois quando o desafio erosivo foi associado ao desafio cariogênico ele promoveu uma menor %PDS (68,87%) do que ocorreu somente no desafio cariogênico (86,12%).

Outro resultado que em um primeiro momento pareceu contraditório foi a concentração de flúor no biofilme do grupo III quando comparado ao grupo IV. Se os resultados mostraram que houve uma menor %PDS no grupo III e conseqüentemente um menor desafio, parece estranho o fato deste possuir uma

menor concentração de flúor quando comparado ao grupo IV, embora não haja diferença estatisticamente significativa.

Apesar de uma aparente contradição dos resultados, a literatura apresenta possíveis hipóteses para explicar todos eles. O primeiro fato a ser esclarecido é o porquê da associação do desafio cariogênico com o refrigerante gerar um menor efeito deletério sobre o esmalte do que somente o desafio com sacarose. Percebe-se claramente que a bebida ácida possui algum efeito inibitório que minimiza a perda mineral quando associada ao desafio cariogênico. Os resultados mostram que o efeito da bebida ácida no GIII, com relação à %PDS pode ser considerado insignificante (vide grupo II que perdeu apenas 13% de dureza com a presença do biofilme). Assim sendo, boa parte da perda de dureza do GIII (aproximadamente 55%) pode ser atribuída ao desafio cariogênico de 8 gotejamentos diários de sacarose e ao contrário do grupo IV, no grupo III, durante as 3 imersões diárias no refrigerante em pH 2,6 o metabolismo bacteriano foi minimamente paralisado com as rápidas quedas de pH^{24, 25, 47, 48, 49, 103, 144, 145}, fazendo com que, ao contrário do grupo IV, as bactérias não trabalhassem no auge de seu metabolismo a todo tempo, gerando conseqüentemente uma menor produção de ácidos e uma menor porcentagem de perda de dureza superficial.

Estes resultados corroboram com os valores de %PDS encontrados no grupo II e como já fora discutido neste capítulo desta tese, comprovam os efeitos deletérios de baixos valores de pH sobre o biofilme dentário e sobrevivência e/ou metabolismo bacteriano^{24, 25, 47, 48, 49, 103, 144, 145}.

Somado a isso, mais do que no grupo IV, o flúor parece ter tido um importante papel na inibição parcial do desafio cariogênico nos espécimes do grupo III, em função das constantes quedas de pH. Hoje, as evidências indicam que o F possui

vários efeitos indiretos e diretos sobre as bactérias, sendo que alguns deles têm uma significativa influência sobre os microrganismos produtores de ácidos na biofilme dentário⁴⁷.

O primeiro efeito direto do F é sobre o metabolismo energético de bactérias. Existe uma concordância geral de que o F interage com a bactéria rapidamente e este fenômeno é dependente do pH. A entrada do F na bactéria acontece sem gasto de energia e aumenta à medida que o pH diminui. O flúor penetra na forma não ionizada, HF, sendo esta a forma na qual, a membrana da bactéria é permeável. Com a queda do pH ambiental, devido à formação de ácido do metabolismo de carboidratos por bactérias acidogênicas ou devido a presença de bebidas ácidas, a diferença de pH intracelular (pH básico) e extracelular (pH ácido) aumenta e o F (como HF) vai entrar e se acumular dentro da célula, até que não exista mais esta diferença. A entrada do HF num citoplasma mais alcalino resulta na dissociação em H^+ e F^- . A dissociação do HF dentro da célula tem 2 efeitos principais e distintos na fisiologia da célula: 1) a liberação de F que interage com constituintes celulares, incluindo várias enzimas sensíveis ao F, causando a inibição da atividade destas e 2) liberação de H^+ , que resulta na acidificação do citoplasma. Conseqüentemente, a diminuição do pH intracelular resultante da entrada do HF vai deixar o citoplasma menos favorável para a atuação de enzimas essenciais. A acidificação do citoplasma provocada pelo F é reconhecida como um fator significativo na inibição do crescimento e do metabolismo das bactérias e, conseqüentemente, no potencial cariogênico⁴⁷.

Um outro efeito direto do F é sobre a via glicolítica. O açúcar é a principal fonte de energia da microbiota no biofilme dentário. Esta via utiliza a glicose como fonte de energia para uma cadeia de reações para o crescimento celular, para os

vários processos que mantêm a integridade celular e a homeostase, tendo como produto final, ácidos. Estes por sua vez, vão fazer com que o pH do biofilme diminua e ocorra todo o processo de desmineralização do esmalte, resultando num processo de cárie. Desta forma, os produtos da via glicolítica são: ATP para o metabolismo celular e ácidos como produtos finais. O principal e o mais estabelecido objetivo do F na via glicotítica é a inibição da metaloenzima enolase (que catalisa a reação de 2 fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato) que requer Mg^{++} para a sua atividade. O F formando complexos com o Mg^{++} , remove-o do seu sítio catalítico, inibindo a atividade desta enzima. Conseqüentemente, esta inibição promoverá a redução da produção de ácidos e também da produção de ATP pela célula⁴⁷.

As bactérias acidogênicas possuem um importante mecanismo de manter a homeostase do pH intracelular durante o metabolismo que gera ácido. As enzimas celulares normalmente trabalham numa faixa estreita de pH e a acidificação do citoplasma reduziria severamente a atividade metabólica necessária para o crescimento e viabilidade. Um dos mecanismos que os estreptococos bucais possuem é o bombeamento de prótons para fora da célula através da bomba ATPase (uma proteína de membrana que bombeia os prótons para fora da célula energizada pela hidrólise do ATP) e pelo efluxo do produto final⁴⁷. Pesquisadores tem mostrado que a enzima ATPase é importante na manutenção da tolerância ácida de bactérias bucais, permitindo que bactérias acidúricas, como o *S. mutans*, metabolizem carboidratos em baixo pH sobre a superfície do dente⁴⁹. A ATPase de bactérias bucais é diretamente inibida pelo F^{143} , e como conseqüência, a homeostase do pH celular vai ser comprometida principalmente em ambientes com valores baixos de pH. Esta quebra da regulação intracelular de pH é um significativo fator no efeito antimicrobiano do F e ilustra seus múltiplos efeitos na fisiologia da

célula⁴⁷. O segundo mecanismo pelo qual a célula bombeia os prótons para fora da célula é o chamado efluxo do produto final, processo no qual os prótons são expulsos da célula juntamente com produtos metabólicos finais, como o ácido láctico¹⁵⁰.

O bombeamento de prótons para fora da célula promove um gradiente de pH entre o meio interno e externo, assim como um gradiente elétrico. A energia potencial nesses gradientes conhecida como força próton motora, pode ser utilizada para fazer trabalhos biológicos, como a síntese de ATP, movimento flagelar, ou transporte de glicose para dentro da célula. Essas reações contribuem significativamente para a conservação da energia metabólica na bactéria e para a manutenção da homeostase do pH da célula. Além da energia, esses processos requerem a presença de íons potássio. Assim, o F, aumentando a permeabilidade da membrana celular a prótons e dissipando o gradiente de pH, inibe os processos dependentes da força próton motora⁴⁷.

Basicamente o F age reduzindo a tolerância ácida das bactérias e sendo mais efetivo em pHs ácidos. Em condições ácidas do biofilme cariogênico, o F em baixos níveis pode causar parada completa da glicólise por células intactas de *Streptococcus mutans*. O F aumenta a morte ácida e a morte oxidativa das bactérias⁴⁷. Desta forma, embora o flúor estivesse presente tanto no grupo III quanto no grupo IV, ele teve uma ação maior no metabolismo acidogênico do biofilme dentário em função das abruptas quedas de pH provocadas pela bebida ácida, promovendo assim uma menor liberação de ácidos pelas bactérias, resultando em um menor desafio cariogênico.

As bactérias bucais podem concentrar flúor em seu interior, a partir do ambiente e parte dessa concentração parece ser devida à ligação do F a várias

estruturas celulares, principalmente proteínas. Por também aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana em baixos valores de pH, o flúor presente no biofilme do grupo III penetrou mais no citoplasma das bactérias do que no grupo IV, podendo ter se ligado em maiores proporções aos componentes celulares de forma irreversível, acusando assim uma menor concentração de flúor no biofilme quando comparado ao grupo IV, uma vez que a metodologia utilizada para leitura e dosagem deste elemento por meio de eletrodo de flúor não permite sua quantificação no interior dos microrganismos do biofilme.

Por fim, os valores de desgaste dos espécimes do grupo III (0,341 μ m) não apresentaram diferença estatisticamente significativa com aqueles do grupo II e IV, sendo também considerados desprezíveis, visto que seu padrão de desmineralização também foi subsuperficial. Na análise visual também verificou-se uma mancha branca nítida com a superfície plana, polida e brilhante.

Diante de toda discussão apresentada pôde-se perceber a complexidade e a importância de trabalhos acerca da interação dos fenômenos erosivos e cariogênicos, visto que ao contrário do que se costuma fazer cientificamente ao estudá-los separadamente, estes podem perfeitamente interagir em condições reais na cavidade bucal. No entanto, é importante ressaltar, que os resultados apresentados por terem sido obtidos *in situ*, proporcionam apenas indicações do que realmente ocorre na cavidade bucal, havendo necessidade de mais trabalhos que confirmem estes achados e que preencham muitas lacunas que ainda não foram exploradas no âmbito da interação entre erosão e cárie dentária.

FEUP USP

O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

7 CONCLUSÕES

1 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, baseado nas hipóteses nulas consideradas, pode-se constatar e concluir que:

- Houve diferença na perda de microdureza e no desgaste do esmalte dentário exposto à ação de um refrigerante a base de cola, com ou sem a formação de biofilme dentário. A presença do biofilme dentário proporcionou uma menor %PDS e um menor desgaste ao esmalte dentário exposto à ação de um refrigerante a base de cola;
- Houve diferença apenas na perda de microdureza do esmalte dentário resultante de um desafio cariogênico ou de um desafio cariogênico associado à ação de uma bebida a base de cola. A ação da bebida a base de cola inibiu a %PDS e não alterou o desgaste proporcionado por um desafio cariogênico sobre o esmalte dentário;
- Houve diferença na concentração de flúor do biofilme formado pela exposição a um refrigerante a base de cola e dos biofilmes formados pela exposição freqüente à sacarose e pela associação de ambos. A exposição freqüente à sacarose gerou uma menor concentração de flúor no biofilme formado.

Estas conclusões permitem a rejeição das duas primeiras hipóteses e a rejeição parcial da última hipótese nula formulada.

FEUP USP

A capacidade pouco vale sem
oportunidade.

Napoleão Bonaparte

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 94/2005

Bauru, 30 de setembro de 2005.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "**Avaliação in situ do efeito erosivo e cariogênico de um refrigerante à base de cola em dentes humanos**", de autoria de Heitor Marques Honório, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 28 de setembro de 2005 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
DD. Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

Heitor Marques Honório

Anexo 2

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

Nome do sujeito da pesquisa: _____

1 - Título do Trabalho Experimental

Avaliação *in situ* do efeito erosivo e cariogênico de um refrigerante à base de cola em dentes humanos

2 - Objetivo

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a ação de um refrigerante tipo cola associado ao gotejamento freqüente de sacarose sobre a estrutura dentária.

3 – Procedimentos da Fase Experimental

Você irá utilizar um aparelho móvel por 2 períodos experimentais de 14 dias (totalizando 28 dias), o qual conterá 4 pedaços de esmalte humano previamente esterilizados com solução de formol a 2%. Durante o primeiro período experimental, você deverá seguir um protocolo em que será preciso utilizar o dispositivo palatino por 14 dias, podendo apenas retirá-lo 3 horas por dia (1 hora para cada refeição, aproveitando a retirada para fazer a própria higiene bucal) e realizar a imersão de todo o aparelho em Coca-Cola por 5 minutos, 3 vezes ao dia (5 minutos após recolocar o aparelho na boca depois das refeições). No segundo período experimental, você deverá utilizar outro dispositivo palatino por 14 dias, podendo apenas retirá-lo 3 horas por dia (1 hora para cada refeição, aproveitando a retirada para fazer a própria higiene bucal) e realizar a imersão de apenas metade do aparelho (**o lado VERMELHO**) por 5 minutos em Coca-Cola, 3 vezes ao dia (5 minutos após recolocar o aparelho na boca depois das refeições) e deverá também aplicar sobre todos os blocos do aparelho 2 gotas de solução de sacarose 20%, oito vezes por dia. As dificuldades encontradas pelo sujeito da pesquisa constituem-se basicamente em uma pequena dificuldade de falar com o aparelho na boca principalmente durante os primeiros dias, somada à limitação da freqüência de alimentações diárias (3 vezes ao dia). O sujeito da pesquisa deve estar ciente que o não cumprimento das instruções poderá prejudicar os resultados da pesquisa e que a sua participação ajudará no estabelecimento de protocolos educativos em relação ao consumo de refrigerantes voltados para a população de modo geral. Não há nenhum tipo de risco à sua cavidade bucal ou aos seus dentes, pois o experimento será conduzido fora da boca, nos pedaços de dente fixados no aparelho.

4 – Benefício para participar do experimento

Além disso, o sujeito da pesquisa será beneficiado com atendimento preventivo (limpeza profissional) e curativo, caso este último seja necessário, sob responsabilidade do autor.

Fica claro que você pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). O sujeito da pesquisa encontrará à sua disposição tratamento médico e indenização a que legalmente tem direito, por parte da Instituição, em casos de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa, com nexo causal comprovado. Se existirem gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos você poderá recorrer o autor do projeto – Heitor Marques Honório - Telefone (14) 3224-3390 ou (14) 9701-8970. Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

Heitor Marques Honório
Pesquisador

Anexo 3

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador(a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO.

Fica claro que o sujeito da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru, ____ de _____ de 2005.

Sujeito da pesquisa

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Orientadora

Relatório de acompanhamento da fase experimental

Nome: _____

[illegible]

Avaliação in situ do efeito individual e associado dos desafios erosivo e cariogênico em dentes humanos

Anexo 5

Etiqueta colada no frasco de sacarose que servia como relatório de acompanhamento da fase experimental

5:	6:	7:	8:	9:
10:	11:	12:	13:	14:
15:	16:	17:	18:	19:
20:	21:	22:	23:	24:

Anexo 6

Componentes para preparo dos padrões de flúor para análise da concentração de flúor no biofilme dentário

BLANCK 0,5 mL de água deionizada 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II	Padrão de 0,2 ppm F 0,5 mL de padrão de 0,8 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II
Padrão de 0,0125 ppm F 0,5 mL de padrão de 0,05 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II	Padrão de 0,4 ppm F 0,5 mL de padrão de 1,6 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II
Padrão de 0,025 ppm F 0,5 mL de padrão de 0,1 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II	Padrão de 0,8 ppm F 0,5 mL de padrão de 3,2 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II
Padrão de 0,05 ppm F 0,5 mL de padrão de 0,2 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II	Padrão de 1,6 ppm F 0,5 mL de padrão de 6,4 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II
Padrão de 0,1 ppm F 0,5 mL de padrão de 0,4 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II	Teste (0,1 ppm F) 0,5 mL de padrão de 0,4 ppm F 0,5 mL de HCl 1M 1 mL de TISAB II

FOB USP

Dar o exemplo não é a melhor
maneira de influenciar os outros.
É a única.

Albert Schweitzer

REFERÊNCIAS

Bibliográficas

REFERÊNCIAS

Bibliográficas

1. Addy M, Hughes J, Pickles MJ, Joiner A, Huntington E. Development of a method *in situ* to study toothpaste abrasion of dentine. Comparison of 2 products. J Clin Periodontol. 2002;29(10):896-900.
2. Aires C, Tabchoury C, Cury ADB, HKoo, Cury J. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. Caries Res. 2006;40(1):28-32.
3. Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part I: Prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds. Br Dent J. 2001;190(3):145-9.
4. 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;46(8):697-703.
5. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion *in vitro*: enamel type, temperature and exposure time. J Oral Rehabil. 1999;26(8):624-30.
6. 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;78(12):1821-8.

7. Asher C, Read MJ. Early enamel erosion in children associated with the excessive consumption of citric acid. *Br Dent J.* 1987;162(10):384-7.
8. 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;35(3):216-22.
9. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1997;42(3):243-50.
10. Axelsson P, Lindhe J. The effect of a preventive programme on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. *J Clin Periodontol.* 1974;1(2):126-38.
11. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(5):428-33.
12. Bartlett DW, Coward PY, Nikkah C, Wilson RF. The prevalence of tooth wear in a cluster sample of adolescent schoolchildren and its relationship with potential explanatory factors. *Br Dent J.* 1998;184(3):125-9.
13. Bellini HT, Arneberg P, Von Der Fehr FR. Oral hygiene and caries. A review. *Acta Odontol Scand.* 1981;39(5):257-65.
14. Benelli E, Serra M, Rodrigues AJ, JACury. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res.* 1993;27(4):280-4.
15. Bezerra ACB, Toledo OA. Nutrição dieta e cárie. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p. 45-67.
16. Birkhed D. Sugar content, acidity an effect on plauqe pH of fruit juices, fruit drinks, carbonated beverages and sport drinks. *Caries Res.* 1984;18:120-7.

17. Bowen WH, Lawrence RA. Comparison of the Cariogenicity of Cola, Honey, Cow Milk, Human Milk, and Sucrose. *pediatrics*. 2005;116(4):921-6.
18. Brunton PA, Hussain A. The erosive effect of herbal tea on dental enamel. *J Dent*. 2001;29(8):517-20.
19. Consolaro A. Cárie dentária:. Bauru: Consolaro Editora; 1996.
20. Cury J, Hashizume L, Cury ADB, Tabchoury C. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an *in situ* study. *Caries Res*. 2001 Mar-Apr;35(2):106-10.
21. Cury J, Marques A, Tabchoury C, Cury ADB. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz Dent J*. 2003;14(3):147-52.
22. Cury J, Rebello M, Cury ADB. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res*. 1997;31(5):356-60.
23. Cury J, Simoes G, Cury ADB, Goncalves N, Tabchoury C. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on *in situ* enamel remineralization. *Caries Res*. 2005 May-Jun;39(3):255-7.
24. Dashper SG, Reynolds EC. Effects of organic acid anions on growth, glycolysis, and intracellular pH of oral streptococci *J Dent Res*. 2000;79(1):90-6.
25. Dashper SG, Reynolds EC. pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 1992 May;71(5):1159-65.
26. Dawes C. An analysis of factors influencing diffusion from dental plaque into a moving film of saliva and the implications for caries. *J Dent Res*. 1989;68(11):1483-8.
27. Dawes C, Macpherson LM. Effects of nine different chewing-gums and lozenges on salivary flow rate and pH. *Caries Res*. 1992;26(3):176-82.

28. Deery C, Wagner ML, Longbottom C, Simon R, Nugent ZJ. The prevalence of dental erosion in a United States and a United Kingdom sample of adolescents. *Pediat Dent*. 2000;22(6):505-10.
29. Duggal M, Toumba K, Amaechi B, Kowash M, Higham S. Enamel demineralization *in situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *J Dent Res*. 2001 Aug;80(8):1721-4.
30. Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):649-53.
31. Eccles JD. Erosion affecting the palatal surfaces of upper anterior teeth in young people. A report of 19 cases. *Brit Dent J*. 1982;152(11):375-8.
32. Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update*. 1982;9(7):373-81.
33. Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *J Dent*. 1974;153(9):153-9.
34. Edwards M, Creanor SL, Foye RH, Gilmour WH. Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. *J Oral Rehabil*. 1999;26(12):923-7.
35. Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M. Ultrasonication as a method to study enamel demineralisation during acid erosion. *Caries Res*. 2000;34(4):289-94.
36. Featherstone J, Zero D. An *in situ* model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:804-10.
37. 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.
38. Fonseca YPC, Guedes-Pinto AC. Hábitos alimentares e dieta. *Odontopediatria*. 5ed ed. São Paulo: Ed. Santos; 1995. p. 545-77.

39. Fushida CE, Cury JA. Estudo *in situ* do efeito da frequência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. Rev Fac Odont USP. 1999;13(2):127-34.
40. Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents-a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. Community Dent Oral Epidemiol. 2001;29(4):264-71.
41. Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. Arch Oral Biol. 2000;45(10):897-902.
42. Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. Amer J Dent. 1991;4(3):120-2.
43. Gouveia MMA, Tames DR, Ferreira R, Bahi FC, Morreto J. Propriedades erosivas de sucos de frutas industrializados recomendados como suplemento alimentar para crianças. J Bras Odontopediatr Odontol Bebe. 2000;3(12):111-7.
44. Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH. In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. Caries Res. 1996;30(5):373-8.
45. Grobler SR, Van Der Horst G. Biochemical analysis of various cool drinks with regard to enamel erosion, de- and remineralization. J Dent Ass S Afr. 1982;37(10):681-4.
46. Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. J Dent. 1999;27(5):333-9.
47. Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. J Dent Res. 1990 Feb;69:660-67.

48. Hamilton IR. Growth, metabolism and acid production by *Streptococcus mutans*. In: Hanada S, Michalek SU, Kiyono H, Menaker L, McGhee JR, editors. Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans* Amsterdam: Elsevier; 1986. p. 255-62.
49. Hamilton IR, Buckley ND. Adaptation of *Streptococcus mutans* to acid tolerance. Oral Microbiol Immunol. 1991 Apr;6(2):65-71.
50. Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1999;33(5):372-9.
51. Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries Res. 2001;35(2):142-8.
52. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the *in situ* formed short-term salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2004;49(11):903-10.
53. Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological Factors. In: Lussi A, editor. Dental erosion: from diagnosis to therapy. Basel: Karger; 2006. p. 88-99.
54. 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;111(5):423-7.
55. Holbrook WP, Arnadottir IB, Kay EJ. Prevention. Part 3: prevention of tooth wear. Br Dent J. 2003;195(2):75-81.
56. Holloway PJ, Mellanby M, R.J.C. S. Fruit drinks and tooth erosion. Br Dent J. 1958;104(9):305-9.
57. Honório HM. Avaliação do desgaste de diferentes métodos de profilaxia sobre o esmalte bovino hígido e desmineralizado [Dissertação. (Mestrado)]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2003.

58. Honório HM, Rios D, Abdo RCC, Machado MAAM. Effect of different prophylaxis methods on sound and demineralized enamel. *J Appl Oral Sci.* 2006 Mar/Apr;14(2):117-23.
59. Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M, et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. A study *in situ*. *Caries Res.* 2002;36(1):70-4.
60. 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;27(4):285-9.
61. 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;27(5):345-50.
62. Hughes JA, West NX, Parker DM, Van Den Braak MH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent.* 2000;28(2):147-52.
63. Hunter ML, Hughes JA, Parker DM, West NX, Newcombe RG, Addy M. Development of low erosive carbonated fruit drinks. 1. Evaluation of two experimental orange drinks in vitro and *in situ*. *J Dent.* 2003;31(4):253-60.
64. Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent.* 2000;28(4):257-63.
65. Ikeda T. Sugar substitutes: reasons and indications for their use. *Int Dent J.* 1982;32(1):34-43.

66. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):151-5.
67. Imfeld T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):215-20.
68. Jarvinen V, Rytomaa I, Meurman JH. Location of dental erosion in a referred population. Caries Res. 1992;26(5):391-6.
69. Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth--an in vivo and in vitro study. J Dent. 2001;29(5):333-40.
70. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. Arch Oral Biol. 1960;1(4):304-20.
71. Kielbassa A, Muller U, Garcia-Godoy F. *In situ* study on the caries-preventive effects of fluoride-releasing materials. Am J Dent. 1999 Nov;12 Spec No:S13-4.
72. Kielbassa A, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H. Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. Oper Dent. 2003 Nov-Dec;28(6):765-72.
73. Kim JW, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Garcia-Godoy F. In vivo rehardening of enamel eroded by a cola drink. J Dent Child. 2001;68(2):122-4.
74. Koo R, Cury J. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. Am J Dent. 1998 Aug;11(4):173-6.
75. Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard E, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. J Oral Pathol. 1974;3(4):185-96.
76. Kuroiwa M, Kodaka T, Kuroiwa M, Abe M. Brushing-induced effects with and without a non-fluoride abrasive dentifrice on remineralization of enamel surfaces etched with phosphoric acid. Caries Res. 1994;28(5):309-14.

77. Lagerweij M, ten Cate J. Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an *in situ* study. *Caries Res.* 2002 Jul-Aug;36(4):270-4.
78. Lambrechts P, Van Meerbeek B, Perdigao J, Gladys S, Braem M, Vanherle G. Restorative therapy for erosive lesions. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):229-40.
79. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.
80. Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res.* 2002;36(1):75-80.
81. Lascala NT. *Prevenção na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas; 1997.
82. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle-a review. *Adv Dent Res.* 2000;14:22-8.
83. Levine RS. Fruit juice erosion-an increasing danger? *J Dent.* 1973;2(2):85-8.
84. Lewinstein I, Ofek L, Gedalia I. Enamel rehardening by soft cheeses. *Am J Dent.* 1993;6(1):46-8.
85. Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE. Tooth wear: attrition, erosion, and abrasion. *Quintessence Int.* 2003;34(6):435-46.
86. Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):191-8.
87. Lussi A. *Dental erosion: from diagnosis to therapy*. Basel: Karger; 2006.
88. Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res.* 1995;29(5):349-54.

89. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38:34-44.
90. Lussi A, Jaggi T, Scharer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.
91. Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(2):110-4.
92. Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P. Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991;19(5):286-90.
93. Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. Caries preventive effect of sugar-substituted chewing gum. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2001;29(4):278-88.
94. Magalhães AC. Avaliação *in situ* do efeito do dentífrico fluoretado sobre a erosão dentária associada ou não à abrasão [Dissertação. (Mestrado)]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.
95. Mahoney E, Beattie J, Swain M, Kilpatrick N. Preliminary in vitro assessment of erosive potential using the ultra-micro-indentation system. *Caries Res.* 2003;37(3):218-24.
96. Maia LC, Modesto A. Análise comparativa, ao microscópio eletrônico de varredura, de esmalte bovino exposto a diferentes soluções ácidas. Um estudo in vitro. *Rev Fac Odont USP.* 1996;10(3):161-8.
97. Maltz M. Cariologia. *Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica.* 2ed ed. São Paulo: Premier; 1996. p. 105-33.
98. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2003 Jan;26(5):493-510.

99. Martin-Villa MC, Vidal-Valverde C, Dabrio MV, Rojas-Hidalgo E. Chromatographic measurement of the carbohydrate content of some commonly used soft drinks. *Am J Clin Nutr.* 1981;34:1432-36.
100. Martin-Villa MC, Vidal-Valverde C, Rojas-Hidalgo E. Soluble sugars in soft drinks. *Am J Clin Nutr.* 1981;34:2151-53.
101. Martinhon C, Italiani F, Padilha P, Bijella M, Delbem A, Buzalaf M. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "*in situ*". *Arch Oral Biol.* 2006 Jun;51(6):471-5.
102. Maupome G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde H, Borges-Yanez A. In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Res.* 1999;33(2):140-7.
103. McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;221(1):25-30.
104. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. *J Dent Res.* 1992;71:913-9.
105. 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.
106. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1991;25(1):1-6.
107. Meurman JH, Harkonen M, Naveri H, Koskinen J, Torkko H, Rytomaa I, et al. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res.* 1990;98(2):120-8.
108. Meurman JH, Ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):199-206.

109. Meurman JH, Torkko H, Hirvonen J, J. K, Rytomaa I. Application of a new mechanical properties microprobe to study hardness of eroded bovine enamel in vitro. Scand J Dent Res. 1990;98(6):568-70.
110. Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. Caries Res. 1997;31(1):44-9.
111. Millward A, Shaw L, Smith A. Dental erosion in four-year-old children from differing socioeconomic backgrounds. ASDC J Dent Child. 1994;61(4):263-6.
112. Millward A, Shaw L, Smith AJ, Rippin JW, Harrington E. The distribution and severity of tooth wear and the relationship between erosion and dietary constituents in a group of children. Int J Paed Dent. 1994;4(3):151-7.
113. Morgan KJ, Stults VJ, Stampely GL. Soft drink consumption patterns of the U.S. population. J Am Diet Assoc. 1985;85(3):352-4.
114. Moss SJ. Dental erosion. Int Dent J. 1998;48(6):529-39.
115. Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. Caries Res. 2003;37(3):225-31.
116. Newbrun E. Cariologia. 2. ed ed. São Paulo: Ed. Santos; 1998.
117. 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.
118. Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):156-61.
119. O'sullivan EA, Curzon ME. Salivary factors affecting dental erosion in children. Caries Res. 2000;34(1):82-7.

120. O'sullivan EA, Curzon ME, Roberts GJ, Milla PJ, Stringer MD. Gastroesophageal reflux in children and its relationship to erosion of primary and permanent teeth. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(3):765-9.
121. Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Arends J. Relative cariostatic effects of KOH-soluble and KOH-insoluble fluoride *in situ*. *J Dent Res.* 1990 Aug;69(8):1505-7.
122. Oginni O, Olusile AO. The prevalence, aetiology and clinical appearance of tooth wear: the Nigerian experience. *Int Dent J.* 2002;52(4):268-72.
123. Paes Leme A, Dalcico R, Tabchoury C, Del Bel Cury A, Rosalen P, Cury J. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004 Jan;83(1):71-5.
124. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.* 2005 Mar-Apr;39(2):123-9.
125. Peterson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):436-43.
126. Phelan J, Rees J. The erosive potential of some herbal teas. *J Dent.* 2003;31(4):241-6.
127. Rios D. Avaliação *in situ* do efeito erosivo de um refrigerante, associado ou não à escovação e ação salivar, em dentes humanos e bovinos [Tese. (Doutorado)]: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2004.
128. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delben CAB, Machado MAAM, Silva SMB, 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 May;40(3):218-30.

129. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SMB, Buzalaf MAR, Dibb RGP, et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an *in situ* study. *Braz Oral Res.* 2006;20(2):148-54.
130. Rølla G, Holund U, Koch G. Cáries dentárias: prevenção. *Odontopediatria*. São Paulo: Ed. Santos; 1995. p. 117-42.
131. Rugg-Gunn AJ, Maguire A, Gordon PH, McCabe JF, Stephenson G. Comparison of erosion of dental enamel by four drinks using an intra-oral appliance. *Caries Res.* 1998;32(5):337-43.
132. Rytomaa I, Jarvinen V, Kanerva R, Heinonen OP. Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand.* 1998;56(1):36-40.
133. Rytomaa I, Meurman JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R. In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res.* 1988;96(4):324-33.
134. Sanchez GA, Fernandez de Preliasco MV. Salivary pH changes during soft drinks consumption in children. *Int J Paed Dent.* 2003;13(4):251-7.
135. Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):178-90.
136. Shore R, Kirkham J, Devine D, Marsh P, Nattress B, Robinson C. Investigation to evaluate and validate the Leeds *in situ* device for the study of enamel remineralisation in vivo. *J Dent.* 2001 Aug;29(6):415-9.
137. Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995;53(6):358-62.
138. Smith AJ, Shaw L. Baby fruit juices and tooth erosion. *Br Dent J.* 1987;162(2):65-7.

139. Smith BG. Toothwear: aetiology and diagnosis. Dent Update. 1989;16(5):204-12.
140. Sobral MAP, Luz MAAC, Gama-Teixeira A, Garone Netto N. Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento de erosão dental. Pesqui Odontol Bras. 2000;14(4):406-10.
141. Speirs RL, Beeley JA. Food and oral health: 1 dental caries. Dent Update. 1992 Apr.;19(3):100-6.
142. Stookey GK. Reactor paper concerning patient selection and appliance design in intra-oral models. J Dent Res. 1992;71:911-2.
143. Sutton SVW, Bender GR, Marquis RE. Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria. Infect Imm. 1987 Nov;55(11):2597-603.
144. Svensäter G, Borgström M, Bowden GHW, Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. Caries Res. 2003;37:395-403.
145. Svensäter G, Larsson UB, Greif ECG, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol. 1997;12:266-73.
146. Ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):241-4.
147. Tenuta L, Lima J, Cardoso C, Tabchoury C, Cury J. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. Pesqui Odontol Bras. 2003 Oct-Dec;17(4):326-31.
148. Tenuta L, Ribeiro C, Goncalves N, Del Bel Cury A, Aires C, Tengan C, et al. The short-term *Streptococcus* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. J Dent. 2005 Jul;33(6):491-7.

149. Theilad E, Birkhed D. Tratado de cariologia. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. p. 117-46.
150. Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia clínica. 3. ed ed. São Paulo: Ed. Santos; 2001.
151. West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. J Oral Rehabil. 2001;28(9):860-4.
152. West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. J Dent. 1999;27(5):341-4.
153. West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. J Dent. 1998;26(4):329-35.
154. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Int Dent J. 1994;44(2):181-9.
155. Yamamoto K, Arai K, Fukazawa K, Fukui K, Nagamatsu K, Kato K, et al. Effect of plaque fluoride released from a glass-ionomer cement on enamel remineralization *Streptococcus*. Caries Res. 2005 Mar-Apr;39(2):157-60.
156. Yip KHK, Smales RJ, Kaidonis JA. The diagnosis and control of extrinsic acid erosion of tooth substance. Gen Dent. 2003;51(4):350-3.
157. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res. 1976;55(4):664-70.
158. Zero DT. Etiology of dental erosion-extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):162-77.
159. Zero DT. *In situ* caries models. Adv Dent Res. 1995;9(3):214-30.
160. Zero DT. Sugars- the arch criminal? Caries Res. 2004;38:277-85.

161. Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JD. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res.* 1990;24(3):181-8.

FEB USP

Estou convencido das minhas
próprias limitações,
e esta convicção é minha força.

Mahatma Gandhi

ABSTRACT

ABSTRACT

***In situ* evaluation of individual or associated effect of erosive and cariogenic challenge on human teeth.**

This *in situ* study evaluated whether an erosive attack with the presence of dental biofilm and the association between erosive and cariogenic challenge could reduce or increase the wear and the percent change in microhardness (%SMH) of human enamel. During 2 experimental 14-day crossover phases, 11 previously selected volunteers wore intraoral devices containing human enamel specimens which were submitted to four groups of separated treatment: (GI) cola drink, (GII) cola drink and biofilm accumulation, (GIII) cola drink plus 20% sucrose and biofilm accumulation, (GIV) 20% sucrose and biofilm accumulation. Thus, on GI the specimens were fixed at the intraoral device level and on GII, GIII and GIV they were fixed 1.0mm under the device level and covered by plastic meshes for biofilm accumulation. In one phase (GI and GII under study), the volunteers immersed the device for 5 minutes in 200ml of cola drink, 3 times per day. On the other phase, 20% sucrose solution was dripped onto the specimens 8 times per day on GIII and GIV and only half of the palatal device, corresponding to GIII, was immerse in cola drink as mentioned above. Biofilm fluoride concentration, changes in wear and %SMH were measured. Data were tested using ANOVA and Tukey's test ($p < 0,05$). The mean values of wear (μm) and %SMH were respectively: GI- 4.82A, 87.45a, GII- 0.14B, 13.47b, GIII- 0.34B, 68.87c,

GIV- 0.41B, 86.12a. The cola drink with biofilm accumulation (GII) promoted greater biofilm fluoride concentration. The data suggest that the presence of dental biofilm can decrease the acid attack of an erosive drink and the association of erosive and cariogenic challenge can reduce the dental enamel alterations (wear and %SMH).

Key words: Dental Caries , Tooth Erosion, Dental Enamel, Tooth Demineralization, Dental Plaque.