UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FERNANDA LYRIO MENDONÇA

**Remineralização e desmineralização erosiva do esmalte
considerando diferentes tempos de ação salivar e dispositivos
intrabuciais – estudo *in situ***

BAURU
2015

FERNANDA LYRIO MENDONÇA

**Remineralização e desmineralização erosiva do esmalte
considerando diferentes tempos de ação salivar e dispositivos
intrabuciais – estudo *in situ***

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Rios

Versão corrigida

BAURU
2015

M523r

Mendonça, Fernanda Lyrio

Remineralização e desmineralização erosiva do
esmalte considerando diferentes tempos de ação
salivar e dispositivos intrabucais – estudo *in situ*.

Fernanda Lyrio Mendonça. – Bauru, 2015

133 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São
Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Rios

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº 556.264
Data: 10/03/2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida. Aqueles que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Aqueles que estiveram ao meu lado em toda essa caminhada.

Aos meus pais, Eduardo e Rita

Agradeço à Deus todos os dias por ter vocês na minha vida. Meus anjos da guarda, que sempre cuidaram de mim e nunca mediram esforços para que eu pudesse ser feliz. Ninguém nesse mundo será capaz de entender o tamanho do nosso amor. Palavras jamais serão suficientes para expressar o tamanho da minha gratidão. Obrigada por tudo, e principalmente, por serem meus maiores exemplos de vida. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Dudu

Pelo companheirismo e palavras de apoio. Obrigada por acreditar em mim e viver esse sonho junto comigo. Para mim, você é um grande exemplo de determinação. Amo você.

Os meus avós, Nicinha e Antônio

Com vocês a minha vida se torna muito mais completa. À minha Vó, obrigada por todas as palavras de carinho e orações. Ao meu Avô, meu segundo pai, obrigada por ser tão maravilhoso comigo. Obrigada pelo incentivo e por sempre fazer parte dos meus sonhos. Obrigada por dividir comigo toda a sua sabedoria e serenidade. Amo muito você!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Pai, obrigada por todas as suas bênçãos. Por me dar sabedoria e me amparar nos momentos difíceis. Acima de tudo, obrigada por nunca deixar que eu perdesse a minha fé. “Ao enxergar tua grandeza e minha pequenez, eu reconheço que minha história é nada sem o teu amor”.

Aos meus pais, Rita e Eduardo, ao meu irmão Dudu e meu avô Antônio

Nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Vocês são tudo de melhor que eu tenho na vida. Sou muito grata a Deus pela família que ele me deu. Obrigada por tudo!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Daniela Rios

Pela orientação e por ser exemplo de amor à profissão. Sou muito grata a você por todas as oportunidades ao longo desses dois anos. Obrigada pela compreensão em momentos diversos, por me ajudar a crescer e me fazer acreditar que todo esforço tem seu valor. Tenha certeza que o meu Mestrado valeu a pena por ter tido você como orientadora. Levarei comigo todos os seus ensinamentos.

À Maisa

Ma, obrigada por te me dado à oportunidade de trabalhar com você. Você é alguém que faz bem ter por perto. Sua bondade e serenidade são admiráveis. Obrigada (de coração), por toda a sua ajuda.

Às alunas de Iniciação Científica, Bianca e Poliana

Muito obrigada por toda ajuda no decorrer da pesquisa. Vocês são muito queridas.

Aos meus voluntários, Franciny, Mariana, Ana Paula, Ana Zingra, Brunna, Maisa, Gabriela, Paola, Priscilla, Poliana, Bianca, Marcela, Clara, Vinícius, João, Larissa, Juliana, Pedro e Mariele

Muito obrigada pela disponibilidade e boa vontade em ajudar. Sem vocês esse estudo não teria acontecido. A todos vocês, minha gratidão!

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, através da sua diretora, Profª Drª Maria Aparecida Andrade Moreira Machado e à comissão de pós-graduação desta instituição, presidida pelo Prof. Dr. Guilherme Janson.

Pelo trabalho desenvolvido em benefício do reconhecimento desta instituição de ensino e do seu programa de pós-graduação

Aos professores da disciplina de odontopediatria da FOB- USP, Profª Drª Salete Moura Bonifácio da Silva, Profª Drª Maria Aparecida Andrade Moreira Machado, Profª Drª Thaís Marchini de Oliveira, Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, Prof. Dr. Thiago Cruvinel,

A vocês, meu agradecimento pela dedicação e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório

Pela disponibilidade em ajudar e pela contribuição com a realização da estatística desse trabalho.

Aos funcionários do departamento de Odontopediatria FOB-USP, Alexandre, Dona Lia, Estela, Evandro, Lílian e Lourisvalda

Pela solicitude e disponibilidade em ajudar.

Ao departamento de Ciências Biológicas - Disciplina de Bioquímica da FOBUSP, na pessoa da Profª Drª Marília Anfonso Rabello Buzalaf

Pela permissão de uso dos equipamentos necessários para realização desse estudo.

Aos funcionários do laboratório de bioquímica da FOB-USP, Aline, Larissa, Thelma

Pela solicitude e disponibilidade em ajudar. Em especial, agradeço a Thelma por toda ajuda e carinho comigo.

Ao Sérgio, funcionário do laboratório de Ortodontia da FOB-USP

Pela confecção dos dispositivos intrabucais mandibulares utilizados nessa pesquisa.

Às instituições de fomento CAPES e FAPESP (Processo nº 2013/15765-2)

Pelo apoio financeiro concedido.

À Central de Esterilização Sterileno

Pela esterilização dos blocos de dentes utilizados nesse estudo.

Aos colegas de pós-graduação

Pela convivência e companheirismo ao longo desses dois anos. Cada um de vocês com um jeito diferente fizeram desse tempo um verdadeiro aprendizado. A vocês, muito obrigada.

Agradeço em especial, aos colegas de pós-graduação orientados pela Prof^a. Dani

Muito obrigada pelos momentos compartilhados e pelos desafios que vivemos juntos. Obrigada pelo trabalho em equipe. Levarei um pouco de cada um de vocês comigo.

Agradeço em especial, as amigas Catarina, Franciny e Mariana

Cati, muito obrigada por tudo. Você é uma amiga muito especial e alguém que eu tenho uma grande admiração. Obrigada pelo apoio e suporte desde o início dessa caminhada. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, pelas horas de estudo, pelas palavras de carinho nos momentos difíceis e acima de tudo, pela sua amizade. Levo você no meu coração e com ela, a certeza de uma amizade verdadeira.

Fran, muito obrigada por tudo que fez por mim ao longo desses dois anos. Sua amizade foi um grande presente que Bauru me deu. Obrigada por estar ao meu lado e por estar sempre presente nos momentos em que eu precisei. Obrigada por me acolher e por ter me dado à oportunidade de conviver com você e toda a sua família. Guardo você e sua família no meu coração. Enfim, muito obrigada pela sua amizade. Tenho certeza que ela irá além de qualquer distância Bauru – Salvador.

Mari, você é a certeza de que Deus coloca as pessoas certas no momento certo. Obrigada pelos momentos que vivemos. Obrigada pela sua amizade e cuidados de mãe, irmã, amiga. Você tem um coração lindo. Alguém que eu quero ter por perto sempre. Muito obrigada por tudo. Não tenho dúvida da força da amizade que construímos e tenho certeza também que ela vai continuar assim independente de qualquer distância.

À amiga Soraia

Sol, tivemos que sair da Bahia para construir nossa amizade em Bauru. Isso é a certeza de que Deus sempre dá um jeito de colocar as pessoas boas no nosso caminho. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e amizade. Você é muito especial.

Ao amigo Julhierme

Juli, assim como Catarina, sua amizade também foi um presente. Obrigada por tudo e principalmente, pelos conselhos, suporte e momentos compartilhados. .

À Paula, Ana Paula, Mariana, Júlia, Maguinha, Jordana, Erika

Vocês foram uma grata surpresa que Bauru me proporcionou. Vocês fizeram meus dias aqui muito melhores e felizes. Obrigada por tudo que vocês fizeram por mim, pelo carinho e momentos que passamos juntas. Quero vocês sempre perto de mim.

À minha amiga Paula

Minha vizi... é difícil falar o quanto sua amizade se tornou especial na minha vida. Eu só tenho que agradecer a Deus por esse presente. Obrigada por tudo. Pela sua amizade, seu carinho, pelas horas de conversa e compreensão. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos. Tenha certeza que você sempre estará no meu coração, independente de qualquer distância física. E mesmo longe, estarei presente todas as vezes que você precisar.

A todos os meus professores da graduação, na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, em especial, aos professores de Odontopediatria

A vocês, o meu carinho e gratidão pelo incentivo e contribuição na minha formação. Obrigada por todas as oportunidades durante os 5 anos de graduação.

À minha querida Professora de graduação, Anna Paula Greck

Você é meu grande exemplo de amor à profissão. Obrigada por me ensinar a amar ainda mais a Odontopediatria e estar ao meu lado desde o início dessa caminhada. Obrigada por todas as oportunidades, pela sua amizade, carinho e incentivo. Obrigada por abrir as portas da sua clínica e da sua vida e por me permitir conviver com um ser humano tão maravilhoso como você. Eu sou muito grata por tudo que fez e faz por mim. Agradeço também a sua família, Bernard, Nany e Clarinha por todo o carinho comigo.

A todos os meus familiares, tias, tios, primas e primos

Muito obrigada pela torcida e orações.

Às minhas amigas de infância Lai, Laurinha, Nanda e Thaci

Obrigada por todo apoio e por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Nossa amizade vale ouro. Vocês são a certeza de que eu sempre terei com quem contar.

À minha irmã Lai

Palavras não são suficientes pra descrever a importância que você tem pra mim. Obrigada por todo carinho e preocupação. Sua amizade é a certeza de que eu nunca estarei sozinha.

À minha amiga Yanna,

Obrigada por se fazer presente na minha vida mesmo de longe. Obrigada pela sua torcida, apoio e palavras de carinho. Você é uma amiga muito importante na minha vida.

À minha amiga Dea

Tampinha, muito obrigada pela sua amizade ao longo desses anos. Obrigada pelas horas no telefone me ouvindo falar e chorar a minha saudade de casa. Obrigada pelo apoio e palavras de incentivo. Enfim, obrigada por ser tão presente na minha vida e fazer por mim só o que os amigos de verdade fazem.

Às amigas Carlinha e Paulinha

Obrigada por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado. Sei que mesmo distantes, nós seremos sempre unidas.

À amiga Vanessa

Nessa, obrigada pelas palavras de carinho e apoio. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelos conselhos dados e por ter sido um suporte em São Paulo.

A Anderson

Muito obrigada pela ajuda, apoio e incentivo nos últimos momentos.

Ao meu primo Roque

Obrigada pela ajuda e por estar sempre presente todas as vezes que eu preciso.

Aos alunos de graduação em Odontologia da FOB-USP

Pela troca de conhecimento nas clínicas.

Aos pacientes

Obrigada pelo carinho, paciência, compreensão e, acima de tudo, por tornarem o aprendizado possível.

“Um dia aprendi que sonhos existem para tornarem-se realidade. E, desde aquele dia, já não durmo pra descansar. Simplesmente durmo pra sonhar.”

Walt Disney

RESUMO

O potencial protetor da saliva tem sido descrito como um importante fator que influencia na patogênese da erosão dentária. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito remineralizador “*in situ*” da saliva sobre lesões iniciais de erosão e a sua capacidade protetora em relação à desmineralização erosiva do esmalte, através da utilização de dispositivos intrabuciais palatino e mandibular em diferentes tempos de avaliação (30 min, 1h, 2h e 12h). Este estudo foi dividido em dois subprojetos, cada um com número amostral de 20 voluntários. No subprojeto I, após a avaliação da dureza de superfície inicial, os blocos de esmalte foram desmineralizados *in vitro* (ácido clorídrico 0,01 M por 30 segundos), selecionados e divididos aleatoriamente entre os 2 dispositivos, sendo utilizado quatro blocos por dispositivo palatino e dois blocos por dispositivo mandibular (2 dispositivos por voluntário/direito e esquerdo). Durante a etapa “*in situ*”, os voluntários foram orientados a utilizar os dispositivos durante o período máximo de 12 horas, de modo que após cada período de tempo pré-determinado, os dispositivos foram removidos da cavidade bucal para retirada dos blocos de esmalte e avaliação imediata da dureza superficial pós remineralização. No Subprojeto II, blocos de esmalte foram selecionados pela dureza de superfície inicial e distribuídos aleatoriamente entre os voluntários de acordo com o fator tempo e tipo de dispositivo intrabucal. Além destes, foi utilizado um grupo controle com blocos não submetidos à ação salivar. Na etapa *in situ*, para cada tempo em avaliação, os voluntários utilizaram os dispositivos com dois blocos de esmalte em cada dispositivo palatino (1 dispositivo por voluntário) e um bloco em cada mandibular (2 dispositivos por voluntário/direito e esquerdo). Imediatamente após cada fase da etapa *in situ*, os blocos (grupos experimentais e controle) sofreram desmineralização erosiva através da imersão em ácido clorídrico durante 30 segundos e, em seguida, a dureza superficial foi avaliada. Os dados foram analisados utilizando ANOVA 2 critérios e teste Tukey – subprojeto I e Kruskal-Wallis e teste Tukey – subprojeto II, considerando $p < 0,05$. No subprojeto I, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) entre os tempos de 30 minutos e 2 horas, o qual não mostrou diferença em relação ao tempo de 12 horas. Não houve diferença na recuperação de dureza dos espécimes mantidos na maxila em relação aos espécimes mantidos na

mandíbula. No subprojeto II, não se observou diferença entre os tipos de dispositivos. Porém, quando os tempos foram comparados entre si, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 30 minutos e 2 horas, o qual não mostrou diferença quando comparado com o período de 12 horas. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando os tempos de 2 horas e 12 horas foram comparados com o grupo controle, tanto para utilização do dispositivo palatino quanto mandibular. Portanto, independente do tipo de dispositivo utilizado, o tempo de 2 horas de exposição salivar apresentou potencial remineralizador, bem como promoveu algum nível de proteção em relação à desmineralização erosiva do esmalte, sendo que um aumento da exposição do esmalte à saliva (12 horas) não aumentou estes efeitos.

Palavras-chave: Erosão dentária, saliva, remineralização, desmineralização.

ABSTRACT

Enamel erosive Remineralization and demineralization considering different times of salivary action and intraoral appliances – *In situ* study

The protective potential of saliva has been described as an important factor that influences the pathogenesis of dental erosion. The aim of this study was to evaluate *in situ* the remineralizing effect of saliva on initial erosion lesions and the protective effect of saliva in relation to erosive enamel desmineralization, using palatal and mandibular appliances in different times of salivary exposure (30 min, 1h, 2h e 12h). This study consisted of two subprojects, each one with a sample size of 20 volunteers. In subproject I, after initial surface hardness evaluation, enamel blocks were demineralized *in vitro* (hydrochloric acid 0.01 M for 30 seconds), selected and randomly assigned between two types of appliances. Four blocks were placed on the palatal device and two blocks for the mandibular appliance (2 appliances per volunteer / right and left). In the *in situ* phase, the volunteers were instructed to use the palatal and mandibular appliances for 12 hours, so that after every predetermined period of time, the enamel blocks were removed from the appliances for immediate evaluation of surface hardness (remineralization surface hardness). In subproject II, enamel blocks were selected using initial surface hardness and randomized among the volunteers according to factors time (30 min, 1h, 2h, and 12h) and types of intrabuccal appliance (palatal and mandibular). A control group with enamel blocks not subjected to salivary effect was also used. In *in situ* phase, the volunteers used intrabuccal appliances with two enamel blocks in the palatal appliance (1 appliance per volunteer) and one block in each mandibular appliance (2 appliances per volunteer / right and left). Immediately after use in each phase, the enamel blocks were desmineralized and the surface hardness was assessed. The data were analyzed using two-way ANOVA and Tukey test – subproject I; Kruskal-Wallis and Tukey test – subproject II, considering $p < 0.05$. In subproject I, was observed a significant difference ($p < 0.0001$) between 30 minutes and 2 hours, which showed no difference comparing to 12 hours. There was no significant difference in hardness recovery between specimens kept in the maxilla and mandibula. In subproject II, no significant

difference was seen between the types of intraoral appliances. However, when times were compared, there was no difference between 30 minutes and 2 hours, which showed no difference compared to the 12 hours. Significant difference was found when the periods of 2 hours and 12 hours were compared with the control group (without exposure to saliva), for both, palatal and mandibular appliances. Therefore, regardless of the type of appliance, 2 hours of salivary exposure showed remineralizing potential, as well as promoted some level of protection in relation to erosive enamel demineralization, and increased enamel exposure to saliva (12 hours) did not increase these effects.

Key words: Tooth erosion, saliva, remineralization, desmineralization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 Distribuição dos grupos em estudo (dispositivo palatino)	48
Figura 2 Distribuição dos grupos em estudo (dispositivo mandibular)	48
Figura 3 Coroa fixada em placa acrílica cristal com godiva termo ativada...	51
Figura 4 Aparelho de corte de precisão montado com discos diamantados e espaçador metálico de 4 mm	51
Figura 5 Corte no sentido cérvico-incisal	51
Figura 6 Corte no sentido méso-distal	51
Figura 7 Obtenção do bloco de esmalte de 4 x 4 mm ² da porção mais plana da coroa	51
Figura 8 Espécime fixado com cera com o esmalte voltado para a placa acrílica para a planificação da dentina	51
Figura 9 Espécime após a planificação da dentina	51
Figura 10 Espécime fixado com cera com a dentina voltada para a placa acrílica para o polimento do esmalte	52
Figura 11 Espécime após o polimento final	52
Figura 12 Microdurômetro acoplado a um microcomputador	53
Figura 13 Penetrador tipo Knoop	53
Figura 14 Determinação dos limites da indentação em esmalte hígido	53
Figura 15 Espécimes embalados antes da esterilização	54
Figura 16 Espécimes embalados após a esterilização	54
Figura 17 Dispositivo intrabucal palatino – Subprojeto I	58
Figura 18 Dispositivo intrabucal mandibular – Subprojeto I	58
Figura 19 Vista intrabucal do dispositivo palatino - Subprojeto I	59
Figura 20 Vista intrabucal do dispositivo mandibular - Subprojeto I	59
Figura 21 Vista lateral do dispositivo mandibular - Subprojeto I	59
Figura 22 Vista oclusal do dispositivo mandibular - Subprojeto I	59
Figura 23 Distribuição dos grupos em estudo (dispositivo palatino)	61
Figura 24 Distribuição dos grupos em estudo (dispositivo mandibular)	61

Figura 25 Dispositivo intrabucal palatino - Subprojeto II	63
Figura 26 Dispositivo intrabucal mandibular - Subprojeto II	63
Figura 27 Vista intrabucal do dispositivo palatino - Subprojeto II	64
Figura 28 Vista intrabucal do dispositivo mandibular - Subprojeto II	64
Figura 29 Vista lateral do dispositivo mandibular – Subprojeto II	64
Figura 30 Vista oclusal do dispositivo mandibular – Subprojeto II	64

GRÁFICOS

Gráfico 1 Mediana, variação interquartil, valores mínimos e máximos referente a mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo palatino.....	71
Gráfico 2 Mediana, variação interquartil, valores mínimos e máximos referente a mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo mandibular	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média e desvio padrão da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo maxilar e mandibular (n = 20).....	70
Tabela 2 Média e desvio padrão da porcentagem de mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo palatino e mandibular (n=20).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E PALAVRAS DE LÍNGUA ESTRANGEIRA

®	Marca Registrada
<i>in situ</i>	do latim, em sítio, no local (no caso, a cavidade bucal)
<i>in vitro</i>	do latim, em laboratório
<i>in vivo</i>	do latim, em ser vivo
pH	Potencial hidrogeniônico
M	Molaridade
%	Por cento
p	Nível de significância
<	Menor do que
min	Minuto
h	Hora
s	Segundo
α	Alfa
β	Beta
n	Número amostral
SH _i	Dureza superficial inicial
SH _d	Dureza superficial pós desmineralização
SH _f	Dureza superficial final
rpm	Rotações por minutos
g	Grama
μ m	Micrometro
cm	Centímetro
mm	Milímetro

mm ²	Milímetro quadrado
ml	Mililitro
kHz	Quilohertz
°C	Grau Celsius
<i>KHN</i>	Valor de dureza Koop
%SHR	Percentual de recuperação de dureza
%SHC	Percentual de perda de dureza
±	Mais ou menos
<i>SD</i>	Desvio padrão
F	Flúor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 Erosão Dentária	31
2.2 Definição e etiologia	31
2.1.1.1 Fatores químicos	33
2.1.1.2 Fatores comportamentais	34
2.1.1.3 Fatores biológicos	34
2.1.1.3.1 Película adquirida	36
2.1.2 Prevenção e modelos de estudo para erosão.....	39
3. PROPOSIÇÃO	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Aspectos éticos	47
4.2 Delineamento experimental	47
Subprojeto I	
4.3 Preparo dos espécimes de esmalte.....	48
4.3.1 Obtenção dos blocos de esmalte, planificação e polimento	48
4.4 Avaliação da dureza superficial inicial (SHi) e seleção dos espécimes de esmalte	52
4.5 Esterilização dos blocos de esmalte	54
4.6 Desmineralização dos blocos de esmalte	54
4.7 Avaliação da dureza superficial pós desmineralização.....	54
4.8 Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos.....	55
4.9 Seleção dos voluntários.....	55
4.10 Avaliação do fluxo salivar não estimulado	56
4.11 Avaliação do fluxo salivar estimulado	55
4.12 Preparo do dispositivo intrabucal palatino	57
4.13 Preparo do dispositivo intrabucal mandibular.....	57
4.14 Procedimentos intrabucais	58
4.15 Avaliação da dureza superficial pós remineralização (SHf) 	60
4.16 Análise estatística	60
Subprojeto II	
4.17 Preparo dos espécimes de esmalte.....	61
4.17.1 Obtenção dos blocos de esmalte, planificação e polimento	61
4.18 Avaliação da dureza superficial inicial (SHi) e seleção dos espécimes de esmalte	62
4.19 Aleatorização dos blocos de esmalte entre os	

grupos.....	62
4.20 Esterilização dos bloco de esmalte	62
4.21 Seleção dos voluntários, avaliação do fluxo salivar não estimulado e estimulado	62
4.22 Preparo do dispositivo intrabucal palatino	63
4.23 Preparo do dispositivo intrabucal mandíbular	63
4.24 Procedimentos intrabucais	63
4.25 Desmineralização erosiva dos blocos de esmalte.....	65
4.26 Análise da dureza superficial final (SHf).....	65
4.27 Análise estatística	65
5. RESULTADOS	69
5.1 Subprojeto I	69
5.2 Subprojeto II	70
6. DISCUSSÃO	75
6.1 Subprojeto I	75
6.1.1 Considerações sobre a metodologia empregada	75
6.1.2 Considerações sobre os resultados.....	77
6.2 Subprojeto II	79
6.2.1 Considerações sobre a metodologia empregada	79
6.2.2 Considerações sobre os resultados	80
7. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	101
ANEXOS	133

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, a erosão dentária foi uma condição pouco explorada por clínicos e pesquisadores (LUSSI, JAEGGI, 2008; LUSI, CARVALHO, 2014). Porém, nos últimos anos, devido ao significativo aumento de sua prevalência (JAEGGI, LUSI, 2006; HUYSMANS *et. al.*, 2011; JAEGGI, LUSI, 2014), muitos estudos tem sido realizados visando uma melhor compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento dessa condição (WIEGAND, ATTIN, 2011; YOUNG, TENUTA, 2011; WEST *et. al.*, 2011; SCHLUETER *et. al.*, 2011).

A erosão dentária é definida como um processo químico que envolve a perda progressiva de tecido dentário duro pelos ácidos intrínsecos e extrínsecos de origem não bacteriana (TEN CATE, INFELD, 1996; GANSS, 2006; LINNETT, SEOW, 2001; LARSEN, 1990). Em lesões iniciais da erosão, ou seja, quando há apenas o amolecimento do esmalte, apesar do ácido promover a perda da sua integridade estrutural e resistência mecânica, esta condição ainda é passível de remineralização (SHELLIS *et. al.*, 2011; HUYSMANS *et. al.*, 2011). Porém, se o desafio erosivo for prolongado, com repetidos eventos de amolecimento, ocorrerá à dissolução das camadas consecutivas dos cristais de esmalte, levando a uma perda permanente do volume da estrutura dentária (SHELLIS *et. al.*, 2011; HUYSMANS *et. al.*, 2011).

Devido à etiologia multifatorial da erosão dentária (LUSSI, 2006; LUSI, JAEGGI, 2006; HARA *et. al.*, 2006; ZERO, LUSI, 2006; MAGALHÃES *et al*, 2009; BUZALAF *et. al.*, 2012; LUSI, CARVALHO, 2014), o conhecimento dos fatores químicos, biológicos e comportamentais é fundamental para a sua prevenção e tratamento (LUSSI, 2006; LUSI, JAEGGI, 2006; HARA *et. al.*, 2006; ZERO, LUSI, 2006; LUSI *et. al.*, 2011; LUSI, CARVALHO, 2014). Dentre os fatores biológicos, o potencial protetor da saliva tem sido descrito em diversos estudos como um importante fator que influencia na patogênese dessa condição (WOËLTGENS *et. al.*, 1985; MANDEL, 1987; HALL *et. al.*, 1999; RIOS *et al.*, 2006; HARA *et. al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2008; BUZALAF *et. al.*, 2012; HARA, ZERO, 2014). Acredita-se que o cálcio, fosfato e flúor presentes na saliva podem assumir o efeito reparador da lesão inicial do esmalte (INFELD, 1996; HARA, ZERO, 2014). Além disso, a saliva pode atuar como um agente de diluição para ácidos, que são gradualmente removidos da cavidade bucal pelo processo de deglutição. (BUZALAF *et. al*, 2012; HARA, ZERO,

2014). A saliva contém ainda uma variedade de proteínas que apresentam propriedades protetoras, especialmente importantes na formação da película adquirida (SIQUEIRA *et. al.*, 2007; HARA, ZERO, 2014), a qual é definida como uma barreira seletiva formada pela adsorção de proteínas e glicoproteínas na superfície da estrutura dentária, que atua minimizando o contato direto entre o ácido e a superfície dentária, reduzindo a dissolução da hidroxiapatita (HANNIG, 2004; HARA *et. al.*, 2006; HANNIG, JOINTER, 2006; SIQUEIRA, 2012; HANNIG, HANNIG, 2014).

A saliva, dependendo da glândula pela qual é secretada, apresenta características distintas em relação a sua qualidade e quantidade (VEERMAN *et. al.*, 1996, ENGELEN, *et. al.* 2003). A glândula parótida produz uma saliva com grande quantidade de amilase e proteínas ricas em prolina, enquanto a saliva secretada pela glândula sublingual/submandibular contém elevada concentração de lisozima e mucina, sendo esta última um importante constituinte da película adquirida (DODDS *et. al.* 2005). Deste modo, a saliva pode promover diferentes níveis de proteção em vários sítios da cavidade bucal (HANNIG, BALZ, 2001). Amaechi *et. al.* (1999), ao realizarem um estudo “*in situ*”, observaram que a taxa de erosão foi significativamente menor na superfície lingual de dentes inferiores quando comparada com a superfície palatina de dentes superiores, devido a maior espessura da película adquirida nessa superfície, sendo essa condição atribuída ao fato da superfície lingual dos dentes inferiores estarem constantemente banhadas pela saliva produzida pela glândula sublingual/mandibular.

Deste modo, os estudos desenvolvidos para avaliar métodos preventivos para a erosão deveriam ser idealmente, conduzidos *in vivo* (WEST *et. al.*, 1998; WEST *et. al.*, 2011). No entanto, os estudos *in vivo* são reconhecidos por sua dificuldade em promover mensurações precisas da perda de tecido dentário. Outros fatores que inviabilizam a aplicabilidade de estudos clínicos em erosão incluem incertezas sobre o padrão de progressão da lesão, implicando na necessidade de estudos de longa duração e falta de controle sobre a exposição ao desgaste, o que torna difícil a avaliação da erosão isoladamente.

Assim, os modelos *in vitro* e *in situ* foram desenvolvidos para superar os desafios impostos pelos estudos *in vivo*. Os modelos *in situ* oferecem a vantagem de permitir o controle do desafio erosivo, mas também expõem as amostras ao ambiente bucal (WEST *et. al.*, 2004; ZERO *et. al.*, 2006; AMAECHI *et. al.*, 2010;

WEST *et. al*, 2011). Geralmente os modelos *in situ* apresentam duas abordagens: dispositivos removíveis de uso contínuo ou intermitente, ou aparelhos fixos que são usados continuamente (WEST *et. al*, 2011). No entanto, não existe uma padronização de modelo experimental, havendo variações quanto ao tempo de remineralização, tempo de formação da película adquirida e tipo de dispositivo intrabucal, entre outros. Sabe-se que estes fatores podem influenciar na intensidade de alteração do esmalte resultante do desafio erosivo, o que também poderá influenciar no efeito de medidas preventivas em estudo. Assim sendo, ainda existem lacunas quanto à influência da ação salivar entre os desafios erosivos, a influência de diferentes tempos de formação da película adquirida no resultado final de um modelo *in situ*, bem como o comportamento de diferentes dispositivos intrabucais na remineralização e desmineralização erosiva do esmalte.

O presente grupo de pesquisa realizou estudos pilotos comparando o potencial remineralizador da saliva em diferentes tempos de permanência do dispositivo no ambiente bucal (GONÇALVES *et. al.*, 2013) além de avaliar dispositivos palatinos em relação aos mandibulares (ALENCAR *et. al.*, 2013). Não foi encontrada diferença significativa entre os tempos de remineralização avaliados (15, 30, 60, 120 min), contudo este resultado pode ter ocorrido em função da avaliação da remineralização em diferentes blocos de esmalte para cada tempo avaliado, mascarando as diferenças entre os tempos de remineralização. Além disso, constatou-se que o tipo de dispositivo mandibular utilizado foi desconfortável e não foi observada diferença estatística significativa, porém a força do estudo foi baixa, determinando a necessidade de um estudo com maior número amostral e com outro tipo de dispositivo mandibular.

Desta forma, considerando a importância do tema, torna-se oportuno avaliar o comportamento da saliva, película adquirida e tipo de dispositivo intrabucal no desenvolvimento e progressão de lesões iniciais de erosão assim como o potencial protetor desses fatores diante de desafio erosivo, buscando resultados que norteiem o delineamento de futuros estudos no que se refere à prevenção e controle da erosão dentária.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Erosão dentária

2.1.1. Definição e etiologia

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de melhor compreender o processo envolvido no desenvolvimento do desgaste dentário (WIEGAND, ATTIN, 2011; HUYSMANS, 2011). O termo desgaste dentário é definido como um processo cumulativo e multifatorial, o qual resulta na perda de tecido dentário duro devido à ação sinérgica da erosão, atrição e abrasão (WIEGAND, ATTIN, 2011; GANSS, 2006). Muitos dados epidemiológicos, estudos *in vitro* e *in situ* tem sugerido que dos três processos de desgaste, a erosão dentária é considerada a ameaça mais comum para a perda de tecido dentário (NUNN, 2000; ZERO, LUSSI, 2000).

A erosão dentária é definida como um processo químico que envolve a perda progressiva e crônica de tecido dentário duro pelos ácidos intrínsecos e extrínsecos de origem não bacteriana (TEN CATE, IMFELD, 1996; LINNETT, SEOW, 2001; GANSS, 2006). Em lesões iniciais da erosão, ou seja, quando há apenas o amolecimento do esmalte, apesar do ácido promover a perda da sua integridade estrutural e resistência mecânica, esta condição ainda é passível de remineralização (SHELLIS *et. al.*, 2011; HUYSMANS *et. al.*, 2011; LUSSI, CARVALHO, 2014). Porém, se o desafio erosivo for prolongado, com repetidos eventos de amolecimento, ocorrerá a dissolução das camadas consecutivas dos cristais de esmalte, levando a uma perda permanente do volume da estrutura dentária (SHELLIS *et. al.*, 2011; HUYSMANS *et al.*, 2011; LUSSI, CARVALHO, 2014).

Diante de um desafio erosivo, o esmalte e a dentina são acometidos de maneiras diferentes (LUSSI *et. al.*, 2011; MAGALHÃES *et. al.*, 2009). Devido ao teor mineral elevado, a erosão do esmalte promove uma desmineralização parcial na superfície levando ao amolecimento e aumento da rugosidade. A dentina, por apresentar um menor conteúdo mineral e maior quantidade de matéria orgânica, apresenta inicialmente desmineralização na fronteira entre a dentina peritubular e intertubular. Em seguida, ocorre a perda de dentina peritubular, alargamento dos túbulos dentinários e a desmineralização da dentina intertubular com exposição da matriz orgânica (SELVIG, 1968; MEURMAN *et. al.*, 1991; KINNEY *et al.*, 1995).

Portanto, existem algumas diferenças na estrutura anatômica dos dentes decíduos em comparação com os dentes permanentes (JAEGGI, LUSI, 2006; MAGALHÃES *et. al.*, 2009; JAEGGI, LUSI, 2014; CARVALHO *et. al.*, 2014). O esmalte dos dentes decíduos é menos espesso e devido a isso, o processo erosivo atinge a dentina anteriormente e conduz a uma lesão avançada após um curto período de exposição a ácidos. No entanto, os estudos mostram resultados contraditórios no que diz respeito à suscetibilidade dos dentes decíduos à erosão dentária (HUNTER *et. al.*, 2000a; HUNTER *et. al.*, 2000b; LUSI *et. al.*, 2000). Amaechi *et. al.*, (1999) analisaram a perda de substância de dentes decíduos e permanentes após imersão em suco de laranja. Os resultados mostraram que a progressão das lesões de erosão foi 1,5 vezes maior no esmalte da dentição decídua em comparação com a da dentição permanente. Contrariando esses resultados, Lippert *et. al.*, (2004) ao investigarem o efeito de 4 bebidas diferentes sobre o esmalte, observaram que o esmalte de dentes decíduos não foi mais suscetível à erosão quando comparado com o esmalte de dentes permanentes.

O diagnóstico das lesões iniciais de erosão é bastante difícil, uma vez que o paciente apresenta poucos sinais e pouco ou nenhum sintoma. Além disso, não existe nenhum tipo de dispositivo disponível para a detecção clínica precoce, sendo o aspecto clínico, o principal recurso responsável por auxiliar no diagnóstico dessas lesões (LUSI *et. al.*, 2006; LUSI, JAEGGI, 2008). Clinicamente, observa-se que na face vestibular ou lingual do dente, o esmalte apresenta aparência lisa e vítrea, com ausência de periquimácias e presença de esmalte intacto na margem gengival (LUSI, JAEGGI, 2008). Acredita-se que o esmalte preservado na margem gengival é devido à presença de placa bacteriana nessa região, a qual funciona como uma barreira para a difusão de ácidos (SCHWEIZER-HIRT *et. al.*, 1978; HONÓRIO *et. al.*; 2008; HONÓRIO *et. al.*, 2010). Outro fenômeno também considerado é a ação neutralizante do fluido sulcular, o qual apresenta pH entre 7,5 – 8,0 (STEPHEN *et. al.*, 1980). Em fases mais avançadas, pode-se observar o desenvolvimento de uma concavidade no esmalte, cuja largura excede claramente a sua profundidade. No que diz respeito à face oclusal, a progressão da erosão causa um arredondamento das cúspides, elevação das restaurações acima do nível das superfícies dos dentes adjacentes ou até mesmo o desaparecimento de toda a morfologia, nos casos mais severos (LUSI, JAEGGI, 2008).

Os ácidos responsáveis pelo desenvolvimento da erosão dentária podem ser de origem intrínseca ou extrínseca (AMAECHI, HIGHAM, 2005). Dentre os ácidos extrínsecos, pode-se citar a dieta ácida, medicamentos de uso crônico, drogas ilícitas, uso abusivo de bebidas alcoólicas, água de piscinas excessivamente cloradas ou fumaças industriais (SHAW *et. al.*, 1998; AMAECHI, HIGHAM, 2005). Os fatores etiológicos intrínsecos incluem distúrbios associados com a presença de ácido gástrico na cavidade oral, tais como vômitos ou de refluxo gastro-esofágico, sendo o desgaste dentário erosivo uma manifestação comum em pacientes que sofrem de desordens orgânicas ou psicossomáticas, como anorexia ou bulimia nervosa (BARTLETT, 2006; MAGALHÃES *et. al.*, 2009).

Devido à etiologia multifatorial da erosão dentária, o conhecimento dos fatores químicos, comportamentais e biológicos é de grande importância para entender o processo envolvido no desenvolvimento dessa condição (LUSSI, 2006; MAGALHÃES *et. al.* 2009; HUYSMANS *et. al.*, 2011; BUZALAF *et. al.*, 2012). Portanto, considerando esses aspectos, o diagnóstico da erosão deve ser fundamentado a partir da história completa do paciente, a qual deverá abordar aspectos relacionados à saúde geral, dieta e hábitos, bem como avaliação do fluxo salivar (LUSSI, JAEGGI, 2008).

2.1.1.1 Fatores químicos

Os fatores químicos estão relacionados com as propriedades do agente erosivo e exercem influência direta no desenvolvimento da erosão dentária. (LUSSI, JAEGGI, 2008; MAGALHAES *et al.*, 2009). Muitos estudos *in vitro* e *in situ* mostram que o potencial erosivo de diferentes alimentos e bebidas ácidas não é exclusivamente dependente do seu valor de pH, sendo influenciado também pelo seu teor de minerais, sua capacidade tampão e propriedade quelante (HOLLOWAY *et. al.*, 1958; GRANDO, *et. al.*, 1986; MAUPOMÉ *et. al.*, 1998).

O valor do pH e o conteúdo de cálcio, fosfato e flúor contido em uma bebida ou alimento ácido determina o grau de saturação em relação ao conteúdo mineral do dente (ZERO; LUSSI, 2005; BARBOUR *et al.*, 2011). Quando o pH da solução é inferior ao pH crítico, pode-se dizer que a solução encontra-se subsaturada, podendo provocar a dissolução do esmalte. Caso contrário, se o pH da solução estiver acima do pH crítico, a solução ficará subsaturada, podendo levar a precipitação (FEATHERSTONE, LUSSI, 2006; LUSSI *et al.*, 2011). No entanto,

apesar de a erosão dentária ocorrer em baixos valores de pH, não existe um valor de pH crítico definido, visto que ele varia de acordo com a composição mineral de cada tipo de solução erosiva (LUSSI, CARVALHO, 2014). Alguns trabalhos citam o iogurte como um exemplo de alimento que praticamente não tem qualquer efeito erosivo, pois apesar do seu baixo pH (4.0), o elevado teor de cálcio e fosfato torna-o supersaturado com em relação à hidroxiapatita (LUSSI, JAEGGI, 2006).

A capacidade de uma solução ácida dissolver a estrutura dentária depende da sua capacidade tampão, a qual está relacionada com a concentração de ácido não dissociado em bebidas e alimentos (GRAY, 1962). Quanto maior a capacidade de tamponamento da bebida ou comida ácida, mais tempo será necessário para a saliva neutralizar o ácido, aumentando a quantidade de mineral dental que poderá ser dissolvido (LUSSI *et. al.*, 2004; LUSSI *et. al.*, 2011). Além disso, deve-se também levar em consideração que as bebidas podem apresentar propriedade quelante, e devido a isso, podem se ligar aos íons cálcio do substrato dental e da própria saliva, favorecendo o processo de desmineralização (LUSSI, JAEGGI, 2006).

2.1.1.2 Fatores comportamentais

Devido a uma mudança nos hábitos dietéticos da população, o consumo frequente e excessivo de bebidas e alimentos ácidos tem sido associado ao aumento do risco de erosão (LUSSI *et. al.*, 2004; BARTLETT, 2006; MAGALHÃES *et. al.*, 2009).

Durante e após um desafio erosivo, os fatores comportamentais desempenham um papel importante na modificação do grau de desgaste dentário (LUSSI, JAEGGI, 2008). A frequência e a duração do desafio erosivo são variáveis importantes para o desenvolvimento da erosão (EISENBURGER, ADDY, 2001; WEST *et. al.*, 2000). A utilização de mamadeira com bebidas ácidas durante a noite tem sido relatada como fator de risco para o desenvolvimento da erosão, uma vez que nesse período o fluxo salivar encontra-se diminuído (LUSSI, 2006). Além disso, a maneira pela qual as bebidas ácidas são introduzidas na boca também deve ser considerada, uma vez que influencia no tempo de contato do dente com o agente erosivo (BASSIOUNY, YANG, 2005).

A dieta lactovegetariana, que inclui o consumo de alimentos ácidos, tem sido associada a uma maior prevalência de erosão dentária (GANSS *et. al.*, 1999).

Além dos ácidos na dieta, os pacientes devem estar cientes dos fatores de estilo de vida pouco saudáveis, como o consumo de drogas, abuso de álcool, os quais também podem aumentar o risco de erosão (ZERO, LUSI, 2006).

Alguns estudos têm relatado uma associação entre as atividades esportivas e erosão dentária. Os grupos de risco são os nadadores, devido ao fato de se exercitarem em água com baixo pH, além dos atletas que fazem uso de bebidas esportivas em excesso (LUSI, JAEGGI, 2006; LUSI, JAEGGI, 2008).

No que diz respeito à exposição ao ácido ambiental, tem sido relatado um aumento do risco de erosão dentária em trabalhadores de indústrias de bateria, que são comumente expostos ao ácido sulfúrico ou clorídrico (WIEGAND, ATTIN, 2007; MAGALHAES *et. al.*, 2009). O uso de equipamentos de proteção (máscaras respiratórias) é considerado uma importante estratégia preventiva para diminuir a erosão ocupacional (WIEGAND, ATTIN, 2007).

2.1.1.3 Fatores biológicos

A saliva tem sido descrita como o fator biológico mais importante na prevenção da erosão dentária (HARA, LUSI, 2006; HARA, ZERO, 2014). É constituída de componentes orgânicos e inorgânicos, sendo secretada por três pares de glândulas salivares maiores (parótida, sublingual e submandibular), além de inúmeras glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000). Sabe-se que com o aumento do fluxo salivar, ocorre uma maior concentração dos componentes orgânicos e inorgânicos na saliva, os quais proporcionam um ambiente favorável para diminuição ou prevenção do desafio erosivo (LUSI, HARA, 2006).

Entre os componentes inorgânicos, o bicarbonato e os íons cálcio e fosfato apresentam grande importância por serem responsáveis pelo aumento da capacidade tampão da saliva e pela manutenção da integridade mineral da estrutura dentária, respectivamente (DAWES, KUBIENIEC, 2004; BUZALAF *et. al.*, 2012). No que diz respeito ao conteúdo orgânico, a saliva apresenta uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas, as quais podem exercer influência no ambiente bucal através de diferentes aspectos (DODDS *et. al.*, 2005). A maioria das proteínas contém níveis elevados de prolina (35-40%), e devido a isso, são designadas como proteínas ricas em prolina, as quais compreendem cerca de 70% do conteúdo total de proteínas salivares secretadas pela glândula parótida (DODDS *et. al.*, 2005). Além dessas, a saliva contém estaterina, histatina e mucina, sendo esta última a

principal proteína orgânica presente na saliva secretada pela glândula sublingual/submandibular (NIEW *et. al.* 1987; SCHUPBACH *et. al.*, 2001). A mucina, além de apresentar propriedades como a de lubrificação e aglutinação de bactérias, é considerada como a principal constituinte da película adquirida (NIEW *et. al.*, 1987; SCHUPBACH *et. al.*, 2001).

A saliva humana apresenta a capacidade de proteger o esmalte contra desafios erosivos por meio da ação de limpeza e capacidade tampão e pela formação da película adquirida na superfície dentária (LENDENMANN *et. al.*, 2000; HANNIG *et. al.*, 2009; ZWIER *et. al.*, 2013; BUZALAF *et. al.*, 2012; HARA, ZERO, 2014). Além disso, o nível de bicarbonato na saliva é positivamente relacionado com a taxa de fluxo salivar, o que significa que a saliva produzida em alto fluxo apresenta maior pH e maior capacidade de tamponamento (MOSS, 1998). Sendo assim, devido as suas propriedades, a saliva favorece o processo de remineralização e diminui a taxa de desmineralização (JAEGGI, LUSSI, 1999; HALL *et. al.*, 1999; HARA *et. al.*, 2003; HARA *et. al.*, 2006). Estudo prévio, comparando modelos de erosão *in vitro* (sem proteção salivar) e *in situ*, reforçou a relevância da saliva no processo erosivo, uma vez que os resultados mostraram que a erosão do esmalte foi dez vezes menor no modelo *in situ* (WEST *et. al.*, 1998).

2.1.1.3.1 Película Adquirida

A película adquirida é definida como um filme orgânico formado pela adsorção de proteínas e glicoproteínas na superfície dentária (LENDENMANN *et. al.*, 2000; HANNIG *et. al.*, 2004; HANNIG, JOINER, 2006; SIQUEIRA *et. al.*, 2012). Acredita-se que a sua formação ocorra em duas fases. Inicialmente, após alguns segundos de exposição da estrutura dentária ao ambiente bucal, as proteínas precursoras (estaterinas, histatinas, proteínas ricas em prolinas) se aderem seletivamente à superfície do esmalte através de interações eletrostáticas, formando uma camada de proteína de 10-20 nm de espessura (HAY, 1973; SKJORLAND *et. al.*, 1995; HANNIG, BALZ 1999; HANNIG, JOINTER, 2006; LENDENMANN *et. al.*, 2000; HANNIG *et. al.*, 2009; SIQUEIRA *et. al.*, 2012). Em um segundo momento, ocorre um rápido aumento na espessura da película (100-1000 nm) devido à interação de agregados de proteínas ou estruturas semelhantes às micelas, com a camada formada inicialmente (SKJORLAND *et. al.*, 1995; HANNIG, BALZ, 1999; YOUNG *et. al.*, 1999; VITKOV *et. al.*, 2004; SIQUEIRA *et. al.*, 2012).

Diante de um desafio erosivo, a película adquirida funciona como uma barreira seletiva, a qual minimiza o contato direto do agente erosivo com a superfície dentária, reduzindo a taxa de dissolução da hidroxiapatita (AMAECHI *et. al.*, 1999; HANNIG, BALZ, 1999; MAUPOME *et. al.*, 1999; HANNIG, BALZ, 2001; HANNIG *et. al.*, 2004; LENDENMANN *et. al.*, 2000; HARA *et. al.*, 2006; SIQUEIRA *et. al.*, 2010; HANNIG, HANNIG, 2014; HARA, ZERO, 2014). Um estudo conduzido por Nekrashevych e Stösser (2003), objetivou avaliar o potencial protetor da película adquirida formada 24 horas *in vitro*. Blocos de esmalte bovino, após formação da película adquirida, foram submetidos a desafio erosivo com ácido cítrico (0,1 ou 1,0%) por 1, 5 ou 10 min. Mediante os resultados, os autores concluíram que uma pequena exposição ao ácido cítrico 0,1% não causou mudanças significativas na dureza do esmalte coberto pela película. No entanto, o efeito protetor da película foi perdido após 10 minutos de exposição a 1,0% de ácido cítrico. Hannig e Balz (1999), ao realizarem um estudo *in situ*, observaram que uma película formada por 24 horas mostrou alguma proteção contra o desafio erosivo com ácido cítrico (0,1-1%) realizado até 5 min.

Apesar de a película adquirida interferir no processo de desmineralização erosiva da superfície dentária, a eficácia dessa proteção é dependente de suas propriedades físicas, tais como espessura e tempo de maturação (NYVAD, FEJERSKOV, 1987; VUKOSAVLJEVIC *et. al.*, 2014), bem como a sua localização na cavidade bucal (AMAECHI *et. al.*, 1999; HANNIG, BALZ, 1999). Além disso, a formação da película apresenta uma grande variabilidade interindividual (FINKE *et. al.*, 2002).

A espessura da película varia amplamente em toda cavidade bucal, sendo mais espessa nas superfícies linguais dos dentes inferiores, visto que essa região é constantemente banhada pela saliva secretada pela glândula sublingual/submandibular (CARLEN *et. al.*, 1998). Amaechi *et. al.* (1999) em um estudo *in situ*, mostraram que a película formada após 1 hora de exposição intrabucal apresentou espessura cerca de 0,96 -1,06 μm na superfície lingual de dentes inferiores, enquanto que na superfície palatina essa espessura foi cerca de 0,3-0,38 μm . Esses autores acreditam que a formação de uma camada mais fina de película na superfície palatina dos dentes superiores pode ser devido ao fato de que essa região é pouco banhada pela saliva, além de ser submetida a uma maior fricção da língua durante a fala e deglutição. Portanto, a variação na espessura da

película dentro dos arcos dentários e dos dentes apresenta grande relevância na determinação da gravidade da erosão, bem como dos sítios mais suscetíveis.

A película adquirida é capaz de alcançar a sua espessura total no período de 2 horas (HANNIG, JOINER, 2006). Hara *et. al.* (2006a) demonstraram em estudo *in situ* que a película adquirida formada por duas horas na superfície do esmalte foi capaz de reduzir a desmineralização erosiva provocada por suco de laranja em até dez minutos de exposição. Apesar disso, tem sido sugerido que alguma modificação estrutural ocorre após este período como parte do processo de amadurecimento da película, tornando-a mais resistente ao ácido. Considerando esse aspecto, HANNIG *et. al.* (2005), realizaram estudo piloto comparando o efeito protetor da película formada *in situ* em diferentes tempos (2 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas) após exposição a ácido cítrico a 1,0%. Os autores concluíram mediante os resultados que, dependendo do tempo de formação, as películas apresentaram comportamentos distintos. Portanto, a película formada por 2 horas foi dissolvida e separada da superfície do esmalte em maior extensão quando comparada com as películas formadas por 6, 12 e 24 horas, indicando que resistência aos ácidos da película aumenta de acordo com a sua maturação. Em outro estudo, observou-se que quando películas formadas por um período de 24 horas e 7 dias foram comparadas, não houve diferença significativa na capacidade de proteção de ambas (HANNIG, BALZ, 1999). Alguns autores têm demonstrado que películas desenvolvidas ao longo de 1h hora podem oferecer máxima proteção contra a desmineralização, não havendo diminuição do desgaste erosivo quando tempos de maturação mais longos são utilizados (AMAECHI *et. al.*, 1999; NIEW *et. al.*, 1987; HANNIG *et. al.*, 2003; WETTON *et. al.*, 2006). Wetton *et. al.* (2006), realizaram um estudo *in vitro* com o intuito de determinar o menor tempo de exposição salivar capaz de reduzir a erosão do esmalte. Para tanto, as amostras foram pré- tratadas com saliva humana não estimulada por períodos de 2 min, 30 min, 1 hora, 2 horas ou 4 horas e em um segundo momento foram expostas a ácido cítrico a 0,3%, pH 3,2, durante 10 minutos, sendo esse ciclo realizado doze vezes. Em conclusão, o estudo mostrou que 1 hora de pré-tratamento das amostras com saliva promoveu máxima proteção contra a erosão.

O estudo conduzido por HANNIG *et. al.* (2004) não encontrou nenhuma diferença no efeito protetor entre películas formadas após 3 minutos e 2 horas, respectivamente. Isso pode ser atribuído ao fato de que após alguns segundos de

exposição da estrutura dentária ao meio bucal ocorre a formação de uma densa camada basal de película adquirida (HANNIG *et. al.*, 2009). Considerando a menor densidade das camadas subsequentes quando comparada a camada basal, observa-se que, diante de um desafio erosivo, as camadas externas da película são removidas em extensões diferentes de acordo com a região da cavidade bucal, ao passo que a película basal não é afetada (HANNIG, JOINER, 2006).

Embora tenha sido demonstrado que a película adquirida pode interferir no processo de desmineralização erosiva do esmalte, pouco se sabe sobre a eficácia dessa película em indivíduos suscetíveis à erosão. Acredita-se que a película alterada sobre o esmalte pode funcionar como um fator de risco para o desenvolvimento do desgaste erosivo nesses indivíduos (MOAZZEZ *et. al.*, 2014). Devido a isso, Moazzez *et. al.* (2014), realizaram um estudo com o objetivo de comparar o possível efeito protetor da película adquirida formada *in vivo* por pacientes como e sem sinais de erosão. Os resultados mostraram que a mudança na microdureza foi estatisticamente menor nos indivíduos sem erosão, sugerindo que algum componente da película ofereceu proteção contra a ação do agente erosivo. Assim sendo, o conhecimento dos componentes e propriedades da saliva e película pode impulsionar o desenvolvimento de medidas preventivas destinadas a reforçar os seus efeitos benéficos nos estágios iniciais de erosão (SANTOS 2013; DELECRODE, 2015).

2.1.2 Prevenção e modelos de estudo para erosão

Muitos estudos têm sido realizados com intuito de avaliar métodos preventivos para a erosão dentária (JAEGGI, LUSSI, 2006; HUYSMANS *et. al.*, 2011; JAEGGI, LUSSI, 2014). Para tal, diferentes tipos de dispositivos intrabucais que carregam blocos de dentes são utilizados. (WEST *et. al.*, 1998; AMAECHI *et al.*, 2000; WEST *et. al.*, 2004; ZERO *et al.*, 2006; AMAECHI *et al.*, 2010). Esses dispositivos apresentam duas abordagens: removíveis de uso contínuo ou intermitente, ou aparelhos fixos que são usados continuamente (WEST *et. al.*, 2011).

Em dispositivos palatinos, os espécimes devem ser idealmente colocados em regiões nas quais a erosão ocorre com maior frequência, como as superfícies palatina e oclusal. No entanto, a localização dos espécimes em tais áreas pode interferir na oclusão. De acordo com Hooper *et. al.* (2006) os espécimes colocados na região palatina em uma posição mais anterior mostrou mais erosão do que os

espécimes colocados posteriormente, porém, as diferenças não foram significativas. Dispositivos intrabucais inferiores também têm sido sugeridos como um modelo apropriado para estudos de erosão (WEST *et. al.*, 2011).

O desenho do dispositivo intrabucal e sua localização na boca é influenciado pela necessidade de prevenir significativo acúmulo de placa e para proteger amostras de abrasão (WEST *et. al.*, 2011). Estudos anteriores usaram métodos diferentes para evitar a influência de abrasão sobre os espécimes, tais como a colocação de fios de retenção (WEST *et. al.*, 1998). Amaechi *et. al.* (2010) realizaram estudo *in situ* utilizando dispositivos intrabucais confeccionados a partir de aparatos ortodônticos, posicionando os espécimes cerca de 0,5 mm abaixo da superfície de contato da banda ortodôntica. Além disso, é importante ressaltar que o posicionamento dos espécimes e do dispositivo intrabucal deve ser padronizado em todos os indivíduos (SHELLIS *et. al.*, 2011).

Diversas terapias para avaliar a eficácia dos métodos de prevenção são inicialmente testadas usando protocolos *in vitro* (IONTA *et. al.*, 2013). Entretanto, o modelo *in situ* tem apresentado vantagens no que diz respeito ao controle do desafio erosivo e exposição das amostras em estudo ao ambiente bucal (WEST *et. al.*, 2004; WEST *et. al.*, 2011; ZERO *et. al.*, 2006, AMAECHI *et. al.*, 2010), visto que a saliva pode influenciar no desenvolvimento e progressão da erosão dentária.

Alguns estudos *in situ*, apesar de utilizarem a saliva como agente remineralizante, não estabelece o tempo necessário para que ocorra a remineralização. No estudo conduzido por Rios *et. al.* (2009), que avaliou o potencial erosivo de dois refrigerantes tipo cola (light e normal), os voluntários utilizaram dispositivo intrabucal palatino contendo blocos de esmalte por um período de 14 dias. Entretanto, no que diz respeito ao tempo diário de uso do dispositivo, os voluntários foram orientados a utilizar o aparelho de forma contínua, removendo-os da cavidade bucal apenas para a realização dos desafios, das refeições e da higiene bucal. Ao contrário desse estudo, no trabalho previamente realizado por West *et. al.* (1998), os voluntários utilizaram o dispositivo intrabucal apenas durante o dia (9 às 17 horas), removendo-o por um período de 1 hora durante o almoço.

Considerando esses aspectos, torna-se importante avaliar a influência da ação salivar entre os desafios erosivos, bem como o comportamento de diferentes dispositivos intrabucais na remineralização e desmineralização erosiva do esmalte, com objetivo de buscar resultados que norteiem a realização de futuros estudos.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito remineralizador “*in situ*” da saliva sobre lesões iniciais de erosão e a capacidade protetora da mesma em relação à desmineralização erosiva do esmalte hígido, por meio da utilização de dispositivos intrabucais palatino e mandibular em diferentes tempos de avaliação (variável de resposta – dureza).

Especificamente foram avaliados:

Subprojeto I:

- O potencial remineralizador da saliva sobre o esmalte com lesão inicial de erosão após diferentes tempos de utilização do dispositivo intrabucal *in situ* (30 min, 1h, 2h, 12h);
- A diferença no grau de remineralização do esmalte utilizando dispositivos intrabucais palatino ou mandibular.

Subprojeto II:

- A capacidade protetora da saliva em função dos diferentes tempos de permanência do dispositivo intrabucal *in situ* (30 min, 1h, 2h e 12h), quando o esmalte hígido é submetido a desafio erosivo inicial *in vitro*.
- A diferença no efeito protetor da saliva utilizando dispositivos intrabucais palatino ou mandibular *in situ*, previamente a desafio erosivo inicial do esmalte *in vitro*.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo de pesquisa do presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP), recebendo parecer favorável (Anexo 1). Os voluntários participaram da pesquisa após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo *in situ* foi dividido em dois subprojetos de acordo com os objetivos específicos propostos, cada um com uma amostra formada por 20 voluntários.

Subprojeto I

Um total de 160 blocos de esmalte foi selecionado pela dureza de superfície inicial (SMH inicial) e posteriormente pela lesão inicial de erosão (desmineralização *in vitro* - ácido clorídrico 0,01 M por 30 segundos). Os blocos foram distribuídos aleatoriamente entre os 20 voluntários de acordo com o fator tempo de remineralização (em 4 níveis: 30 min, 1h, 2h e 12h) e tipo de dispositivo intrabucal (em 2 níveis: palatino e mandibular) (Figuras 1 e 2). Para o fator tempo de remineralização foram utilizados os mesmos blocos de esmalte, com medidas repetidas em diferentes momentos, sendo utilizado quatro blocos por dispositivo intrabucal palatino (1 dispositivo por voluntário) e dois blocos por dispositivo mandibular (2 dispositivos por voluntário/direito e esquerdo).

O número de voluntários foi estipulado considerando 8 grupos em estudo com uma diferença minimamente detectável de 30% de remineralização, desvio padrão de 13,83% (GONÇALVES et al, 2013), erro α de 5% e erro β de 20%. Sendo assim, foi determinado o número de 7 voluntários. Entretanto, considerando a possibilidade de perda, 20 voluntários participaram do presente estudo.

Durante a etapa *in situ*, os voluntários foram orientados a utilizar os dispositivos removíveis (palatino e mandibular) em diferentes tempos de exposição salivar (30 min, 1h, 2h, 12 h), com o intuito de avaliar a capacidade remineralizadora

da saliva. Ao final de cada intervalo de tempo, os 8 blocos de esmalte (4 por dispositivo) foram removidos dos dispositivos para avaliação da dureza superficial. As medições correspondentes aos tempos de remineralização foram realizadas nos mesmos blocos de esmalte (medidas repetidas).

Figuras 1 e 2: Distribuição dos grupos em estudo.

4.3. PREPARO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE

4.3.1. Obtenção dos blocos de esmalte, planificação e polimento dos espécimes

Um total de 300 dentes bovinos extraídos de gado da raça Nelore, com idade média de 36 meses e abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru, SP foram utilizados no presente estudo. Previamente, os dentes passaram por um processo de seleção, sendo eliminados aqueles que apresentavam trincas, rachaduras e espessura de dentina muito delgada. Com o intuito de remover todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície, os dentes foram limpos com curetas periodontais e em seguida, mantidos em solução de tymol 0,1% (pH 7,0) até o corte e obtenção dos blocos.

Inicialmente, com o auxílio de um torno para polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni / Série 16.223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ), as raízes foram separadas de suas coroas por meio de uma secção na porção cervical. Em seguida, as coroas foram fixadas com godiva termooativada (Kerr Corporation, made in U.S.A.) em uma pequena placa de acrílico (40 x 40 x 5 mm³) (Figura 3). A placa de acrílico foi parafusada em um aparelho de corte de precisão (ISOMET Low Speed Saw

,Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) (Figura 4) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face (XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7 mm³ Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, os dentes foram seccionados no sentido cérvico-incisal (Figura 5) e no sentido mésio-distal (Figura 6), para obtenção de blocos de esmalte de 4 x 4 mm² da porção mais plana da coroa (Figura 7). Com o objetivo de realizar a planificação da dentina, os fragmentos 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 (Figura 8). Com auxílio de um instrumento PKT (Duflex 55G/SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, SP), os blocos foram fixados colocando-se cera para técnica de enceramento progressivo (Pasom Ind. e Com. de Materiais para Fundição Ltda, São Paulo, SP, Brasil) ao redor do espécime. Cuidado especial foi tomado para que a cera não escoasse entre o esmalte e o acrílico. Após a fixação, o conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (Arotec, Aropol 2v, Cotia, SP, Brasil), com sistema de polimento múltiplo, capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova, permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico onde os espécimes foram fixados. Neste procedimento de planificação, uma lixa de silicone carbide de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler) sob refrigeração com água deionizada foi utilizada, até que os fragmentos obtivessem espessura de aproximadamente 3 mm (Figura 9). Assim, a politriz foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86g, durante 30 segundos a 2 minutos, variando de acordo com o desgaste da lixa. Posteriormente, os blocos foram removidos dos discos de acrílico, os quais foram limpos com xilol (Merck, Darmstadt, Germany) para retirar todo resíduo de cera. Os blocos foram novamente fixados com cera para técnica de enceramento progressivo (Pasom Ind. e Com. de Materiais para Fundição Ltda, São Paulo, SP, Brasil) no centro da placa de acrílico sendo que, desta vez, com o esmalte voltado para cima (Figura 10). Nesta fase, tomou-se o importante cuidado de evitar que a cera escoasse entre a dentina e a placa de acrílico, evitando alteração do paralelismo entre o esmalte e a dentina. O conjunto

foi adaptado na politriz iniciando o desgaste do esmalte com uma lixa de silicone carbide de granulação 600 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-600, Buehler) sob refrigeração com água deionizada, durante 30 segundos a 7 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta para remoção das ondulações superficiais. Em seguida, foi realizado o polimento do esmalte com lixa de silicone carbide de granulação 1200 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-1200, Buehler), sob refrigeração, durante 2 minutos e 30 segundos, com 2 pesos, em velocidade alta, até observar uma superfície de aspecto vítreo (figura 11). Para finalizar o polimento, foi utilizado um disco de feltro (Polishing Cloth Buehler 40-7618) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μ m (Water based diamond permanent polishing suspension Extec Corp. 1 micron 16.587) durante 3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta. Este tratamento teve como objetivo planificar e remover ranhuras do fragmento de esmalte, e consequentemente, permitir a aferição da dureza no local.

Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, após 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) contendo água deionizada e com frequência de 40 kHz, durante 2 minutos. Ao final do polimento os blocos 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 armazenados em refrigerador a aproximadamente 4°C. Durante este período e até o final do experimento, os espécimes foram numerados e armazenados em recipientes plásticos com tampa. Os espécimes eram separados por gaze embebida em água deionizada.

FIGURA 3. Coroa fixada em placa acrílica cristal com godiva termo ativada.

FIGURA 4. Aparelho de corte de precisão montado com discos diamantados e espacador metálico de 4mm.

FIGURA 5. Corte no sentido cérvico – incisal.

FIGURA 6. Corte no sentido mesio-distal.

FIGURA 7. Obtenção do bloco de esmalte de 4 x 4 mm² da porção mais plana da coroa.

FIGURA 8. Espécime fixado com cera com o esmalte voltado para a placa acrílica para a planificação da dentina.

FIGURA 9. Espécime após a planificação da dentina.

FIGURA 10. Espécime fixado com cera com a dentina voltada para a placa acrílica para o polimento do esmalte.

FIGURA 11. Espécime após o polimento final.

4.4. AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL INICIAL (SH_i) E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE

A dureza superficial inicial do esmalte (SH_i) foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (Knoop diamond, 25 g, 10s, Hardness tester from Buehler, US) acoplado a um microcomputador e com um software específico para a análise das imagens (Figura 12).

Foi utilizado um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga estática de 25g, aplicada por 10 segundos (Figura 13). Em cada corpo de prova foram realizadas 5 indentações na área central da superfície, com distância de 100 µm entre elas. Para medir as indentações realizadas, duas retas presentes na tela do computador se sobreporam ao final dos vértices agudos do losango correspondente à indentação (Figura 14), determinando o comprimento da maior diagonal e, conseqüentemente, os resultados da dureza KNOOP através do cálculo automático feito pelo software através 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.

Nesta fase foram desprezados os blocos cujas indentações não formavam um losango com todos os lados iguais, sendo selecionados 289 blocos de esmalte (Apêndice 2). Esse número de blocos foi utilizado, pois considerou-se a possibilidade de perda após a desmineralização. A média da dureza superficial de todos os espécimes foi de $358,93 \pm 27,95$ KHN.

FIGURA 12. Microdurômetro acoplado a um microcomputador

FIGURA 13. Penetrador tipo Knoop.

FIGURA 14. Determinação dos limites da indentação em esmalte hígido.

4.5. ESTERELIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Os blocos de esmalte com dureza inicial selecionados foram numerados com caneta permanente ultra-fina (A. W. Faber-Castell S.A., São Carlos, SP, Brasil) na região da dentina, embalados em envelope de papel grau cirúrgico (VedaMax, Presidente Venceslau, SP, Brasil) (Figura 15 e 16) e enviados para a esterilização com óxido de etileno (ACECIL. Central de Esterilização Com. Ind. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil).

FIGURA 15 e 16. Espécimes embalados antes e após a esterilização, respectivamente.

4.6. DESMINERALIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

A lesão de erosão inicial foi realizada *in vitro* pela imersão dos blocos em ácido clorídrico (0,01 M), pH 2,3 durante 30 segundos sob agitação constante. Para tal, os blocos foram encaixados em um dispositivo de EVA que permitia a imersão simultânea de 15 blocos, no volume de 17,6 ml de ácido por bloco.

Após a formação da lesão de erosão, foi avaliada a dureza superficial pós-desmineralização, para possibilitar a exclusão de blocos com valor médio de dureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos.

4.7. AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL PÓS DESMINERALIZAÇÃO (SHd)

A dureza superficial dos blocos de esmalte pós desmineralização (SHd) foi avaliada da mesma forma que a inicial (item 4.4), sendo que as indentações foram realizadas a 100 μ m de distância em relação às iniciais. A média de dureza obtida a partir das cinco indentações foi utilizada para excluir blocos de esmalte com

dureza fora do padrão. Foram desprezados os blocos com um valor médio de dureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos. Foram selecionados 160 blocos de esmalte, 80 para cada tipo de dispositivo (Apêndice 3). A média da dureza superficial de todos os blocos foi de $295,42 \pm 18,82$ KHN.

4.8. ALEATORIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE ENTRE OS GRUPOS

Após a seleção planejada dos blocos de esmalte conforme os valores de dureza pós-desmineralização, foi feita uma distribuição aleatória estratificada entre os grupos, de forma que em todos os grupos e voluntários tivessem blocos com dureza mais baixa e mais alta. Para tal, foi utilizado o programa Microsoft Excel. Os 160 blocos de esmalte foram ordenados no sentido crescente de dureza e utilizando a função “ALEATÓRIA” da categoria matemática, sorteios aleatórios foram realizados para dividir os espécimes entre os voluntários e tipo de dispositivo.

4.9. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Vinte voluntários adultos jovens, com idade entre 18 e 30 anos foram selecionados para participar da pesquisa. Os critérios de exclusão considerados na anamnese para composição da amostra foram: fumar; apresentar lesões de cárie ou erosão ativa; 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, praticar 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-imune, xerostomia, diabetes tipo 1, 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.

Os voluntários foram submetidos a um exame clínico, realizado com espátula de madeira sob luz natural, para avaliação de lesões de cárie e/ou desgaste dentário e realização dos testes salivares.

Todas as coletas de saliva foram realizadas ao final da tarde e os voluntários foram orientados a permanecerem em jejum nas duas horas antecedentes a coleta.

4.10. 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 permaneceram em repouso com a cabeça levemente inclinada para baixo. Durante 15 minutos a saliva foi dispensada passivamente em um 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 a densidade da saliva como 1, foi dividida a diferença entre os pesos inicial e final pelo tempo de 15 minutos, resultando na determinação do volume e velocidade de liberação da saliva (ml/min – fluxo normal > 0,1ml/min). O pH da saliva coletada também foi aferido por meio de um pH-âmetro (B371, I-micronal, Ind. Brás., São Paulo-SP), utilizando uma amostra de 1 ml de saliva.

4.11. AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR ESTIMULADO

Para avaliação do fluxo salivar, os voluntários mascaram uma película transparente (Parafilm® M, Sigma-Aldrich, EUA) para estimular a produção de saliva. A saliva produzida durante os primeiros 30 segundos foi deglutida, sendo subsequentemente coletada por 5 minutos em um béquer de 100 ml previamente pesado. Os voluntários foram instruídos a movimentar constantemente a película 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) e uma amostra de 1 ml foi utilizada para determinar seu pH. Foi considerado normal um fluxo maior que 1ml/min.

4.12. PREPARO DO DISPOSITIVO INTRABUCAL PALATINO

Moldes do arco superior dos voluntários foram feitos com alginato (EzactKromm, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ) e vazados em gesso pedra (Duranit, Chaves S.A. Mineração e Indústria, Fortaleza, CE). Um dispositivo intrabucal palatino, por voluntário, foi confeccionado em resina acrílica (Jet, Artigos Odontológicos Clássicos, São Paulo, SP). Cada dispositivo apresentava 2 cavidades de 6 x 6 x 3 mm, uma no lado direito e outra no esquerdo, sendo que cada uma delas serviu para fixação de 2 blocos de esmaltes (Figura 17). Os dispositivos foram polidos mecanicamente em 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.

Os blocos foram fixados no dispositivo intrabucal com cera para técnica de enceramento progressivo (Pasom Ind. e Com. de Materiais para Fundição Ltda, São Paulo, SP, Brasil), sendo cuidadosamente adaptados, ao nível da superfície de resina do dispositivo, evitando-se fendas laterais entre os blocos e as cavidades que poderiam resultar no acúmulo de biofilme dentário. Além disso, um fio ortodôntico foi fixado nas extremidades da cavidade, passando sobre os blocos de esmalte sem tocá-los. Essa conduta foi realizada com o intuito de evitar a abrasão dos blocos pela língua.

4.13. PREPARO DO DISPOSITIVO INTRABUCAL MANDIBULAR

Moldes do arco inferior dos voluntários foram feitos com alginato (EzactKromm, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ) e vazados em gesso pedra (Duranit, Chaves S.A. Mineração e Indústria, Fortaleza, CE). Dois dispositivos intrabucais mandibular, por voluntário, foram confeccionados em resina acrílica (Jet, Artigos Odontológicos Clássicos, São Paulo, SP). Cada dispositivo, posicionado por meio de grampos de retenção na região de pré-molares e primeiro molar, apresentou na região vestibular 2 cavidades de 6 x 6 x 3 mm, as quais serviram para fixação de 2 blocos de esmalte (Figura 18). 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.

Os blocos foram fixados no dispositivo intrabucal com cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP), sendo cuidadosamente adaptados, ao nível da superfície de resina do dispositivo, evitando-se fendas laterais entre os blocos e as cavidades que poderiam resultar o acúmulo de biofilme dentário. Além disso, um fio ortodôntico foi fixado nas extremidades da cavidade, passando sobre os blocos de esmalte sem tocá-los. Essa conduta foi realizada com o intuito de evitar a abrasão dos blocos pela língua.

FIGURA 17. Dispositivo intrabucal palatino – Subprojeto I

FIGURA 18. Dispositivo intrabucal mandibular - Subprojeto I

4.14. PROCEDIMENTOS INTRABUCAIS

Inicialmente, cada voluntário recebeu um kit contendo: as instruções detalhadas para realização da etapa in situ (Apêndice 4), um estojo plástico para guardar o dispositivo intrabucal, uma bisnaga de dentifrício fluoretado (Colgate Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil), uma escova de dente (Curaprox, São Paulo, SP, Brasil), um tubo de fita dental sabor menta (Colgate Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e um envelope de gaze (Cremer S.A. Ind. Brás., Blumenau, SC). As instruções escritas foram reforçadas verbalmente. Os voluntários foram orientados a realizar higiene bucal 1 hora antes da inserção dos dispositivos, utilizando o dentifrício, a escova e a fita dental fornecido pelo pesquisador. Os voluntários também foram orientados a não ingerirem bebidas e alimentos durante o uso dos dispositivos.

Na etapa *in situ*, os voluntários utilizaram os dispositivos intrabuciais (palatino e mandibular) simultaneamente (Figuras 19, 20, 21, 22), durante o período máximo de 12 horas, de modo que após cada período de tempo pré-determinado (30 min, 1h, 2h e 12h), os dispositivos foram removidos da cavidade bucal para retirada dos blocos de esmalte. Em seguida, os blocos foram submetidos à avaliação imediata da dureza superficial (pós remineralização). Após a leitura, os blocos foram reinseridos nos dispositivos, os quais foram reposicionados na boca para análise do tempo seguinte em estudo. Para o período de 12 horas, os dispositivos foram utilizados durante a noite, incluindo o período do sono. Nos momentos em que os dispositivos não estavam na cavidade bucal, eles foram mantidos envoltos em gaze umedecida em água de abastecimento (Bauru – 0,7 ppm F) (Buzalaf *et. al.*, 2013).

FIGURA 19. Vista intrabucal do dispositivo palatino.

FIGURA 20. Vista intrabucal do dispositivo mandibular.

FIGURA 21. Vista lateral do dispositivo mandibular.

FIGURA 22. Vista oclusal do dispositivo mandibular.

4.15. AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL PÓS REMINERALIZAÇÃO (SHf)

Para avaliação da dureza superficial pós remineralização (SHf), foi utilizado o mesmo microdurômetro com as mesmas especificações (25 g por 10 s). Foram feitas 5 indentações, com distância de 100 µm entre elas e a 100 µm das indentações pós desmineralização. A média das indentações (dureza final após a remineralização em saliva) foi utilizada para avaliar a *porcentagem de recuperação de dureza* de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%SHR = \frac{(SHf - SHd)}{(SHi - SHd)} \times 100$$

4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para essa etapa de remineralização (variável de resposta dureza superficial), os dados foram analisados pela “Análise de Variância de Medidas Repetidas a dois critérios” (tempos de remineralização e tipo de dispositivo) e Teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. O software utilizado foi o SigmaPlot for Windows version 11.0 (Germany).

Subprojeto II

Nesse subprojeto, foi estudada a capacidade protetora da saliva em função dos diferentes tempos de formação da película adquirida (30min, 1h, 2h e 12h) utilizando dispositivos intrabucais palatino e mandibular.

Um total de 340 blocos de esmalte foi selecionado pela dureza de superfície inicial (SMH inicial) e distribuídos aleatoriamente entre os 20 voluntários de acordo com o fator tempo (em 4 níveis: 30 min, 1h, 2h e 12h) e tipo de dispositivo intrabucal (em 2 níveis: palatino e mandibular) (Figuras 22 e 23). Além destes grupos em estudo foi utilizado um grupo controle, com blocos não submetidos à ação salivar, os quais foram desmineralizados da mesma forma que os blocos mantidos *in situ*.

Figuras 23 e 24: Distribuição dos grupos em estudo.

O número de voluntários foi estipulado considerando 8 grupos em estudo com uma diferença minimamente detectável de 10% de desmineralização, desvio padrão 7,6% (valor obtido em estudo piloto), erro α de 5% e erro β de 20%. Sendo assim, foi determinado o número de 19 voluntários. Entretanto, considerando a possibilidade de perda, 20 voluntários participaram do presente estudo.

Na etapa *in situ*, para cada voluntário, foram confeccionados 4 dispositivos intrabuciais palatinos e 8 mandibulares, com dois blocos esmalte em cada dispositivo palatino e um bloco em cada mandibular. Após a remoção dos blocos de esmalte dos dispositivos, eles sofreram desmineralização erosiva por meio de imersão em 70,4 ml ácido clorídrico (17,6 ml por bloco); 0,01 M, pH 2,3, durante 30 segundos sob agitação constante. Após o processo de desmineralização erosiva, a dureza superficial foi avaliada.

4.17. PREPARO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE

4.17.1. Obtenção dos blocos de esmalte, planificação e polimento dos espécimes

Para realização desta etapa, foi adotado o mesmo protocolo descrito no item 4.3.1.

4.18. AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL INICIAL (SHi) E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE

Para avaliação da dureza superficial, foi adotado o mesmo protocolo descrito no item 4.4

A média de dureza das cinco endentações foi utilizada para excluir os blocos de esmalte com dureza fora do padrão. Foram desprezados os blocos com um valor médio de dureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos. Foram selecionados o número de blocos de esmalte correspondentes ao número de voluntários (20) multiplicado pelo número de grupos (4), multiplicado pelo número de blocos (2), multiplicado pelo número de tipos de dispositivo (2) adicionados de 20 espécimes que seriam do grupo controle (total de 340) (Apêndice 5). A média da dureza superficial de todos os blocos foi de $350,47 \pm 25,93$ KHN.

4.19. ALEATORIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE ENTRE OS GRUPOS

Após a seleção planejada dos blocos de esmalte conforme os valores de dureza inicial, foi feita uma distribuição aleatória estratificada entre os grupos, de forma que em todos os grupos e voluntários tivessem blocos com dureza mais baixa e mais alta. Para tal, foi utilizado o programa Microsoft Excel. Os 340 blocos de esmalte foram ordenados no sentido crescente de dureza e utilizando a função “ALEATÓRIA” da categoria matemática, sorteios aleatórios foram realizados para dividir os espécimes entre 4 grupos de 85 blocos cada. A seguir foram retirados aleatoriamente 5 blocos de cada grupo, para compor o grupo controle. Assim os 80 blocos dos quatro grupos foram novamente ordenados no sentido crescente de dureza e utilizando a função “ALEATÓRIA” da categoria matemática, sorteios aleatórios foram realizados para dividir os espécimes entre os voluntários e tipo de dispositivo.

4.20. ESTERELIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Para realização desta etapa, foi adotado o mesmo protocolo descrito no item 4.5.

4.21. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS, AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR NÃO ESTIMULADO E ESTIMULADO.

Os critérios utilizados para seleção dos voluntários, avaliação do fluxo salivar não estimulado e estimulado foram os mesmos descritos, respectivamente, nos itens 4.9, 4.10, 4.11 do subprojeto I.

4.22 PREPARO DO DISPOSITIVO INTRABUCAL PALATINO

O dispositivo palatino foi confeccionado utilizando o mesmo protocolo descrito no item 4.12, cada um contendo dois blocos de esmalte (Figura 25).

4.23. PREPARO DO DISPOSITIVO INTRABUCAL MANDIBULAR

Os dispositivos mandibulares foram confeccionados utilizando o mesmo protocolo descrito no item 4.13, cada um contendo um bloco de esmalte (Figura 26).

FIGURA 25. Dispositivo palatino – subprojeto II

FIGURA 26. Dispositivo mandibular – subprojeto II

4.24. PROCEDIMENTOS INTRABUCAIS

Inicialmente, cada voluntário recebeu um kit contendo: as instruções detalhadas para realização da etapa in situ (Apêndice 6), um estojo plástico para guardar o dispositivo intrabucal, uma bisnaga de dentífrico fluoretado (Colgate Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil), uma escova de dente (Curaprox, São Paulo, SP, Brasil), um tubo de fita dental sabor menta (Colgate Palmolive Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e um envelope de gaze (Cremer S.A. Ind. Brás., Blumenau, SC). As instruções escritas foram reforçadas verbalmente. Os voluntários foram orientados a realizar higiene bucal 1 hora antes da inserção dos dispositivos, utilizando o dentífrico, a escova e a fita dental fornecido pelo pesquisador. Os voluntários

também foram orientados a não ingerirem bebidas e alimentos durante o uso dos dispositivos.

Os voluntários do estudo utilizaram os dispositivos intrabuciais palatino e mandibulares simultaneamente (Figuras 27, 28, 29, 30). Cada fase correspondeu a um grupo de acordo com o tempo de utilização do dispositivo para ação salivar e formação da película adquirida (30 min, 1h, 2h e 12h). Ao final de cada fase, o dispositivo foi removido da cavidade bucal e, imediatamente, os blocos foram submetidos à desmineralização erosiva. Para o período de 12 horas, os dispositivos foram utilizados a noite, incluindo o período do sono.

FIGURA 27. Vista intrabucal do dispositivo palatino.

FIGURA 28. Vista intrabucal do dispositivo mandibular.

FIGURA 29. Vista lateral do dispositivo mandibular.

FIGURA 30. Vista oclusal do dispositivo mandibular.

4.25. DESMINERALIZAÇÃO EROSIVA DOS BLOCOS DE ESMALTE

A desmineralização erosiva foi realizada *in vitro* e correspondeu a imersão dos blocos em 70 ml de ácido clorídrico 0,01 M, pH 2,3 durante 30 segundos. Após o desafio erosivo, os espécimes foram removidos da solução e lavados com água

destilada para realização da análise da dureza superficial final. Cabe ressaltar que além dos blocos submetidos à ação salivar *in situ*, neste subprojeto havia um grupo controle. Os blocos do controle não sofreram ação salivar, ou seja, em nenhum momento foram expostos *in situ* ao meio bucal. Depois de preparados e selecionados, os blocos foram desmineralizados *in vitro*.

4.26. ANÁLISE DA DUREZA SUPERFICIAL FINAL (SHf)

Para realização da dureza superficial final, foi utilizado o mesmo microdurômetro com as mesmas especificações (25 g por 10 s). Foram feitas 5 indentações, com distância de 100 µm entre elas e a 100 µm das endentações iniciais. A média das indentações (dureza final após a desmineralização) foi utilizada para avaliar o percentual de mudança de dureza de superfície (%SHC – Surface Hardness Change), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%SHC = \frac{\text{dureza final} - \text{dureza inicial}}{\text{dureza inicial}} \times 100$$

4.27. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação do tempo de ação salivar e tipo de dispositivo, os dados foram analisados pela Análise de Variância de Medidas Repetidas a dois critérios e Teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. A comparação dos tempos de ação salivar em relação ao grupo controle foi realizada individualmente para cada tipo de arco. Tanto para a maxila, quanto para a mandíbula, não foi observada uma distribuição normal dos dados e, portanto, foi utilizado um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) e Teste de Tukey, considerando $p < 0,05$.

Para todas as análises, foi utilizado software foi o SigmaPlot for Windows version 11.0 (Germany).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. SUBPROJETO I

Nesse subprojeto, referente ao potencial remineralizador da saliva, todos os 20 voluntários finalizaram o estudo e seguiram adequadamente o protocolo *in situ* proposto.

Ao final de cada tempo de exposição salivar pré-determinado (30 minutos, 1 hora, 2 horas e 12 horas), todos os 160 blocos de esmalte, referentes aos dispositivos palatino e mandibular foram submetidos ao teste de dureza superficial. Após a realização das medidas, foi realizado o cálculo do percentual de recuperação de dureza (item 4.15 – material e métodos) com base na média da dureza dos 4 espécimes de cada dispositivo intrabucal. O cálculo foi realizado separadamente, considerando os diferentes tempos de remineralização para cada tipo de dispositivo.

A tabela 1 mostra os valores médios da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR) para os diferentes tempos avaliados em diferentes tipos de dispositivos intrabucais (palatino e mandibular). Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.0001$) entre os tempos de 30 minutos e 1 hora, os quais apresentaram menor recuperação de dureza quando comparado com o tempo de 2 horas ($p > 0.0001$). Diferença estatisticamente significativa não foi observada entre os tempos de 2 horas e 12 horas. Além disso, quando os dispositivos foram comparados entre si, não foi observado diferença na recuperação de dureza dos espécimes mantidos na maxila em relação aos espécimes mantidos na mandíbula.

Tabela 1. Média e desvio padrão da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo maxilar e mandibular (n = 20)

Tempos de exposição salivar	Dispositivo Palatino %SHR ($\pm$ SD) ^A	Dispositivo Mandibular %SHR ($\pm$ SD) ^A
30 minutos	21,12% ($\pm$ 11,75) ^a	19,84% ($\pm$ 13,99) ^a
1 hora	35,69% ($\pm$ 14,72) ^a	30,50% ($\pm$ 16,32) ^a
2 horas	44,65% ($\pm$ 13,15) ^b	40,87% ($\pm$ 11,26) ^b
12 horas	49,33% ($\pm$ 15,20) ^b	49,08% ($\pm$ 15,44) ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre tempos de exposição salivar (ANOVA/Tukey's Test, $p < 0,0001$). Letras maiúsculas semelhantes indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre tipos de dispositivo (ANOVA/Tukey's Test, $p > 0,05$).

5.2. SUBPROJETO II

Todos os 20 voluntários finalizaram o estudo e seguiram adequadamente o protocolo *in situ* proposto. Um total de 340 blocos de esmalte após serem expostos a diferentes tempos de ação salivar foram submetidos à desmineralização erosiva com ácido clorídrico (0.01M; pH 2.3) por 30 segundos. Em seguida, o percentual de mudança de dureza de superfície (%SHC – Surface Hardness Change) foi calculado.

A tabela 2 mostra os valores médios do percentual de mudança de dureza de superfície (%SHC) apenas entre os diferentes tempos avaliados em diferentes tipos de dispositivos intrabucais (palatino e mandibular), sem comparação com o grupo controle. A análise estatística não revelou diferença entre os tipos de dispositivos intrabucais. Porém, quando os tempos foram comparados entre si, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 30 minutos e 1 hora ($p > 0.0001$), os quais apresentaram maior perda de dureza em relação ao tempo de 2 horas. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 2 horas e 12 horas.

Os gráficos 1 e 2 referem-se a comparação dos tempos de ação salivar *in situ* em relação ao grupo controle, no qual não houve ação salivar, considerando o dispositivo palatino e mandibular separadamente. Os resultados mostraram que os tempos de 2 horas e 12 horas promoveram uma menor porcentagem de perda de dureza em relação ao grupo controle, sem exposição à saliva ($p < 0.0001$) quando

ambos foram comparados com o grupo controle (sem exposição à saliva), tanto para utilização do dispositivo palatino quando mandibular.

Tabela 2. Média e desvio padrão da porcentagem de mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo palatino e mandibular (n = 20).

Tempos de exposição salivar	Dispositivo Palatino %SHC ($\pm$ SD) ^A	Dispositivo Mandibular %SHC($\pm$ SD) ^A
30 minutos	-13,93 ($\pm$ 5,91) ^a	-14,32 ($\pm$ 5,02) ^a
1 hora	-13,00 ($\pm$ 4,86) ^a	-14,19 ($\pm$ 3,99) ^a
2 horas	-9,66 ($\pm$ 5,38) ^b	-10,52 ($\pm$ 5,60) ^b
12 horas	-8,32 ($\pm$ 5,60) ^b	-10,88 ($\pm$ 7,83) ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre tempos de exposição salivar (ANOVA/Tukey's Test, $p < 0,0001$). Letras maiúsculas semelhantes indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre tipos de dispositivo (ANOVA/Tukey's Test, $p > 0,05$).

Gráfico 1. Mediana, variação interquartil, valores mínimos e máximos referente à mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo palatino

* Letras minúsculas diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre tempos de exposição salivar e grupo controle (Kruskal-Wallis/Tukey's Test, $p < 0,0001$).

Gráfico 2. Mediana, variação interquartil, valores mínimos e máximos referente a mudança de dureza de superfície (%SHC) para os tempos de exposição salivar avaliados (30 min, 1h, 2h, 12h), utilizando o dispositivo mandibular.

* Letras minúsculas diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre tempos de exposição salivar e grupo controle (Kruskal-Wallis/Tukey's Test, $p < 0,0001$).

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. SUBPROJETO I

6.1.1. Considerações sobre a metodologia empregada

A saliva é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos e pode ser secretada na cavidade bucal por três glândulas salivares maiores e inúmeras glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000; DODDS *et. al.*, 2005). Ela é considerada o fator biológico mais importante na prevenção da erosão dentária (WOËLTGENS *et. al.*, 1985; MANDEL, 1987; HALL *et al.*, 1999; HARA *et. al*, 2006; BUZALAF *et. al*, 2012; HARA, ZERO, 2014). Considerando esse aspecto, sabe-se que o conteúdo de cálcio, fosfato e fluoreto da saliva pode exercer um efeito reparador sobre a lesão inicial de erosão (INFELD, 1996), por meio da remineralização da superfície do esmalte amolecida (AMAECHI, HIGHAM, 2001; ATTIN *et. al*, 2001; HARA, ZERO, 2014). No entanto, não há relatos sobre a padronização de tempo necessário para simular a remineralização da camada superficial amolecida após um desafio erosivo (YOUNG, TENUTA, 2011), dificultando a comparação entre os estudos *in situ*, que consideram a saliva como um agente remineralizante.

Dependendo da glândula pela qual a saliva é secretada, a composição e fluxo salivar variam (ENGELEN *et. al.* 2003), fornecendo vários níveis de proteção em diferentes sítios na cavidade bucal (HANNIG, BALZ, 2001). Sabe-se que sítios pobremente banhados pela saliva são mais suscetíveis à erosão (YOUNG, KHAN, 2002), visto que a superfície vestibular dos incisivos superiores é mais susceptível a erosão quando comparada à superfície lingual dos dentes inferiores (HARA *et. al.*, 2006). No entanto, também não há na literatura uma padronização em relação ao tipo de dispositivo intrabucal para estudos de erosão, uma vez que diferentes desenhos de dispositivos intrabucais que carregam blocos de dentes têm sido utilizados (WEST *et. al.*, 1998; AMAECHI *et. al.*, 2000; WEST *et. al.*, 2004; ZERO *et. al.*, 2006; AMAECHI *et. al.*, 2010). Considerando os aspectos citados, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito remineralizador da saliva sobre lesões iniciais de erosão utilizando dois dispositivos intrabucais em diferentes tempos de exposição

salivar. Desse modo, o intuito foi buscar resultados que norteassem a realização e padronização de futuros estudos *in situ*, buscando protocolos mais simplificados.

Tendo em vista que o objetivo da primeira etapa do estudo foi a avaliação do potencial de remineralização da saliva, optou-se pela desmineralização dos espécimes de esmalte *in vitro*. O tempo de imersão dos espécimes em ácido clorídrico durante 30 segundos foi determinado em estudo piloto para a obtenção de uma lesão de erosão inicial (OLIVEIRA *et. al.*, 2015). As lesões erosivas em estágios iniciais são caracterizadas pela desmineralização parcial da superfície, resultando em amolecimento da superfície (diminuição da dureza) e aumento da rugosidade, sem perda de estrutura em altura, ou seja, sem desgaste (SHELLIS *et. al.*, 2011, HUYSMANS *et. al.*, 2011). Devido a isso, o presente estudo utilizou como variável de resposta a dureza superficial, a qual foi mensurada através da resistência do substrato à pressão exercida por um penetrador Knoop (SCHLUETER *et. al.*, 2011).

Em se tratando de estudos *in situ*, uma das maiores dificuldades diz respeito à colaboração e ao seguimento correto do protocolo pelos voluntários (ZERO, 1995). O cuidado utilizado para minimizar esta limitação no presente estudo foi a seleção de voluntários entre alunos de iniciação científica e pós-graduação em odontologia, pressupondo-se haver entre eles um maior grau de comprometimento e maior responsabilidade com o estudo.

A realização do estudo em duas etapas permitiu a observação de que estudos mais curtos apresentam uma maior aceitação pelos voluntários. Apesar disso, essa fase de remineralização foi complexa em termos operacionais, devido à necessidade de remoção dos espécimes para avaliação da dureza após cada tempo de exposição salivar pré-determinado, seguida pelo reposicionamento dos mesmos blocos de esmalte para avaliação do tempo seguinte. A utilização de espécimes diferentes não foi realizada porque poderia mascarar as diferenças entre os tempos avaliados. Tal fato foi observado no trabalho realizado por GONÇALVES *et. al.*, (2013), o qual utilizou os mesmos espécimes para mensuração do potencial remineralizador da saliva para os tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas de uso do dispositivo intrabucal palatino, mostrando não haver diferença entre os tempos avaliados. Além disso, cada bloco de esmalte apresenta um valor de dureza distinto, o que poderia influenciar na acurácia dos resultados obtidos. A

avaliação do efeito remineralizador utilizando dispositivos intrabuciais simultaneamente é o ideal, pois não há dependência do voluntário utilizar de forma padronizada os dispositivos, em diferentes momentos. No presente estudo isso foi possível pelo design dos aparelhos, pois os voluntários relataram em estudo piloto que a utilização simultânea não causava desconforto adicional.

No presente estudo, outro fator importante a ser considerado foi a utilização de fios de retenção sobre os blocos de esmalte, sem tocá-los. Esta abordagem teve como objetivo evitar a abrasão dos blocos de esmalte pela língua (GREGG *et. al.*, 2004) ou tecidos moles adjacentes (AMAECHI *et. al.*, 2003).

6.1.2. Considerações sobre os resultados

Diante de um desafio erosivo, diversos mecanismos salivares são ativados para proteger a estrutura dentária (JAGER *et. al.*, 2011; HARA, ZERO, 2014), tais como o fluxo salivar e a capacidade tampão (ZWIER *et. al.*, 2013). Sabe-se que a composição da saliva muda dependendo do método e tempo estimulação, bem como período do dia (ENGELN *et. al.*, 2003). Além disso, a literatura relata que a saliva de diferentes doadores oferecem níveis de proteção distintos em relação à desmineralização erosiva do esmalte (WETTON *et. al.*, 2007) e por isso, o desenho experimental considerou as diferenças de tempos e tipos de dispositivo dentro de um único indivíduo.

A glândula submandibular é a maior contribuinte para o fluxo salivar não estimulado, produzindo uma saliva com altas concentrações de mucina, a qual é responsável por lubrificar os tecidos bucais. Por outro lado, o fluxo da glândula parótida aumenta durante a estimulação e sua principal função está relacionada com a capacidade tampão da saliva (SCREENBY, 2000; DODDS *et. al.*, 2005). Além disso, com o estímulo salivar há maior produção de saliva, e aumento do aporte de cálcio e fosfato, o que poderia beneficiar a remineralização (HARA, ZERO, 2014). Nos estudos *in situ* com aparelhos removíveis, a colocação dos aparelhos constitui um estímulo mecânico ao aumento do fluxo salivar. Desta forma, esperava-se que o dispositivo palatino, supostamente sob maior influência da glândula parótida, pudesse ser beneficiado pelo aumento do fluxo, com um maior nível remineralização dos blocos de esmalte. No entanto, este estudo não mostrou diferença no grau de remineralização do esmalte utilizando dispositivos intrabuciais palatino e mandibular.

Por outro lado, o desenho do aparelho mandibular, no qual os blocos se localizavam por vestibular da região de segundo pré-molar e primeiro molar permanente, pode ter tido grande influência nos resultados, pois o acesso nessa região à saliva da glândula parótida pode ser tão grande quanto o acesso que apresentam os blocos localizados no palato na região de pré-molares. De acordo com Lussi et. al. (2012), a recuperação do pH após a ingestão de suco de laranja foi mais rápida no segundo pré-molar inferior em comparação com o incisivo central superior. Os autores sugeriram que isso pode ter sido devido à proximidade segundos pré-molares inferiores com glândula parótida. Desta forma, no presente estudo não se pode dizer que o aparelho mandibular, por estar na mandíbula, sofreu maior influência da ação das glândulas sublingual e submandibular.

Outros aspectos podem exercer influência na ação salivar e no desenvolvimento da erosão dentária (HARA, ZERO, 2014). Diferentes sítios da cavidade bucal podem tornar os dentes mais susceptíveis ao desgaste dentário erosivo. Esse fato é atribuído não somente devido aos diferentes níveis de proteção salivar, mas também pela sua exposição a forças mecânica resultante do contato com os tecidos moles adjacentes (AMAECHI et. al, 2003) e à língua (GREGG et. al, 2004), sendo que diferentes regiões podem exercer forças mecânicas distintas resultando em diferentes graus de abrasão. No presente estudo, a utilização de fios ortodônticos sobre os blocos impediu a ação de tecidos moles e língua, o que pode ocorrer clinicamente. No entanto, a não ocorrência de desgaste era fundamental para a metodologia utilizada, pois a recuperação de dureza só é uma variável de resposta válida quando se avalia uma mesma superfície, antes e depois da exposição ao agente em estudo. Estudos anteriores também utilizaram métodos para evitar a influência da abrasão sobre os espécimes, tais como a colocação de fios de retenção (West, 1998) ou pelo posicionamento do espécime cerca de 0,5 mm abaixo da superfície de contato (HARA et. al., 2009; AMAECHI et. al., 2010).

Estudos *in situ* oferecem a vantagem de simular uma situação próxima do real (WEST et. al, 2004; ZERO et. al, 2006; AMAECHI et. al, 2010; WEST et. al, 2011), na qual desafios erosivos são seguidos por períodos de exposição intrabucal, favorecendo o processo de remineralização. No presente estudo, mesmo com o uso de creme dental com flúor antes da colocação do aparelho, acredita-se que o resultado obtido pode ter sido apenas em função do efeito remineralizador da

saliva. Apesar de o flúor influenciar na remineralização do esmalte, alguns estudos mostraram que o aumento de flúor na saliva após o uso de um creme dental fluoretado geralmente é limitado e de curta duração (ZERO *et. al.*, 1992; WIEGAND, ATTIN, 2003). Em consonância com esses estudos, Magalhães *et. al* (2008) mostraram em estudo *in situ* que flúor residual na saliva após o uso do dentífrico não apresenta um efeito preventivo contra a erosão.

Quanto à remineralização do esmalte previamente erodido em diferentes tempos de exposição salivar, os resultados mostraram que 30 minutos e uma hora promoveram menor recuperação da dureza do esmalte em relação a duas horas de exposição salivar, sendo que a utilização de 12 horas durante o período noturno não aumentou o percentual de recuperação. A remineralização parcial do esmalte pela saliva, observada mesmo após 2 e 12 horas de ação salivar está de acordo com estudos prévios (ALENCAR *et. al*, 2014). Além disso, estes resultados trouxeram dados que poderão padronizar e simplificar os estudos *in situ*. Assim sendo, ao considerar a remineralização, pareceu ser apropriado um intervalo mínimo de duas horas entre os desafios erosivos para a remineralização da camada de esmalte amolecida. Adicionalmente, considerando apenas a remineralização, não seria necessária a utilização dos dispositivos intrabuciais durante a noite, o que tornaria a utilização pelos voluntários mais fácil e mais padronizada. Os aparelhos poderiam ser utilizados diariamente apenas no período comercial, sob supervisão e serem recolhidos pelo pesquisador durante a noite, evitando a perda e mau uso pelo voluntário.

6.2 SUBPROJETO II

6.2.1 Considerações sobre a metodologia empregada

Essa etapa do estudo avaliou a capacidade protetora da saliva após desmineralização erosiva do esmalte utilizando dispositivos intrabuciais palatino e mandibular em diferentes tempos de exposição salivar. Para tal, os voluntários inicialmente utilizaram dispositivos contendo blocos de esmalte hígidos, para que após cada tempo pré-determinado o desafio erosivo fosse realizado. Diferentemente do subprojeto 1, as medidas não puderam ser repetidas no mesmo espécime, uma vez que a desmineralização inviabiliza uma adequada condição para posterior mensuração. Assim sendo, foram utilizados espécimes diferentes para cada tempo

avaliado. Além disso, houve necessidade da existência de um grupo controle negativo, pois o modelo experimental não pressupõe qual seria a desmineralização quando não há a ação salivar prévia, o que é um ponto de partida para estabelecer o efeito salivar. A desmineralização dos espécimes de esmalte foi realizada *in vitro*, optando-se novamente pela utilização do ácido clorídrico durante 30 segundos (OLIVEIRA *et. al.*, 2015).

Para a realização do desafio erosivo, os voluntários removiam os dispositivos da boca e colocavam imediatamente em um Becker com ácido clorídrico. Tal conduta foi realizada com o intuito de evitar qualquer manipulação na superfície do bloco de esmalte, uma vez que isso poderia interferir nos resultados. Após o desafio, a dureza da superfície foi mensurada utilizando penetrador Knoop (SCHLUETER *et. al.*, 2011), com endentações o mais próximo possível das mensurações iniciais, para evitar viés da heterogeneidade do grau de mineralização do próprio espécime de esmalte.

6.2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS

A saliva apresenta propriedades biológicas que também influenciam na proteção da superfície do esmalte, tais como a formação da película adquirida (HARA, ZERO, 2014; VUKOSAVLJEVIC, 2014; HANNIG, HANNIG 2014). Alguns estudos *in vivo* e *in situ* mostraram que a película adquirida tem o potencial para proteger a superfície do esmalte contra a desmineralização erosiva (AMAECHI *et. al.*, 1999; HANNIG *et. al.*, 2003; HANNIG, BALZ, 1999; HANNIG, BALZ, 2001; HANNIG *et. al.*, 2004; HARA *et. al.*, 2006; JAGER *et. al.*, 2011; MOAZZEZ *et. al.*, 2014; WIEGAND *et. al.*, 2008). A película adquirida é definida como um filme orgânico formado pela adsorção de proteínas e glicoproteínas na superfície do dente, funcionando como barreira semi-seletiva (LENDENMANN *et. al.*, 2000; HANNIG *et. al.*, 2004; SIQUEIRA *et. al.*, 2012; HANNIG *et. al.*, 2005; ZIMMERMAN *et. al.*, 2013). Quando o agente erosivo entra em contato com a cavidade bucal, a desmineralização da superfície do dente ocorre após a difusão do ácido através da película adquirida (LUSSI, CARVALHO 2014). Devido à sua estrutura, a película é capaz de retardar o contato entre o ácido e a superfície dentária, reduzindo a desmineralização do esmalte (HANNIG, HANNIG 2014). No entanto, ela não é

capaz de inibir completamente as alterações provocadas pelo ácido na superfície do esmalte (HANNIG, JOINTER, 2006).

Assim como para a remineralização, a saliva pode fornecer diferentes níveis de proteção em relação ao desenvolvimento da erosão, uma vez que diferentes glândulas salivares produzem saliva com componentes distintos (HANNIG, BALZ, 2001). Além disso, a contribuição de cada glândula salivar varia de acordo com o estímulo aplicado, o que resulta em mudanças na sua qualidade e composição (Dawes, 2004). Na mandíbula, a glândula submandibular é o maior contribuinte para o fluxo salivar não estimulado (SCREENBY, 2000; DODDS *et. al.*, 2005) e responsável pela produção de uma saliva com alta concentração de mucina, sendo esta um importante componente da película adquirida (DODDS *et. al.*, 2005). Um estudo conduzido por Santos (2013), ao comparar o perfil proteico em películas formadas *in vivo* sobre o esmalte em repouso e após a estimulação, mostrou que a estimulação salivar mecânica e química promoveu a formação de uma película adquirida com maior concentração de proteínas, o que poderia resultar em uma maior proteção para o esmalte dentário. No presente estudo não foi observada diferença na susceptibilidade à erosão dentária do esmalte sob ação salivar com o uso de dispositivo mandibular em relação ao palatino, possivelmente porque independente da localização ambos os dispositivos podem ter promovido estímulo mecânico, resultando em maior concentração de proteínas. Sabe-se que a eficácia da proteção da película adquirida contra a desmineralização é dependente de suas propriedades físicas, tais como espessura e tempo de maturação (AMAECHI *et. al.*, 1999; VUKOSAVLJEVIC 2014). A espessura da película varia amplamente em toda cavidade bucal, sendo mais espessa nas superfícies linguais dos dentes inferiores, visto que essa região é constantemente banhada pela saliva secretada pela glândula sublingual/submandibular (CARLEN *et. al.*, 1998). Em estudo *in situ* conduzido por Amaechi *et. al.* (1999), foi observado que a película formada na superfície lingual de dentes inferiores foi maior quando comparada com a película formada na superfície palatina, o que pode ter ocorrido devido ao fato de que essa região é pouco banhada pela saliva, além de ser submetida a uma maior fricção da língua durante a fala e deglutição. Apesar disso, o presente estudo observou que o dispositivo mandibular não se mostrou superior em relação ao palatino e isso pode estar relacionado com a localização dos blocos de esmalte na região vestibular entre pré-molares e molares

nos aparelhos mandibulares, uma vez que a amostra encontrava-se mais próxima da glândula parótida do que da submandibular.

Alguns autores têm demonstrado que a película adquirida formada ao longo do tempo de uma hora pode fornecer proteção máxima contra a desmineralização, não havendo subsequente diminuição da erosão quando tempos de maturação mais longos são utilizados (AMAECHI *et. al.*, 1999; NIEW *et. al.*, 1987; HANNIG *et. al.*, 2003; WETTON *et. al.*, 2006). Por outro lado, outros estudos não relatam diferença no efeito protetor da película formada após 3 minutos em comparação com uma película formada após de 2 horas (HANNIG, *et. al.*, 2004). Assim, não há qualquer padronização em relação ao tempo de formação da película adquirida capaz de reduzir as consequências da desmineralização erosiva.

O presente estudo *in situ* realizou a desmineralização erosiva dos blocos de esmalte após diferentes tempos de exposição salivar (30 min, 1h, 2h e 12h). O objetivo não foi analisar a película adquirida, no entanto considerando sua formação pela saliva e sendo a película uma das principais responsáveis pelo efeito protetor do organismo contra a erosão dentária, sua ação foi avaliada indiretamente. Quando somente os tempos foram comparados uns com os outros, os resultados mostraram que houve diferença entre 30 minutos e 2 horas, a qual não mostrou diferença em relação a 12 horas. Esse resultado sugere que a película formada no tempo de 2 horas foi suficiente para promover algum nível de proteção contra o desafio erosivo, e que esta proteção não aumentou quando o tempo de ação salivar foi prolongado. Este resultado foi reforçado quando os tempos de exposição salivar foram comparados com o grupo controle, uma vez que apenas os períodos de 2 horas e 12 horas mostraram diferença com o grupo sem exposição salivar (controle).

Com base nos resultados do presente estudo, sugere-se que 2 horas de formação de película adquirida pode ser viável para utilização em futuro estudos *in situ*. Além disso, este estudo demonstrou que o uso do dispositivo intrabucal durante a noite, incluindo o período do sono, não é justificado. Portanto, uso de protocolos simples e de curta duração pode ser mais bem aceito por voluntários, permitindo resultados mais realistas e confiáveis.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo *in situ*, conclui-se que diferentes tempos de exposição salivar apresentam efeito remineralizador distintos sobre lesões iniciais de erosão e nem todos os períodos de exposição do esmalte à ação salivar são capazes de inibir a erosão inicial do esmalte. A utilização de dispositivos intrabuciais palatinos promove efeito similar aos mandibulares, quando se avalia a capacidade de remineralização e proteção da saliva em relação à lesão inicial de erosão.

Especificamente conclui-se:

Subprojeto I:

- O potencial remineralizador da saliva após 2 horas de uso de dispositivos intrabuciais promove maior recuperação da dureza do esmalte em relação aos intervalos de uso de 30 minutos e uma hora. O aumento de tempo de utilização, durante a noite (12 horas), não resulta em maior recuperação da dureza do esmalte.
- Não há diferença no grau de remineralização do esmalte utilizando dispositivos intrabuciais palatino e mandibular.

Subprojeto II:

- A proteção do esmalte pela saliva em relação a desafio erosivo inicial só foi observada após a utilização prévia dos dispositivos por 2 e 12 horas, quando foi observada menor porcentagem de perda de dureza em relação à situação sem ação salivar.
- Não houve diferença na proteção do esmalte pela saliva utilizando dispositivos intrabuciais palatino e mandibular previamente a desafio erosivo inicial.

Referências

REFERÊNCIAS

- Alencar CRB, Oliveira GC, Ionta FQ, Oliveira TM, Magalhães AC, Buzalaf MAR, Honório HM, Rios D. Influence of intra-Oral Appliance on Remineralization of Initial Erosion. J Dent Res 92(Spec Iss B):abstract number 1237, 2013.
- Alencar CRB, Mendonça FL, Guerrini LB, Oliveira GC, Jordão MC, Oliveira TM, Honório HM, Rios D. Efeito in situ de diferentes tempos de ação salivar sobre a dureza superficial do esmalte erodido. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica 2014, São Paulo. Brazilian Oral Research 2014. p. 311..
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of Acquired Salivary Pellicles as a Determinant of the Sites of Dental Erosion. J Dent Res. 1999; 78(12): 1821-1828.
- Amaechi B, Higham SM, Edgar WM: Development of an in situ model to study dental erosion; in Addy M, Embery G, Edgar WM, Orchardson R (eds): Tooth Wear and Sensitivity. London, Dunitz, 2000: 141–152.
- Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001; 29(5):371-6.
- Amaechi BT, Hightman SM, Edgar WM. Influence of abrasion in clinical manifestation of human dental erosion. J Oral Rehabil 2003, 30(4):407-413.
- Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent. 2005;33(3):243-52.
- Amaechi BT, Ramalingam K, Meninksai PK, Narjibfard K, Mackey AC, Karlinsey RL. Remineralization of eroded enamel by a NaF rinse containing a novel calcium phosphate agent in an in situ model: a pilot study. Clin Cosm Invest Dent 2010; 2: 93–100.
- Attin T, Knöfel S, Buchalla W, Tütüncü R: In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. Caries Res 2001; 35:216-22.
- Bassiouny MA, Yang J. Influence of drinking patterns of carbonated beverages on dental erosion. Gen Dent 2005;53(3):205-21.
- Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. Caries Res. 2011;45:124-32.
- Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:119-39.
- Buzalaf MAR, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. J Appl Oral Sci 2012; 20(5):493-501.
- Buzalaf MAR, Magalhães AC, Wiegand A. Alternatives to Fluoride in the Prevention and Treatment of Dental Erosion. Monogr Oral Sci 2014; 25:230-243

-
- Buzalaf MAR, Moraes CM, Olympio KPK, Pessan JP, Grizzo LT, Silva TL, Magalhães AC, Oliveira RC, Groisman S, Ramires I. Seven Years of external control of fluoride levels in the public water supply in Bauru, São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci* 2013;21(1):92-8
- Carlen A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res* 1998;32(6):447–55.
- Carvalho TS, Lussi A, Jaeggi T, Gamgon DL. Erosive tooth wear in children. *Monogr Oral Sci* 2014; 25:262-278.
- Dawes C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Arch Oral Biol*. 1969;14:277-94.
- Dawes C, Kubieniec K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004;49(8):665–669.
- Delecrode TR, Siqueira LW, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D, Magalhães AC, Buzalaf MA. Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *J Dent* 2015: 1-6.
- Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005;33(3):223-33.
- Dugmore CR, Rock WP. The progression of tooth erosion in a cohort of adolescents of mixed ethnicity. *Int J Paediatr Dent*. 2003;13(5):295-303.
- Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. *Clin Oral Investig* 2001; 5(2): 108-11.
- Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, van der Bilt A, Bosman F. The relation between saliva flow after diferente stimulations and the perception of flavor and texture atributes in custard desserts. *Physiol Behav*. 2003; 78(1): 165-169.
- Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006; 2066-76.
- Finke M, Parker DM, Jandt KD. Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel. *J Colloid Interface Sci* 2002; 251(2): 263-70.
- Ganss C, Schlechtriemen M, Klimek J. Dental erosions in subjects living on a raw food diet. *Caries Res* 1999; 33(1):74–80
- Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear. *Monogr Oral Sci* 2006; 20: 9–16.

Gonçalves PSP, Alencar CRB, Oliveira GC, Ionta FQ, Magalhães AC, Silva SMB, Honório HM, Rios D. Different Times for In Situ Salivary Remineralisation of Initial Erosion. J Dent Res 92(Spec Iss B):abstract number 1229, 2013.

Grando LJ, Tames DR, Carsoso 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): 373–378

Gray JA: Kinetics of the dissolution of human dental enamel in acid. J Dent Res 1962; 41: 633–645.

Gregg T, Mace S, West NX, Add M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. Caries Res 2004; 38(6):557-560.

Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. Journal of Dentistry 1999; 27(5): 333-9.

Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1999;33(5):372-9.

Hannig M, Balz M. Protective Effect of Salivary Pellicles from two different intraoral sites on Enamel Erosion. Caries Res 2001;35(2):142-48

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, de Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. Clin Oral Invest 2003 7(3):158–161

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

Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci 2005; 113(1): 2–13.

Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. Monogr Oral Sci. 2006;1929-64.

Hannig C, Berndt D, Hoth-Hannig W, Hannig M. The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle-- An in situ study. Arch Oral Biol. 2009; 54(6):518-26

Hannig M, Hannig C. The Pellicle and Erosion. Monogr Oral Sci 2014;25:206-214.

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

-
- Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the acquired enamel pellicle against erosive challenges in situ. *Caries Res* 2006a; 85(7):612-6.
- Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;2088-99.
- Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res* 2009; 43(1): 57–63.
- Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25:197-205
- Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1973; 18(12):1517-1529
- Holloway PJ, Mellanby M, Stewart RJC. Fruit drinks and tooth erosion. *Br Dent J* 1958;104:305–309
- Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Buzalaf MAR, Machado MAAM. Effects of Erosive, Cariogenic or Combined Erosive/Cariogenic Challenges on Human Enamel- An in situ/ex vivo Study. *Caries Res* 2008;42:454–459
- Honório HM, Rios D, Santos CF, Buzalaf MA, Machado MAAM. Influence of dental plaque on human enamel erosion: in situ / ex vivo study. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(2):179-84.
- Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. *J Dent.* 2000a;28(4):265-70
- Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent.* 2000b ;28(4):257-63.
- Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res.* 2011; 45 (Suppl 1): 60-8.
- Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci* 2014; 25: 230-43.
- Imfeld T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. *European Journal of Oral Sciences* 1996; 104: 215-20.
- Ionta FQ, Mendonça FL, Oliveira GC, de Alencar CRB, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *Journal of Dentistry* 2013; 42(2):175-9.
- Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res* 1999; 33(6):455-61.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:44-65.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, Incidence and Distribution of Erosion. *Monogr Oral Sci* 2014; 25:55-73.

Jager DH, Vieira AM, Ligtenberg AJ, Bronkhorst E, Huysmans MC, et al. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res* 2011; 45(6):532-7.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW. Mineral distribution and dimensiona changes in human dentin during demineralisation. *J Dent Res* 1995; 74(5): 1179–1184

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Oral Sci* 1999;69:575-580.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle- A review. *Adv Dent Res.* 2000;14:22-8.

Linnett V, Seow WK. Dental erosion in children: a literature review. *Pediatr Dent* 2001; 23(1): 37-43.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Susceptibility od deciduous and permanent enamel to dietary acid-induced erosion studied with anatomic force microscopy nanoindentation. *Eur J Oral Sci* 2004;112:61-66.

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.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38:134-44.

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

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

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

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatulina E, Ganss. Dental Erosion – Na Overview with Emphases on Chemical and Histopatological Aspects. *Caries Res* 2011;45:2-12

Lussi A, Von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwing E, Cheaib Z, Jaeggi T. Clinical study monitoring the pH on tooth surfasse in patientes with ou without erosion. *Caries Res* 2012; 46:507-512

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: A Multifactorial Condition of Growing Concern and Increasing Knowledge. *Monogr Oral Sci* 2014; 25:1-15.

- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights Into Preventive Measures For Dental Erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):75-86
- Mandel ID. The functions of saliva. *Journal of Dental Research* 1987; 66: 623-7.
- Maupomé G, Diez-de-Bonilla J, Torres-Villasenor G, Andrade- Delgado L, Castano VM. In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in cola drink. *Caries Res* 1998; 32:148–153
- Maupomé G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde H, Borges-Yáñez A. In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to na eroding cola drink. *Caries Res.* 1999;33(2):140-7.
- Meurman JH, Drysdale T, Frank RM: Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 1991; 99: 457–462.
- Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, Zaidel L, Bartlett DW. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. *Caries Res.* 2014;48(1):57-62.
- Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J.* 1998;48(6):529-39.
- 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.
- Nunn JH. Prevalence and distribution of tooth wear; in Addy M, Embery G, Edgar WM, Orchardson R (eds): *Tooth Wear and Sensitivity*. London, Martin Dunitz 2000, pp 93–104.
- Nyvad B, Fejerskov O. Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987; 95(4):297-307.
- Oliveira GC, Dionísio EJ, Ferrairo BM, Gonçalves PSP, Jordão MC, Silva, TC, Honório HM, Rios D. Validation of in vitro initial erosion protocol using different methods. *J. Dent. Res.*, 93 spec. Iss. A: abstract number 211937, 2015
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, Buzalaf MA. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2006; 40(3): 218-23.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA, Buzalaf MA. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz Oral Res.* 2008; 22(2): 132-8.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Wiegand A, Machado MAAM, Buzalaf MAR. Light cola drink is less erosive than the regular one: an in situ/ex vivo study. *J Dent* 2009;37(2):163-6

Santos, FZC. Determinação da composição da película adquirida formada sobre o esmalte humano in vivo e da sua modificação após estimulação química e mecânica do fluxo salivar: estudo proteômico. 2013.147 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

Selvig KA: Ultrastructural changes in huma dentine exposed to a weak acid. *Arch Oral Biol* 1968; 13(7):19–34

Shaw L, Weatherill S, Smith A. Tooth wear in children: an investigation of etiological factors in children with cerebral palsy and gastroesophageal reflux. *ASDC J Dent Child*. 1998;65(6):484-6.

Siqueira W, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 2007;6(6) 2152–60.

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 2010;89(6):626–30.

Siqueira, WL, Custodio W, McDonald EE. New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res* 2012 ;91(12):1110-1118

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the Measurement and Characterization on Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Res* 2011;45(Suppl 1):13-23.

Schupbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B: Electronmicroscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci* 2001;109(1):60–68.

Schweizer-Hirt CM, Scheit A, Schmid R, Imfeld T, Lutz F, Mühlemann HR: Erosion und Abrasion des Schmelzes: Eine experimentelle Studie. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1978;88: 497–529.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J*. 2000;50(3):140-61.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45:69-77

Stephen K, McCrossan J, Mackenzie D, Macfarlane CB, Speirs CF: Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. *Br Dent Clin Pharmacol* 1980;9(1):51–55.

Skjorland KK, Rykke M, Sonju T: Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 1995;53(6):358–362.

Ten Cate JM, Infeld T. Dental erosion: Sumarry. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 241-4.

West NX, Maxwell A, Addy M, Parker D, Jackson RJ. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998;26(4): 329–35.

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

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

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

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 2006;40(3):213–7.

Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M. The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries Res* 2007;41(5):423-426.

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(4):245-53.

Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med* 2007;57(3):169-76.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies -insights and rational concepts. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:53-9

Woëltgens JHM, V P, DE Blicke-Hogervorst JMA, Bervoets D. Enamel erosion and saliva. *Clinical Preventive Dentistry* 1985; 7: 8-10.

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

Young WG, Khan F. Sites of dental erosion are saliva-dependent. *J Oral Rehabil* 2002; 29(1):35-43.

Veerman EC, Van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV . Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 1996;104:346-352.

Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD. Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 2004;112:320-325.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira LW. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch oral biol* 2014; 59(6): 631-638

Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J Dent Res*. 1992;71(11):1768-75

Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995;9(3):214-30; discussion 231-4.

Zero DT, Lussi A: Etiology of enamel erosion: intrinsic and extrinsic factors; in Addy M, Embery G, Edgar WM, Orchardson R (eds): *Tooth Wear and Sensitivity*. London, Martin Dunitz, 2000, pp 121–140.

Zero DT, Lussi AB. Behavioral Factors. *Monogr Oral Sci* 2006;20:100-105

Zero DT, Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC. Evaluation of a desensitizing test dentifrice using an in situ erosion remineralization model. *J Clin Dent* 2006; 17(4): 112–6.

Zwier N, Huysmans MC, Jager DH, Ruben J, Bronkhorst EM, Truin GJ. Saliva parameters and erosive wear in adolescents. *Caries Res* 2013;47(6):548-52.

Apêndices

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Prof.^a Dr.^a Daniela Rios e Fernanda Lyrio Mendonça, responsáveis pela pesquisa intitulada **“Remineralização e desmineralização erosiva do esmalte considerando diferentes tempos de ação salivar e dispositivos intrabucais – Estudo in situ”**, o chamamos a participar como convidado desse nosso estudo.

Esta pesquisa pretende avaliar o efeito da saliva sobre lesões iniciais de erosão e a capacidade protetora da mesma em relação à desmineralização erosiva do esmalte (condição em que se observa a perda de mineral do esmalte do dente), por meio da utilização de aparelhos para serem usados no palato (céu da boca) e para serem usados sobre os dentes inferiores em diferentes tempos de avaliação (30 min, 1 hora, 2 horas e 12 horas). Acreditamos que essa pesquisa irá esclarecer as melhores formas de se conduzir estudos in situ, ou seja, dentro da boca, mas sem influência ou intervenção nos dentes dos convidados. Assim, novas terapias para a erosão poderão ser testadas utilizando o método in situ determinado pelo estudo.

Relataremos a seguir as partes da pesquisa na qual necessitaremos da sua colaboração como convidado.

Você, convidado terá que usar aparelhos sem grampos metálicos no palato (céu da boca) e aparelhos com grampos metálicos sobre os dentes inferiores, sendo que neles serão fixados pedaços de dentes bovinos, previamente esterilizados. Serão dois períodos diferentes de uso com duração máxima de 12 horas. Na primeira etapa, após cada período de tempo determinado pelo pesquisador (30 minutos, 1 hora, 2 horas e 12 horas), o aparelho será removido da boca para retirada dos blocos de esmalte bovino, que serão avaliados em laboratório. Após a leitura, os blocos serão recolocados no aparelho na posição original e o pesquisador será o responsável por devolver o aparelho para que o convidado continue o uso, não havendo necessidade de ele esperar no laboratório até o fim da leitura. Durante os períodos de 30 min, 1 hora e 2 horas, o convidado permanecerá na clínica de Odontopediatria até o término do uso do aparelho. Para o período de 12 horas, o convidado deverá utilizar os aparelhos durante a noite, enquanto estiver dormindo. Na segunda etapa do estudo, ele também terá que utilizar os aparelhos, em diferentes tempos (30 min, 1 hora, 2 horas e 12 horas) e entre cada um desses períodos de tempo, haverá um intervalo de 2 dias. Durante os períodos de 30 min, 1 hora e 2 horas, o convidado permanecerá na clínica de Odontopediatria até o término do uso do aparelho. No período de 12 horas os aparelhos serão utilizados no período da noite. Durante o período de permanência do aparelho na boca, o convidado não deve consumir alimentos e bebidas (exceto água). A sua higiene bucal também será feita com o aparelho fora da boca.

O uso dos aparelhos não causa dor, mas dependendo da sensibilidade individual poderão causar desconforto passageiro e dificuldade na pronúncia das palavras. No entanto, estes serão utilizados em curto intervalo de tempo, não alterando a qualidade de vida e a rotina dos voluntários. Não existe benefício específico para o

convidado que aceite participar dessa pesquisa. No entanto caso os resultados deste trabalho sejam positivos, os benefícios serão para auxiliar a realização de futuros estudos de maneira mais rápida. O uso destes aparelhos é importante, pois permite, a nós pesquisadores, realizar o experimento simulando os eventos que ocorrem na boca de forma fiel, sem trazer nenhum efeito colateral aos dentes dos convidados, por quem os aparelhos serão utilizados. Cabe ressaltar, que não haverá gasto nenhum para os convidados envolvidos na pesquisa, uma vez que, todo o material necessário para realização da pesquisa será fornecido pelo pesquisador. Além disso, não haverá custos da vinda para a FOB, visto que a pesquisa será realizada enquanto o convidado estiver presente na Faculdade, em horários que não interfiram em suas atividades curriculares. Embora não sejam previstos riscos aos participantes do estudo, os pesquisadores garantem a indenização ao convidado diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Asseguramos que o convidado apresenta plena liberdade em aceitar ou recusar o nosso convite, tendo o direito de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma. Além disso, será preservado o sigilo das informações coletadas e a privacidade dos participantes da pesquisa. Estando de acordo em participar pesquisa o aceite será formalizado através da assinatura do presente "TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO", em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, convidado da pesquisa e a outra ficará de posse do pesquisador responsável.

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos sobre sua participação na pesquisa, você poderá entrar em contato com um dos pesquisadores por meio do endereço Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, Departamento de Odontopediatria, ou através dos telefones e e-mails: Fernanda Lyrio Mendonça: (14) 981302808/ fernandalyrio@usp.br; Prof.^a Dr.^a Daniela Rios: (14)981157718 ou (14) 32243390/ daniriosop@yahoo.com.br. Em caso de denúncias e/ou reclamações entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa-FOB/USP, à Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, ou pelo telefone (14)3235-8356, e-mail: cep@fob.usp.br.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____,
após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE
CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos
profissionais 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 concordando em
participar da pesquisa proposta. 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 tornar-
se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de
Ética Odontológica). Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa,
comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 da resolução
do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias (uma via para o sujeito da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término.

Bauru, SP, ____ de fevereiro de 2014.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Fernanda Lyrio Mendonça
Pesquisadora

Apêndice 2

Valores das 5 indentações, médias (KHN) da dureza superficial inicial de todos os espécimes – Subprojeto

Espécime	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	Média
1	382,33	390,87	399,70	396,13	389,14	391,64
2	372,44	367,64	369,23	364,49	374,06	369,57
3	370,83	380,65	384,01	378,99	385,71	380,04
4	385,71	382,33	389,14	390,87	390,87	387,78
5	390,87	396,13	416,38	412,58	396,13	402,42
6	378,99	380,65	384,01	369,23	364,49	375,47
7	406,99	408,84	403,32	416,38	410,70	409,25
8	384,01	394,37	399,70	412,58	403,32	398,80
9	335,11	364,49	390,87	387,42	384,01	372,38
10	394,37	382,33	424,12	401,51	343,50	389,16
11	370,83	367,64	403,32	347,87	309,14	359,76
12	370,83	324,34	410,70	387,42	372,44	373,15
13	418,29	369,23	410,70	416,38	399,70	402,86
14	385,71	397,91	405,15	399,70	343,54	386,40
15	392,61	396,13	385,71	394,37	396,13	392,99
16	389,14	394,37	396,13	380,65	389,14	389,89
17	384,01	401,51	394,37	367,64	390,87	387,68
18	394,37	350,81	343,54	346,42	375,69	362,17
19	344,97	380,65	377,33	366,06	370,83	367,97
20	339,28	328,32	329,66	335,11	339,28	334,33
21	362,93	378,99	380,65	384,01	370,83	375,48
22	362,93	361,38	352,29	347,87	349,34	354,76
23	347,87	344,97	397,91	347,87	369,23	361,57
24	254,21	323,03	344,97	335,11	324,34	316,33
25	382,33	394,37	380,65	361,38	392,61	382,27
26	346,42	321,73	346,41	356,79	331,01	340,47
27	324,34	336,49	355,28	352,29	352,29	344,14
28	366,06	378,99	387,42	377,33	403,32	382,62
29	324,34	344,97	266,48	328,32	324,34	317,69
30	347,87	366,06	342,11	362,93	364,49	356,69
31	328,32	331,01	329,66	332,37	331,01	330,47
32	392,61	377,33	390,87	401,51	372,44	386,95

33	312,84	337,88	347,87	316,61	332,37	329,51
34	382,33	385,71	382,33	370,83	378,99	380,04
35	367,64	356,79	347,87	364,49	364,49	360,26
36	339,28	367,64	377,33	390,87	362,93	367,61
37	369,23	374,06	353,78	374,06	366,06	367,44
38	389,14	387,42	389,14	401,51	389,14	391,27
39	336,49	359,84	366,06	340,69	378,99	356,42
40	343,54	347,87	359,84	319,15	335,11	341,10
41	369,23	356,79	358,31	347,87	374,06	361,25
42	301,94	310,37	319,15	332,37	326,98	318,16
43	399,70	399,70	387,42	378,99	372,44	387,65
44	323,03	336,49	340,69	349,34	321,73	334,26
45	387,42	378,99	364,49	370,83	385,71	377,49
46	335,11	337,88	335,11	353,78	366,06	345,59
47	394,37	387,42	406,99	385,71	390,87	393,07
48	310,37	309,14	263,57	310,37	319,15	302,52
49	325,66	359,84	325,66	312,84	335,11	331,82
50	387,42	394,37	384,01	384,01	352,29	380,42
51	390,87	401,51	408,84	370,83	399,70	394,35
52	401,51	378,99	401,51	392,61	384,01	391,73
53	361,38	378,99	385,71	367,64	361,38	371,02
54	316,61	343,54	340,69	353,78	340,69	339,06
55	349,34	374,06	362,93	401,51	353,78	368,32
56	385,71	344,97	337,88	339,28	332,37	348,04
57	367,64	384,01	369,23	377,33	369,23	373,49
58	406,99	401,51	394,37	394,37	401,51	399,75
59	406,99	392,61	397,91	397,91	408,84	400,85
60	370,83	369,23	359,84	374,06	352,29	365,25
61	367,64	375,69	361,38	385,71	377,33	373,55
62	396,13	375,69	382,33	394,37	380,65	385,83
63	312,84	314,08	347,87	323,03	325,66	324,70
64	356,79	390,87	380,65	394,37	377,33	380,00
65	369,23	367,64	370,83	346,42	375,69	365,96
66	389,14	352,29	364,49	367,64	352,29	365,17
67	380,65	379,13	378,98	349,69	390,87	375,86
68	384,01	380,65	389,14	390,87	430,07	394,95
69	374,06	372,44	380,65	359,84	377,33	372,87

70	375,69	370,83	370,83	387,42	356,79	372,31
71	356,79	337,88	344,97	353,78	356,79	350,05
72	384,01	385,71	390,87	387,42	403,32	390,27
73	394,37	385,71	364,49	353,78	370,83	373,84
74	390,87	401,51	396,13	406,99	399,70	399,04
75	346,42	343,54	333,73	349,34	361,38	346,88
76	378,99	382,32	408,84	412,58	408,84	398,31
77	372,44	408,84	377,33	406,99	410,70	395,26
78	291,60	306,71	323,03	305,51	297,28	304,82
79	390,87	392,61	359,84	362,93	390,87	379,43
80	316,61	374,06	344,97	380,65	390,87	361,43
81	380,65	320,44	210,64	374,06	394,37	336,03
82	367,64	331,01	314,09	349,34	344,97	341,41
83	420,22	422,16	424,12	424,12	450,85	428,30
84	349,34	353,78	333,73	361,38	374,06	354,46
85	389,14	375,69	364,49	382,33	375,69	377,47
86	342,11	364,49	329,66	306,71	309,14	330,42
87	387,42	370,83	392,61	394,37	385,71	386,19
88	306,71	340,69	325,66	332,37	346,42	330,37
89	374,06	394,37	366,06	380,65	397,91	382,61
90	374,06	392,61	353,78	331,01	349,34	360,16
91	397,91	399,70	399,70	378,99	367,64	388,79
92	397,91	392,61	378,99	390,87	424,12	396,90
93	382,33	346,42	377,33	344,97	396,13	369,44
94	389,14	396,13	355,28	355,28	389,14	377,00
95	344,97	390,87	358,31	390,87	337,88	364,58
96	444,46	361,38	361,38	366,06	403,32	387,32
97	344,97	355,28	352,29	362,93	369,23	356,94
98	382,33	380,65	364,49	387,42	370,83	377,14
99	380,65	408,84	428,08	416,38	403,32	407,45
100	370,83	370,83	359,84	356,79	374,06	366,47
101	324,34	332,37	336,49	362,93	370,83	345,39
102	392,61	372,44	367,64	366,06	359,84	371,72
103	337,88	333,73	316,61	326,98	336,49	330,34
104	333,73	326,98	332,37	337,88	300,76	326,35
105	370,83	364,49	390,87	378,99	377,33	376,50
106	397,91	403,32	389,14	416,38	426,09	406,57

107	353,78	347,87	384,01	347,87	362,93	359,29
108	390,87	401,51	349,34	418,29	401,51	392,30
109	397,91	384,01	403,32	392,61	366,06	388,78
110	384,01	370,83	372,44	375,69	394,37	379,47
111	332,37	346,42	316,61	331,01	333,73	332,03
112	362,93	408,84	347,87	408,84	392,61	384,22
113	394,37	349,34	314,09	372,44	344,97	355,04
114	350,81	359,84	344,97	372,44	353,78	356,37
115	294,98	337,88	311,60	329,66	320,44	318,91
116	333,73	309,14	314,09	289,37	315,34	312,34
117	410,70	396,13	408,84	392,61	401,51	401,96
118	359,84	311,60	329,66	316,61	309,14	325,37
119	366,06	385,71	361,38	347,87	378,99	368,00
120	392,61	396,13	385,71	382,33	397,91	390,94
121	277,57	304,31	307,92	303,12	301,94	298,97
122	405,15	392,61	382,33	377,33	418,29	395,14
123	256,04	276,54	260,70	251,50	275,50	264,06
124	375,69	362,93	352,29	380,65	370,83	368,48
125	378,99	408,84	397,91	387,42	389,14	392,46
126	359,84	364,49	374,06	359,84	375,69	366,79
127	378,99	385,71	355,28	362,93	377,33	372,05
128	390,87	339,28	236,92	355,28	356,79	335,83
129	332,37	349,34	346,42	358,31	369,23	351,13
130	394,37	397,91	346,42	356,79	344,97	368,09
131	385,71	405,15	399,70	380,65	392,61	392,77
132	372,44	361,38	380,65	358,31	384,01	371,36
133	444,46	420,22	403,32	450,85	401,51	424,07
134	384,01	412,58	426,09	392,61	394,37	401,93
135	317,88	328,32	317,88	303,12	320,44	317,53
136	406,99	392,61	384,01	370,83	369,23	384,73
137	364,49	350,81	349,34	325,66	333,73	344,81
138	367,64	343,54	339,28	346,42	385,71	356,52
139	392,61	349,34	372,44	377,33	377,33	373,81
140	339,28	335,11	374,06	350,81	358,31	351,52
141	347,87	349,34	366,06	370,83	380,65	362,95
142	366,06	366,06	387,42	378,99	378,99	375,50
143	343,54	370,83	364,49	355,28	324,34	351,70

144	401,51	372,44	382,33	384,01	349,34	377,92
145	333,73	382,33	366,06	364,49	369,22	363,17
146	335,11	362,93	367,64	359,84	369,23	358,95
147	326,98	291,60	358,31	329,66	340,69	329,45
148	364,49	340,69	349,34	366,06	372,44	358,60
149	310,37	307,92	311,60	296,13	298,43	304,89
150	320,44	390,87	353,78	364,49	349,34	355,78
151	356,79	380,65	344,97	384,01	389,14	371,11
152	370,83	361,38	384,01	378,99	384,01	375,85
153	356,79	342,11	326,98	350,81	350,81	345,50
154	339,28	331,01	325,66	367,64	328,32	338,38
155	323,03	344,97	339,28	323,03	321,73	330,41
156	314,09	364,49	343,54	349,34	349,34	344,16
157	385,71	377,33	387,42	367,64	375,69	378,76
158	344,97	352,29	366,06	382,33	343,54	357,84
159	305,51	324,34	323,03	325,66	323,03	320,32
160	310,37	343,54	366,06	356,79	329,66	341,28
161	279,66	342,11	311,60	336,49	344,97	322,97
162	329,66	333,73	352,29	331,01	319,15	333,17
163	370,83	362,93	346,42	390,87	350,81	364,37
164	370,83	369,23	405,15	385,71	356,79	377,54
165	390,87	370,83	352,29	367,64	399,70	376,27
166	372,44	374,06	331,01	359,84	369,23	361,32
167	367,64	337,88	378,99	389,14	369,23	368,58
168	350,81	336,49	309,14	326,98	316,61	328,01
169	325,66	337,88	331,01	343,54	384,01	344,42
170	367,64	323,03	346,42	369,23	390,87	359,44
171	385,71	380,65	403,32	394,37	367,64	386,34
172	356,79	344,97	377,33	372,44	347,87	359,88
173	335,11	335,11	366,06	377,33	362,93	355,31
174	353,78	366,06	349,34	350,81	380,65	360,13
175	328,32	336,49	349,34	364,49	387,41	353,21
176	347,87	350,81	353,78	364,49	399,70	363,33
177	337,88	333,73	310,37	339,28	359,84	336,22
178	339,28	350,81	283,92	358,31	317,88	330,04
179	394,37	375,69	389,14	410,70	356,79	385,34
180	352,29	367,64	317,88	372,44	375,69	357,19

181	284,99	303,12	323,03	279,66	315,34	301,23
182	366,06	333,73	405,15	384,01	372,44	372,28
183	314,09	329,66	385,71	349,34	346,42	345,04
184	366,06	342,11	366,06	375,69	359,84	361,95
185	342,11	366,06	347,87	380,65	344,97	356,33
186	350,81	335,11	367,64	352,29	367,64	354,70
187	426,09	382,33	397,91	424,12	362,93	398,68
188	358,31	378,99	350,81	349,34	369,22	361,33
189	375,69	401,51	352,29	356,79	377,33	372,72
190	325,66	323,03	340,69	305,51	347,87	328,55
191	337,88	329,66	328,32	340,69	343,54	336,02
192	364,49	352,29	364,49	380,65	339,28	360,24
193	389,14	384,01	355,28	384,01	356,79	373,85
194	387,42	377,33	374,06	369,23	343,54	370,32
195	389,14	369,23	370,83	396,13	385,71	382,21
196	342,11	227,38	310,37	306,71	350,81	307,48
197	378,99	364,49	372,44	385,71	369,23	374,17
198	362,93	396,13	369,23	385,71	358,31	374,46
199	370,83	399,70	384,01	397,91	385,71	387,63
200	332,37	361,38	340,69	349,34	310,37	338,83
201	384,01	350,81	380,65	347,87	337,88	360,25
202	350,81	364,49	336,49	359,84	387,42	359,81
203	394,37	390,87	362,93	403,32	397,91	389,88
204	346,42	315,34	362,93	349,34	367,64	348,33
205	392,61	399,70	432,09	426,09	406,99	411,50
206	366,06	333,73	377,33	353,78	362,93	358,77
207	403,32	405,15	405,15	420,22	405,15	407,80
208	290,48	292,72	269,44	282,84	267,46	280,59
209	321,73	311,60	366,06	392,61	347,87	347,98
210	343,54	359,84	387,42	372,44	387,42	370,13
211	346,42	326,98	333,73	265,50	328,32	320,19
212	245,34	278,61	283,92	277,57	261,66	269,42
213	333,73	355,28	336,49	329,66	323,03	335,64
214	301,94	297,28	270,44	309,14	319,15	299,59
215	279,66	332,37	306,71	319,15	225,85	292,75
216	361,38	359,84	380,65	389,14	349,34	368,07
217	366,06	392,61	359,84	385,71	372,44	375,33

218	337,88	328,32	331,01	355,28	343,54	339,21
219	343,54	359,84	370,83	353,78	331,01	351,80
220	369,23	331,01	346,42	359,84	370,83	355,47
221	347,87	353,78	364,49	355,28	343,54	352,99
222	343,54	359,84	389,14	396,13	350,81	367,89
223	418,29	401,51	396,13	372,44	377,33	393,14
224	342,11	356,79	317,88	332,37	340,69	337,97
225	349,34	344,97	372,44	356,79	356,79	356,07
226	401,51	336,49	336,49	370,83	359,84	361,03
227	336,49	366,06	340,69	384,01	387,42	362,94
228	331,01	336,49	364,49	335,11	342,11	341,84
229	325,66	362,93	405,15	349,34	385,71	365,76
230	304,31	279,66	314,09	296,13	303,12	299,46
231	336,49	350,81	335,11	314,09	339,28	335,16
232	306,71	343,54	329,66	317,88	321,73	323,90
233	323,03	320,44	331,01	324,34	324,34	324,63
234	390,87	326,98	358,31	305,51	316,61	339,66
235	305,51	356,79	306,71	329,66	353,78	330,49
236	311,60	350,81	337,88	340,69	380,65	344,33
237	344,97	320,44	332,37	328,32	333,73	331,97
238	374,06	342,11	377,33	337,88	316,61	349,60
239	344,97	374,06	335,11	382,33	347,87	356,87
240	336,49	329,66	366,06	377,33	364,49	354,81
241	372,44	361,38	389,14	346,42	336,49	361,17
242	329,66	305,51	374,06	350,81	315,34	335,08
243	305,51	314,09	324,34	335,11	328,32	321,47
244	335,11	339,28	375,69	366,06	366,06	356,44
245	355,28	361,38	394,37	323,03	346,42	356,10
246	387,42	329,66	370,83	359,84	403,32	370,21
247	355,28	397,91	375,69	406,99	455,18	398,21
248	344,97	324,34	362,93	343,54	362,93	347,74
249	422,16	389,14	375,69	355,28	346,42	377,74
250	307,92	346,42	273,46	331,01	378,99	327,56
251	300,76	289,37	311,60	290,48	342,11	306,86
252	335,11	332,37	350,81	315,34	331,01	332,93
253	323,03	377,33	312,84	356,79	335,11	341,02
254	396,13	377,33	403,32	382,33	358,31	383,49

255	291,60	343,54	294,98	300,76	300,76	306,33
256	416,38	394,37	390,87	412,58	430,07	408,85
257	356,79	325,66	314,09	353,78	366,06	343,28
258	356,79	380,65	346,42	377,33	366,06	365,45
259	362,93	328,32	342,11	311,60	353,78	339,75
260	369,23	380,65	384,01	361,38	328,32	364,72
261	301,94	310,37	323,03	317,88	317,88	314,22
262	329,66	258,83	303,12	306,71	342,11	308,09
263	390,87	422,16	389,14	361,38	278,61	368,43
264	306,71	326,98	299,59	315,34	326,98	315,12
265	297,28	337,88	350,81	333,73	320,44	328,03
266	362,93	380,65	389,14	422,16	380,65	387,11
267	370,83	380,65	374,06	370,83	406,99	380,67
268	317,88	339,28	317,88	353,78	326,98	331,16
269	385,71	378,99	356,79	358,31	384,01	372,76
270	346,42	367,64	370,83	346,42	333,73	353,01
271	268,45	304,31	281,78	315,34	301,94	294,36
272	342,11	353,78	339,28	377,33	396,13	361,73
273	355,28	375,69	361,38	359,84	356,79	361,80
274	347,87	369,23	418,29	406,99	387,42	385,96
275	278,61	310,37	303,12	335,11	347,87	315,02
276	350,81	339,28	394,37	403,32	428,08	383,17
277	349,34	333,73	333,73	333,73	335,11	337,13
278	310,37	304,31	323,03	366,06	317,88	324,33
279	336,49	340,69	339,28	347,87	337,88	340,45
280	367,64	323,03	346,42	335,11	324,34	339,31
281	280,72	312,84	344,97	325,66	307,92	314,42
282	384,01	374,06	401,51	284,99	394,37	367,79
283	406,99	397,91	396,13	384,01	353,78	387,77
284	396,13	380,65	353,78	377,33	356,79	372,94
285	394,37	378,99	384,01	397,91	359,84	383,03
286	397,91	408,84	380,65	403,32	346,42	387,43
287	343,54	422,16	319,15	332,37	340,69	351,58
288	367,64	392,61	349,34	382,33	333,73	365,13
289	314,09	369,23	274,48	270,44	340,69	313,78

Apêndice 3

Valores das 5 indentações, médias (KHN) da dureza pós desmineralização dos blocos selecionados – Subprojeto I:

Espécime	SHd1	SHd2	SHd3	SHd4	SHd5	Média
184	283,92	309,14	292,72	255,12	272,45	282,67
287	282,84	278,61	268,45	247,95	284,99	272,57
206	284,99	281,78	267,46	319,15	293,85	289,45
210	311,60	293,85	304,31	314,09	258,83	296,53
175	252,40	260,71	232,08	311,60	259,76	263,31
114	291,60	265,50	311,60	286,08	289,37	288,83
150	290,48	293,85	304,31	277,57	284,99	290,24
127	281,78	293,85	319,15	303,12	298,43	299,27
6	249,71	246,20	294,98	340,69	231,28	272,58
275	278,61	245,34	255,12	272,45	267,46	263,80
263	299,59	284,99	278,61	288,27	256,96	281,69
266	296,13	324,34	298,43	268,45	319,15	301,30
24	281,78	311,60	294,98	279,66	305,51	294,71
277	258,83	247,07	280,72	245,34	214,12	249,21
279	264,54	276,54	229,71	243,62	292,72	261,42
191	270,44	292,72	284,99	292,72	290,48	286,27
11	299,59	301,94	269,44	320,44	287,17	295,72
260	286,08	300,76	271,44	248,83	241,07	269,64
154	291,60	316,61	293,85	311,60	286,08	299,95
125	324,34	307,92	317,88	320,44	342,11	322,54
41	272,45	294,98	314,09	311,60	309,14	300,45
67	297,28	314,09	317,88	310,37	290,48	306,02
272	269,44	281,78	267,46	282,84	280,72	276,45
119	298,43	276,54	291,60	331,01	304,31	300,38
18	283,92	262,61	301,94	244,47	314,09	281,41
216	264,54	279,66	289,37	296,13	273,46	280,63
217	296,13	310,37	266,48	305,51	293,85	294,47
247	293,85	297,28	298,43	324,34	254,21	293,62
211	289,37	216,96	300,76	307,92	282,84	279,57
223	270,44	306,71	290,48	303,12	317,88	297,72
218	319,15	266,48	300,76	276,54	335,11	299,61

231	267,46	290,48	314,09	319,15	303,12	298,86
93	232,87	207,92	210,64	247,95	232,08	226,29
88	287,17	257,89	227,38	270,44	282,84	265,14
183	324,34	251,50	310,37	298,43	319,15	300,76
269	291,60	289,37	264,54	300,76	305,51	290,35
283	241,07	258,83	243,62	219,13	237,74	240,08
87	265,50	276,54	289,37	307,92	278,61	283,59
233	291,60	258,83	212,02	273,46	274,48	262,08
220	282,84	252,40	291,60	246,20	269,44	268,50
4	342,11	350,81	326,98	287,17	266,48	314,71
55	331,01	306,71	310,37	307,92	315,34	314,27
240	316,61	268,45	301,94	321,73	289,37	299,62
281	244,47	236,92	208,59	236,92	269,44	239,27
101	307,92	293,85	289,37	280,72	208,59	276,09
219	214,12	291,60	265,50	314,09	299,59	276,98
225	317,88	286,08	303,12	293,85	281,78	296,54
270	312,84	350,81	328,32	328,32	353,78	334,81
23	301,94	283,92	262,61	276,54	250,60	275,12
108	337,88	347,87	315,34	329,66	325,66	331,28
222	314,09	331,01	321,73	319,15	287,17	314,63
257	296,13	283,92	269,44	266,48	256,04	274,40
146	273,46	279,66	293,85	267,46	250,60	273,01
151	328,32	343,54	331,01	323,03	315,34	328,25
155	300,76	306,71	303,12	311,60	292,72	302,98
246	290,48	342,11	317,88	311,60	317,88	315,99
130	271,44	326,98	287,17	305,51	299,59	298,14
159	219,13	234,48	264,54	249,71	266,48	246,87
180	319,15	311,60	370,83	326,98	314,09	328,53
213	303,12	315,34	307,92	331,01	316,61	314,80
40	283,92	270,44	274,48	319,15	317,88	293,17
169	309,14	263,57	316,61	283,92	291,60	292,97
245	287,17	326,98	331,01	307,92	321,73	314,96
276	298,43	335,11	296,13	320,44	361,38	322,30
135	288,27	306,71	283,92	317,88	296,13	298,58
140	314,09	304,31	342,11	301,94	294,98	311,49
172	306,71	347,87	331,01	343,54	355,28	336,88
192	306,71	307,92	320,44	321,73	316,61	314,68

109	352,29	323,03	340,69	377,33	380,65	354,80
145	316,61	333,73	321,73	328,32	319,15	323,91
195	299,59	324,34	340,69	325,66	317,88	321,63
274	252,40	256,96	288,27	290,48	307,92	279,21
115	232,87	282,84	264,54	282,84	279,66	268,55
136	260,71	241,07	350,81	283,92	263,57	280,02
152	321,73	284,99	253,30	287,17	303,12	290,06
249	286,08	279,66	256,96	328,32	273,46	284,90
12	311,60	312,84	331,01	305,51	306,71	313,53
16	346,42	342,11	329,66	321,73	356,79	339,34
113	287,17	281,78	258,83	279,66	259,76	273,44
235	261,66	258,83	316,61	272,45	270,44	275,99
244	271,44	309,14	273,46	290,48	266,48	282,20
27	294,98	283,92	294,98	289,37	277,57	288,17
282	306,71	284,99	286,08	278,61	296,13	290,51
186	305,51	300,76	300,76	306,71	293,85	301,52
20	280,72	265,50	282,84	287,17	304,31	284,11
224	252,40	278,61	312,84	296,13	310,37	290,07
60	294,98	268,45	296,13	311,60	287,17	291,67
139	272,45	314,09	307,92	325,66	312,84	306,59
221	283,92	276,54	262,61	291,60	309,14	284,76
285	316,61	299,59	283,92	277,57	294,98	294,53
39	298,43	323,03	289,37	315,34	300,76	305,39
238	289,37	324,34	316,61	296,13	310,37	307,36
232	282,84	275,50	282,84	296,13	296,13	286,69
147	310,37	301,94	305,51	315,34	278,61	302,35
242	296,13	294,98	301,94	314,09	320,44	305,51
166	315,34	316,61	331,01	326,98	260,71	310,13
69	286,08	264,54	253,30	287,17	263,57	270,93
265	263,57	314,09	320,44	283,92	287,17	293,84
177	300,76	300,76	306,71	317,88	291,60	303,54
71	312,84	317,88	298,43	326,98	296,13	310,45
258	286,08	292,72	266,48	267,46	277,57	278,06
98	300,76	306,71	287,17	304,31	291,60	298,11
178	289,37	333,73	303,12	293,85	320,44	308,10
202	320,44	311,60	312,84	321,73	286,08	310,54
129	270,44	282,84	298,43	279,66	306,71	287,62

73	314,09	311,60	289,37	305,51	286,08	301,33
50	304,31	300,76	305,51	317,88	301,94	306,08
171	297,28	307,92	315,34	304,31	329,66	310,90
163	300,76	288,27	312,84	301,94	280,72	296,90
158	306,71	306,71	291,60	309,14	293,85	301,60
96	306,71	306,71	325,66	289,37	306,71	307,03
194	314,09	321,73	299,59	321,73	317,88	315,00
3	276,54	275,50	287,17	298,43	319,15	291,36
138	294,98	301,94	286,08	301,94	283,92	293,77
182	274,48	300,76	312,84	298,43	299,59	297,22
25	293,85	323,03	316,61	328,32	311,60	314,68
250	287,17	280,72	304,31	307,92	284,99	293,02
1	291,60	287,17	287,17	294,98	311,60	294,50
173	303,12	290,48	311,60	307,92	309,14	304,45
85	312,84	310,37	315,34	326,98	311,60	315,43
84	271,44	271,44	266,48	300,76	311,60	284,34
42	288,27	290,48	277,57	317,88	288,27	292,49
126	326,98	301,94	294,98	289,37	310,37	304,73
36	309,14	317,88	297,28	310,37	303,12	307,56
65	297,28	288,27	275,50	286,08	300,76	289,58
267	298,43	297,28	292,72	306,71	323,03	303,63
90	294,98	321,73	299,59	316,61	297,28	306,04
102	307,92	283,92	314,09	319,15	316,61	308,34
160	317,88	309,14	303,12	290,48	321,73	308,47
188	282,84	280,72	288,27	296,13	280,72	285,73
234	299,59	312,84	315,34	271,44	298,43	299,53
38	292,72	319,15	311,60	321,73	297,28	308,50
278	291,60	280,72	283,92	284,99	282,84	284,81
128	289,37	287,17	290,48	283,92	282,84	286,76
200	303,12	310,37	299,59	310,37	284,99	301,69
26	314,09	321,73	306,71	305,51	323,03	314,21
5	280,72	286,08	280,72	279,66	277,57	280,95
75	292,72	303,12	282,84	306,71	319,15	300,91
144	292,72	309,14	306,71	310,37	297,28	303,24
241	287,17	314,09	316,61	316,61	316,61	310,21
229	300,76	290,48	298,43	306,71	303,12	299,90
273	284,99	310,37	305,51	309,14	305,51	303,10

116	299,59	310,37	305,51	319,15	300,76	307,08
226	314,09	319,15	307,92	301,94	314,09	311,44
237	311,60	280,72	282,84	282,84	297,28	291,06
86	290,48	293,85	292,72	300,76	291,60	293,88
56	283,92	279,66	305,51	286,08	312,84	293,60
176	312,84	289,37	300,76	314,09	303,12	304,04
49	290,48	278,61	271,44	306,71	316,61	292,77
167	288,27	300,76	279,66	292,72	316,61	295,60
112	300,76	298,43	304,31	292,72	312,84	301,81
132	310,37	301,94	316,61	314,09	309,14	310,43
162	290,48	270,44	292,72	278,61	271,44	280,74
37	296,13	288,27	283,92	298,43	298,43	293,03
30	299,59	294,98	303,12	289,37	306,71	298,76
239	300,76	305,51	303,12	301,94	309,14	304,09
156	293,85	281,78	270,44	293,85	289,37	285,86
236	282,84	281,78	305,51	307,92	293,85	294,38
148	287,17	288,27	324,34	299,59	304,31	300,74
153	312,84	297,28	314,09	314,09	325,66	312,79

Apêndice 4

Instruções gerais para a etapa *in situ* – Subprojeto I

INSTRUÇÕES GERAIS

*Após a entrega do aparelho, o voluntário deverá utilizar o mesmo pelo período de tempo pré-determinado pelo pesquisador. Antes da utilização do aparelho o voluntário deverá escovar os dentes utilizando a escova e o creme dental fornecido pelo pesquisador responsável. Após a escovação, o voluntário deverá esperar o período mínimo de 1 hora para a instalação do aparelho. Além disso, é importante lembrar que durante o período de uso do aparelho **NÃO** será permitido à ingestão de alimentos e bebidas, inclusive água.*

1º dia – Uso dos dispositivos intrabucais por 30 minutos

2º dia – Uso dos dispositivos intrabucais por 1 hora

3º dia – Uso dos dispositivos intrabucais por 2 horas

3º dia – Uso dos dispositivos intrabucais por 12 horas

OBS: Logo após o uso, o aparelho (enrolado em gaze umedecida) deverá ser entregue ao pesquisador responsável, o qual aguardará no laboratório de Bioquímica da FOB-USP.

Agradecemos a compreensão de todos os voluntários, e caso haja dúvidas poderá ser esclarecida pelos emails ou telefones abaixo:

Fernanda Lyrio (14) 81302808 / (71) 88128449 – fernandalyrio@usp.br

Apêndice 5

Valores das 5 indentações, médias (KHN) da dureza superficial inicial de todos os espécimes – Subprojeto II:

	Espécime	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	Média
	1	328,32	349,34	366,06	352,29	350,81	349,36
	2	311,60	312,84	294,98	299,59	340,69	311,94
	3	333,73	374,06	337,88	352,29	347,87	349,17
	4	397,91	416,38	362,93	367,64	408,84	390,74
	5	350,81	359,84	343,54	370,83	344,97	354,00
	6	346,42	359,84	377,33	343,54	366,06	358,64
	7	387,42	389,14	405,15	355,28	367,64	380,93
	8	336,49	372,44	314,09	367,64	346,42	347,42
	9	263,57	292,72	281,78	255,12	259,76	270,59
	10	342,11	332,37	324,34	356,79	347,87	340,70
	11	312,84	352,29	310,37	342,11	358,31	335,18
	12	321,73	300,76	301,94	335,11	323,03	316,51
	13	352,29	382,33	353,78	399,70	426,09	360,03
	14	352,29	359,84	356,79	335,11	396,13	398,52
	15	405,15	384,01	359,84	459,58	384,01	398,52
	16	366,06	366,06	333,73	406,99	367,64	368,10
	17	367,64	385,71	378,99	353,78	358,31	368,89
	18	329,66	294,98	332,37	281,78	329,66	313,69
	19	294,98	362,93	350,81	337,88	369,23	343,17
	20	390,87	352,29	387,42	390,87	367,64	377,82
	21	269,44	358,31	358,31	346,42	347,87	336,07
	22	323,03	331,01	315,34	292,72	332,37	318,89
	23	361,38	347,87	355,28	314,09	346,42	345,01
	24	344,97	349,34	387,42	344,97	394,37	364,21
	25	339,28	366,06	353,78	364,49	359,84	356,69
	26	369,23	387,42	369,23	382,33	418,29	385,30
	27	372,44	394,37	370,83	401,51	428,08	393,44
	28	294,98	384,01	362,93	369,23	320,44	346,32
	29	349,34	359,84	356,79	343,54	336,49	349,20
	30	336,49	335,11	320,44	352,29	366,06	342,08

	31	307,92	347,87	294,98	324,34	301,94	315,41
	32	235,29	361,38	362,93	333,73	366,06	331,88
	33	384,01	362,93	378,99	359,84	382,33	373,62
	34	390,87	408,84	384,01	352,29	352,29	377,66
	35	418,29	382,33	378,99	390,87	382,33	390,56
	36	333,73	208,59	329,66	275,50	366,06	302,71
	37	401,51	366,06	378,99	346,42	362,93	371,18
	38	268,45	364,49	326,98	319,15	380,65	331,95
	39	378,99	361,38	358,31	380,65	370,83	370,03
	40	374,06	264,54	389,14	346,42	342,11	343,25
	41	392,61	359,84	364,49	382,33	375,69	374,99
	42	369,23	356,79	416,38	374,06	370,83	377,46
	43	377,33	366,06	362,93	356,79	319,15	356,45
	44	306,71	332,37	300,76	310,37	288,27	307,70
	45	380,65	349,34	347,87	356,79	347,87	356,51
	46	331,01	331,01	325,66	377,33	328,32	338,67
	47	426,09	387,42	397,91	369,23	375,69	391,27
	48	337,88	362,93	361,38	305,51	358,31	345,20
	49	317,88	375,69	336,49	355,28	352,29	347,53
	50	361,38	332,37	362,93	344,97	335,11	347,35
	51	377,33	364,49	359,84	343,54	339,28	356,90
	52	283,92	276,54	298,43	284,99	284,99	285,77
	53	314,09	312,84	282,84	297,28	312,84	303,98
	54	287,17	289,37	240,23	282,84	291,60	278,24
	55	369,23	346,42	325,66	335,11	343,54	343,99
	56	358,31	311,60	307,92	367,64	355,28	340,15
	57	416,38	394,37	378,99	380,65	361,38	386,35
	58	359,84	358,31	353,78	346,42	317,88	347,25
	59	356,79	356,79	384,01	350,81	377,33	365,15
	60	377,33	356,79	405,15	367,64	384,01	378,19
	61	352,29	372,44	344,97	342,11	369,23	356,21
	62	353,78	359,84	361,38	346,42	367,64	357,81
	63	361,38	392,61	355,28	358,31	364,49	366,42
	64	319,15	349,34	362,93	358,31	347,87	347,52
	65	380,65	385,71	315,34	281,78	239,40	320,58
	66	356,79	353,78	362,93	312,84	354,08	348,09
	67	353,78	321,73	390,87	377,33	324,34	353,61

	68	387,42	390,87	350,81	364,49	350,81	368,88
	69	288,27	343,54	356,79	362,93	362,93	342,89
	70	288,27	306,71	329,66	312,84	316,61	310,82
	71	311,60	362,93	340,69	335,11	382,33	346,53
	72	422,16	397,91	387,42	444,46	359,84	402,36
	73	396,13	408,84	362,93	453,01	403,32	404,85
	74	337,88	352,29	331,01	358,31	343,54	344,61
	75	392,61	392,61	367,64	370,83	361,38	377,02
	76	366,06	382,33	352,29	358,31	287,17	349,23
	77	305,51	377,33	352,29	320,44	359,84	343,08
	78	377,33	405,15	362,93	319,15	328,32	358,58
	79	336,49	362,93	358,31	356,79	359,84	354,87
	80	315,34	317,88	271,44	342,11	310,37	311,43
	81	364,49	349,34	358,31	374,06	332,37	355,71
	82	303,12	309,14	310,37	289,37	297,28	301,85
	83	355,28	369,23	380,65	405,15	375,69	377,20
	84	353,78	406,99	375,69	344,97	359,84	368,26
	85	359,84	352,29	369,23	364,49	361,38	361,45
	86	352,29	310,37	323,03	326,98	337,88	330,11
	87	461,80	337,88	384,01	356,79	370,83	382,26
	88	323,03	362,93	251,50	168,69	266,48	274,53
	89	346,42	375,69	353,78	372,44	372,44	364,15
	90	352,29	403,32	412,58	378,99	396,13	388,66
	91	359,84	420,22	382,33	340,69	396,13	379,84
	92	307,92	303,12	301,94	306,71	340,69	312,08
	93	396,13	372,44	385,71	420,22	362,93	387,49
	94	270,44	286,08	297,28	307,92	304,31	293,20
	95	307,92	369,23	367,64	355,28	389,14	357,84
	96	412,58	382,33	385,71	369,23	362,93	382,56
	97	384,01	396,13	387,42	372,44	364,49	380,90
	98	350,81	392,61	385,71	369,23	352,29	370,13
	99	353,78	347,87	336,49	355,28	358,31	350,35
	100	372,44	382,33	335,11	356,79	347,87	358,91
	101	347,87	366,06	377,33	384,01	378,99	370,85
	102	392,61	403,32	377,33	384,01	440,28	399,51
	103	370,83	356,79	359,84	387,42	305,51	356,08
	104	361,38	361,38	350,81	380,65	344,97	359,84

	105	339,28	349,34	382,33	370,83	385,71	365,50
	106	387,42	355,28	340,69	377,33	399,70	372,09
	107	359,84	329,66	343,54	335,11	319,15	337,46
	108	359,84	329,66	375,69	412,58	372,44	370,04
	109	274,48	265,50	290,48	256,04	292,72	275,84
	110	378,99	366,06	392,61	389,14	406,99	386,76
	111	309,14	283,92	290,48	283,92	296,13	292,72
	112	408,84	385,71	406,99	414,47	378,99	399,00
	113	377,33	216,96	378,99	394,37	358,31	345,19
	114	361,38	328,32	312,84	366,06	367,64	347,25
	115	349,34	321,73	332,37	347,87	347,87	339,84
	116	396,13	382,33	346,42	380,65	382,33	377,57
	117	323,03	352,29	339,28	325,66	337,88	335,63
	118	333,73	367,64	336,49	385,71	359,84	356,68
	119	394,37	382,33	410,70	444,46	450,85	416,54
	120	342,11	358,31	323,03	356,79	339,28	343,91
	121	343,54	364,49	279,66	377,33	397,91	352,59
	122	343,54	432,09	405,15	342,11	356,79	375,94
	123	286,08	324,34	293,85	275,50	307,92	297,54
	124	378,99	359,84	387,42	399,70	384,01	381,99
	125	366,06	314,09	361,38	316,61	298,43	331,31
	126	289,37	343,54	339,28	325,66	332,37	326,04
	127	305,51	328,32	281,78	288,27	281,78	297,13
	128	367,64	353,78	394,37	396,13	390,87	380,56
	129	315,34	399,70	375,69	396,13	355,28	368,43
	130	364,49	372,44	389,14	356,79	403,32	377,24
	131	359,84	336,49	361,38	358,31	350,81	353,37
	132	362,93	369,23	352,29	369,23	361,38	363,01
	133	266,48	310,37	269,44	342,11	320,44	301,77
	134	328,32	380,65	344,97	377,33	343,54	354,96
	135	335,11	369,23	382,33	359,84	311,60	351,62
	136	403,32	366,06	378,99	356,79	397,91	380,61
	137	328,32	335,11	343,54	353,78	378,99	347,95
	138	408,84	389,14	382,33	405,15	356,79	388,45
	139	233,67	242,76	174,75	287,17	248,83	237,44
	140	364,49	355,28	369,23	374,06	378,99	368,41
	141	378,99	416,38	389,14	444,46	374,06	400,60

	142	416,38	384,01	378,99	392,61	361,38	386,67
	143	343,54	347,87	326,98	286,08	350,81	331,06
	144	403,32	369,23	372,44	375,69	392,61	382,66
	145	328,32	310,37	342,11	297,28	314,09	318,43
	146	356,79	350,81	356,79	359,84	377,33	360,31
	147	366,06	342,11	342,11	340,69	382,33	354,66
	148	346,42	361,38	353,78	377,33	324,34	352,65
	149	337,88	339,28	347,87	329,66	326,98	336,34
	150	374,06	350,81	342,11	346,42	370,83	356,85
	151	380,65	394,37	362,93	382,33	442,36	392,53
	152	366,06	370,83	420,22	399,70	366,06	384,57
	153	315,34	323,03	320,44	378,99	355,28	338,62
	154	382,33	361,38	375,69	344,97	320,44	356,96
	155	264,54	248,83	244,47	265,50	276,54	259,98
	156	401,51	340,69	364,49	329,66	369,23	361,12
	157	359,84	332,37	344,97	367,64	353,78	351,72
	158	352,29	387,42	374,06	377,33	347,87	367,80
	159	311,60	306,71	260,71	250,60	307,92	287,51
	160	328,32	333,73	328,32	316,61	353,78	332,15
	161	251,50	309,14	298,43	269,44	317,88	289,28
	162	359,84	342,11	367,64	331,01	317,88	343,70
	163	317,88	297,28	319,15	317,88	210,64	292,56
	164	335,11	378,99	332,37	380,65	370,83	359,59
	165	301,94	263,57	306,71	369,23	319,15	312,12
	166	317,88	344,97	336,49	350,81	321,73	334,38
	167	336,49	333,73	364,49	321,73	328,32	336,95
	168	356,79	359,84	347,87	339,28	366,06	353,97
	169	397,91	374,06	384,01	406,99	378,99	388,39
	170	362,93	361,38	397,91	362,93	361,38	369,31
	171	412,58	399,70	374,06	375,69	382,33	388,87
	172	367,64	353,78	323,03	359,84	470,86	375,03
	173	367,64	344,97	377,33	387,42	367,64	369,00
	174	248,83	266,48	243,62	236,92	244,47	248,06
	175	349,34	333,73	375,69	336,49	353,78	349,81
	176	347,87	288,27	347,87	335,11	369,23	337,67
	177	367,64	424,12	390,87	401,51	370,83	390,99
	178	328,32	362,93	369,23	315,34	343,54	343,87

	179	390,87	392,61	366,06	378,99	366,06	378,92
	180	337,88	336,49	349,34	339,28	369,23	346,45
	181	385,71	339,28	369,23	375,69	375,69	369,12
	182	273,46	353,78	346,42	374,06	356,79	340,90
	183	426,09	366,06	331,01	307,92	366,06	359,43
	184	384,01	342,11	369,23	340,69	359,84	359,18
	185	333,73	390,87	375,69	372,44	385,71	371,69
	186	352,29	394,37	401,51	366,06	359,84	374,81
	187	382,33	397,91	361,38	361,38	336,49	367,90
	188	426,09	375,69	359,84	320,44	335,11	363,43
	189	382,33	405,15	390,87	347,87	389,14	383,07
	190	356,79	311,60	340,69	359,84	364,49	346,68
	191	355,28	339,28	344,97	347,87	361,38	349,76
	192	389,14	387,42	380,65	416,38	414,47	397,61
	193	382,33	397,91	428,08	378,99	399,70	397,40
	194	311,60	304,31	329,66	355,28	375,69	335,31
	195	412,58	412,58	397,91	438,21	405,15	413,29
	196	377,33	385,71	387,42	347,87	331,01	365,87
	197	349,34	347,87	326,98	355,28	349,34	345,76
	198	343,54	380,65	361,38	333,73	343,54	352,57
	199	361,38	332,37	335,11	339,28	336,49	340,93
	200	336,49	356,79	374,06	382,33	372,44	364,42
	201	349,34	317,88	374,06	325,66	337,88	340,96
	202	304,31	355,28	320,44	361,38	339,28	336,14
	203	277,57	289,37	283,92	219,86	303,12	274,77
	204	315,34	343,54	331,01	343,54	344,97	335,68
	205	340,69	319,15	312,84	329,66	307,92	322,05
	206	366,06	347,87	347,87	328,32	349,34	347,89
	207	324,34	326,98	382,33	296,13	325,66	331,09
	208	358,31	346,42	352,29	343,54	375,69	355,25
	209	333,73	352,29	356,79	356,79	370,83	354,09
	210	364,49	384,01	355,28	347,87	372,44	364,82
	211	344,97	329,66	321,73	309,14	332,37	327,57
	212	370,83	343,54	382,33	355,28	343,54	359,10
	213	310,37	310,37	320,44	305,51	335,11	316,36
	214	356,79	350,81	372,44	367,64	355,28	360,59
	215	310,37	350,81	362,93	356,79	296,13	335,41

	216	362,93	344,97	366,06	339,28	361,38	354,93
	217	352,29	311,60	389,14	347,87	353,78	350,94
	218	312,84	297,28	276,54	293,85	287,17	293,53
	219	281,78	288,27	297,28	293,85	304,31	293,10
	220	332,37	311,60	340,69	333,73	323,03	328,29
	221	320,44	442,36	342,11	333,73	297,28	347,18
	222	406,99	261,66	314,09	289,37	280,72	310,56
	223	337,88	305,51	312,84	309,14	328,32	318,74
	224	332,37	394,37	370,83	337,88	320,44	351,18
	225	301,94	342,11	339,28	370,83	396,13	350,06
	226	281,78	303,12	282,84	294,98	310,37	294,62
	227	339,28	299,59	276,54	282,84	332,37	306,12
	228	281,78	325,66	225,85	320,44	314,09	293,56
	229	317,88	346,42	352,29	337,88	353,78	341,65
	230	399,70	344,97	361,38	394,37	344,97	369,08
	231	274,48	265,50	325,66	328,32	294,98	297,79
	232	335,11	319,15	320,44	358,31	315,34	329,67
	233	301,94	337,88	350,81	358,31	347,87	339,36
	234	323,03	326,98	346,42	297,28	350,81	328,90
	235	320,44	283,92	340,69	311,60	278,61	307,05
	236	201,34	209,95	225,09	232,87	230,50	219,95
	237	287,17	309,14	323,03	320,44	301,94	308,34
	238	310,37	339,28	329,66	358,31	317,88	331,10
	239	238,57	305,51	320,44	296,13	303,12	292,75
	240	335,11	324,34	347,87	346,42	378,99	346,55
	241	332,37	335,11	305,51	339,28	328,32	328,12
	242	312,84	312,84	320,44	323,03	332,37	320,30
	243	329,66	324,34	350,81	339,28	315,34	331,89
	244	312,84	319,15	394,37	347,87	455,18	365,88
	245	307,92	312,84	310,37	304,31	297,28	306,54
	246	326,98	335,11	356,79	347,87	372,44	347,84
	247	359,84	364,49	403,32	375,69	403,32	381,33
	248	346,42	361,38	333,73	344,97	349,34	347,17
	249	385,71	336,49	390,87	333,73	366,06	362,57
	250	380,65	390,87	382,33	377,33	387,42	383,72
	251	292,72	284,99	321,73	294,98	326,98	304,28
	252	401,51	416,38	385,71	367,64	405,15	395,28

	253	356,79	329,66	369,23	375,69	352,29	356,73
	254	362,93	349,34	372,44	356,79	366,06	361,51
	255	265,50	294,98	257,89	276,54	276,54	274,29
	256	375,69	340,69	366,06	380,65	390,87	370,79
	257	355,28	347,87	358,31	364,49	356,79	356,55
	258	316,61	240,23	252,40	278,61	282,84	274,14
	259	370,83	362,93	374,06	353,78	349,34	362,19
	260	282,84	291,60	274,48	262,61	280,72	278,45
	261	273,46	206,57	236,92	232,08	229,71	235,75
	262	310,37	307,92	286,08	331,01	347,87	316,65
	263	298,43	277,57	301,94	288,27	287,17	290,68
	264	311,60	325,66	269,44	328,32	292,72	305,55
	265	273,46	301,94	292,72	279,66	305,51	290,66
	266	324,34	349,34	352,29	323,03	350,81	339,96
	267	366,06	372,44	382,33	396,13	380,65	379,52
	268	336,49	353,78	314,09	350,81	339,28	338,89
	269	312,84	326,98	306,71	319,15	315,34	316,21
	270	375,69	364,49	370,83	352,29	367,64	366,19
	271	343,54	328,32	378,99	380,65	319,15	350,13
	272	314,09	317,88	297,28	324,34	342,11	319,14
	273	246,20	282,84	290,48	300,76	296,13	283,28
	274	259,76	314,09	312,84	287,17	320,44	298,86
	275	290,48	271,44	274,48	271,44	278,61	277,29
	276	361,38	366,06	266,48	346,42	359,84	340,04
	277	326,98	314,09	287,17	332,37	304,31	312,98
	278	372,44	377,33	424,12	337,88	346,42	371,64
	279	253,30	252,40	267,46	290,48	264,54	265,63
	280	301,94	301,94	293,85	326,98	361,38	317,22
	281	319,15	299,59	361,38	337,88	355,28	334,66
	282	260,71	244,47	237,74	214,82	284,99	317,22
	283	314,09	344,97	355,28	377,33	366,06	351,55
	284	305,51	259,76	300,76	306,71	310,37	296,62
	285	282,84	280,72	264,54	299,59	297,28	284,99
	286	358,31	294,98	314,09	288,27	286,08	308,35
	287	374,06	353,78	362,93	377,33	384,01	370,42
	288	364,49	380,65	378,99	378,99	377,33	376,09
	289	294,98	299,59	314,09	300,76	333,73	308,63

	290	326,98	333,73	346,42	359,84	317,88	336,97
	291	225,09	294,98	273,46	288,27	286,08	273,58
	292	299,59	292,72	306,71	306,71	303,12	301,77
	293	309,14	362,93	344,97	316,61	331,01	332,93
	294	314,09	311,60	306,71	343,54	317,88	318,76
	295	250,60	358,31	339,28	378,99	333,73	332,18
	296	343,54	331,01	364,49	353,78	332,37	345,04
	297	339,28	324,34	328,32	344,97	329,66	333,32
	298	361,38	367,64	350,81	358,31	350,81	357,79
	299	259,76	372,44	325,66	356,79	329,66	328,86
	300	352,29	418,29	314,09	397,91	384,01	373,32
	301	355,28	392,61	461,80	394,37	328,32	386,48
	302	396,13	405,15	405,15	343,54	344,97	378,99
	303	306,71	342,11	335,11	311,60	394,37	337,98
	304	343,54	356,79	343,54	337,88	349,34	346,22
	305	326,98	333,73	372,44	356,79	346,42	347,27
	306	366,06	361,38	382,33	382,33	369,23	372,27
	307	307,92	353,78	292,72	300,76	320,44	315,13
	308	312,84	331,01	346,42	297,28	352,29	327,97
	309	256,04	297,28	264,54	304,31	289,37	282,31
	310	279,66	297,28	261,66	254,21	254,21	269,40
	311	375,69	353,78	361,38	364,49	380,65	367,20
	312	324,34	316,61	312,84	210,64	306,71	294,23
	313	315,34	333,73	343,54	328,32	343,54	332,89
	314	352,29	328,32	347,87	333,73	352,29	342,90
	315	346,42	288,27	307,92	336,49	337,88	323,40
	316	352,29	306,71	329,66	326,98	333,73	329,88
	317	337,88	301,94	333,73	343,54	324,34	328,29
	318	267,46	277,57	261,66	280,72	276,54	272,79
	319	339,28	293,85	316,61	303,12	297,28	310,03
	320	280,72	335,11	321,73	346,42	326,98	322,19
	321	340,69	356,79	335,11	347,87	346,42	345,38
	322	299,59	343,54	342,11	337,88	352,29	335,08
	323	336,49	321,73	359,84	329,66	307,92	331,13
	324	292,72	275,50	311,60	296,13	291,60	293,51
	325	309,14	339,28	369,23	324,34	301,94	328,79
	326	353,78	325,66	321,73	335,11	328,32	332,92

	327	310,37	282,84	236,92	265,50	266,48	272,42
	328	401,51	390,87	361,38	336,49	331,01	364,25
	329	298,43	346,42	301,94	328,32	312,84	317,59
	330	342,11	343,54	311,60	230,50	340,69	313,69
	331	397,91	387,42	390,87	387,42	343,54	381,43
	332	378,99	364,49	335,11	362,93	343,54	357,01
	333	389,14	374,06	366,06	370,83	361,38	372,29
	334	364,49	337,88	375,69	353,78	358,31	358,03
	335	347,87	350,81	359,84	420,22	390,87	373,92
	336	369,23	432,09	385,71	337,88	384,01	381,78
	337	412,58	509,88	504,74	459,58	438,21	465,00
	338	329,66	339,28	335,11	349,34	320,44	334,77
	339	311,60	307,92	288,27	306,71	298,43	302,59
	340	336,49	309,14	329,66	355,28	366,06	339,33
	341	377,33	390,87	389,14	387,42	497,18	408,39
	342	374,06	394,37	394,37	416,38	364,49	388,73
	343	299,59	306,71	286,08	340,69	323,03	311,22
	344	275,50	247,95	256,04	247,95	238,57	253,20
	345	291,60	272,45	344,97	367,64	387,42	332,82
	346	390,87	448,70	387,42	378,99	332,37	387,67
	347	291,60	280,72	316,61	323,03	292,72	300,93
	348	324,34	366,06	369,23	375,69	350,81	357,23
	349	297,28	321,73	291,60	329,66	305,51	309,15
	350	289,37	278,61	288,27	300,76	342,11	299,83
	351	349,34	316,61	323,03	326,98	301,94	323,58
	352	339,28	319,15	323,03	301,94	352,29	327,14
	353	267,46	359,84	320,44	350,81	340,69	327,85
	354	281,78	282,84	300,76	306,71	310,37	296,49
	355	299,59	294,98	317,88	311,60	291,60	303,13
	356	329,66	332,37	342,11	394,37	349,34	349,57
	357	358,31	343,54	399,70	372,44	369,23	368,64
	358	412,58	359,84	352,29	353,78	358,31	367,36
	359	301,94	301,94	301,94	309,14	320,44	307,08
	360	384,01	355,28	384,01	267,46	350,81	348,32
	361	377,33	384,01	420,22	384,01	314,09	375,93
	362	298,43	333,73	315,34	297,28	323,03	313,56
	363	382,33	394,37	333,73	412,58	384,01	381,40

	364	335,11	361,38	362,93	332,37	320,44	342,45
	365	353,78	342,11	372,44	333,73	384,01	357,22
	366	349,34	358,31	362,93	375,69	355,28	360,31
	367	374,06	405,15	387,42	367,64	374,06	381,67
	368	378,99	385,71	385,71	353,78	382,33	377,30
	369	367,64	367,64	380,65	397,91	377,33	378,24
	370	364,49	356,79	352,29	377,33	335,11	357,20
	371	392,61	403,32	397,91	399,70	380,65	394,84
	372	384,01	374,06	384,01	364,49	366,06	374,53
	373	339,28	353,78	361,38	396,13	349,34	359,98
	374	361,38	356,79	352,29	378,99	369,23	363,74
	375	340,69	344,97	312,84	353,78	337,88	338,03
	376	374,06	396,13	424,12	428,08	394,37	403,35
	377	387,42	324,34	350,81	335,11	309,14	341,36
	378	328,32	344,97	332,37	333,73	271,44	322,17
	379	358,31	349,34	347,87	364,49	412,58	366,52
	380	408,84	306,71	428,08	399,70	426,09	393,88
Controle	4	397,91	416,38	362,93	367,64	408,84	390,74
	10	342,11	332,37	324,34	356,79	347,87	340,70
	19	294,98	362,93	350,81	337,88	369,23	343,17
	27	372,44	394,37	370,83	401,51	428,08	393,44
	53	314,09	312,84	282,84	297,28	312,84	303,98
	59	356,79	356,79	384,01	350,81	377,33	365,15
	74	337,88	352,29	331,01	358,31	343,54	344,61
	85	359,84	352,29	369,23	364,49	361,38	361,45
	102	392,61	403,32	377,33	384,01	440,28	399,51
	105	339,28	349,34	382,33	370,83	385,71	365,50
	113	377,33	216,96	378,99	394,37	358,31	345,19
	123	286,08	324,34	293,85	275,50	307,92	297,54
	132	362,93	369,23	352,29	369,23	361,38	363,01
	169	397,91	374,06	384,01	406,99	378,99	388,39
	237	287,17	309,14	323,03	320,44	301,94	308,34
	274	259,76	314,09	312,84	287,17	320,44	298,86
	311	375,69	353,78	361,38	364,49	380,65	367,20
	337	412,58	509,88	504,74	459,58	438,21	465,00
	341	377,33	390,87	389,14	387,42	497,18	408,39
	355	299,59	294,98	317,88	311,60	291,60	303,13

Apêndice 6

Instruções gerais para a etapa *in situ* – Subprojeto II

INSTRUÇÕES GERAIS

*Após a entrega do aparelho, o voluntário deverá utilizar o mesmo pelo período de tempo pré-determinado pelo pesquisador. Antes da utilização do aparelho o voluntário deverá escovar os dentes utilizando a escova e o creme dental fornecido pelo pesquisador responsável. Após a escovação, o voluntário deverá esperar o período mínimo de 1 hora para a instalação do aparelho. Além disso, é importante lembrar que durante o período de uso do aparelho **NÃO** será permitido à ingestão de alimentos e bebidas, inclusive água*

1º dia – Uso dos dispositivos intrabuciais por 30 minutos

2º dia – Uso dos dispositivos intrabuciais por 1 hora

3º dia – Uso dos dispositivos intrabuciais por 2 horas

3º dia – Uso dos dispositivos intrabuciais por 12 horas

OBS: Antes de completar o tempo de uso, o voluntário deverá ir ao laboratório de Bioquímica da FOB-USP para que a desmineralização dos blocos seja realizada imediatamente após a remoção do dispositivo no tempo inicialmente determinado. Após a realização desse procedimento, o voluntário receberá outros dispositivos contendo novos blocos de esmalte para a utilização durante o tempo seguinte.

Agradecemos a compreensão de todos os voluntários, e caso haja dúvidas poderá ser esclarecida pelos emails ou telefones abaixo:

Fernanda Lyrio (14) 81302808 / (71) 88128449 – fernandalyrio@usp.br

Anexos

Anexo 1

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 556.264

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 10.3.2014. No entanto solicita-se a correção da Resolução 196/96 para a Resolução vigente, Res.466/12 (p.13 do projeto na íntegra). Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 13 de Março de 2014

Assinador por:
Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)