UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MAISA CAMILLO JORDÃO ALMEIDA

**Estabelecimento de protocolos *in vitro* e *in situ* para estudos de
erosão dentária**

BAURU
2016

MAISA CAMILLO JORDÃO ALMEIDA

Estabelecimento de protocolos *in vitro* e *in situ* para estudos de erosão dentária

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

Orientadora: Profª Drª Daniela Rios Honório

Versão Corrigida

BAURU
2016

AL64e Almeida, Maisa Camillo Jordão
Estabelecimento de protocolos *in vitro* e *in situ*
para estudos de erosão dentária / Maisa Camillo
Jordão Almeida. – Bauru, 2016.
122 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profª Drª Daniela Rios Honório

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 tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:
43949715.8.0000.5417
07102812.8.0000.5417
Data: 18/09/2015

DEDICATÓRIA

À Deus

Que dá sentido à minha vida. Que me faz conservar a esperança todos os dias, me fazendo acreditar que se eu seguir seus passos não precisarei temer o inesperado. Obrigada Senhor por ser minha fortaleza e agir em minha vida me cobrindo de graças.

“Acreditar não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para os enfrentar sabendo que não estamos sozinhos.

Deus nos surpreende sempre, rompe os nossos esquemas, põe em crise os nossos projetos e nos diz: confia em Mim, não tenhas medo, deixa-te surpreender, sai de ti mesmo e segue- Me!”

Papa Francisco

Aos meus pais Vera Lúcia e Luís Francisco

Aos meus maiores e melhores exemplos. O que seria de mim se não fosse o apoio e amor incondicional de vocês. Graças a vocês concretizo mais esta etapa. E é com muita alegria que iremos compartilhar desse momento tão aguardado. Espero um dia poder ser uma mãe tão boa e dedicada quanto você mãe, transmitir aos meus filhos os princípios e valores tão verdadeiramente ensinados a mim pai. Essa conquista é graças a vocês e para vocês! Obrigada por serem tudo para mim! Amo muito vocês!

Ao meu marido Douglas

Amor, quantas mudanças ao longo desses últimos 3 anos. A distância não foi fácil. Como você fez falta. Hoje vejo o quanto nos tornamos mais fortes e maduros com todas essas experiências. Se hoje estou aqui foi graças ao seu incentivo. Você me motivou a iniciar o doutorado e o mais importante, me apoiou durante todo o percurso, que não foi nada fácil. Mas que graça teria se fosse. Essa vitória será muito comemorada por nós. Você faz parte dela! E que venham novos desafios. Ao seu lado tudo é mais tranquilo e seguro! Obrigada pela paciência, companheirismo, amizade e cuidado. Te amo para sempre!

À minha querida irmã Martha

Como é bom ter uma irmã tão maravilhosa. Nossa amizade e cumplicidade são inexplicáveis. Mana, sabe o quanto te amo e te admiro! Agradeço à Deus por ter você em minha vida! Obrigada por sempre estar na torcida pelo meu crescimento. Sabe o quanto é importante para mim. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Daniela Rios

Dani, o carinho que tenho por você é imenso. Sempre estarei na torcida pelo seu sucesso e crescimento pessoal e acima de tudo orando por sua família. Você me ensinou muito. Não tenho como agradecer isso. Espero um dia poder passar para meus alunos um pouco das experiências que você compartilhou comigo, do conhecimento que você repartiu e mais do que tudo isso, fazê-lo com o amor que você faz. O amor é a ferramenta mais linda que temos. Ele tudo transforma. Quando trabalhamos com amor, semeamos só boas sementes. Obrigada por me orientar com amor!

Aos professores Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, Dr. Ruy César Camargo Abdo e Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva pela dedicação. Levarei sempre comigo seus ensinamentos. A vocês meu respeito e admiração!

À Profa. Dra. Maria Aparecida Andrade Moreira Machado. Seu entusiasmo e dinamismo são contagiantes. Muito obrigada pela atenção e incentivo. Isso fez toda a diferença!

À Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira e ao Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva. Agradeço a orientação e ensinamentos transmitidos. Obrigada por contribuírem com minha formação!

Ao Prof Dr Heitor Marques Honório por realizar a estatística deste trabalho. Obrigada pela sua disponibilidade e importante colaboração! Admiro sua competência, capacidade e profissionalismo.

Aos colegas da Odontopediatria e da Pós-Graduação Jana, Fabrício, Nádía, Juliana, Natália, Luciana, Paulinha, Bianca, Daniela, Tássia, Natalino, Mariel, Ana Paula, Brunna, Paola, agradeço pela convivência, pelas conversas e aprendizado. Desejo a cada um de vocês um caminho de muitas realizações e sucesso!

*Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, **Dona Lia, Estela, Lilian, Lourisvalda, Evandro e Alexandre** pelo carinho com que sempre me receberam e por todas as vezes em que me ajudaram. Levo vocês no meu coração!*

*Ao Departamento de Ciências Biológicas da Disciplina de Bioquímica desta Instituição, na pessoa da **Profa Dra Marília Anfonso Rabello Buzalaf** pela permissão de uso dos equipamentos necessários para realização desse estudo.*

*Às funcionárias do laboratório de Bioquímica da FOB-USP, **Telma e Larissa**, pela disposição e carinho com que me auxiliaram durante a realização desta pesquisa e ao funcionário do laboratório de Ortodontia da FOB-USP, **Sérgio**, pela confecção dos dispositivos intrabucais mandibulares utilizados nessa pesquisa.*

*À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.*

*Aos **alunos da graduação** que confiaram em mim ao pedir uma opinião ou ajuda, me permitindo transmitir um pouco do meu conhecimento. Vocês me fizeram sentir o prazer de ensinar, de compartilhar e principalmente de aprender. Ao lado de vocês coloquei em prática um desejo que há tempos estive quieto e tímido dentro de mim. Além de gratificante, me encheu de alegria. À toda a turma meu muito obrigada pela acolhida sincera e carinhosa!*

*Às minhas queridas “orientadas” **Isabela, Poliana e Bianca**. Como aprendi com vocês. Foi realmente um presente viver a experiência da orientação junto de três alunas tão disciplinadas e responsáveis. Tão diferentes entre si, mas igualmente especiais. Também aos demais alunos que tive a satisfação de auxiliar em algum momento. Sou muito grata por ter convivido com vocês!*

*Aos **voluntários** das pesquisas realizadas no departamento. Sem vocês nada disso seria possível. A colaboração de cada um foi essencial. Minha eterna gratidão!*

Aos meus **“pequenos pacientes”**, que ao final de cada consulta me recompensaram com seu sorriso e um abraço carinhoso, me dando a certeza de que escolhi a profissão certa.

À toda minha família, queridos **sogro e sogra, tios e tias, cunhados e cunhadas, primos e amigos** que sempre estiveram na torcida por mim!

À nossa **Lis**, que nos completa com sua alegria e amor!

Ao meu avô **Valdemar**, que me chama de doutora mesmo antes de eu receber o título e a minhas avós **Lica e Lourdinha**. Como amo vocês! É tão bom receber o amor verdadeiro que vem de cada olhar e gesto de vocês. Esse amor me fortalece sempre! Tenham certeza que suas orações sempre chegaram até mim e me encheram de bênção!

Ao meu querido amigo e sempre mestre **Dr. Antônio Vicente Fernandes**, que acreditou em meu trabalho quando eu apenas engatinhava na profissão. Com sua bondade e carinho me fez conhecer a verdadeira odontopediatria. Como é linda nossa profissão! Como foi gratificante poder compartilhar de seu conhecimento e sabedoria. Tenho muito orgulho em ter convivido com o senhor, de ter trabalhado e aprendido ao seu lado! E além de tudo, tive o privilégio de ser mimada pela sua família, aliás, minha família Mariliense. Isso é impagável. Serei eternamente grata por tudo!

À minha querida prima **Joyce**, por ter me recebido em sua casa com tanto carinho! Jo, jamais esquecerei do que fez por mim. Sua casa foi também minha por 1 ano, durante minhas idas à Marília. E como era bom ter sua companhia semanal! Sinto saudade de nossas conversas.

A todos os professores que passaram pela minha vida, aos que me ensinaram a levantar depois de uma queda, a segurar o lápis, a controlar a ansiedade na véspera das provas, a discernir o certo do errado. A todos que despertaram em mim o amor pela profissão durante a graduação e fizeram enxergar o que eu queria para o futuro. Em especial as minhas primeiras orientadoras, **Karina**

Fittipaldi Bombonato Prado e **Cecília Pedroso Turssi**. Como vocês foram importantes para minha iniciação no meio científico. A todos os que escutaram meus medos e aconselharam sabiamente. Durante a pós-graduação, perdi as contas de quantas vezes você **Dani** fez isso. E aos que continuam a me ensinar agora em São Paulo! Sou muito grata a todos os professores que passaram pela minha vida e aos que permanecem plantando o conhecimento plenamente. Graças a todos vocês hoje conquisto mais essa vitória.

À querida amiga **Gabriela**. O que dizer de uma pessoa que se tornou tão especial. Gabi, obrigada pelas risadas, pela ajuda, pelas conversas, ligações, preocupação e por me receber de braços abertos em sua casa! Isso é impagável. Espero um dia poder retribuir um pouquinho do que fez por mim. Você merece toda a felicidade desse mundo! Tenho certeza que, independentemente de onde estiver e do que fizer, desde que seja com amor, terá um futuro brilhante pela frente! Deus sempre mostrará o caminho para isso! Obrigada por tudo!

À querida amiga **Fernanda**. Como foi bom ter convivido com você Fer. Sempre aparece naquele momento que nada parece dar certo, e de repente, com um gesto seu, tudo acontece e fica bem. Obrigada por toda ajuda. Continue sempre conduzindo sua vida de maneira leve. Você se tornou uma amiga muito querida e especial. Estarei sempre na torcida para que tudo de melhor aconteça em sua vida!

À querida amiga **Franciny**. Sabe aquela pessoa que no momento em que conhecemos sabemos que vamos nos dar bem?! Com você foi assim Fran. Como é bom ter sua amizade. Adoro nossas conversas, sua maneira de agir, seu posicionamento perante a vida. Aprendi muito com você e espero continuar aprendendo sempre! Obrigada pela sua imensa disposição em ajudar! Adoro você!

À querida **Priscilla**. Pri, passamos muitos momentos juntas, principalmente no início de sua pesquisa. Não foi fácil e imagino como ainda está sendo trabalhoso para você. No entanto, hoje só tenho a agradecer por você ter me apresentado um lado da pesquisa que eu ainda não conhecia. Através de você abri meus horizontes e possibilidades. Sou muito grata por isso! Desejo a você muita sorte e sucesso!

À querida **Catarina**. Cat, sua determinação sempre me admirou e inspirou. Não tenho dúvida que seu caminho será sempre de muito sucesso. A vejo como uma grande professora! Estarei sempre na torcida por você!

À todos que torceram por mim e colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho o meu MUITO OBRIGADA!

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.”

Buda

“Nunca deixe ninguém te dizer que não pode fazer alguma coisa. Se você tem um sonho tem que correr atrás dele.”

À procura da Felicidade

RESUMO

O objetivo foi comparar uma formulação de saliva artificial com e sem mucina (*in vitro*) com a saliva humana (*in situ*) na inibição da desmineralização (subprojeto I) e no reendurecimento de lesões de erosão (subprojeto II), e a influência do tipo de dispositivo intrabucal (mandibular X palatino) no desgaste erosivo do esmalte (subprojeto III). No subprojeto I, blocos de esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície e randomizados entre os grupos: GI - saliva humana (n=30), GII - saliva artificial sem mucina (n=15), GIII - saliva artificial com mucina (n=15) e GIV - água deionizada (n=15). Quinze voluntários utilizaram o dispositivo palatino por um período 2 horas (GI). Nos grupos GII, GIII e GIV, os blocos foram imersos em suas respectivas soluções por um período de 2 horas. Imediatamente após, tanto os blocos do grupo *in situ* quanto dos grupos *in vitro* foram submetidos ao desafio erosivo inicial com ácido cítrico 1% (pH 3,6) por 4 minutos. A microdureza final foi mensurada para determinar a porcentagem de perda de dureza. No subprojeto II, os blocos, após seleção, foram erodidos *in vitro* e randomizados entre grupos como no subprojeto I. Para a erosão, os blocos foram imersos em ácido cítrico 1% (pH 3,6) por 4 minutos. A seguir, no grupo GI, 15 voluntários utilizaram dispositivos palatinos durante 2 horas. Nos outros grupos os blocos foram imersos nas salivas artificiais com (GIII) e sem mucina (GII) e água deionizada (GIV) por 2 horas. A precipitação de minerais sobre o esmalte foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação de dureza. No subprojeto III, após seleção dos blocos pela dureza, os mesmos foram aleatorizados em 2 grupos (n=20): GI - dispositivo palatino e GII - dispositivo mandibular. A ciclagem consistiu na imersão dos dois dispositivos em ácido clorídrico 0,01 M (pH 2,3) por 2 minutos, 4X/dia durante 5 dias. A perda do esmalte foi avaliada por perfilometria e os voluntários responderam a um questionário quanto ao conforto dos dispositivos. Nos subprojetos I e II, os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey e no subprojeto III foi aplicado o Teste T pareado ($p<0,05$). Nos subprojetos I e II observou-se que todas as salivas estudadas foram capazes de promover uma recuperação de dureza do esmalte e nenhuma diferença foi encontrada entre elas ($p<0,05$). No ensaio de desmineralização, a saliva artificial com mucina e a saliva humana (*in situ*) promoveram menor perda de dureza, não mostrando diferença entre elas ($p<0,05$). No subprojeto III os resultados mostraram que os blocos localizados no dispositivo palatino (GI) apresentaram maior desgaste

erosivo quando comparados aos do dispositivo mandibular (GII). Além disso, todos voluntários relataram maior conforto no uso do dispositivo palatino. Considerando que o dispositivo palatino é mais confortável e resultou em maior perda de esmalte quando comparado ao mandibular, sugere-se o uso de dispositivos palatinos em protocolos *in situ* que queiram mimetizar pacientes com alto risco de erosão dentária. Para estudos *in vitro*, a saliva com mucina mostrou-se como uma boa substituta à saliva humana.

Palavras-chave: Esmalte. Erosão dentária. Saliva. Protocolos. *In situ*. *In vitro*.

ABSTRACT

Establishment of *in vitro* and *in situ* protocols for dental erosion studies

The aim was to compare artificial saliva formulation with and without mucin (*in vitro*) with human saliva (*in situ*) on the inhibition of erosive demineralization (subproject I) and on the rehardening of erosion lesions (subproject II), and analyze the influence of the type of intraoral appliance (mandibular X maxillary) in enamel wear caused by erosive challenges (subproject III). In the subproject I, bovine enamel blocks were selected by initial surface hardness and randomized among the groups: GI - human saliva (n=30), GII - artificial saliva without mucin (n=15), GIII - artificial saliva with mucin (n=15) and GIV - deionized water (n=15). Fifteen volunteers wore palatal appliances for 2 hours (GI). In the GII, GIII and GIV groups, the blocks were immersed to the respective solutions for 2 hours. Subsequently, both *in situ* and *in vitro* blocks were subjected to initial erosive challenge in 1% citric acid (pH 3.6) for 4 minutes. Final enamel hardness was measured to determine the protective capacity of saliva tested by percentage of hardness loss. For the subproject II, after blocks selection, they were *in vitro* eroded and randomly among the groups as in subproject I. For erosion, the enamel blocks were immersed on 1% citric acid (pH 3.6) for 4 minutes. Then, in the GI, 15 volunteers wore palatal appliances for 2 hours. In the other groups the blocks were immersed in artificial saliva with (GIII) and without mucin (GII) and deionized water (GIV) for 2 hours. The minerals precipitation on the enamel was evaluated by the percentage of hardness recovery. On subproject III, after enamel blocks selection by surface hardness, they were randomly divided into 2 groups (n=20): GI - palatine appliance and GII - mandibular appliance. Erosive cycling consists in immersing of both devices in 0.01 M hydrochloric acid (pH 2.3) for 2 minutes, 4X/day during 5 days. The analysis of the wear was measured by profilometry and volunteers answered a questionnaire about the comfort of the devices. In the subprojects I and II, data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test, and in the subproject III It was applied paired *t*-test ($p < 0.05$). In subprojects I and II it was observed that all studied saliva promoted enamel rehardening and no difference was found between them ($p < 0.05$). In the demineralization test, the artificial saliva with mucin and human saliva (*in situ*) provided lower enamel hardness loss, showing no difference between them (p

<0.05). In the subproject III, the results showed that the specimens allocated in palatine appliance (GI) presented significantly higher erosive wear when compared to the specimens fixed in mandibular appliance (GII). In addition, all volunteers reported greater comfort in using the palatal device. Considering the palatal device is more comfortable and resulted in higher enamel loss when compared to the mandibular device, it is suggested the use of palatine appliances in *in situ* protocols who want to mimic a patient at high risk of dental erosion. For *in vitro* studies, the saliva with mucin might be a good substitute for human saliva.

Key words: Enamel. Dental erosion. Saliva. Protocols. *In situ*. *In vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bloco de esmalte de 4 x 4 mm ² obtido da porção mais plana da coroa dental bovina	51
Figura 2 - Bloco de esmalte após polimento.....	51
Figura 3 - Endentação inicial do bloco em microdurômetro com ponta Knoop.....	53
Figura 4 - Determinação dos limites da endentação em esmalte hígido	53
Figura 5 - Dispositivo intrabucal palatino	55
Figura 6 - Determinação das áreas controle e teste com lâmina de bisturi.....	61
Figura 7 - Avaliação do perfil inicial	61
Figura 8 - Dispositivo intrabucal palatino	62
Figura 9 - Dispositivo intrabucal mandibular	63

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Média e desvio padrão dos valores de dureza inicial, dureza pós erosão e da porcentagem de perda de dureza do esmalte resultante do desafio erosivo inicial após imersão do esmalte nas salivas estudadas.	69
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de dureza inicial, dureza pós erosão, dureza pós-saliva e da porcentagem de recuperação de dureza do esmalte previamente erodido imerso nas salivas estudadas.	70
Tabela 3 - Médias do desgaste (μm) e desvio-padrão (dP) dos grupos em estudo	71
Tabela 4 - Descrição (%) do desconforto relatada pelos voluntários (n=18) para o uso dos dispositivos intrabucais palatino e mandibular.....	71

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

α	alfa
β	beta
$\cong$	aproximadamente
$<$	menor que
$>$	maior que
$\pm$	mais ou menos
®	marca registrada
°C	grau(s) Celsius
%	por cento
%PDS	porcentagem de perda de dureza de superfície
%SHR	porcentagem de recuperação de dureza
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cm	centímetro(s)
cm ⁻¹	inverso do centímetro
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
dP	desvio-padrão
<i>ex vivo</i>	realizado fora do organismo (latim)
F	flúor
g	grama(s)
g/l	gramas por litro
h	hora
H ⁺	íons de hidrogênio
HA	hidroxiapatita
HCL	ácido clorídrico
<i>In situ</i>	em sítio, no local (no caso, cavidade bucal) (latim)
<i>In vitro</i>	em laboratório (latim)
<i>In vivo</i>	em ser humano (latim)
Ind. Bras.	indústria brasileira
Ind. e Com.	indústria e comércio
KCL	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
KHN	número de dureza knoop

KHN	valor de dureza Knoop
KHz	quilohertz
Ltda	limitada
M	molar
m ³	metro(s) cúbico(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
ml/min	mililitros por minuto
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
mm ³	milímetro(s) cúbico(s)
MMPs	metaloproteinases de matriz
n	número amostral
Na ₂ HPO ₄	hidrogenofosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
NaSCN	tiocianato de sódio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
p	probabilidade
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte(s) por milhão
PRPs	proteínas ricas em prolina
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)
SHe	dureza superficial pós erosão
SHf	dureza superficial final
SHi	dureza superficial inicial
µm	micrometro(s)
µs	microsegundo(s)

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	27
2 - REVISÃO DE LITERATURA	33
3 - PROPOSIÇÃO	45
4 - MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 - Aspectos Éticos	49
4.2 - Obtenção, planificação e polimento dos blocos de esmalte	49
4.3 - Subprojeto 1	51
4.3.1 - Delineamento Experimental	51
4.3.2 - Avaliação da dureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte	52
4.3.3 - Esterilização	53
4.3.4 - Seleção dos Voluntários	53
4.3.5 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado	54
4.3.6 - Avaliação do fluxo salivar estimulado	54
4.3.7 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos	54
4.3.8 - Preparo dos dispositivos intrabucais	55
4.3.9 - Procedimentos intrabucais (<i>in situ</i>) - Grupo I	55
4.3.10 - Formulação das Salivas	56
4.3.11 - Procedimentos laboratoriais (<i>in vitro</i>)	56
4.3.12 - Microdureza Final	56
4.3.13 - Análise Estatística	57
4.4 - Subprojeto 2	57
4.4.1 - Delineamento Experimental	57
4.4.2 - Avaliação da dureza superficial inicial, formação de lesão	

inicial de erosão e seleção dos blocos de esmalte	57
4.4.3 - Esterilização.....	57
4.4.4 - Seleção dos Voluntários	58
4.4.5 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado	58
4.4.6 - Avaliação do fluxo salivar estimulado	58
4.4.7 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos	58
4.4.8 - Preparo dos dispositivos intrabucais.....	58
4.4.9 - Procedimentos intrabucais (in situ) - Grupo I.....	58
4.4.10 - Formulação das Salivas.....	58
4.4.11 - Procedimentos laboratoriais (in vitro)	58
4.4.12 - Microdureza Final.....	59
4.4.13 - Análise Estatística.....	59
4.5 - Subprojeto 3	59
4.5.1 - Delineamento Experimental	59
4.5.2 - Avaliação da dureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte	60
4.5.3 - Avaliação da perfilometria inicial	60
4.5.4 - Esterilização e delimitação das áreas de referência	61
4.5.5 - Seleção dos Voluntários	61
4.5.6 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado	61
4.5.7 - Avaliação do fluxo salivar estimulado	61
4.5.8 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos	61
4.5.9 - Preparo do dispositivo intrabucal palatino.....	61
4.5.10 - Preparo do Dispositivo intrabucal mandibular.....	62
4.5.11 - Procedimentos intrabucais.....	63
4.5.12 - Avaliação da perfilometria final pós-experimento	64

4.5.13 - Avaliação de conforto dos dispositivos intrabucais	65
4.5.14 - Análise Estatística.....	65
5 - RESULTADOS	69
5.1 - Subprojeto 1	69
5.2 - Subprojeto 2	69
5.3 - Subprojeto 3	70
5.3.1 - Questionário de conforto.....	71
6 - DISCUSSÃO	75
6.1 - Considerações sobre a metodologia empregada	75
6.2 - Considerações sobre o resultado dos subprojetos 1 e 2.....	78
6.3 - Considerações sobre o resultado do subprojeto 3.....	81
7 - CONCLUSÕES.....	89
8 - REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE	109
ANEXO	119

1 Introdução

1 - INTRODUÇÃO

Por muitos anos, a erosão dentária recebeu pouca atenção dos clínicos, pesquisadores e da saúde pública (LUSSI; CARVALHO, 2014). No entanto, o aumento da prevalência e incidência de erosão mudou tais percepções (LUSSI; CARVALHO, 2014; JAEGGI; LUSSI, 2014; SALAS et al., 2015). Esta condição tornou-se uma preocupação diária na prática clínica e inúmeras pesquisas vem sendo realizadas para uma melhor compreensão da erosão dentária (WIEGAND; ATTIN, 2011; YOUNG; TENUTA, 2011; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011; SCHLUETER et al., 2011; RAKHMATULLINA; BEYELER; LUSSI, 2013; LUSSI; CARVALHO, 2014). Consequentemente, um aumento do número de publicações relacionadas ao desgaste erosivo dentário têm sido encontradas atualmente (LUSSI; CARVALHO, 2014).

A erosão é um processo químico de perda progressiva do tecido dentário duro que envolve a dissolução de esmalte e/ou dentina por ácidos intrínsecos e extrínsecos não derivados de bactérias (TEN CATE; INFELD, 1996; LINNETT; SEOW, 2001; LARSEN; NYVAD, 1999; GANSS, 2006; GANSS, 2014). A desmineralização envolvida neste processo é causada pelo amolecimento da superfície mineral devido à dissolução dos cristais de apatita do esmalte. Nesta condição, apesar do ácido promover a perda da integridade estrutural provocando alterações físico-químicas do esmalte, este ainda pode sofrer de redeposição mineral (SHELLIS et al., 2011; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; GANSS et al., 2014). Entretanto, se o desafio erosivo for prolongado, com sucessivos eventos de amolecimento, ou houver associação com uma ação mecânica (desgaste), haverá a dissolução das camadas consecutivas dos cristais de esmalte, levando a uma perda permanente do volume da estrutura dentária com amolecimento das camadas subsequentes (SHELLIS et al., 2011; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; GANSS et al., 2014).

Sabe-se que diversas condições podem estar relacionadas à etiologia da erosão dentária, destacando-se os fatores químicos, comportamentais e biológicos (LUSSI, 2006; MAGALHÃES et al., 2009; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; BUZALAF et al., 2012). A interação de todos esses fatores é fundamental e ajuda a explicar o motivo pelo qual alguns indivíduos apresentam mais erosão do que outros, mesmo que estes sejam expostos exatamente ao mesmo desafio erosivo (LUSSI et al., 2006). Dentre os fatores biológicos, o potencial protetor da saliva tem sido descrito

em diversos estudos como um importante aspecto 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; LUSSI; CARVALHO, 2014). A saliva contém uma variedade de proteínas que apresentam propriedades protetoras, especialmente importantes na formação da película adquirida (SIQUEIRA et al., 2007). O principal componente orgânico da saliva responsável pela formação da película adquirida secretada pelas glândulas sublingual e submandibular é a mucina, uma glicoproteína que além de apresentar propriedades como a de lubrificação e aglutinação de bactérias, é considerada como a principal constituinte da película adquirida (NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN, 1987; SCHUPBACH et al., 2001). Esta por sua vez 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 do dente (HANNIG et al., 2004; HARA et al., 2006).

Deste modo, estudos desenvolvidos para avaliar métodos preventivos para erosão têm utilizado tanto a saliva humana como salivas artificiais como agentes remineralizadores (ATTIN et al., 2000; HARA et al., 2008; IONTA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; BATISTA et al., 2016). Entretanto, grande parte das formulações das salivas artificiais apresenta limitações em relação à presença de proteínas salivares responsáveis pela formação da película adquirida, favorecendo o processo de desmineralização (IONTA et al., 2014; BATISTA et al., 2016). Idealmente, os modelos *in vitro* de erosão deveriam expor o substrato dentário à saliva humana natural, porém tal condição se torna inviável pelo fato de que o fluido salivar, após coletado, decompõe-se rapidamente devido à degradação das proteínas (AMAECHI; HIGHAM, 2001).

O ideal seria utilizar ensaios clínicos para o estudo da erosão dentária, mas eles nem sempre são possíveis de serem feitos. As incertezas sobre o padrão da progressão da lesão em estudos a longo prazo e a dificuldade em controlar a exposição do substrato ao desafio ácido torna difícil a realização deste tipo de estudo (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011), pois as variáveis inseridas não podem ser isoladas e mensuradas. Como alternativa, estudos *in situ* podem ser realizados para superar as dificuldades enfrentadas pelos estudos *in vivo*. Estudos *in situ* fornecem muitas vantagens como a redução do número de voluntários, menor período de tempo necessário e a possibilidade de padronização do desafio erosivo (ZERO, 1995). Uma

importante vantagem dos modelos *in situ* é a exposição das amostras à cavidade bucal, permitindo que haja contato direto com a saliva, propiciando o desenvolvimento da película adquirida. Os modelos *in situ* e *in vitro* também podem ser usados em conjunto a fim de ajudar no desenvolvimento e avaliação de métodos preventivos para a erosão (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011).

Dados importantes podem ser obtidos a partir de estudos *in vitro* e *in situ* (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). No entanto, a falta de padronização pode comprometer a comparação dos resultados obtidos por diferentes tipos de estudos. Especificamente em relação aos estudos *in situ*, não há padronização sobre o tipo de dispositivo intrabucal usado, pois alguns estudos adotam dispositivo palatino enquanto outros optam pelo uso do mandibular (de ALENCAR et al., 2014; BELLAMY et al., 2014; HOOPER et al., 2014; STENHAGEN et al., 2013). Sabe-se que este fator pode 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 ao comportamento de diferentes dispositivos intrabucais na erosão do esmalte, o que dificulta a comparação dos estudos que avaliam métodos preventivos.

Desta forma, considerando a importância do tema e com o intuito de buscar resultados que norteiem a padronização de protocolos para o delineamento de futuros estudos no que se refere ao controle da erosão dentária, torna-se oportuno avaliar o impacto da presença de mucina na saliva artificial utilizada em estudos *in vitro* na proteção contra a desmineralização e na promoção da re-precipitação mineral do esmalte, bem como a influência do tipo de dispositivo intrabucal (mandibular X palatino) no desgaste do esmalte diante de desafio erosivo prolongado.

2 Revisão de Literatura

2 - REVISÃO DE LITERATURA

O aumento da prevalência de erosão dentária tem atraído a atenção de clínicos e pesquisadores. Questões envolvendo este processo abrangem uma ampla área da pesquisa em odontologia e constitui também uma preocupação diária na prática clínica (LUSSI; CARVALHO, 2014). Sabendo que o aumento da expectativa de vida tem contribuído para a preservação de maior número de elementos dentais em adultos e idosos (NUNN, 1996), admite-se que mais superfícies estão sob o risco de desgaste, o qual se manifesta através de processos erosivos, abrasivos e de fadiga (ADDY; SHELLIS, 2006). Apesar de ainda não haver um consenso na diferenciação entre o desgaste patológico e o fisiológico (KREULEN et al., 2010), já se verificou um aumento da taxa de erosão nos grupos etários mais jovens (JAEGGI; LUSI, 2006; AUAD et al., 2007; GURGEL et al., 2011; SALAS et al., 2015; HASSELKVIST et al., 2016), sendo importante o diagnóstico precoce para que medidas preventivas sejam implementadas, minimizando as consequências da erosão (VARGAS-FERREIRA et al., 2010). Hasselkvist et al. (2016), após estudarem prospectivamente (por 4 anos) a progressão da erosão dentária em um grupo de adolescentes suecos de 13 a 14 anos de idade, observaram que a progressão ocorreu em 35% das 2566 superfícies dentais analisadas, sendo que 32% das superfícies pioraram em um grau de gravidade ($n = 51$ indivíduos) e 3%, em dois graus ($n = 2$ indivíduos). Conclui-se assim que tanto a incidência quanto a progressão da erosão dentária mostraram-se elevadas nos jovens acompanhados pelo período de 4 anos.

A erosão pode ser definida como o resultado físico de uma perda de tecido duro da superfície dentária de forma localizada, crônica e irreversível, provocada por ácidos e/ou quelantes, sem o envolvimento de bactérias (TEN CATE; IMFELD, 1996). Inicialmente, o ácido presente na cavidade bucal difunde-se pela película adquirida para só então atingir a superfície do dente. Ao alcançá-la, os íons de hidrogênio (H^+) irão iniciar a dissolução dos cristais de esmalte. O efeito dos íons de hidrogênio inicialmente desencadeará a dissolução dos cristais, prismas da bainha e posteriormente dos prismas centrais, deixando a aparência de favos de mel (MEURMAN; FRANK, 1991). Devido a dissolução de tais cristais de esmalte ocasionada pela desmineralização, acontecerá inicialmente o amolecimento da superfície mineral. Nesta condição, apesar do ácido promover a perda da integridade estrutural e da resistência mecânica do esmalte, este ainda é susceptível à

redeposição mineral (SHELLIS et al., 2011; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; GANSS, et al., 2014). Shellis et al. (2013), provaram experimentalmente que a dissolução ocorre não somente na interface entre solução e esmalte, mas também em seu interior, na camada de esmalte parcialmente desmineralizada e consequentemente amolecida. Sendo assim, o desafio erosivo prolongado, ou o impacto de forças mecânicas, provoca o desgaste das camadas consecutivas dos cristais de esmalte, levando a uma perda permanente do volume da estrutura dentária com amolecimento da camada da superfície remanescente (SHELLIS et al., 2011; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; GANSS, et al., 2014).

Quanto às características clínicas, o diagnóstico de lesões iniciais de erosão é bastante desafiador, por apresentarem poucos sinais e praticamente nenhum sintoma. Além disso, não existe nenhum tipo de dispositivo disponível para a detecção destas lesões, sendo a anamnese e o aspecto clínico os principais recursos responsáveis pelo diagnóstico (LUSSI et al., 2006; LUSSI; JAEGGI, 2008). Quando o desafio erosivo acontece por um longo período, a lesão se torna clinicamente visível (GANSS, 2014). As faces lisas dos dentes, começam a apresentar aparência lisa e vítrea, com ausência de periquimácias e presença de esmalte intacto na margem gengival (LUSSI; JAEGGI, 2008). Essa última característica se dá pela presença de placa bacteriana na região cervical dos dentes, 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 e 8,0 (STEPHEN et al., 1980).

Em fases mais avançadas da erosão, pode-se observar o desenvolvimento de uma concavidade no esmalte, cuja largura excede claramente a sua profundidade. Na superfície oclusal, as cúspides tornam-se arredondadas e as restaurações apresentam-se elevadas, acima do nível das superfícies adjacentes, podendo ocorrer o desaparecimento de toda a morfologia dentária nos casos mais severos (LUSSI; JAEGGI, 2008; GANSS, 2014).

Os ácidos responsáveis pela dissolução dos tecidos dentais podem ser de origem intrínseca ou extrínseca (AMAECHI; HIGHAM, 2005). Dentre os ácidos extrínsecos, pode-se citar os ingeridos na dieta por meio do consumo de produtos ácidos (sucos, refrigerantes, vinhos, alimentos), medicamentos de uso crônico, drogas ilícitas, uso abusivo de bebidas alcoólicas, água de piscinas excessivamente cloradas ou vapores industriais (SHAW et al., 1998; AMAECHI; HIGHAM, 2005). Estudos em

crianças e adultos mostram que a ingestão de quatro dietas ácidas diárias está associada com a presença e a progressão da erosão quando outros fatores de risco (tais como a manutenção da bebida na boca) estão presentes (LUSSI; SCHAFFNER, 2000; O'SULLIVAN; CURZON, 2000). No entanto, o potencial erosivo de bebidas ácidas não é inteiramente dependente de seu pH, mas também é afetado fortemente pela titulação do conteúdo ácido (capacidade tampão) e pela propriedade quelante de cálcio (ZERO; LUSI, 2005). Os ácidos de origem intrínseca, também apresentam importância no estudo da erosão, como por exemplo, o ácido clorídrico proveniente do estômago. Este pode ter efeito erosivo se for mantido regularmente na cavidade bucal (LUSSI et al., 2011) e a migração deste ácido pode estar relacionada a condições de regurgitação e vômito associados a desordens alimentares como bulimia e anorexia, doença do refluxo gastroesofágico e em outras situações como alcoolismo crônico, gravidez, cirurgia bariátrica, desordens orgânicas ou psicossomáticas (BARTLETT, 2006; MAGALHÃES et al., 2009).

Apesar da erosão dentária ser provocada pela ação de ácidos, sua etiologia é complexa, uma vez que diversos fatores relacionados ao desgaste erosivo podem estar associados (LARSEN; NYVAD, 1999; EL AIDI et al., 2011; LUSI et al., 2011). Os fatores químicos, comportamentais e biológicos são de grande importância para o entendimento do processo envolvido no desenvolvimento dessa condição (LUSSI, 2006; MAGALHÃES et al., 2009; HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; BUZALAF et al., 2012). A interação e conhecimento de todos eles são fundamentais para a prevenção e tratamento da erosão, além de contribuir para o entendimento da susceptibilidade de alguns indivíduos em relação a outros, mesmo que apresentem desafio erosivo idêntico em suas dietas (LUSSI et al., 2006). 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; LUSI; CARVALHO, 2014). Acredita-se que o cálcio, fosfato e flúor presentes na saliva podem assumir o efeito reparador da lesão inicial do esmalte (IMFELD, 1996). Além disso, a saliva pode atuar como um agente de diluição para ácidos, que são gradualmente removidos da cavidade bucal pelo processo de deglutição. A variedade de proteínas contidas na saliva apresenta propriedades protetoras, especialmente importantes na formação da película adquirida (SIQUEIRA et al., 2007), 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 o dente, reduzindo a dissolução da hidroxiapatita (HANNIG et al., 2004; HARA et al., 2006). Processos que removam ou reduzam a espessura da película podem comprometer sua propriedade protetora e acelerar o processo de erosão (ZERO; LUSSI, 2005; LUSSI et al., 2006). Assim sendo, procedimentos como escovação com dentífrícios abrasivos, limpeza profissional com pasta profilática e clareamento dental irão remover ou enfraquecer a película e tornar o dente mais susceptível à erosão (ZERO; LUSSI, 2005).

A película começa a se formar assim que a saliva entra em contato com o esmalte dentário. Ela incorpora principalmente proteínas salivares (especialmente mucinas), mas também contém peptídeos e em menor escala, as enzimas, as glicoproteínas, os hidratos de carbono, e lipídios (HANNIG; HANNIG; ATTIN, 2005; ZIMMERMAN et al., 2013). Inicialmente, peptídeos e proteínas são adsorvidos na superfície do esmalte, formando assim a película inicial (camada basal) quase instantaneamente. Posteriormente, ocorre um rápido aumento na espessura da película, devido interações proteína-proteína, que permitem a adsorção de proteínas individuais ou aglomerados de proteínas, levando à maturação e modulação da película salivar e a formação de sua camada globular (SKJORLAND et al., 1995; HANNIG; BALZ, 1999; VITKOV et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2012; CARVALHO; BAUMANN; LUSSI, 2016).

É importante destacar que na maioria dos estudos *in vitro* os pesquisadores utilizam saliva artificial, porém em grande parte das formulações faltam proteínas salivares, impedindo a formação adequada da película adquirida e consequentemente favorecendo o processo erosivo. Idealmente, os modelos *in vitro* de erosão deveriam realizar exposição a saliva humana natural, o que não é fácil (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011) visto que a coleta de saliva é demorada e tal fluido decompõe-se rapidamente (AMAECHI; HIGHAM, 2001). Alguns trabalhos tiveram como objetivo mostrar a proteção da superfície do esmalte promovida pela película formada *in situ* (HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG; BALZ, 2001; HANNIG et al., 2003; HANNIG et al., 2004; HEMINGWAY et al., 2010). Películas formadas *in situ* por 30 min, 1 e 2 horas (HANNIG et al., 2004) ou 2, 6, 12 e 24 horas (HANNIG et al., 2003), respectivamente, não diferiram significativamente na capacidade de reduzir a desmineralização em esmalte. Películas em esmalte, mesmo que formadas em curto período (3 min)

ofereceram proteção contra a desmineralização por ácido cítrico (HANNIG et al., 2004).

Um estudo conduzido por Nekrashevych et al. (2003), objetivou avaliar o potencial protetor da película adquirida formada por 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. Perante 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 et al. (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 (NYVAD; FEJERSKOV, 1987; VUKOSAVLJEVIC et al., 2014), e 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). Carvalho et al. (2016), analisando os efeitos protetores de películas salivares formadas com saliva de adultos ou crianças, em esmalte de dentes permanentes ou decíduos, concluíram que tais películas promoveram efeito protetor diferentes contra a erosão, sendo que a película do adulto proporcionou uma melhor proteção para o esmalte do dente permanente, enquanto que a película formada na criança promove uma melhor proteção no esmalte dos dentes decíduos.

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 e submandibular (CARLEN et al., 1998). Em um estudo *in situ*, Amaechi et al. (1999), 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 de 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 um maior atrito pela 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. (2006), 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 de formação, 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 às películas formadas por 6, 12 e 24 horas, indicando que a resistência da película aos ácidos 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 1 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 previamente 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).

A saliva é secretada por três pares de glândulas maiores, sendo elas parótida, submandibular e sublingual, além de numerosas glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000). A saliva é um fluido constituído por componentes inorgânicos e orgânicos. Entre os componentes inorgânicos estão presentes o cálcio e fosfato, responsáveis por manter a integridade mineral do dente, e o bicarbonato, que se relaciona com a capacidade tampão da saliva, ou seja, a capacidade de manter o pH constante frente as contínuas variações de pH do meio bucal (BUZALAF et al., 2012). Em sua composição orgânica, as proteínas são os componentes mais abundantes. Muitas destas proteínas contem altos níveis de prolina (35-40%), sendo designadas proteínas ricas em prolina (PRPs) (BUZALAF et al., 2012).

As características salivares são distintas em relação a sua qualidade e quantidade, dependendo da glândula pela qual é secretada (VEERMAN et al., 1996). A glândula parótida produz uma saliva com grande quantidade de amilase e proteínas ricas em prolina, enquanto a saliva secretada pelas glândulas sublingual e submandibular contém elevada concentração de lisozima e mucina, sendo esta última um importante constituinte da película adquirida. Deste modo, a saliva pode promover diferentes níveis de proteção em vários sítios da cavidade bucal (HANNIG; BALZ, 2001). Além disso, 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.

O principal componente orgânico da saliva sublingual / submandibular são as mucinas, que são glicoproteínas de elevado peso molecular (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). Enquanto as suas propriedades viscoelásticas fornecem lubrificação, o seu potencial de hidratação e elevado grau de glicosilação evita a dessecação. Além disso, são componentes importantes da película adquirida (NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN, 1987). Num estudo recente, a exposição da película

adquirida da dentina ao ácido cítrico reduziu expressivamente o número de proteínas, sendo que a mucina foi identificada como uma proteína resistente uma vez que ainda estava presente na película adquirida após exposição à tal ácido (DELECRODE et al., 2015a).

Em um estudo anterior, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito de diferentes formulações de saliva artificial sobre lesão inicial de erosão em esmalte. Concluiu-se que não havia diferença na dureza superficial quando comparadas as formulações com e sem mucina (FERRAIRO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; IONTA et al., 2014). No entanto, nesse estudo as formulações de saliva artificial não foram comparadas com a saliva humana *in situ*, não podendo se afirmar que a saliva artificial promove proteção equivalente à saliva humana.

Batista et al. (2016), avaliaram o efeito preventivo de diferentes formulações de saliva artificial e da saliva humana *in vitro* em comparação com saliva humana *in situ* na erosão dental. Na fase *in vitro*, as amostras de esmalte e dentina bovina foram armazenados em saliva artificial (4 formulações diferentes), água deionizada ou saliva humana por 2 horas. Na etapa *in situ*, dispositivos contendo blocos de esmalte e dentina foram usados por 10 voluntários durante 2 horas. Os blocos foram então erodidos (HCl, pH 2,6, por 60 segundos). Metade das amostras foram submetidos a análise de microdureza (esmalte) e da perda de cálcio (esmalte e dentina), enquanto a outra metade foi novamente colocada em seu respectivo dispositivo e utilizado pelo voluntário por 2 horas antes que o segundo desafio erosivo fosse realizado. Estas amostras também foram submetidas à análise de microdureza do esmalte e da perda de cálcio em esmalte e dentina. Como resultado, obtiveram que a dureza do esmalte não apresentou diferença significativa entre os grupos, tanto na primeira quanto na segunda etapa. A perda de cálcio foi significativamente mais baixa na condição *in situ* em comparação com a experiência *in vitro*. Os autores concluíram que a utilização de formulações de saliva artificial e saliva humana *in vitro* não refletem adequadamente a situação intrabucal em estudos de erosão dentária.

Considerando que a mucina tem um efeito importante na formação da película adquirida e esta por sua vez, exerce forte efeito protetor contra a erosão, se faz importante estudar o efeito da presença de mucina em formulação de saliva artificial na proteção contra a desmineralização e promoção do reendurecimento da superfície erodida.

Outro aspecto importante relacionado aos estudos de erosão é que não existe uma padronização de modelo experimental *in situ*, havendo variações quanto ao tipo de dispositivo intrabucal (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). Sabe-se que este fator pode influenciar na intensidade de alteração do esmalte resultante do desafio erosivo, o que também poderá influenciar no efeito de medidas preventivas em estudo. Segundo Barbour et al. (2011), a padronização de uma metodologia seria um pré-requisito necessário para oferecer informações suficientes em publicações, permitindo que os experimentos sejam repetidos. Assim sendo, ainda existem lacunas quanto ao comportamento de diferentes dispositivos intrabucais na erosão do esmalte.

O presente grupo de pesquisa realizou estudos pilotos comparando dispositivos palatinos em relação aos mandibulares (ALENCAR et al., 2013). 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. Assim, foi realizado estudo mais completo com objetivo de 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 intrabucais palatino e mandibular em diferentes tempos de avaliação (30 min, 1h, 2h e 12h) (MENDONÇA, 2015). Na primeira etapa, 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 dispositivos mandibulares e palatinos. Na segunda etapa, os 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. 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. Na primeira etapa 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 blocos mantidos na maxila em relação aos blocos mantidos na mandíbula. Na segunda etapa, 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 do mandibular. Portanto, independentemente 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. Este resultado levou à condução do presente estudo.

Considerando a importância do tema, torna-se oportuno avaliar o efeito da presença de mucina em formulação de saliva artificial na proteção contra a desmineralização e na promoção da re-precipitação mineral no esmalte e a influência do tipo de dispositivo intrabucal (mandibular X palatino) no desgaste do esmalte diante de desafio erosivo, buscando resultados que norteiem o delineamento de futuros estudos no que se refere à prevenção e controle da erosão dentária.

3 Proposição

3 - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da presença de mucina na saliva artificial na proteção contra a desmineralização erosiva e na promoção da reprecipitação mineral do esmalte, bem como a influência do tipo de dispositivo intrabucal *in situ* (mandibular X palatino) no desgaste do esmalte diante de desafios erosivos.

Especificamente foram avaliados (as):

Subprojeto I:

- O primeiro subprojeto comparou a capacidade de proteção de duas salivas artificiais em relação à saliva humana, diante de um desafio erosivo inicial.

Subprojeto II:

- O segundo subprojeto comparou a capacidade de proteção de duas salivas artificiais e da saliva humana diante de um desafio erosivo inicial, utilizando modelo de redeposição mineral (“remineralização”).

Subprojeto III:

- A influência do tipo de dispositivo intrabucal *in situ* (mandibular X palatino) no nível de desgaste erosivo do esmalte.
- O conforto dos dispositivos durante o uso, a fala, e presença ou não de dor ao longo da utilização ou depois de sua remoção.

4 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). Após aprovação dos projetos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, segundo a resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde (CAAE 24216514.8.0000.5417 / 07102812.8.0000.5417), alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB-USP foram convidados a participarem do trabalho. Os voluntários foram informados sobre a natureza e riscos da pesquisa e somente participaram desta após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 - Obtenção, planificação e polimento dos blocos de esmalte

Aproximadamente 350 dentes bovinos extraídos de gado da raça Nelore com idade média de 36 meses, abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru, SP, foram utilizados no presente estudo. Os dentes passaram por uma seleção prévia, eliminando aqueles com trincas, ou espessura de dentina muito delgada. Os dentes foram limpos com curetas periodontais para remover todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície e foram mantidos em solução de timol 0,1% (pH 7,0) até o corte e obtenção dos blocos.

Primeiramente, as raízes foram separadas de suas coroas, 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), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes. Em seguida, para obtenção dos blocos de esmalte, as coroas foram fixadas com godiva termoativada (Kerr Corporation, EUA) em uma placa de acrílico (40 x 40 x 5 mm). A placa de acrílico foi parafusada em um aparelho de corte de precisão (ISOMET Low Speed Saw, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face (XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7 mm Extec Corp., Enfield, CT, USA) 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, foram obtidos os blocos de esmalte de 4 x 4 mm da porção mais plana da coroa, através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido méso-distal (Figura 1).

Com o intuito 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 e com auxílio de um instrumento PKT (Duflex 55G/SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, SP) 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 bloco. Cuidado especial foi tomado para que a cera não escoasse entre o esmalte e o acrílico. O conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (Arotec, Aropol2v, 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 foram fixados os blocos. Neste procedimento de planificação, uma lixa recoberta de silício de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler) sob refrigeração com água deionizada foi utilizada, até que os fragmentos ficassem com espessura de aproximadamente 3 mm. Assim, a politriz foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86 g, durante 30 segundos a 2 minutos, e isto variou em função da perda de abrasividade da lixa.

Posteriormente, os blocos foram removidos do disco de acrílico e limpos com xilol (Merck, Darmstadt, Germany) para retirar todo resíduo de cera. Em seguida, foram novamente fixados com cera 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. Nesta fase também foi importante evitar que a cera escoasse entre a dentina e a placa de acrílico, o que poderia alterar o paralelismo entre o esmalte e a dentina. O conjunto foi adaptado na politriz iniciando o desgaste do esmalte com uma lixa de silício carbide de granulação 600 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-600, Buehler) sob refrigeração com água deionizada, durante 30 segundos, com 2 pesos, em velocidade alta para remoção das ondulações superficiais. Em seguida, foi feito o polimento do esmalte com lixa recoberta de silício de granulação 1200 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-1200, Buehler), sob refrigeração, durante 2 minutos e 30 segundos, com 2 pesos, em velocidade alta, após o qual observou-se uma superfície de aspecto vítreo. Para

finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Polishing Cloth Buehler 40-7618) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Water based Diamond permanent polishing suspension Extec Corp. 1 micron), durante 3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta. Este tratamento teve por objetivo remover ranhuras do fragmento de esmalte (Figura 2), o que permitiu a aferição da dureza no local.

Para impedir que os resíduos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner Mod USC 750, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, SP), com frequência de 40 kHz, durante 2 minutos, com água deionizada. 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 blocos passaram a ser guardados em refrigerador a aproximadamente 4°C. Durante este período e até o final do experimento foram armazenados nos discos de acrílico numerados, em recipientes plásticos com tampa, separados por gaze, embebidos em água deionizada.

Figura 1. Bloco de esmalte de 4 x 4 mm² obtido da porção mais plana da coroa dental bovina.

Figura 2. Bloco de esmalte após polimento.

4.3 - Subprojeto 1

4.3.1 - Delineamento Experimental

O primeiro subprojeto comparou a capacidade de proteção de duas salivas artificiais em relação à saliva humana, diante de um desafio erosivo inicial. Foram utilizadas duas formulações de salivas artificiais a partir da formulação de Klimek

(1982), sendo uma com e outra sem a adição da mucina (IONTA et al., 2014). Foi realizada a microdureza inicial para seleção e aleatorização dos blocos (n=75) entre os grupos, sendo utilizados 15 blocos para os grupos das salivas artificiais e controle (água deionizada) e 30 blocos para os grupos *in situ* (saliva humana). Os grupos foram divididos em: GI- saliva humana, GII- saliva artificial sem mucina (saliva de Klimek modificada sem mucina), GIII- saliva artificial com mucina (saliva de Klimek original com mucina) e GIV- água deionizada (controle negativo). Para avaliação da saliva humana foram utilizados dispositivos intrabuciais palatinos por 15 voluntários, cada dispositivo contendo 2 blocos de esmalte. Nos grupos GII, GIII e GIV, os blocos de esmalte foram imersos em suas respectivas soluções (17,6 ml por bloco) por um período de 2 horas sob agitação constante. No grupo GI o voluntário utilizou o dispositivo palatino pelo mesmo tempo (2 horas). Imediatamente após este período, tanto os blocos do grupo *in situ* quanto os dos grupos *in vitro* foram submetidos ao desafio erosivo com ácido cítrico 1% (pH 3,6) por 4 minutos. A dureza de superfície foi avaliada novamente ao final.

4.3.2 - Avaliação da dureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte

A dureza superficial inicial do esmalte foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (Microdurômetro Micromet 5114 hardness tester, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) acoplado a um microcomputador e um software específico para a análise das imagens. Foi utilizado um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga estática de 25 g, aplicada por 10 segundos (Figura 3). Em cada corpo de prova foram realizadas 5 endentações na área central da superfície de esmalte com distância de 100 µm entre elas (Figura 4).

O valor da média de dureza das cinco endentações foi utilizado para excluir blocos de esmalte com dureza fora do padrão. Os blocos de esmalte bovino com um valor médio de dureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos foram eliminados, sendo selecionados 75 blocos.

Figura 3. Endentação inicial do bloco em microdurômetro com ponta knoop.

Figura 4. Determinação dos limites da endentação em esmalte hígido.

4.3.3 - Esterilização

Os blocos de esmalte com a dureza inicial dentro dos padrões de normalidade foram numerados com caneta permanente ultra-fina (A. W. Faber-Castell S.A., São Carlos, SP, Brasil) na região da dentina interna e embalados em envelope de papel grau cirúrgico (VedaMax, Presidente Venceslau, SP, Brasil) e enviados para a esterilização com óxido de etileno (Acecil Central de Esterelização Com. Ind. Ltda, Campinas, SP, Brasil).

4.3.4 - Seleção dos Voluntários

Quinze 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); apresentar doenças sistêmicas tais como as auto-imune, 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 0,3 ml/min.

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

4.3.5 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado

A avaliação do fluxo salivar não estimulado foi realizada individualmente. O voluntário foi acomodado em uma cadeira localizada em lugar tranquilo sem estímulos olfativos ou visuais onde permaneceu em repouso com a cabeça levemente inclinada para baixo. Durante 15 minutos a saliva foi dispensada passivamente em um béquer plástico de 100 ml (Pyrex, USA) previamente pesado em uma balança eletrônica de precisão (AND, GR-202, A&D Company Limited C.E., Japan). Após a coleta, o peso do recipiente foi novamente aferido. Considerando-se a densidade da saliva como 1, 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 > 0,3 ml/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.

4.3.6- Avaliação do fluxo salivar estimulado

Os voluntários mascaram um pedaço de aproximadamente 1 cm de um tubo de látex, nº 203 (Auriflex, São Roque, SP), previamente esterilizado, 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 o tubo de látex na cavidade bucal.

A saliva coletada no béquer foi pesada de forma semelhante à saliva não estimulada. O fluxo salivar estimulado foi expresso em mililitros por minuto (ml/min) e uma amostra de 1 ml foi utilizada para determinar seu pH. Foi considerado normal um fluxo maior que 1 ml/min.

4.3.7 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos

Após a seleção planejada dos blocos de esmalte foi feita uma distribuição aleatória estratificada entre os grupos, de forma que em todos eles houvessem blocos

com dureza mais baixa e mais alta. Para tal, foi utilizado o programa Microsoft Excel. Os 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 blocos entre os grupos.

4.3.8 - Preparo dos dispositivos intrabucais

Moldes do arco superior dos voluntários foram feitos com alginato (Ezact Kromm, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ) e vertidos 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 apresentou 2 fileiras verticais cada qual com uma cavidade de 6 x 6 x 3 mm, uma no lado direito e outra no esquerdo, onde cada uma delas serviu para fixação de um bloco. 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 no nível da superfície de resina do dispositivo. Um fio ortodôntico foi colocado sobre o bloco, sem tocá-lo, com objetivo de prevenir a abrasão dos blocos pela língua (Figura 5).

Figura 5. Dispositivo intrabucal palatino.

4.3.9 - Procedimentos intrabucais (*in situ*) - Grupo I

Uma semana antes do início do experimento os voluntários receberam kits contendo escova dental (Curaprox 5460 ultra soft, Curaden Swiss, Suíça) e dentifrício fluoretado (Tripla Ação, 1.450 ppm F, Colgate, Brasil). Estes foram orientados para

iniciar o uso do kit e não utilizarem nenhum outro produto contendo flúor. A última escovação foi realizada 1 hora antes do início do estudo. O dispositivo intrabucal palatino com os dois blocos de esmalte foi utilizado por um período de 2 horas. Posteriormente, o dispositivo foi removido da cavidade bucal para retirada dos blocos de esmalte que foram imersos *in vitro* em ácido cítrico 1% para formação de lesão inicial de erosão e foram submetidos à avaliação imediata da microdureza final.

4.3.10 - Formulação das Salivas

A composição básica das salivas artificiais utilizadas foi a seguinte: Grupo II (saliva sem mucina)- 0,33 g KH_2PO_4 ; 0,34 g Na_2HPO_4 ; 1,27 g KCL; 0,16 g NaSCN; 0,58 g NaCL; 0,17 g CaCl_2 ; 0,16 g NH_4Cl ; 0,2 g uréia; 0,03 g glicose; 0,002 g ácido ascórbico em 1000 ml de água destilada, pH 7,0 - Grupo III (saliva com mucina) - 0,33 g KH_2PO_4 ; 0,34 g Na_2HPO_4 ; 1,27 g KCL; 0,16 g NaSCN; 0,58 g NaCL; 0,17 g CaCl_2 ; 0,16 g NH_4Cl ; 0,2 g uréia; 0,03 g glicose; 0,002 g ácido ascórbico e 2,7 g de mucina de porco (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 1000 ml de água destilada, pH 7,0 (KLIMEK et al., 1982).

4.3.11 - Procedimentos laboratoriais (*in vitro*)

Os blocos de esmalte foram imersos nas soluções (17,6 ml por bloco, à temperatura ambiente): saliva artificial sem mucina (Grupo II), saliva artificial com mucina (Grupo III) e água deionizada (Grupo IV) (n=15 para cada solução) por um período de 2 horas sob agitação constante. Imediatamente após este período, foram submetidos à erosão inicial com ácido cítrico 1% (Merck) ajustado com KOH (1N) para pH 3,6 durante 4 minutos (BREVIK et al., 2013). A seguir foi realizada a microdureza final para se determinar a capacidade protetora das salivas testadas obtendo-se a porcentagem de perda mineral.

4.3.12 - Microdureza Final

Todos os blocos foram avaliados por microdureza sendo realizadas 5 endentações com carga estática de 25 g, aplicada por 10 s (Microdurômetro Micromet 5114 hardness tester, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) com distância de 100 μm entre elas e a 100 μm das endentações iniciais. A média das endentações (dureza final após a desmineralização) foi utilizada para avaliar a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), de acordo com a seguinte fórmula:

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

4.3.13 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software Sigmaplot versão 12.3 (2011 Systat Software, Germany). Utilizou-se os testes de Bartlett e Shapiro Wilk para verificar a homogeneidade e distribuição normal dos dados. Foi realizado o teste ANOVA a um critério e Tukey com nível de significância 5%.

4.4 - Subprojeto 2

4.4.1 - Delineamento Experimental

O segundo subprojeto comparou a capacidade de proteção de duas salivas artificiais e da saliva humana diante de um desafio erosivo inicial, utilizando modelo de redeposição mineral (“remineralização”). Os blocos (n=75) foram selecionados pela microdureza inicial. Posteriormente, foram erodidos em ácido cítrico 1% (pH 3,6) por 4 minutos e uma nova leitura da dureza foi realizada. Estes valores de dureza foram utilizados para a randomização entre os grupos. As formulações das salivas utilizadas e os grupos em estudo foram os mesmos do subprojeto 1. No grupo GI, 15 voluntários utilizaram dispositivos intrabuciais palatinos, contendo 2 blocos de esmalte cada, durante 2 horas. Nos outros grupos, os blocos foram imersos nas salivas artificiais (17,5 ml por bloco) com (GIII) e sem mucina (GII) e água deionizada (GIV) por 2 horas, sob agitação. Ao final, a dureza superficial foi novamente avaliada.

4.4.2 - Avaliação da dureza superficial inicial, formação de lesão inicial de erosão e seleção dos blocos de esmalte

Os blocos de esmalte foram avaliados como descrito no item 4.3.2. Posteriormente, os 100 blocos selecionados foram submetidos à erosão inicial com ácido cítrico 1% (Merck) ajustado com KOH (1N) para pH 3,6. Os blocos foram imersos em ácido à temperatura ambiente (37°C) durante 4 minutos (BREVIK et al., 2013). A seguir todos os blocos foram avaliados por microdureza, sendo realizadas 5 endentações com carga estática de 25 g, aplicada por 10 s (Microdurômetro Micromet 5114 hardness tester, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) com distância de 100 µm entre elas e a 100 µm das endentações iniciais, obtendo-se a microdureza pós lesão de erosão, a qual foi utilizada para selecionar 75 blocos de esmalte.

4.4.3 - Esterilização

Os blocos de esmalte foram esterilizados como descrito no item 4.3.3.

4.4.4 - Seleção dos Voluntários

Quinze voluntários adultos jovens, com idade entre 18 e 30 anos foram selecionados para participar da pesquisa. Os critérios de exclusão e seleção dos voluntários são os mesmos descritos no item 4.3.4 do subprojeto 1.

4.4.5 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado

A avaliação do fluxo salivar não estimulado foi realizada como descrito no item 4.3.5.

4.4.6 - Avaliação do fluxo salivar estimulado

A avaliação do fluxo salivar estimulado foi realizada como descrito no item 4.3.6.

4.4.7 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos

A aleatorização dos blocos entre os grupos foi feita como descrito no item 4.3.7.

4.4.8 - Preparo dos dispositivos intrabucais

O preparo dos dispositivos intrabucais ocorreu como descrito no item 4.3.8.

4.4.9 - Procedimentos intrabucais (*in situ*) - Grupo I

Uma semana antes do início do experimento, os voluntários receberam kits contendo escova dental (Curaprox 5460 ultra soft, Curaden Swiss, Suíça) e dentífrico fluoretado (Tripla Ação, 1.450 ppm F, Colgate, Brasil). Estes foram orientados para iniciar o uso do kit e não utilizarem nenhum outro produto contendo flúor. A última escovação foi realizada 1 hora antes do início do estudo. Os dispositivos contendo 2 blocos de esmalte previamente erodidos em ácido foram utilizados por 15 voluntários durante 2 horas. Em seguida, os blocos foram submetidos à avaliação imediata da microdureza final.

4.4.10 - Formulação das Salivas

A composição básica das salivas artificiais utilizadas foi a mesma já descrita no item 4.3.10.

4.4.11 - Procedimentos laboratoriais (*in vitro*)

Os blocos de esmalte previamente erodidos foram imersos nas soluções (17,6 ml por bloco): saliva artificial sem mucina (Grupo II), saliva artificial com mucina (Grupo III) e água deionizada (Grupo IV) (n=15 para cada solução) por um período de 2 horas. Imediatamente após este período foi realizada a microdureza final para se determinar a capacidade de redeposição mineral das salivas testadas.

4.4.12 - Microdureza Final

Todos os blocos foram avaliados por microdureza, sendo realizadas 5 endentações com carga estática de 25 g, aplicada por 10 s (Microdurômetro Micromet 5114 hardness tester, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) com distância de 100 µm entre elas e a 100 µm das endentações pós lesão de erosão.

As médias dos valores obtidos nas endentações iniciais (SH_i), pós lesão de erosão (SH_e) e após o experimento *in situ* e *in vitro* (SH_f) foram utilizadas para cálculo do percentual de recuperação de dureza (%SHR) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%SHR = \frac{(SH_f - SH_e)}{(SH_i - SH_e)} \times 100$$

4.4.13 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software Sigmaplot versão 12.3 (2011 Systat Software, Germany). Utilizou-se os testes de Bartlett e Shapiro Wilk para verificar a homogeneidade e distribuição normal dos dados. Foi realizado o teste ANOVA a um critério e teste de Tukey com nível de significância 5%.

4.5 - Subprojeto 3

4.5.1 - Delineamento Experimental

No subprojeto 3 foi analisada a influência do tipo de dispositivo intrabucal no desgaste erosivo do esmalte após desafio erosivo produzido *in situ*. Para isso, 160 blocos de esmalte, selecionados previamente pela avaliação da dureza de superfície inicial, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, de acordo com o tipo de dispositivo intrabucal utilizado: GI - dispositivo palatino; GII - dispositivo mandibular. Foram selecionados 20 voluntários e na etapa *in situ* (estudo cruzado), para cada voluntário foram confeccionados 1 dispositivo intrabucal palatino (contendo quatro blocos de esmalte) e 2 mandibulares (cada qual contendo dois blocos de esmalte). A seguir foi iniciada a ciclagem erosiva, que consistiu na imersão dos dispositivos palatino e mandibulares em ácido clorídrico 0,01 M (pH 3,6) por 2 minutos e reinserção

dos dispositivos na cavidade bucal. Este procedimento foi repetido 4 vezes ao dia durante 5 dias. Ao final deste período os blocos de esmalte foram removidos dos dispositivos para avaliação do desgaste por meio de perfilometria. O conforto durante o uso dos dispositivos foi avaliado por um questionário.

4.5.2 - Avaliação da dureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte

A dureza superficial inicial do esmalte foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (Microdurômetro Micromet 5114 hardness tester, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) acoplado a um microcomputador e um software específico para a análise das imagens. Foi utilizado um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga estática de 25 g, aplicada por 10 segundos. Em cada corpo de prova foram realizadas 4 endentações na área central da superfície do esmalte com distância de 100 μm entre elas.

O valor da média de dureza das quatro endentações foi utilizado para excluir blocos de esmalte com dureza fora do padrão. Os fragmentos com um valor médio de dureza 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os fragmentos foram eliminados, sendo selecionados 160 blocos de esmalte bovino.

4.5.3 - Avaliação da perfilometria inicial

Antes da etapa *in situ* foram realizadas marcações com uma lâmina de bisturi número 11 (Embramac, Itapira, SP, Brasil) para delimitação das áreas controle e teste de cada bloco. Para tal, um guia metálico com as seguintes dimensões: 2 mm de largura, 1,5 mm de altura e 2,5 cm de comprimento foi posicionado sobre a região central de cada bloco e fixado em suas extremidades com godiva termoativada (Kerr Corporation, USA) para realização da marcação, resultando em duas áreas controle nas extremidades (1,00 mm²) e área teste na região central (2,0 mm²) (Figura 6).

O perfil inicial dos blocos de esmalte hígidos foi avaliado através de um perfilômetro Marh (MarSurf GD 25, Göttingen, Germany), acoplado a um microcomputador através do software de contorno (MarSurf XCR 20). Os blocos foram fixados a um dispositivo de padronização da posição e as medidas que determinam a sua localização foram registradas para permitir a sua recolocação após o experimento e avaliação do perfil final, determinando o desgaste sofrido (Figura 7).

Em cada bloco foram feitas 5 leituras com distâncias pré-determinadas de 2.25, 2.0, 1.75, 1.5 e 1.25 μm (no eixo y) do bloco em relação a posição da ponta avaliadora,

sendo o percurso total da varredura correspondente à 3 mm. Os gráficos oriundos do percurso da ponta sobre o bloco foram salvos individualmente.

Figura 6. Determinação das áreas controle e teste com lâmina de bisturi.

Figura 7. Avaliação do perfil inicial.

4.5.4 - Esterilização e delimitação das áreas de referência

Os blocos de esmalte foram esterilizados como descrito no item 4.4.2. Posteriormente, os dois terços localizados nas extremidades dos blocos foram protegidos com esmalte cosmético de unha (Colorama Maybelline - Ultra duração, Cosbra Cosméticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), para manutenção da integridade das áreas de referência para a etapa *in situ*.

4.5.5 - Seleção dos Voluntários

Vinte voluntários adultos jovens, com idade entre 18 e 30 anos foram selecionados para participar da pesquisa. O cálculo da amostra foi baseado em estudo piloto *in situ* com 3 voluntários. Um tamanho de amostra de 12 voluntários foi estimado com base em um erro α de 5% e β de 20%, 0,69 μm como desvio padrão estimado e 1 μm como diferença mínima detectável. Considerando a possibilidade de desistência foram selecionados 20 voluntários.

Os critérios de exclusão e seleção dos voluntários são os mesmos descritos no item 4.3.4 do subprojeto 1.

4.5.6 - Avaliação do fluxo salivar não estimulado

A avaliação do fluxo salivar não estimulado foi realizada como descrito no item 4.3.5.

4.5.7 - Avaliação do fluxo salivar estimulado

A avaliação do fluxo salivar estimulado foi realizada como descrito no item 4.3.6.

4.5.8 - Aleatorização dos blocos de esmalte entre os grupos

A aleatorização dos blocos entre os grupos foi feita como descrito no item 4.3.7.

4.5.9 - Preparo do dispositivo intrabucal palatino

Moldes do arco superior dos voluntários foram feitos com alginato (Ezact Kromm, 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 continha 2 cavidades de 10 x 10 x 3 mm, uma do lado direito e outra do lado esquerdo, onde cada uma delas serviu para fixação de 2 blocos de esmalte. 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 no 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. Adicionalmente foram colocados dois fios ortodônticos aderidos ao dispositivo, sobre o esmalte, mas sem tocar nos blocos, para garantir a ausência de abrasão pela língua (Figura 8).

Figura 8. Dispositivo intrabucal palatino.

4.5.10 - 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. 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 (Figura 9). Essa conduta foi realizada com o intuito de evitar a abrasão dos blocos pelo tecido mole.

Figura 9. Dispositivo intrabucal mandibular.

4.5.11 - Procedimentos intrabucais

Uma semana antes do início do experimento os voluntários receberam kits contendo escova dental (Curaprox 5460 ultra soft, Curaden Swiss, Suíça) e dentifrício fluoretado (Tripla Ação, 1.450 ppm F, Colgate, Brasil). Estes foram orientados para iniciar o uso do kit e não utilizarem nenhum outro produto contendo flúor durante uma

semana antes do experimento *in situ* e da utilização dos dispositivos. Os voluntários utilizaram os dispositivos intrabucais palatino e mandibular simultaneamente por um período de 5 dias. Além do kit de escovação, cada voluntário recebeu uma pasta com as instruções; garrafas de 600 ml ácido clorídrico 0,01 M (pH 2,3; à temperatura ambiente) e copos para imersões com volume padronizado da solução ácida (150 mL - volume exato da demarcação superior do copo); um estojo plástico para guardar o dispositivo intrabucal, e pacote de gaze (Cremer S.A. Ind. Brás., Blumenau, SC). As instruções escritas foram reforçadas verbalmente.

Os dispositivos intrabucais foram utilizados apenas durante o período comercial (7 h às 18 h) tendo sido removidos por 1 h e 45 min para almoço, totalizando 8 horas e 30 min de uso (MENDONÇA, 2015). Nos períodos em que os dispositivos ficaram fora da boca os mesmos foram mantidos no estojo plástico, envoltos em gaze umedecida em água de abastecimento (Bauru - 0,7 ppm F). Foi permitido aos voluntários realizar a higiene bucal normalmente, após as refeições, sem o dispositivo, utilizando o dentífrício fornecido. O dispositivo pôde ser limpo com escova dentária, e água, sendo proibida a escovação da área que continha os blocos. Os voluntários também foram orientados a não ingerir bebidas, exceto água, durante o experimento, a não ser nos horários das refeições quando da não utilização do dispositivo.

Para desenvolver a lesão de desgaste dentário erosivo os voluntários imergiram os dispositivos em copo contendo 150 ml de ácido clorídrico por 2 min (1 copo por dispositivo). A seguir os dispositivos intrabucais foram lavados em água corrente e reinseridos na boca. Este procedimento foi repetido 4 vezes ao dia nos seguintes horários: 8 h, 10 h, 14 h e 16 h (sendo que das 12h às 13:45 os dispositivos permaneceram fora da boca) durante 5 dias (totalizando 8 horas e 30 minutos de uso diário).

4.5.12 - Avaliação da perfilometria final pós-experimento

Após 5 dias de ciclagem erosiva *in situ*, os blocos foram removidos dos dispositivos intrabucais e o esmalte cosmético de unhas foi retirado. Os blocos foram reposicionados sobre a mesa do perfilômetro segundo a sua posição inicial e utilizou-se o mesmo software (XCR 20) com os mesmos parâmetros de medição, sendo realizadas cinco leituras por bloco conforme descrito anteriormente. Os gráficos iniciais e finais de cada uma das cinco leituras de cada um dos blocos foram sobrepostos um a um, permitindo a mensuração do desgaste a partir da média das

cinco leituras. Para tanto, o gráfico inicial foi aberto, através da função “carregar perfil nominal” e em seguida o mesmo procedimento foi executado para o gráfico final correspondente. Selecionou-se a “zona de perfil” no gráfico inicial, através da marcação de dois pontos nas extremidades dos riscos delimitadores das áreas controle e utilizando a função “ajustar perfil”, marcou-se um ponto na área central do gráfico final. O primeiro procedimento de adaptação utilizado foi a “adaptação centrada”, posteriormente, aplicou-se um fator de zoom não proporcional de 50 vezes no eixo X e 500 vezes no eixo Z, possibilitando o refinamento da sobreposição através da “adaptação manual”. Esse recurso permite a inclinação e deslocamento dos gráficos, promovendo o ajuste correto nas áreas controle. Com os gráficos sobrepostos, definiu-se a “reta de regressão de perfil” e o “ponto médio” de ambos os gráficos e através do recurso “distância z”, os dois pontos médios foram selecionados para medição da distância entre os mesmos em altura, definindo a perda de esmalte expressa em micrômetros.

4.5.13 - Avaliação de conforto dos dispositivos intrabucais

No início da fase *in situ* os voluntários receberam um questionário (Apêndice D) referente ao conforto dos dispositivos durante o uso, a fala, e presença ou não de dor ao longo da utilização ou depois da remoção dos dispositivos. As respostas continham como alternativa apenas sim ou não (perguntas dicotomizadas). Na última pergunta, considerando a possibilidade de participação em estudos futuros, os voluntários tiveram que escolher o dispositivo de sua preferência.

4.5.14 - Análise Estatística

A análise estatística da perda de esmalte foi realizada com o software Sigmaplot versão 12.3 (2011 Systat Software, Germany). Utilizou-se os testes de Bartlett e Shapiro Wilk para verificar a homogeneidade e distribuição normal dos dados. Assim foi aplicado o Teste T pareado com nível de significância 5%. A análise do conforto dos dispositivos intrabucais foi realizada de forma descritiva.

5 Resultados

5 - Resultados

5.1 - Subprojeto 1

A porcentagem de perda de dureza resultante do desafio erosivo inicial após imersão do esmalte nas formulações avaliadas (saliva artificial com e sem mucina e água deionizada) e na saliva humana (*in situ*), está apresentado na Tabela 1. O grupo controle (água deionizada) resultou em maior perda de dureza (erosão inicial) do que os outros grupos, seguido pela saliva sem mucina. Houve diferença significativa entre os grupos em estudo, com exceção da saliva com mucina, que promoveu uma porcentagem de perda de dureza do esmalte semelhante à saliva da condição *in situ*.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores de dureza inicial, dureza pós erosão e da porcentagem de perda de dureza do esmalte resultante do desafio erosivo inicial após imersão do esmalte nas salivas estudadas.

Grupos	Desafio erosivo		
	Dureza inicial (KHN)	Dureza pós-erosão (KHN)	% de perda de dureza*
Controle (água)	347,33 ($\pm$ 8,92)	214,14 ($\pm$ 11,13)	-38,37 ($\pm$ 3,19) ^a
Saliva artificial com mucina	347,00 ($\pm$ 11,42)	250,67 ($\pm$ 12,52)	-27,67 ($\pm$ 4,68) ^b
Saliva artificial sem mucina	344,13 ($\pm$ 11,36)	234,47 ($\pm$ 8,58)	-31,83 ($\pm$ 2,76) ^c
Saliva humana (<i>in situ</i>)	353,17 ($\pm$ 9,63)	261,37 ($\pm$ 8,68)	-25,93 ($\pm$ 3,22) ^b

* Na coluna “% de perda de dureza” letras diferentes mostram diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.2 - Subprojeto 2

Os dados do efeito re-endurecedor das diferentes salivas encontra-se na tabela 2. Tanto a saliva artificial quanto a humana foram capazes de promover uma recuperação de dureza do esmalte com lesão inicial de erosão, sendo que nenhuma diferença foi encontrada entre elas. O grupo controle (água deionizada) não mostrou nenhum efeito na recuperação de dureza.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de dureza inicial, dureza pós erosão, dureza pós-saliva e da porcentagem de recuperação de dureza do esmalte previamente erodido imerso nas salivas estudadas.

Grupos	Reendurecimento			
	Dureza inicial (KHN)	Dureza pós-erosão (KHN)	Dureza pós-saliva	% de recuperação de dureza*
Controle (água)	352 ($\pm$ 6,43)	257 ($\pm$ 18,89)	256 ($\pm$ 17,67)	-1,37 ($\pm$ 0,04) ^a
Saliva artificial com mucina	352 ($\pm$ 6,44)	258 ($\pm$ 13,93)	290 ($\pm$ 12,05)	33,5 ($\pm$ 8,22) ^b
Saliva artificial sem mucina	349 ($\pm$ 5,81)	257 ($\pm$ 11,91)	285 ($\pm$ 14,63)	33,6 ($\pm$ 7,35) ^b
Saliva humana (in situ)	347 ($\pm$ 4,29)	263 ($\pm$ 11,60)	287 ($\pm$ 9,31)	28,1 ($\pm$ 7,85) ^b

* Na coluna “% de recuperação de dureza” letras diferentes mostram diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.3 - Subprojeto 3

Todos os 20 voluntários finalizaram o estudo e seguiram adequadamente o protocolo *in situ* proposto. A tabela 3 contém as médias de desgaste de cada grupo experimental dos 20 voluntários incluídos na amostra. Os valores indicam que os blocos alocados no dispositivo palatino (GI) apresentaram desgaste erosivo significativamente maior quando comparados aos blocos fixados no dispositivo mandibular (GII).

Tabela 3. Médias do desgaste (μ m) e desvio padrão (dP) dos grupos em estudo.

Grupos	Desgaste ($\pm$ dP)
GI (Dispositivo Palatino)	1,91 ($\pm$ 0,95) ^a
GII (Dispositivo Mandibular)	1,36 ($\pm$ 0,65) ^b

*Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Teste T Pareado.

5.3.1 - Questionário de conforto

A tabela 4 descreve o conforto dos dispositivos de acordo com o que foi reportado pelos voluntários. Apenas 18 voluntários responderam as perguntas do questionário. Todos os voluntários escolheram o dispositivo palatino para uso, caso fossem convidados a participar de novos estudos.

Tabela 4. Descrição (%) do desconforto relatada pelos voluntários ($n=18$) para o uso dos dispositivos intrabucais palatino e mandibular.

Grupos	GI (Dispositivo Palatino)	GII (Dispositivo Mandibular)
Desconforto na fala	16,6% ($n=3$)	72,2% ($n=13$)
Desconforto no uso por 5 dias	11,1% ($n=2$)	72,2% ($n=13$)
Dor ao uso	0% ($n=0$)	39,9% ($n=7$)
Dor após remoção do dispositivo	0% ($n=0$)	50% ($n=9$)
Número de dias com dor após remoção do dispositivo	-	1 a 2 dias

6 Discussão

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Considerações sobre a metodologia empregada

A saliva é considerada o fator biológico mais relevante para a prevenção da erosão dentária (WOËLTGENS et al., 1985; MANDEL, 1987; HALL et al., 1999; HARA et al., 2006; BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; HARA; ZERO, 2014). Sua ação se inicia antes mesmo do contato com o ácido, com um aumento do fluxo salivar como resposta aos estímulos ácidos. Isso cria um cenário mais favorável, através do tamponamento salivar e da diluição e limpeza dos ácidos que entram em contato com as superfícies dentárias durante o desafio erosivo (HARA; ZERO, 2014). Além disso, a saliva desempenha papel importante na formação da película adquirida, que funciona como uma membrana semipermeável de macromoléculas salivares e fornece uma proteção parcial contra desafios erosivos (HANNIG; HANNIG, 2014). Devido ao seu teor mineral, a saliva pode exercer um efeito reparador sobre a lesão inicial de erosão (IMFELD, 1996), por meio da redeposição mineral na superfície amolecida do esmalte (AMAECHI; HIGHAM, 2001; ATTIN et al., 2001; HARA; ZERO, 2014) bem como prevenindo sua desmineralização (HANNIG; HANNIG, 2014).

Dependendo dos estímulos orais, diferentes glândulas salivares podem ser ativadas, variando sua composição e fluxo salivar (ENGELEN et al., 2003), fornecendo vários níveis de proteção em diferentes sítios da cavidade bucal (HANNIG; BALZ, 2001). Sítios pobremente banhados pela saliva são mais vulneráveis à erosão (YOUNG; KHAN, 2002). De fato, a superfície vestibular dos incisivos superiores é mais susceptível à 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 portam 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, este trabalho avaliou a influência do tipo de dispositivo intrabucal (mandibular e palatino) no desgaste erosivo, quando o esmalte foi submetido à ciclagem erosiva por 5 dias. Desse modo, o intuito foi buscar resultados que nortegassem a realização e padronização de futuros estudos *in situ*, buscando protocolos melhor aceitos pelos voluntários.

Sabendo que os estudos *in situ* apresentam como uma de suas maiores dificuldades a colaboração e o seguimento do correto protocolo pelos voluntários (ZERO, 1995) e com intuito de minimizar tais limitações, no presente estudo foram selecionados como voluntários 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.

Durante o preparo da etapa *in situ*, a esterilização dos blocos foi realizada através do óxido de etileno (HARA et al., 2006; VIEIRA et al., 2007), por ser um procedimento eficaz na esterilização de dentes extraídos (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998), além de não alterar a dureza superficial nem a resposta à desmineralização do esmalte (PASHLEY; TAO; PASHLEY, 1993; THOMAS et al., 2007).

Nos subprojetos I e II, o ácido cítrico à 1% (pH 3,6) foi o de escolha para promover a lesão inicial de erosão, o que resultou no amolecimento da superfície sem perda de tecido duro (BREVIK et al., 2013). O tipo de ácido, concentração e pH deve ser escolhido embasando-se na similaridade com bebidas ácidas (Shellis et al., 2011; BREVIK et al., 2013). O tempo de imersão em ácido cítrico foi baseado em pesquisas anteriores que mostraram a presença de lesão de erosão inicial antes de 4 min de exposição ácida (BREVIK et al., 2013). Como o objetivo foi avaliar estágios iniciais da dissolução em esmalte, sem perdas, a variável de resposta utilizada foi a microdureza de superfície (ATTIN; WEGEHAUPT, 2014).

No subprojeto III, foi utilizado o ácido clorídrico a 0,01 M (pH 2,3) para a formação das lesões de erosão, com o intuito de simular o contato da superfície dental com o conteúdo gástrico, decorrente de episódios de refluxo gastroesofágico ou vômito. Tal ácido foi utilizado em estudos anteriores por 30 s, com objetivo de simular apenas a lesão inicial de erosão (OLIVEIRA et al., 2015; MENDONÇA, 2015). Como neste terceiro subprojeto propôs-se estudar lesões em estágios mais avançados, onde já se observa uma perda irreversível de estrutura dentária, foram feitas 4 imersões diárias em ácido clorídrico por 2 minutos, durante 5 dias (GANSS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Embora o ácido gástrico puro apresente pH entre 0,9 e 1,5 (HOVE et al., 2006), o pH na cavidade bucal após a ocorrência do vômito dificilmente ou nunca é menor que 1,5, devido ao tamponamento do conteúdo ocasionado no esôfago e diluição proporcionada pela ingestão de bebidas e alimentos (HOVE et al.,

2006). Sendo assim, o emprego de uma solução de ácido clorídrico à 0,01 M e pH ao redor de 2,0, torna a condição clinicamente relevante por aproximá-la de uma situação real (HOVE et al., 2006).

Com base em trabalhos anteriores (RIOS et al., 2011; BATISTA et al., 2016), as amostras deste estudo foram expostas ao ambiente oral para melhor reproduzir o papel da saliva, no entanto, nas etapas *in situ* de todos subprojetos, optou-se pela desmineralização dos blocos *ex vivo*, ou seja, fora da cavidade bucal, como alternativa de padronização do tempo de exposição destes à solução ácida e pela inviabilidade de deglutição do ácido, evitando danos aos tecidos biológicos dos voluntários. Entretanto, ao se realizar o desafio ácido em ambiente extra-oral, o processo de desmineralização apresenta-se mais agressivo (WEST et al., 1998), já que, exceto pela presença da película adquirida, a capacidade protetora da saliva encontra-se comprometida pela ausência do fluxo salivar durante a exposição (HARA et al., 2003). Por outro lado, o episódio erosivo realizado *ex vivo* viabiliza a condução de experimentos que empregam soluções de ácido puro como agentes erosivos, conforme realizado no presente trabalho (BREVIK et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; MENDONÇA, 2015).

Devido à ocorrência de desgaste, o subprojeto III utilizou como variável de resposta a perfilometria, método de avaliação que permite quantificar a perda de tecido dentário em relação a uma área de referência não tratada no espécime (SCHLUETER et al., 2011). Assim, torna-se importante a proteção das áreas de referência, sendo um requisito essencial para correta avaliação do desgaste. Para tal, alguns cuidados são necessários, como a aplicação do esmalte cosmético sobre as extremidades dos blocos, incluindo-se o risco de referência, tempo de secagem do produto seguida da aplicação de uma segunda camada do esmalte, sendo a proteção finalizada com a cobertura da área esmaltada com a cera utilizada para fixação dos blocos no dispositivo intrabucal. A demarcação dos blocos através do risco também é importante para a adequada realização da perfilometria de contato através do software utilizado (MarSurf XCR 20) que apresenta como vantagem a compensação da curvatura natural do esmalte na mensuração do desgaste, por meio da sobreposição dos perfis iniciais e finais, permitindo uma interpretação mais adequada dos resultados.

6.2 - Considerações sobre o resultado dos subprojetos 1 e 2

A prevalência de erosão dentária está aumentando como resultado de hábitos alimentares e do estilo de vida moderno. Vários estudos têm sido realizados em busca de medidas para evitar o desgaste dentário erosivo (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; RAKHMATULLINA et al., 2013; BUZALAF et al., 2014; HUYSMANS et al., 2014; SULLIVAN et al., 2014; LUSSI; CARVALHO, 2015; WEBER et al., 2015), sendo a maioria das evidências originadas de estudos *in vitro* e *in situ*. No entanto, não há uma padronização entre tais modelos, o que dificulta as comparações entre os estudos e diminui a confiabilidade dos resultados. No que se refere aos estudos *in vitro*, várias formulações de saliva artificial estão disponíveis na literatura, no entanto há pouca orientação sobre qual delas se assemelha mais a saliva humana na condição clínica (LEUNG; DARVELL, 1997). As principais propriedades que devem ser mimetizadas por substitutos da saliva nestes tipos de estudos são a recuperação de dureza superficial e a capacidade inibidora contra a desmineralização erosiva. As formulações de saliva artificial à base de mucina foram relatadas para mostrar a semelhança de suas propriedades reológicas com às da saliva humana [CHRISTERSSON et al., 2000]. No entanto, o efeito da presença da mucina em saliva artificial sobre a erosão ainda não está ainda esclarecido. No presente estudo, a capacidade de a saliva promover re-endurecimento, bem como seu efeito protetor diante de desafio erosivo foram estudadas separadamente com o intuito de identificar a influência da mucina sobre cada processo.

Existem alguns resultados conflitantes no que diz respeito ao papel da mucina no re-endurecimento do esmalte (KAPSIMALIS et al., 1966; VISSINK et al., 1985; NIEUW AMERONGEN et al., 1987; KIELBASSA et al., 2001; MEYER-LUECKEL et al., 2004; KIELBASSA et al., 2005; HARA et al., 2008; IONTA et al., 2014). Altas concentrações desta glicoproteína aumentam a viscosidade da saliva artificial quando comparada à humana, podendo diminuir a difusão mineral (VISSINK et al., 1985; HARA et al., 2008). Alguns estudos mostraram que a adição de altas concentrações desta glicoproteína (30 g/l) à saliva artificial diminui seu potencial remineralizador sobre o esmalte desmineralizado (NIEUW AMERONGEN et al., 1987). Por outro lado, outros estudos encontraram que a concentração fisiológica da mucina (KAPSIMALIS et al., 1966) não interfere no esmalte remineralizado (KIELBASSA et al., 2001; MEYER-LUECKEL et al., 2004; KIELBASSA et al., 2005; IONTA et al., 2014). No

presente estudo, concentrações fisiológicas de mucina foram adicionadas à saliva artificial (2,7 g/l) (CARPENTER et al., 2014) e o efeito reendurecedor não diferiu quando comparado a saliva artificial sem mucina, como mostrado em estudos anteriores (IONTA et al., 2014). É importante ressaltar que, no subprojeto I, os dados mostraram que, independentemente da presença de mucina, a saliva artificial testada apresentou comportamento semelhante à saliva humana *in situ*.

Embora muitas formulações de saliva artificial utilizadas em estudos de erosão dentária não contenham proteínas salivares na sua composição (AMAECHI et al., 1999; AMAECHI et al., 2001; EISENBURGER et al., 2001; KATO et al., 2009; SOUZA et al., 2014), estas formulações podem simular a composição iônica da saliva humana e, assim, apresentam um potencial de reendurecimento da lesão de erosão em esmalte em modelos *in vitro* (MANNERBERG, 1963; DEVLIN et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2010). No entanto, no caso da erosão dentária, a saliva também desempenha um papel importante na inibição da desmineralização (HARA; ZERO, 2014). Clinicamente, as diferenças encontradas nas características salivares e na composição da película adquirida poderiam explicar porque alguns indivíduos apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento de lesões erosivas quando comparados aos indivíduos com exposição semelhante ao ácido e com tecido dentário sadio (WETTON et al., 2007; CHEAIB; LUSSI, 2011; HELLWIG; LUSSI, 2013). Estudo prévio encontrou uma redução de estaterina, mucina (MUC 5B), cálcio e do conteúdo de proteína total na película adquirida de pacientes com erosão dentária (CARPENTER et al., 2014). Além disso, demonstrou-se que, após exposição ao ácido houve mudança proteômica da película adquirida em dentina e esmalte e algumas proteínas resistentes ao ácido foram identificadas, tais como mucinas (DELECRODE et al., 2015a; DELECRODE et al., 2015b)

O papel das mucinas salivares na proteção contra o desafio erosivo do esmalte (desmineralização) foi relatado por diversos autores (NIEUW AMERONGEN et al., 1987; CHEAIB; LUSSI, 2011). Neste estudo, todos os tipos de saliva estudadas foram capazes de proteger contra a erosão do esmalte quando comparados à água deionizada (G4). No entanto, a saliva artificial com mucina (G1) e a saliva humana (G3) promoveram uma maior proteção contra a erosão do esmalte do que a saliva artificial sem mucina (G2). Em contrapartida, Hara et al. (2008), ao considerar a saliva artificial, observaram que a saliva sem mucina resultou em menor perda de esmalte em comparação com a saliva com mucina em um modelo de ciclagem de erosão-

abrasão (HARA et al., 2008). Também não foram encontradas diferenças entre os efeitos da saliva humana coletada (pool de saliva) e saliva artificial com mucina, mostrando que a saliva artificial com mucina seria um potencial substituto da saliva humana para os modelos de ciclagem de erosão-abrasão (HARA et al., 2008). Batista et al. (2016), em estudo recente compararam diferentes formulações de saliva artificial antes de desafio erosivo *in vitro* com o efeito da saliva humana em modelo *in situ*. Uma das formulações artificiais avaliadas apresentava mucina em sua composição, correspondendo à mesma saliva utilizada no presente estudo (KLIMEK et al., 1982). Após análise da microdureza do esmalte e avaliação da liberação de cálcio em esmalte e dentina, os autores observaram não haver diferença significativa na microdureza do esmalte entre os grupos testados, no entanto, o modelo *in situ* apresentou uma menor perda de cálcio no esmalte quando comparado ao *in vitro*. Os pesquisadores concluíram então que o uso de formulações de saliva artificial *in vitro* em estudos de erosão não simulam adequadamente a situação intraoral.

O efeito protetor da mucina pode ser atribuído à sua elevada viscosidade ou composição química, que proporciona maiores propriedades de inibição de erosão. A viscosidade da saliva artificial com mucina parece ser semelhante à da saliva humana (VISSINK et al., 1985). Nieuw Amerongen et al. (1987) constataram que a película adquirida formada em esmalte após 3 dias de incubação em mucinas oferece 100% de proteção contra a desmineralização por ácido cítrico 1%. Além disso, quando a saliva submandibular / sublingual apresenta-se pobre em mucinas, a proteção diminuiu 70% (NIEUW AMERONGEN et al., 1987). Por outro lado, Cheaib e Lussi (2011) demonstraram que a adição de mucina ou caseína isoladamente com intuito de desenvolver película *in vitro* não teve qualquer efeito sobre as suas propriedades inibidoras da erosão. No entanto, a mistura experimental contendo caseína a mucina, adicionada à película resultou numa redução significativa da desmineralização do esmalte (CHEAIB; LUSSI, 2011).

A mucina também forma complexos heterotípicos com amilase, PRPs, estaterina e histatinas (IONTCHEVA et al., 1997) e estes complexos podem ter um impacto importante sobre o papel funcional destas proteínas na cavidade bucal. A presença de complexos de mucina heterotípicas na película madura resulta em maior efetividade na prevenção da erosão do esmalte quando comparado com uma película inicial (HANNIG; JOINER, 2006). No presente estudo, estes complexos heterotípicos poderiam ter sido formados apenas no grupo *in situ* e apesar de serem importantes, o

efeito *in vitro* da saliva artificial com mucina mostrou efeito semelhante ao *in situ*. No entanto, o papel de outras proteínas importantes deve ser investigado no processo de erosão dentária.

O presente estudo não usou um modelo de ciclagem, e a dureza superficial e desmineralização foram estudados separadamente para identificar a influência da presença de mucina na saliva artificial em cada processo. Os experimentos foram separados para garantir as características da lesão de erosão semelhantes entre os grupos no experimento da Re. No entanto, o possível efeito cumulativo da mucina é também uma questão importante que pode ser esclarecida em estudos futuros.

Apesar das limitações deste estudo, concluiu-se que todas as formulações de saliva artificial foram capazes de promover o re-endurecimento de lesões de erosão inicial, embora apenas a saliva artificial com mucina pareceu proteger o esmalte contra a desmineralização de forma semelhante à saliva humana *in situ*. Frente ao exposto, acredita-se que a saliva artificial com mucina pode ser considerada um potencial substituto da saliva humana nos estudos de erosão *in vitro*.

6.3 - Considerações sobre o resultado do subprojeto 3

Os métodos de prevenção de importantes problemas bucais são realizados inicialmente por pesquisas laboratoriais que procuram simular, o mais próximo possível, a condição de interesse. Em muitos casos de pesquisas de erosão dentária, os modelos *in vitro* são o passo inicial. Em seguida, os modelos *in situ* são os mais realistas, reproduzindo melhor o ambiente bucal, representando uma alternativa quando estudos clínicos não são possíveis de serem desenvolvidos. No entanto, uma variedade de metodologias para estudos de erosão dentária *in situ* está disponível na literatura atual, o que pode prejudicar a comparação dos dados obtidos. Assim, este estudo investigou as diferenças entre os aparelhos mandibular e maxilar no desgaste do esmalte, com o propósito de melhor compreender e ajudar na concepção de futuros estudos.

A fim de minimizar a dificuldade de colaboração do voluntário em seguir o protocolo *in situ*, os aparelhos foram projetados para sua segurança e conforto. No entanto, após a aplicação do questionário todos os voluntários responderam que o aparelho maxilar apresentou-se mais confortável do que a mandibular, e caso fossem selecionados para participar de novo estudo *in situ*, prefeririam fazer uso do dispositivo maxilar ao invés do mandibular. Esta informação é importante no desenvolvimento de

futuros estudos, uma vez que o conforto irá interferir diretamente no uso adequado do aparelho pelo voluntário. Além disso, os resultados demonstraram que o aparelho maxilar apresentou um maior desgaste do esmalte em relação ao aparelho mandibular.

Para se entender as diferenças de perdas de esmalte encontradas entre os dispositivos mandibulares e maxilares é importante analisar todas as características salivares que influenciam na erosão dentária. A saliva tem sido considerada o modulador biológico mais relevante para a erosão dentária (HARA; ZERO, 2014). Características tais como o fluxo salivar, capacidade tampão e formação da película adquirida, contribuem para o efeito protetor da saliva (ZWIER et al., 2013). Após a ingestão de alimentos ou bebidas ácidas, a saliva age diluindo e removendo os resquícios de ácido na boca (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). No entanto, como o desafio erosivo foi realizado *ex vivo*, não promovendo o contato direto da saliva com o ácido clorídrico, este fator não pode ser considerado neste estudo, podendo ser visto como uma limitação. Por outro lado, tal como mencionado acima, o desafio ácido sob condições *in vitro* impediu o contato direto do ácido com os dentes e tecidos do voluntário, garantindo sua proteção.

Conforme demonstrado em estudos anteriores, baixas taxas de fluxo salivar aumentam a possibilidade de desenvolvimento de erosão, além de diminuir a capacidade de tamponamento e neutralização de ácidos pela saliva (JÄRVINEN; RYTÖMAA; HEINONEN, 1991; MEURMAN et al., 1994). No entanto, ao ser realizado o desafio *ex vivo*, o efeito imediato do tamponamento não pode ser cogitado, sendo possível pressupor o efeito mediato deste.

A película adquirida impede o contato direto do ácido com a superfície dos dentes, protegendo-os parcialmente contra o desafio erosivo (HARA; ZERO, 2014; HANNING; HANNING, 2014). Alguns autores têm demonstrado que a película adquirida formada ao longo 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 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.

Mendonça et al. (2015), avaliaram *in situ* a desmineralização erosiva de 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 dente contra a erosão, 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 o máximo possível de proteção contra o desafio erosivo, sendo 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). Baseados nos resultados acima, optou-se por padronizar o uso do dispositivo intrabucal por duas horas, não sendo necessário sua utilização durante o período noturno.

A eficácia da proteção contra a erosão da película adquirida também é dependente de suas propriedades físicas, tais como espessura (NYVAD; FEJERSKOV, 1987; VUKOSAVLJEVIC et al., 2014) e a sua localização na cavidade bucal (AMAECHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999). 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), observaram 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. Posteriormente, em 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 entanto, no presente estudo torna-se difícil avaliar a interferência deste fator, visto que os

dispositivos superior e inferior eram utilizados simultaneamente e independentemente da localização ambos podem ter promovido estímulos mecânicos, resultando em maior concentração de proteínas na saliva.

Admite-se que a localização do espécime e o tipo de saliva pode interferir no processo de proteção contra a desmineralização dos dentes. Dependendo do estímulo oral, diferentes glândulas salivares podem ser estimuladas, promovendo variações quanto ao fluxo e composição salivar (ENGELEN et al., 2003) e assim influenciando no nível de proteção da saliva (HARA; ZERO, 2006). Sabe-se que sítios pobremente banhados pela saliva ou principalmente banhadas com saliva serosa são mais propensos ao desenvolvimento da erosão dentária quando comparados aos sítios banhados por saliva mucosa (YOUNG; KHAN, 2002). Lussi et al., 2012, mostraram que 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 ocorrido devido à proximidade dos segundos pré-molares inferiores com a glândula parótida. Esta é uma possível explicação para o observado no presente estudo, que mostrou que os dispositivos inferiores promoveram maior proteção contra a erosão em relação aos superiores. Cabe ressaltar que este efeito de retomada de pH é menor quando o desafio erosivo é realizado fora da boca.

Em contrapartida, estudo prévio no qual foi avaliado o efeito da deposição mineral “*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, observaram não haver diferença no grau de remineralização e no nível de proteção do esmalte utilizando dispositivos intrabucais palatino e mandibular (MENDONÇA, 2015). Tal diferença pode ter sido ocasionada pelo tempo de exposição ácida e pela variável de resposta que diferiram entre os trabalhos, sendo o desafio ácido mais agressivo neste presente estudo, e a perda de esmalte avaliada e não o seu amolecimento superficial (dureza). O trabalho de Hannig e Balz (2001), o qual investigou o efeito protetor e a ultraestrutura de películas salivares formadas *in vivo* próximas aos ductos das glândulas parótida e submandibular / sublingual, sustentam esta hipótese. Os resultados demonstraram que após 5 min de exposição em ácido cítrico a 1%, as películas formadas na face vestibular dos molares superiores foram menos eficazes na proteção contra o amolecimento do esmalte em comparação com

películas formadas na face lingual dos incisivos inferiores, no entanto em tempos menores de desafio erosivo esta diferença não foi observada.

Outro possível fator que interfere no desgaste, refere-se à susceptibilidade dos dentes à erosão decorrente da exposição destes a forças mecânicas resultante do contato com o tecido mole adjacente (AMAECHI et al., 2003) e a língua (GREGG et al., 2004). Neste trabalho optou-se pela proteção dos blocos por meio da utilização de fios ortodônticos posicionados sobre eles, sem tocá-los, com intuito de evitar tais efeitos abrasivos. No entanto, os movimentos dos tecidos moles e da língua podem influenciar no padrão de deglutição e na taxa de depuração salivar (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). Assim há a possibilidade de que os blocos posicionados no palato tenham sido expostos a padrões diferentes de deglutição e depuração salivar quando comparados aos situados na face vestibular dos pré-molares.

Considerando os aspectos discutidos e as limitações deste estudo, sugere-se que o dispositivo maxilar pode ser a melhor escolha para protocolos *in situ* que visem simular um paciente com alto risco de erosão dentária visto que este promoveu maior desgaste erosivo do esmalte, além de proporcionar maior conforto, favorecendo a colaboração do voluntário no decorrer do estudo.

7 Conclusões

7 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo conclui-se que somente a saliva artificial com mucina *in vitro* mostrou efeito semelhante ao da saliva humana *in situ*. Assim, a saliva com mucina pode ser considerada como uma boa substituta da saliva humana. Adicionalmente, conclui-se que os dispositivos palatinos são mais adequados para os estudos *in situ* quando se deseja mimetizar um paciente com alto risco de erosão dentária, uma vez que esse dispositivo promove maior erosão do esmalte e é mais confortável para os voluntários.

Especificamente conclui-se:

Subprojeto I: A saliva com mucina promoveu porcentagem de perda de dureza do esmalte com lesão inicial de erosão semelhante à saliva da condição *in situ*, mostrando-se uma boa substituta da saliva humana (*in situ*) para estudos de erosão.

Subprojeto II: Tanto as formulações de saliva artificial quanto a saliva humana (*in situ*) foram capazes de promover uma recuperação de dureza do esmalte com lesão inicial de erosão. Propõe-se o uso da saliva artificial com mucina como padronização dos protocolos de desmineralização e redeposição mineral para estudos de erosão *in vitro*.

Subprojeto III: Os blocos fixados no dispositivo palatino apresentaram maior desgaste erosivo quando comparados aos blocos alocados no dispositivo mandibular. Além disso, após serem avaliados pelos voluntários, os dispositivos palatinos mostraram ser mais confortáveis em relação aos dispositivos mandibulares.

8 Referências

8 - REFERÊNCIAS

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

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.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. *Caries Res.* 1998;32(6):441-6.

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):1821-28.

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. *Tooth Wear and Sensitivity.* London: Dunitz; 2000. p.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):407-13.

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, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. *Caries Res.* 2000;34:48-52.

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.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:123-42.

Auad SM, Waterhouse PJ, Nunn JH, Steen N, Moynihan PJ. Dental erosion amongst 13- and 14-year-old Brazilian schoolchildren. *Int Dent J.* 2007;57(3):161-7.

Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:24-32.

Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:119-39.

Batista GR, Rocha Gomes Torres C, Sener B, Attin T, Wiegand A. Artificial Saliva Formulations versus Human Saliva Pretreatment in Dental Erosion Experiments. *Caries Res* 2016;50(1):78-86.

Bellamy PG, Harris R, Date RF, Mussett AJ, Manley A, Barker ML, et al. In situ clinical evaluation of a stabilised, stannous fluoride dentifrice. *Int Dent J.* 2014;64 Suppl 1:43-50.

Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *J Dent.* 2013;41(5):428-35.

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

Buzalaf MA, Magalhães AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:244-52.

-
- 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.
- Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, et al. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. *Caries Res.* 2014;48(5):361-7.
- Carvalho TS, Baumann T, Lussi A. In vitro salivary pellicles from adults and children have different protective effects against erosion. *Clin Oral Investig.* 2016 Jan 22. [Epub ahead of print].
- Cheab Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res.* 2011;45(2):107-12.
- de Alencar CR, Magalhães AC, de Andrade Moreira Machado MA, de Oliveira TM, Honório HM, Rios D. In situ effect of a commercial CPP-ACP chewing gum on the human enamel initial erosion. *J Dent.* 2014;42(11):1502-7.
- Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, et al. Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *J Dent.* 2015a;43(5):583-8.
- Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MC, et al. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. *J Dent.* 2015b;43(12):1470-5.
- Devlin H, Bassiouny MA, Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola and artificial saliva. *J Oral Rehabil.* 2006;33:26-30.
- Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res.* 2001;35(3):211-5.
- El Aidi H, Bronkhorst EM, Huysmans MC, Truin GJ. Multifactorial analysis of factors associated with the incidence and progression of erosive tooth wear. *Caries Res.* 2011;45:303-12.

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):165-9.

Ferrairo BM, Oliveira GC, Alencar CRB, Boteon AP, Honório HM, Magalhães AC, et al. The addition of mucin on artificial saliva for erosive studies. *J Dent Res* 92 (Spec Iss B):abstract number 1238, 2013.

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. Definition of erosion and links to tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:9-16.

Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent.* 2012;40(12):1036-43.

Ganss C. Is erosive tooth wear an oral disease? *Monogr Oral Sci.* 2014;25:16-21.

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):557-60.

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

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

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):158-61.

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;19:29-64.

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;25:206-14.

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.* 2006;85(7):612-6.

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

Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:197-205.

Hasselkvist A, Johansson A, Johansson AK.

A 4 year prospective longitudinal study of progression of dental erosion associated to lifestyle in 13-14 year-old Swedish adolescents. *J Dent.* 2016.;47:55-62.

- Hellwig E, Lussi A, Goetz F. Influence of human saliva on the development of artificial erosions. *Caries Res.* 2013;47(6):553-8.
- Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME. Enamel erosion in dietary acids: Inhibition by food proteins *in vitro*. *Caries Res.* 2010;44:525-30.
- 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;42:454-59.
- 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.
- Hooper S, Seong J, Macdonald E, Claydon N, Hellin N, Barker ML, et al. A randomised in situ trial, measuring the anti-erosive properties of a stannous-containing sodium fluoride dentifrice compared with a sodium fluoride/potassium nitrate dentifrice. *Int Dent J.* 2014;64 Suppl 1:35-42.
- Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. *Caries Res.* 2006;40(5):440-3.
- 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. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:215-20.
- Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CR, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *J Dent.* 2014;42(2):175-9.

Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG 1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res.* 1997;76:734-43.

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.

Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991;70(6):942-7.

Kapsimalis P, Rosenthal SL, Updegrave W, Evans R, Hurley B, Cobe HM. The relationship between caries activity, flow rate, total nitrogen and the mucin content of saliva. *J Oral Med.* 1966;21(3):107-10.

Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *J Dent.* 2009;37(3):233-6.

Kielbassa AM, Shohadai SP, Schulte-Mönting J. Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralized and sound dental enamel. *Support Care Cancer.* 2001;9(1):40-7.

Kielbassa AM, Oeschger U, Schulte-Mönting J, Meyer-Lueckel H. Microradiographic study on the effects of salivary proteins on in vitro demineralization of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2005;32(2):90-6.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Effect of plaque on fluoride stability in the enamel after amine fluoride application in the artificial mouth. *DtschZahnarztl Z.* 1982;37(10):836-40.

Kreulen CM, Van't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Res.* 2010;44(2):151-9.

- Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33:81-7.
- Leung VW, Darvell BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *J Dent.* 1997;25:475-84.
- Linnett V, Seow WK. Dental erosion in children: a literature review. *Pediatr Dent.* 2001;23(1):37-43.
- Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res.* 2000;34(2):182-7.
- Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent.* 2006;19(6):319-25.
- Lussi A, Jaeggi T. Erosion diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 2008;12 Suppl 1:S5-13.
- Lussi A, Schlueter N, Rakhmatulina E, Ganss. Dental erosion – an overview with emphases on chemical and histopathological 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 surface in patients with or without erosion. *Caries Res.* 2012;46:507-12.
- Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:1-15.
- Lussi A, Carvalho TS. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:18-29.
- 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.
- Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of a single application of TiF 4 and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J of Dent.* 2010;38:153-7.
- Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66:623-7.

Mannerberg F. Saliva factors in cases of erosion. *Odontol Revy*. 1963;14:156-66.

Mendonça FL. Remineralização e desmineralização erosiva do esmalte considerando diferentes tempos de ação salivar e dispositivos intrabuciais - estudo in situ. Bauru. Dissertação [Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas] - Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo; 2015.

Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res*. 1991;25(1):1-6.

Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(5):583-9.

Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on in vitro Remineralization. *Caries Res*. 2004;38(5):478-83.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res*. 2003;37(3):225-31.

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;21:297-309.

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

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, Alencar CRB, Garcia MF, Honório HM, Magalhães AC, Machado MAAM, et al. Effect of artificial saliva formulations on initial erosion lesion remineralization. *J Dent Res*. 92 (Spec Iss B):abstract number 1239, 2013.

Oliveira GC, Boteon AP, Ionta FQ, Moretto MJ, Honório HM, Wang L, et al. In vitro effects of resin infiltration on enamel erosion inhibition. *Oper Dent*. 2015;40(5):492-502.

O'Sullivan EA, Curzon ME. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *ASDC J Dent Child*. 2000;67(3):186-92.

Pashley EL, Tao L, Pashley DH. Sterilization of human teeth: its effect on permeability and bond strength. *Am J Dent*. 1993;6(4):189-91.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous fluoride containing rinsing solutions. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2013;123(4):296-302.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2006;40(3):218-23.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA, et al. 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, Santos FC, Honório HM, Magalhães AC, Wang L, de Andrade Moreira Machado MA, et al. An in situ/ex vivo comparison of the ability of regular and light colas to induce enamel wear when erosion is combined with abrasion. *Quintessence Int*. 2011;42(3):e44-50.

Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent*. 2015;43(1):42-50.

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, 2013.

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):60-8.

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.

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.

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.

Shellis RP, Barbour ME, Jesani A, Lussi A. Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. *Caries Res.* 2013;47(6):601-11.

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, Custodio W, McDonald EE. New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res.* 2012 ;91(12):1110-18.

Skjorland KK, Rykke M, Sonju T: Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995;53(6):358-62.

Souza BM, Lima LL, Comar LP, Buzalaf MA, Magalhães AC. Effect of experimental mouthrinses containing the combination of NaF and TiF4 on enamel erosive wear in vitro. *Arch Oral Biol.* 2014;59(6):621-4.

- Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J*. 2000;50(3):140-61.
- Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. *Caries Res*. 2013;47(1):2-8.
- 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):51-5.
- Sullivan R, Rege A, Corby P, Klaczany G, Allen K, Hershkowitz D, et al. Evaluation of a dentifrice containing 8% arginine, calcium carbonate, and sodium monofluorophosphate to repair acid-softened enamel using an intra-oral remineralization model. *J Clin Dent*. 2014;25(1 Spec No A): A14-9.
- Ten Cate JM, Infeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2 (Pt 2)):241-4.
- Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. *J Dent*. 2007;35(7):547-51.
- Vargas-Ferreira F, Piovesan C, Praetzel JR, Mendes FM, Allison PJ, Ardenghi TM. Tooth erosion with low severity does not impact child oral health-related quality of life. *Caries Res*. 2010;44(6):531-9.
- Veerman EC, Van den Keybus PA, Vissink A, NieuwAmerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci*. 1996;104:346-352.
- Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MC. Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. *Caries Res*. 2007;41(1):61-7.
- Vissink A, Gravenmade EJ, Gelhard TB, Panders AK, Franken MH. Rehardening properties of mucin- or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel. Effects of sorbitol, xylitol and increasing viscosity. *Caries Res*. 1985;19(3):212-8.

Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD. Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci.* 2004;112(4):320-5.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2014;59(6):631-8.

Weber MT, Hannig M, Pötschke S, Höhne F, Hannig C. Application of plant extracts for the prevention of dental erosion: an in situ/in vitro study. *Caries Res.* 2015;49(5):477-87.

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, Parker D, Weaver LJ, Moohan M, De'Ath J, et al. 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;45:43-52.

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):423-26.

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

Woltgens JH, Vingerling P, de Bleeck-Hogervorst JM, Bervoets DJ. Enamel erosion and saliva. *Clin Prev Dent.* 1985;7:8-10.

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

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

Zero DT, Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, et al.

Evaluation of a desensitizing test dentifrice using an in situ erosion

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

Zero DT, Lussi A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005;55,4 Suppl 1:285-9

Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, SiqueiraWL.

Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. Int J Mol Sci. 2013;14:920-34.

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.

Apêndice

Apêndice 1

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento: Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Prof.^aDr.^aDaniela Rios Honório e Maisa Camillo Jordão, responsáveis pela pesquisa intitulada **“Influência do tipo de dispositivo intrabucal no desgaste do esmalte diante de desafio erosivo - estudo *in situ*”** o convidamos a participar desse nosso estudo.

Esta pesquisa pretende avaliar a influência do tipo de aparelho (usado no palato ou na mandíbula) na proteção contra o desgaste do esmalte (condição de alteração em que se observa a perda mineral do esmalte dentário após a ação de ácidos que não são provenientes de bactérias, ou seja erosão) após serem submetidos à desafio erosivo (ação de ácidos que promove o aparecimento da lesão de desgaste por erosão). Acreditamos que esta pesquisa irá contribuir com a padronização de protocolos científicos usados em estudos de erosão, pois a maioria das pesquisas de erosão é realizada *in situ*. Colaborando assim com o avanço das pesquisas na área, o que consequentemente ajudará na prevenção e controle desta alteração no futuro. Para sua realização será feito o seguinte:

Você, convidado terá que usar aparelhos no palato (“céu da boca”) e na mandíbula (próximo à língua) simultaneamente, sendo que neles serão fixados pedaços de dentes bovinos, previamente esterilizados. Pela manhã, após tomar seu café, você deverá realizar a higienização bucal e aguardar 1 hora antes da inserção dos aparelhos na boca. Passada essa 1 hora, os aparelhos devem ser inseridos na boca por 15 minutos. Em seguida, estes deverão ser removidos e tratados imediatamente por 2 min. A seguir os dispositivos intrabuciais deverão ser lavados em água corrente e reinseridos na boca. Este procedimento será repetido 4 vezes ao dia nos seguintes horários: 8h, 10h, 14h e 16h (sendo que das 12h às 13:45 os aparelhos poderão permanecer fora da boca) durante 5 dias (totalizando 8 horas e 30 minutos de uso diário). Você irá utilizar o aparelho por apenas 5 dias, não havendo assim nenhum risco de dano aos seus dentes, principalmente porque o ácido não entrará em contato com seus dentes pois a erosão (imersão em ácido) dos pedaços de dentes será realizada fora da boca. Durante o período de permanência do aparelho na boca, o convidado não deve consumir alimentos e bebidas (exceto água). A higiene bucal também deverá ser feita com o aparelho fora da boca. O uso do aparelho não causa dor, no entanto dependendo da sensibilidade individual poderá causar desconforto passageiro e dificuldade na pronúncia das palavras no primeiro dia, depois deste período normalmente há uma adaptação à condição de existência de aparelhos dentro da boca. No entanto, este será utilizado por apenas 5 dias, não alterando sua qualidade de vida ou rotina, pois será a mesma sensação de utilizar aparelhos móveis para tratamentos ortodônticos (tratamento para arrumar dentes tortos).

Não existe benefício específico para o convidado que aceite participar dessa pesquisa. No entanto os resultados deste trabalho irão contribuir com o delineamento de futuras pesquisas de erosão dentária, favorecendo novas pesquisas que busquem beneficiar os indivíduos que apresentem lesões de erosão. O uso deste aparelho 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 são utilizados. Cabe ressaltar que não haverá nenhum gasto para os convidados envolvidos na pesquisa, visto que esta 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

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento: Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

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 (asseguramo-lhes inteira liberdade de participar, ou não, da pesquisa, sem quaisquer represálias segundo alínea IV-6b da Portaria 466). Além disso, será preservado o sigilo das informações coletadas e a privacidade dos participantes da pesquisa. Estando de acordo em participar da 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 responsáveis pelo projeto através dos telefones: Maisa Camillo Jordão (maisacjordao_usp@hotmail.com): (14) 98114-1669; Daniela Rios (danirios@usp.br): (14) 98115-7718 / (14) 3224-3390. Em caso de denúncias e/ou reclamações em relação à pesquisa entrar em contato com o 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, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante 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 pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

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

Bauru, 02 de julho de 2015.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Maisa Camillo Jordão
Pesquisadora Responsável

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento: Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **13h30 às 17 horas**, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX(14)3235-8356

e-mail: cep@fob.usp.br

Apêndice 2

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14) 3235-8000 – FAX (0XX14) 3223-4679
Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva
e-mail: dep-oosc@fob.usp.br – Fone: (0XX14) 3235-8224

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 - Título do Trabalho Experimental

“Efeito in situ de diferentes tempos de ação salivar sobre esmalte com lesões erosivas iniciais”

2 - Objetivo

Dentre os inúmeros efeitos benéficos da saliva humana para a manutenção da saúde bucal, constatou-se o seu potencial remineralizador (reposição de minerais perdidos) da estrutura dentária tanto na inibição da cárie quanto prevenção da erosão dentária. A erosão é provocada pelo contato frequente de ácidos com os dentes, esses ácidos podem se originar do próprio organismo (nos episódios de refluxo e vômito), ou da alimentação (comidas e bebidas ácidas) e não tem relação com bactérias, diferentemente da cárie dentária. Várias medidas preventivas têm sido estudadas para aumentar a resistência do dente à erosão e os estudos que avaliam o potencial benéfico da saliva não determinam o tempo necessário para que ocorra uma reposição dos minerais perdidos pelo dente. Desta forma, iremos confeccionar dois tipos de aparelhos, um para ser no palato (céu da boca) e outro sobre os dentes da arcada inferior. Neles serão fixados pedaços de dentes bovinos, previamente esterilizados. Estes aparelhos serão cuidadosamente confeccionados para que machuquem a boca. O uso destes aparelhos é importante, pois permitirão, a nós pesquisadores, estudar a melhor forma de simular os eventos que ocorrem na boca de forma fiel, para que em futuros estudos medidas preventivas sejam testadas adequadamente. É importante frisar que o uso destes aparelhos será rápido (apenas duas vezes de duas horas) sem trazer nenhum efeito colateral aos dentes dos voluntários.

3 – Procedimentos da Fase Experimental

Nesta pesquisa você terá que usar um aparelho que ficará apoiado no céu da boca com 4 blocos de esmalte bovino previamente esterilizados, e outro aparelho sobre os dentes inferiores contendo também 4 blocos de dentes também previamente esterilizados. No primeiro dia, você irá colocar o aparelho na boca, e após os períodos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas, você será solicitado a retirar o aparelho da sua boca para que o pesquisador remova um bloco de dente do aparelho, o espaço correspondente será preenchido com cera para não incomodá-lo. No dia seguinte, o mesmo procedimento será executado, agora com o outro modelo de aparelho.

4 – Benefício para participar do experimento

Não existe benefício específico para os voluntários, pois os benefícios serão para a comunidade científica, caso se constate que em um menor período de tempo, a saliva humana é capaz de remineralizar a estrutura dentária. Atualmente tem-se considerado que é necessário um período de tempo de 2 horas entre uma exposição ácida e outra, para que a saliva exerça seu potencial benéfico. Assim em estudos futuros que utilizam este tipo de aparelho haverá uma redução no tempo de estudo, simplificando o protocolo. A única vantagem para o voluntário será a realização de uma limpeza profissional de seus dentes, antes do início do experimento. Cabe ressaltar, que não haverá gasto nenhum, para nenhum dos voluntários envolvidos na pesquisa.

Fica claro que você pode, a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos você poderá recorrer o autor do projeto – Catarina Ribeiro Barros de Alencar - Telefone (14) 81141857 ou com a Profª Drª Daniela Rios (14) 8115-7718 / (14) 32243390. Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

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 ou seu representante legal, 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 estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Apêndice 3

Instruções para as fases *in situ*

1. Os voluntários serão orientados a utilizar os dispositivos intrabucais continuamente (das 7:45h às 18:00h) exceto durante as refeições, sendo que nestes períodos os dispositivos serão mantidos no estojo plástico, envoltos em gaze umedecida em água de abastecimento.
2. Os voluntários deverão imergir os dispositivos em um copo contendo bebida erosiva por 2 minutos durante 5 dias. Após a imersão os dispositivos serão lavados em água e retornarão à boca.
3. Será permitido aos voluntários realizar a higiene bucal normalmente, após as refeições, sem o dispositivo, utilizando o dentífrício e escova dental fornecidos. O dispositivo poderá ser limpo com escova dentária, e água, sendo terminantemente proibida a escovação da área que contenha os espécimes.
4. Os voluntários também serão orientados a não ingerirem bebidas, exceto água, durante o experimento, a não ser nos horários das refeições quando da não utilização do dispositivo.
5. Este protocolo será realizado 4 vezes ao dia, por 5 dias consecutivos.
6. Ao final do 5º dia, os aparelhos deverão ser entregues ao pesquisador juntamente com as garrafas do Kit.
7. Os blocos devem permanecer embutidos nos aparelhos durante todo o experimento. Se o mesmo sair, ou caso o voluntário tenha qualquer dúvida durante a realização do protocolo, favor entrar em contato imediatamente com um dos pesquisadores responsáveis - Bianca: (14) 996159464 ou Maisa: (14) 981141669.

Horários a serem seguidos

7:45 h - Após tomar o café da manhã e realizar escovação (com o Kit fornecido – 1h antes de colocar o aparelho), inserir os aparelhos na cavidade oral;

8:00 h - Será feita a primeira ciclagem. Para tal serão dadas a você duas garrafas contendo solução incolor (que NÃO deve ser ingerida em hipótese alguma). A estas está acoplado um copo, que deve ser cheio até a marcação definida. Em um dos copos será depositado o aparelho superior e em outro os aparelhos inferiores simultaneamente. Estes devem permanecer no líquido por 2 min e em seguida lavados em água corrente e reinseridos na cavidade bucal; o aparelho superior deve ser imergido separadamente dos aparelhos inferiores;

10:00 h - Será feita a segunda ciclagem (como descrito acima);

12:00 h - O aparelho poderá ser retirado por 1h e 45 min no horário do almoço (lembrando de deixá-lo sempre no estojo plástico envolto em gaze umedecida quando fora da boca);

13:45 h - Após almoçar e realizar escovação (com o Kit fornecido - 1h antes de colocar o aparelho), inserir os aparelhos na cavidade oral;

14:00 h - Será feita a terceira ciclagem (como descrito acima);

16:00 h - Será feita a quarta ciclagem (como descrito acima);

18:00 h - Os aparelhos deverão ser retirados da boca e guardados em geladeira (lembrando de deixá-lo no estojo plástico sempre envolto em gaze umedecida).

****Estes procedimentos deverão ser repetidos rigorosamente durante 5 dias, respeitando sempre o tempo determinado.**

Apêndice 4

Questionário referente ao uso de dispositivos palatinos e mandibulares em estudos *in situ*.

Em relação ao conforto:

1. O dispositivo atrapalhou sua fala?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

2. O dispositivo causou desconforto durante o sono?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

3. O dispositivo ocasionou desconforto durante o dia nos momentos em que você estava em repouso?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

Em relação à dor:

1. O dispositivo provocou dor durante o uso diurno?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

2. O dispositivo provocou dor durante o uso noturno?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

3. Após a remoção do dispositivo você sentiu dor?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

4. Se sim, esta dor permaneceu quanto tempo após o término do uso?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

1 dia () 2 dias () Mais de 2 dias ()

1 dia () 2 dias () Mais de 2 dias ()

Em relação ao tempo:

1. A utilização do dispositivo ocasionou desconforto após o uso contínuo de 5 dias?

Dispositivo palatino

Dispositivo mandibular

Sim () Não ()

Sim () Não ()

Caso você precise utilizar um desses dispositivos novamente, qual deles você preferiria?

Dispositivo palatino ()

Dispositivo mandibular ()

Anexos

ANEXO 1

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência do tipo de dispositivo intrabucal no desgaste do esmalte diante de desafio erosivo - estudo in situ

Pesquisador: Maisa Camillo Jordão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43949715.8.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Devido ao tamanho do arquivo, este foi dividido em três partes, sendo que as duas

Data do Envio: 14/08/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.235.054

Apresentação da Notificação:

Envio relatório final.

Objetivo da Notificação:

Idem acima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatório final condizente com o projeto, resultados, metodologia e conclusão apresentados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

20 TCLEs foram anexados conforme projeto.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 1.235.054

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP reunido ordinariamente no dia 16.09.2015 acata por unanimidade o parecer APROVADO, emitido pelo relator, sobre o relatório final da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio final - Parte 1.pdf	14/08/2015 21:32:44		Aceito
Envio de Relatório Final	Relatório final - Parte 2.pdf	14/08/2015 21:35:15		Aceito
Envio de Relatório Final	Relatorio final - Parte 3.pdf	14/08/2015 21:38:16		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 18 de Setembro de 2015

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

Anexo 2

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO IN SITU DE DIFERENTES TEMPOS DE AÇÃO SALIVAR SOBRE ESMALTE COM LESÕES EROSIVAS INICIAIS

Pesquisador: Catarina Ribeiro Barros de Alencar

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 07102812.8.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 20/08/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.235.593

Apresentação da Notificação:

Envio de relatório final.

Objetivo da Notificação:

Idem acima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatório final adequado com os resultados pertinentes.

Anexo 10 TCLEs devidamente assinados pelos participantes.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 1.235.593

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP reunido ordinariamente no dia 16.09.2015 acata por unanimidade o parecer APROVADO, emitido pelo relator, sobre o relatório final da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_final.pdf	20/08/2015 13:33:50	Catarina Ribeiro Barros de Alencar	Aceito
Envio de Relatório Final	Termos_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.pdf	20/08/2015 13:34:54	Catarina Ribeiro Barros de Alencar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

BAURU, 18 de Setembro de 2015

Assinado por:

Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br