UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CÍNTIA MARIA DE SOUZA E SILVA

**Avaliação de novos tratamentos preventivos da erosão e abrasão
do esmalte e da dentina**

BAURU
2013

CÍNTIA MARIA DE SOUZA E SILVA

**Avaliação de novos tratamentos preventivos da erosão e abrasão
do esmalte e da dentina**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf.

Versão Corrigida

BAURU
2013

Si38a Souza e Silva, Cíntia Maria de
Avaliação de novos tratamentos preventivos da
erosão e abrasão do esmalte e da dentina / Cíntia
Maria de Souza e Silva. – Bauru, 2013.
159 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta 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: 083/2009
Data: 24 de junho de 2009

DEDICATÓRIA

Á **Deus**, por me permitir percorrer os caminhos do conhecimento, por sua iluminação e força durante todos os anos de minha vida.

Ao meu marido **Márcio**, que sempre esteve e está ao meu lado e nunca mediu esforços para que meu sonho se tornasse realidade, me apoiando em todos os momentos, com as palavras certas, muito amor e um lindo sorriso. Obrigada por ter me dado o maior e melhor presente do mundo, a nossa Eduarda. Você é um pai maravilhoso, atencioso e dedicado. Eu te amo.

A minha filha **Eduarda** que nasceu durante a execução dessa tese, e é o melhor presente que Deus poderia ter me dado. Eduarda, você é a minha vida. Filha, eu peço desculpas pelas minhas ausências. A mamãe te ama muitíssimo.

Márcio e Eduarda, eu só consegui chegar ao final desta jornada devido ao amor que existi em nós e pelo amparo de vocês. Obrigada por sacrificarem alguns dias de suas vidas em prol do meu sonho.

Aos meus pais amados, **Nazareno e Irene**, os melhores exemplos de coragem, honestidade, dedicação, profissionalismo e amor que eu poderia ter tido. Vocês estavam e estão sempre presentes e me apoiando em todas as minhas escolhas. Agradeço a vocês por “Tudo”: a minha existência, crescimento, amor, dedicação, ensinamentos, e por serem excelentes profissionais e exemplos a serem seguidos. Mãe, obrigada por estar presente em todos os momentos da minha vida e em especial em um dos mais importantes, naquele em que eu passei do estágio de filha para o de mãe. Pai, obrigada por sempre me incentivar e por ser meu exemplo de profissional.

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa

Eu amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, pela sua orientação constante e sábia, paciência, ensinamentos e amizade. Com sua postura otimista, sempre respeitou meus erros, estimulou o exercício de um pensamento científico e moral e assim, me proporcionou o crescimento profissional e pessoal. Você é um exemplo de honestidade, humildade, dedicação e força de vontade que devo seguir em minha vida. Obrigada pela maneira gentil e carinhosa com que me recebeu como sua orientanda.

À Profa. Dra. **Ana Carolina Magalhães**, pela grande ajuda, apoio e incentivo sempre que precisei. Obrigada pelo acolhimento e carinho com que me recebeu desde a minha primeira visita ao laboratório. A sua amizade foi essencial nessa trajetória.

"Professores ideais são aqueles que se transformam em pontes e que convidam os alunos a cruzá-la, depois de ter facilitado sua passagem, com alegria e colapso, incentivando-os a criar pontes a partir de suas próprias atitudes."

Nikos Kazantzakis

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, obrigada pela oportunidade em realizar o curso de Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso**, pela contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal, sempre pronto a ensinar e direcionar o caminho a ser percorrido.

Às **Professoras Dra. Ana Carolina Magalhães e Dra. Daniela Rios**, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, por ter me iniciado na vida acadêmica, me orientando durante minha dissertação de mestrado, com carinho e amizade.

Aos **Professores e funcionários do laboratório de Materiais Dentários** que prontamente disponibilizaram a utilização de equipamento do laboratório.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto, coordenador do CIP (Centro Integrado de Pesquisa)**, pela autorização do uso do CIP e de equipamentos.

Ao **Laboratório de Caracterização Estrutural**, Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos pela utilização do microscópio eletrônico de varredura - InspectTM S50, em que foi realizada a Análise por microscopia eletrônica de varredura associada a espectroscopia de energia dispersiva com detector de raio-x. Especialmente a secretária **Yasmin**, os técnicos **Victor e Vinícius**.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro que possibilitou o meu aprimoramento acadêmico, científico e profissional, e o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica: **Aline, Larissa, Ovídio, e Thelma.**
Obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar e pelo incentivo.

Ao funcionário do **CIP, Renato**, pela atenção e ajuda enquanto utilizei o local.

Às secretárias **Dalva, Vera e Maristela**, pela ajuda e atenção durante as fases administrativas.

Aos **amigos e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da FOB** que participaram direta e indiretamente do meu aprendizado.

Aos alunos de **Iniciação Científica, Thalissa, Izabella, Suzana, Éven e Juliana**, pela ajuda e convívio. Com vocês pude aprender muito enquanto tentava lhes ensinar.

Aos **colegas da Pós-Graduação do Laboratório de Bioquímica** que ao longo desses anos estiveram comigo nos caminhos do conhecimento, pela amizade e pelos risos compartilhados.

A **Thiemi, Cristiane, Senda, Lívia, Bruna, Kellen e Heloísa** com quem mais me relatei durante a execução desse estudo, o que nos fez tornarmos amigas.

Meus sinceros agradecimentos a todos os voluntários que participaram dessa pesquisa, **Guilherme, Juliana, Lívia, Cristiane, Éven, Aline, Alessandra, Isabela, Priscila, Jéssica, Camila, Heloísa, Janete, Bruno Zarella, Thiemi, Izabella Rosso, Thalissa, Bruno, Senda, Adriana, Kellen, Larissa, Lia, Suzana, Vinícius.** Muito obrigada pela cooperação e grande responsabilidade com que demonstraram durante a execução do estudo, sem a colaboração de vocês seria impossível a realização dessa pesquisa.

A todas as **Professoras e Funcionários do Berçário e Maternal Leite e Amor**, da FOB, pela dedicação, paciência, carinho e amor com que cuidaram do meu maior tesouro, minha filha Eduarda, enquanto me dedicava a realização desse trabalho.

Às minhas irmãs de coração **Karen e Neide** mesmo estando longe, a torcida, a amizade e a dedicação nunca me faltaram.

A outra irmã de coração **Luciana** (*in memorian*), durante o período em que Deus permitiu o nosso convívio você sempre me incentivou, torcendo por minhas conquistas, porém pessoas especiais como você todos querem por perto e o nosso Papai do Céu quis que você estivesse ao lado dele antes que eu pudesse terminar esse trabalho e que você me alegrasse com sua presença no dia da minha defesa de tese, mas sei que de onde você estiver estará torcendo por mim, minha querida amiga.

À família **Souza**, meus irmãos **Adriano e Paulo**, minhas cunhadas **Sandra e Luciane**, sobrinhas **Clara, Julia, Marina**, sobrinho **João Vitor**, por toda torcida, carinho e compreensão.

À minha tia **Cidinha** pelo carinho, incentivo a apoio. Especialmente ao cuidado dedicado a minha filha, o seu cuidado e amor por ela me deixou muito tranquila em deixá-la com você, algumas vezes, durante a realização desse trabalho.

À família **Silva**, meus sogros **Noedi e Sueli**, cunhadas **Alessandra e Luciana**, cunhado **João Paulo** e sobrinha **Juliana**, pelo carinho e incentivo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na concretização deste trabalho e me deram a certeza de que tudo valeu a pena.

Muito Obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho, conduzido na forma de 2 subprojetos, avaliou: 1) o potencial preventivo de pastas à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e a abrasão do esmalte e dentina bovinos *in vitro* e *in situ* e 2) o efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio antes da escovação com dentifrício fluoretado sobre a erosão associada ou não à abrasão do esmalte e dentina bovinos *in vitro* e *in situ*. Na fase *in vitro* do 1º subprojeto, submeteram-se blocos de esmalte e dentina bovinos, por 5 dias, à erosão (coca-cola, pH 2,6, 4x/dia, 90s cada) + abrasão (escova elétrica + solução do dentifrício sem flúor, 10s cada, 2x/dia) e os tratamentos foram realizados após a abrasão, através da aplicação das seguintes pastas sobre os blocos (3 min, 2x/dia): 10% HAP, 10% HAP + 0,2% NaF, 20% HAP, 20% HAP + 0,2% NaF, 20% HAP + 2% NaF, placebo, 0,2% NaF, 2% NaF, MI paste, MI paste plus e controle. Na fase *in situ*, (4 fases, 5 dias/cada), 12 voluntários utilizaram dispositivo intrabucal palatino contendo 4 blocos de dentina e 4 de esmalte bovinos divididos nas condições: erosão e erosão+abrasão. Em cada fase foi feito tratamento com uma das seguintes pastas: 10% HAP, 10% HAP + 0,2% NaF, MI paste plus ou Placebo. O protocolo erosivo e abrasivo foi semelhante ao *in vitro*. No 2º subprojeto, a fase *in vitro* foi semelhante ao subprojeto 1, porém apresentou as condições erosão e erosão+abrasão. O estudo compreendeu os seguintes tratamentos: BCa + DF, BCa + DP, BP + DF e BP + DP. Após erosão, os blocos foram imersos em água deionizada (BP) ou solução de lactato de cálcio 150 mM (BCa; 1 min, sob agitação). Na condição erosão apenas, a solução de dentifrício fluoretado (DF) ou placebo (DP) foi pipetada sobre as amostras. A fase *in situ* foi semelhante ao experimento *in vitro*, porém com 15 voluntários e escovação por 15 s. A variável de resposta para os 2 subprojetos foi a análise de desgaste, avaliada por perfilometria (μm) e para a fase *in situ* do 1º subprojeto foi realizada também a análise por MEV-EDS. Os dados foram analisados pelos testes ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis/Dunn ou ANOVA a dois critérios/Bonferroni ($p < 0,05$). *In vitro*, para o esmalte, as pastas à base de hidroxiapatita (10 e 20%), independentemente da presença do F, foram efetivas na prevenção da erosão associada à abrasão. Para a dentina, o efeito protetor foi encontrado apenas para as pastas contendo F, maior para aquelas com concentração mais elevada. *In situ*, apenas a pasta contendo 10% HAP foi efetiva para reduzir a erosão em esmalte quando comparada à pasta

placebo. Nas demais condições testadas nenhuma das pastas utilizadas diferiu significativamente da placebo. Para o segundo subprojeto, o BCa + DF teve um efeito protetor apenas para a erosão de esmalte e dentina *in vitro*. Para a erosão associada à abrasão *in vitro*, assim como no estudo *in situ*, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Descritores: Erosão dentária. Abrasão dentária. Esmalte dentário. Dentina. Fosfato de Cálcio. Hidroxiapatitas. Nanopartículas. Nanotecnologia. Flúor.

ABSTRACT

Evaluation of new preventive treatments for erosion and abrasion of enamel and dentin

This study, conducted in the form of two subprojects, evaluated: 1) the preventive potential of hydroxyapatite-based (calcium phosphate nanoparticles) pastes on erosion and abrasion of bovine enamel and dentin *in vitro* and *in situ* and 2) the effect of rinsing with a solution of calcium lactate before brushing with fluoride toothpaste on erosion associated or not with abrasion of bovine enamel and dentin *in vitro* and *in situ*. In the *in vitro* phase of the 1st subproject, bovine enamel and dentin blocks were submitted to erosion (coca-cola, pH 2.6, 4x/day, 90s each) + abrasion (electric toothbrush + fluoride-free toothpaste slurry, 10s each, 2x/day) for 5 days. Treatments were performed after abrasion, by applying the following pastes on the blocks (3 min, 2x/day): 10% HAP, 10% HAP + 0.2% NaF, 20% HAP, 20% HAP + 0.2% NaF, 20% HAP + 2% NaF, placebo, 0.2% NaF, 2% NaF, MI paste, MI paste plus and control. In the *in situ* phase (4 phases, 5 days each), 12 volunteers used intraoral palatal appliance containing four blocks of dentin and four blocks enamel divided into conditions erosion and erosion+abrasion. In each phase, treatment was done with one of the following pastes: 10% HAP, 10% HAP + 0.2% NaF, MI paste plus or Placebo. The erosive and abrasive protocol was similar to the *in vitro* phase. In the 2nd subproject, the *in vitro* phase was similar to subproject 1, but presented both conditions erosion and erosion + abrasion. The study included the following treatments: BCa + DF, BCa + DP, BP + DF e BP + DP. After erosion, the blocks were immersed in deionized water (BP) or calcium lactate solution 150 mM (BCa; 1 min, stirring). For the condition erosion only, the slurry of fluoride (DF) or placebo (DP) dentifrice was pipetted on the samples. The *in situ* phase was similar to the *in vitro* experiment, but 15 volunteers were included and brushing was conducted for 15 s. The response variable for the two subprojects was wear, evaluated by profilometry (um). For the *in situ* phase of the 1st subproject, SEM-EDS was also performed. Data were analyzed by ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis/Dunn or two-way ANOVA/Bonferroni tests ($p < 0.05$). *In vitro*, for enamel, 10 and 20% hydroxyapatite-based pastes, regardless the presence of F, were effective in preventing erosion

associated with abrasion. For dentin, the protective effect was found only for F-containing paste and the effect was higher for those with higher F concentration. *In situ*, only pastes containing 10% HAP were effective in reducing enamel erosion as compared to the placebo paste. For the other tested conditions, none of the pastes used significantly differed from placebo. For the second subproject, the BCa + DF had a protective effect only for enamel and dentin erosion *in vitro*. For erosion associated with abrasion *in vitro*, as well as for the *in situ* study, no significant differences were detected among the treatments.

Keywords: Dental erosion. Tooth abrasion. Tooth Enamel. Dentin. Calcium Phosphate. Hydroxyapatites. Nanoparticles. Nanotechnology. Fluoride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cortadeira ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA).....	76
Figura 2 .	Corte da coroa bovina e secção dupla no sentido cérico-incisal e outra no sentido médio-distal para obtenção dos blocos de esmalte 4x4 mm.	76
Figuras 3.	Sequência de corte da dentina radicular para obtenção de bloco de dentina. A – fatia de dentina radicular na porção cervical; B – fatia de dentina fixada a placa de acrílico para corte no sentido vestibulo-lingual; C – placa de acrílico pressa a máquina de corte; D – fatia de dentina radicular cortada no sentido vestibulo-lingual; E – blocos de dentina.	77
Figura 4.	Politriz Metalográfica.....	77
Figura 5.	Bloco colado para planificação da dentina interna e planificado.....	77
Figura 6.	Bloco polido.....	78
Figura 7.	Microdurômetro e endentação.	79
Figura 8.	Bloco protegido com esmalte cosmético de unha.	79
Figura 9.	Disposição dos blocos no aparelho palatino. Colunas 1 e 3 correspondem aos blocos de esmalte e as colunas 2 e 4, aos blocos de dentina.	81
Figura 10.	Fluxograma mostrando o delineamento do estudo.	82
Figura 11.	Fluxograma mostrando o delineamento do estudo.	84
Figura 12.	Recipientes com saliva, coca-cola e dispositivo com os blocos para a realização dos desafios erosivo.....	86
Figura 13.	Aplicação da pasta sobre os blocos com auxílio de microbrush.	86
Figura 14.	Escova elétrica fixada no dispositivo para padronizar a força.	86

Figura 15.	Desenho esquemático do protocolo <i>in vitro</i> do estudo 1.....	87
Figura 16.	Desenho esquemático do protocolo <i>in vitro</i> do estudo 2.....	89
Figura 17.	Aparelho intrabucal palatino em resina acrílica com os blocos dentários posicionados.	90
Figura 18.	Desenho esquemático do protocolo <i>in situ</i> do estudo 1	93
Figura 19.	A. Kit entregue aos voluntários; B. Kit dentro da embalagem em que foi entregue com as instruções.....	94
Figura 20.	Desenho esquemático do protocolo <i>in situ</i> do estudo 2.....	96
Figura 21.	Kit entregue aos voluntários.....	97
Figura 22.	Perfilômetro (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha) do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP e bloco posicionado para leitura.	98
Figura 23.	A – Equipamento para metalização dos blocos; B – Blocos metalizados com cobertura de ouro	99
Figura 24.	Detector de microanálise EDS acoplado ao MEV	99
Figura 25.	A - Gráfico obtido através do perfilômetro; B – Gráfico transformado em linhas e com os pontos para a medição.....	103
Figura 26.	Imagens representativas, obtidas por MEV da superfície do esmalte dos diferentes grupos e condições (erosão e erosão+abrasão) <i>in situ</i> , com aumento de 30.000x.....	111
Figura 27.	Imagens representativas, obtidas por MEV da superfície da dentina dos diferentes grupos e condições (erosão e erosão+abrasão), <i>in situ</i> com aumento de 30.000x.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) do esmalte submetido a desafios erosivos (com refrigerante tipo cola) e abrasivos e tratado com diferentes pastas remineralizantes ou não <i>in vitro</i>	105
Tabela 2.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) e da mediana da dentina submetida a desafios erosivos com refrigerante tipo cola e abrasivos e tratada com diferentes pastas remineralizantes ou não <i>in vitro</i>	106
Tabela 3.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão e erosão associada à abrasão e tratados com diferentes pastas remineralizantes ou não <i>in situ</i>	108
Tabela 4.	Média (desvio-padrão) e mediana da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte submetidos à erosão e erosão associada à abrasão tratadas com diferentes pastas remineralizantes ou não <i>in situ</i>	116
Tabela 5.	Média (desvio-padrão) e mediana da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de dentina submetidas à erosão e erosão associada à abrasão tratadas com diferentes pastas remineralizantes ou não <i>in situ</i>	117
Tabela 6.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão e bochecho de lactato de cálcio ou não <i>in vitro</i>	119
Tabela 7.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não <i>in vitro</i>	119
Tabela 8.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) do esmalte submetido à erosão ou erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não <i>in situ</i>	120
Tabela 9.	Valores de desgaste médio ($\pm dP$, μm) da dentina submetida à erosão ou erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não <i>in situ</i>	121

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
~	aproximadamente
%PDS	porcentagem de perda de dureza superficial
<	menor
=	igual
>	maior
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
®	marca registrada
°C	grau(s) Celsius
µg/g	micrograma(s) por grama
µm	micrometro
abr	abrasão
ACP	fosfato de cálcio amorfo
AmF	fluoreto de amina
ANOVA	análise de variância
APF	fluoreto fosfato acidulado
BCa	bochecho com cálcio
BP	bochecho placebo
C	carbono
Ca	cálcio
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	hidroxiapatita
CaCl ₂ .2H ₂ O	cloreto de cálcio dihidratado
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CHX	clorexidina
Cl	cloro
cm	centímetro(s)
CO ₂	dióxido de carbono
CPP	fosfopeptídeo de caseína
DDW	água destilada deionizada
DF	dentifrício fluoretado
DP	dentifrício placebo
dP	desvio padrão
DS(EM)	grau de saturação em relação ao esmalte dentário
EDS	detector de energia dispersiva de raio-x
EGCG	epigallocatech-galate ou epigallocatequina galato
er	erosão
et al.	(latim) – e colaboradores
F	fluoreto
FV	verniz fluoretado
g	grama

h	hora
HAP	hidroxiapatita
HCl	ácido clorídrico
HfF ₄	tetrafluoreto de háfnio
in situ	(latim) – em sítio, no local (no caso, cavidade bucal)
in vitro	(latim) – em laboratório
in vivo	(latim) – no ser humano
kg	quilograma
K ₂ HPO ₄	monohidrogenofosfato de potássio
KCl	cloreto de potássio
KHN	número de dureza knoop
KHz	quilohertz
KW	Kruskal-Wallis
L	litro(s)
LSS	lauril sulfato de sódio
M	molar ou mol
m ³	metro(s) cúbico(s)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Mg	magnésio
mg	miligrama(s)
mg/L	miligrama por litro
mg/m ³	miligrama por metro cúbico
mg/mL	miligrama por mililitro
min	minuto(s)
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
mmol	milimol
MMPs	metaloproteinase da matriz
N	Newtons
n	tamanho da amostra
Na	sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaF	sulfato de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de sódio
NaSCN	tiocianato de sódio
Nd:YAG	óxido de ítrio e alumínio (Y ₃ Al ₅ O ₁₂) dopado com neodímio (Nd ³⁺)
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
nm	nanômetros
O	oxigênio
P	fósforo

p	nível de significância
p/v	peso por volume
PA	bebida Powerade
pH	potencial hidrogeniônico
pK _a	inverso do logaritmo da constante de acidez
ppm	partes pro milhão
remin	remineralização
RML	microrradiografia longitudinal
rpm	rotação por minuto
s	segundo(s)
SLS	solução substituta de saliva
SnF ₂	fluoreto de estanho
tg	atrição pela língua
TiF ₄	tetrafluoreto de titânio
TMP	trimetafosfato
x	vezes
ZAF	influência do número atômico dos elementos sobre a eficácia da excitação e da detecção (fator Z), probabilidade que um raio-X seja absorvido antes mesmo de ser detectado (fator A) e contribuição dos raios-X emitidos por um outro elemento (fluorescência secundária, fator F)
ZrF ₄	tetrafluoreto de zircônio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Definição e etiologia da erosão e abrasão dentária.....	27
2.2	Medidas preventivas para erosão e abrasão dentária	37
2.2.1	Fatores comportamentais	37
2.2.2	Fatores Biológicos	45
2.2.3	Fatores Químicos	51
3	PROPOSIÇÃO	69
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.1	Obtenção dos dentes e preparo dos blocos	75
4.2	Estudo 1 - Avaliação do efeito de uma pasta à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	80
4.2.1	<i>Design</i> experimental do tratamento <i>in vitro</i>	80
4.2.2	<i>Design</i> experimental do tratamento <i>in situ</i>	81
4.3	Estudo 2 - Avaliação do efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de dentifrício fluoretado na erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	82
4.3.1	<i>Design</i> experimental do tratamento <i>in vitro</i>	82
4.3.2	<i>Design</i> experimental do tratamento <i>in situ</i>	83
4.4	Protocolo detalhado dos estudos <i>in vitro</i>	84
4.4.1	Estudo 1	84
4.4.2	Estudo 2	87
4.5	Seleção dos voluntários.....	89

4.6	Protocolo <i>in situ</i>	91
4.6.1	Estudo 1	91
4.6.2	Estudo 2	94
4.7	Análise de perfil	97
4.8	Análise por microscopia eletrônica de varredura associada a espectroscopia de energia dispersiva com detector de raio-x.....	98
4.9	Análise estatística.....	99
4.9.1.	Estudo 1	100
4.9.2.	Estudo 2	100
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	101
5.1.	Avaliação do efeito de uma pasta à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos <i>in vitro</i> e <i>in</i> <i>situ</i>	103
5.2	Avaliação do efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de dentifrício fluoretado na erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovino <i>in</i> <i>vitro</i> e <i>in situ</i>	118
6	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS.....	129
	ANEXOS	151

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Embora tenha ocorrido um declínio na prevalência da cárie dentária nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil (BROWN; WALL; LAZAR, 2000; NARVAI et al., 2006; PETERSSON; BRATTHALL, 1996), devido ao acesso aos meios preventivos, especialmente ao uso de fluoreto (F) e à escovação, um aumento na prevalência de outras desordens dentárias, tais como o desgaste dentário (lesão do tipo não cariosa), tem sido observado (LUSSI, 2006). As lesões não cariosas englobam principalmente a erosão, abrasão e atrição dentária (ADDY; SHELLIS, 2006; BARTLETT, D.W.; SHAH, 2006).

Mesmo sendo a cárie e a erosão dentária lesões causadas por desmineralização do dente, os fatores etiológicos e o tipo de ácido que determinam as características clínicas de ambas são diferentes. A desmineralização associada à cárie é promovida pela exposição do dente aos ácidos de origem bacteriana, ou seja, na presença de placa bacteriana e uma dieta rica em açúcar (TEN CATE et al., 2005), e o principal ácido envolvido é o ácido láctico, que apresenta um pH em torno de 5, o que leva a uma desmineralização inicial de subsuperfície (TEN CATE et al., 2005). A desmineralização associada à erosão é promovida pela exposição frequente do dente aos ácidos da dieta ou do estômago (TEN CATE et al., 2005), e o tipo de ácido envolvido no estabelecimento da lesão é mais variado, com pH variando entre 2 e 3, o que leva inicialmente a um amolecimento da superfície dentária, seguido por dissolução contínua dos cristais do esmalte, camada por camada (LUSSI; JAEGGI, 2006b; LUSSI et al., 2011).

A erosão dentária é definida como perda irreversível de estrutura dentária, devido a um processo químico, sem envolvimento de microorganismos (LUSSI, 2006), desencadeado por ácidos de origem intrínseca e extrínseca. Já a abrasão e atrição são desgastes ocasionados por fatores mecânicos, tais como escovação e contato dentário patológico (bruxismo), respectivamente (ADDY; SHELLIS, 2006). Os desafios mecânicos são de grande impacto especialmente sobre superfícies erodidas, já que o ataque ácido leva à perda irreversível de estrutura dentária acompanhada por uma desmineralização na superfície. Portanto, forças mecânicas, como a escovação após uma refeição, poderiam remover a camada de esmalte ou

dentina desmineralizada (ATTIN et al., 2001; ATTIN et al., 2004; JAEGGI; LUSI, 1999; MAGALHAES et al., 2007b; MAGALHAES et al., 2008d; RIOS et al., 2006a).

Sabe-se que a interação entre os agentes erosivos e o tecido dentário é diferente para o esmalte e a dentina dentária. Basicamente, o esmalte dentário é composto por mineral (85% volume), na forma de cristais de hidroxiapatita ou fluorapatita, organizado em prismas. Com a queda do pH abaixo de 4,5, na ausência de placa dentária, esses cristais são facilmente dissolvidos por ácidos, produzindo uma lesão de superfície (MAGALHAES et al., 2009c), sendo que na presença de placa ocorre a lesão de subsuperfície. Já a dentina contém em média 47% de componentes inorgânicos (cristais de apatita), 33% de orgânicos (colágeno) e 20% de água. A desmineralização da dentina é iniciada na dentina peritubular. O aumento do tempo do ataque erosivo resulta em uma concavidade e em um afunilamento dos túbulos dentinários, sendo a dentina peritubular completamente dissolvida. As taxas de desmineralização da dentina diminuem quando a quantidade de colágeno degradável aumenta, de modo que é atribuída à matriz desmineralizada a ação de impedir a difusão iônica para dentro e fora da área desmineralizada (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; GANSS; LUSI; KLIMEK, 2005).

Um dos grandes desafios da odontologia atual está no desenvolvimento de tecnologias que confirmem bioatividade aos materiais dentários, tornando-os capazes de reestruturar os tecidos dentários e propiciar as bases para a introdução de novos conceitos de tratamento e prevenção na odontologia através do estabelecimento de procedimentos clínicos minimamente invasivos e altamente eficientes, evitando procedimentos reabilitadores mais complexos e dor. O desenvolvimento de materiais biofuncionais com potencial remineralizador traz possibilidades imediatas de sua aplicação na prevenção de lesões não cariosas e de hipersensibilidade dentinária, e o domínio de sua tecnologia contribuirá para construir as bases de tratamentos restauradores definitivos.

Com base no fato da hidroxiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ser o principal constituinte da fase inorgânica tanto do esmalte como da dentina, produtos com características químicas e estruturais semelhantes, capazes de fornecer íons cálcio e fosfato nas concentrações e na velocidade adequadas, podem reestruturar o esmalte e/ou dentina. No contexto da erosão, sua aplicação poderia refletir em resultados promissores no reendurecimento da estrutura dentária, através da reposição dos íons cálcio e fosfato nas superfícies desmineralizadas e da formação

de uma película/camada protetora de HAP sobre a superfície dentária, com resistência coesiva e ácida semelhante ao do dente natural. No contexto da dessensibilização dentinária, sua aplicação poderia refletir em resultados promissores no tratamento anti-hiperestésico, através da promoção da deposição de uma camada de HAP oclusiva nos túbulos dentinários (ABSI; ADDY; ADAMS, 1987; WANG, Z. et al., 2010) de espessura superior às promovidas pelos materiais dessensibilizantes convencionais, e com alta resistência coesiva, o que conferiria alterações morfológicas na superfície dentinária capazes de formar uma película uniforme, impermeabilizante sobre a dentina, dificultando o acesso de estímulos externos à polpa. No entanto, a disponibilidade destes íons ao organismo é dependente do estado cristalino, da morfologia e da área superficial das partículas.

Recentemente, foi lançado um produto australiano chamado Prospec® MI Paste (GC América Inc., Illinois, USA), à base de fosfato de cálcio e fosfopeptídeo caseína, uma molécula naturalmente presente e que é capaz de ligar íons cálcio e fosfato e estabilizar fosfato de cálcio amorfo. Este produto apresenta propriedades remineralizantes e dessensibilizantes, com excelentes resultados (AL-JOBAIR, 2010; KUMAR; ITTHAGARUN; KING, 2008; RANJITKAR et al., 2009a; RANJITKAR et al., 2009b; BADR; IBRAHM, 2010).

Têm sido desenvolvidos produtos bioativos à base de HAP e fosfatos de cálcio para remineralização e dessensibilização do tecido dentário, capazes de remineralizarem a superfície dentária e promoverem um selamento de qualidade (formação de película impermeabilizante) na interface entre a superfície dentária externa e o ambiente bucal, inibindo a desmineralização e dificultando o acesso de estímulos externos à polpa, visando a levar a uma redução ou mesmo eliminação da perda dentária. Estes produtos contêm nanopartículas de fosfato de cálcio organizadas na forma de cristais (semelhante à estrutura dentária, tamanho < 100 nm). Estas nanopartículas apresentam elevada área superficial, facilitando a disponibilidade do produto para o organismo reorganizar os íons cálcio e fosfato em formato de HAP. Por ser a bioatividade da estrutura dentária baixa, o uso de nanopartículas é um grande diferencial nesta aplicação.

Outra possível estratégia preventiva para erosão e abrasão do esmalte e dentina é o uso de produtos ricos em cálcio, associados aos dentifrícios fluoretados, com o objetivo de aumentar o reservatório de CaF_2 (fluoreto de cálcio) sobre a superfície dentária. Este reservatório, por sua vez, serviria como barreira mecânica

para a difusão dos ácidos. Os dentifrícios com concentrações de 1.100 e 5.000 ppm F apresentam limitado impacto sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina (MAGALHAES et al., 2008d; RIOS et al., 2008b). A realização de bochechos com uma solução contendo cálcio, previamente à utilização de dentifrícios fluoretados, poderia aumentar a formação de CaF_2 sobre a superfície dentária, aumentando o potencial protetor do dentifrício fluoretado, mas isto nunca foi testado em desafios erosivos e abrasivos.

Vários trabalhos têm mostrado que a realização de bochecho com solução contendo cálcio previamente a bochecho com solução fluoretada ou dentifrício fluoretado é capaz de aumentar a concentração de F na saliva, placa total e fluido da placa (VOGEL; CHOW; CAREY, 2008; VOGEL et al., 2006a; VOGEL et al., 1997; VOGEL et al., 1992; VOGEL et al., 2008; VOGEL et al., 2006b), o que poderia aumentar o efeito cariostático do produto fluoretado. Estudos *in situ* e pré-clínicos vêm sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa a fim de avaliar se ocorre uma maior incorporação de F na placa após a utilização de dentifrício fluoretado precedido ou não por um bochecho com solução de cálcio (MAGALHAES et al., 2007a; PESSAN et al., 2006; WHITFORD et al., 2005) e se esta associação reduz a ocorrência de lesões cariosas em esmalte (MAGALHAES et al., 2007a). Em especial o último trabalho, que foi realizado *in situ*, mostrou um aumento entre 4 e 6 vezes na concentração de F e Ca na placa com a associação entre bochecho com Ca (solução de lactato de cálcio a 150 mM) e dentifrício fluoretado (1100 ppm F). Adicionalmente, a remineralização do esmalte artificialmente cariado também foi acelerada com a associação do bochecho com Ca (MAGALHAES et al., 2007a). Portanto, seria interessante avaliar se a associação entre solução de Ca e dentifrício fluoretado poderia ter impacto na erosão e abrasão dentárias.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordados os seguintes tópicos:

2.1 Definição e etiologia da erosão e abrasão dentária

2.2 Medidas preventivas para erosão e abrasão dentária

2.2.1 Fatores comportamentais

2.2.2 Fatores Biológicos

2.2.3 Fatores Químicos

2.1 Definição e etiologia da erosão e abrasão dentária

O termo desgaste dentário é definido como a perda de tecido dentário duro devido aos processos de erosão, atrição e abrasão (LITONJUA et al., 2003). No caso da atrição e da abrasão, ambas são ocasionadas por fatores mecânicos, porém a atrição é a perda de tecido dentário resultante do contato dentário patológico, como ocorre nos casos de bruxismo (ADDY; SHELLIS, 2006; LITONJUA et al., 2003). A abrasão é causada por hábitos orais (escovação) e substâncias abrasivas (dentifrício) (LITONJUA et al., 2003).

A erosão dentária pode ser definida como perda de estrutura dentária desencadeada por um processo químico sem o envolvimento de bactérias, não havendo a presença de placa bacteriana (LUSSI, 2006). Para Huysmans, Chew e Ellwood (2011) a erosão é definida como uma desmineralização parcial do esmalte ou da dentina causada por ácidos intrínsecos e extrínsecos, já o desgaste dentário erosivo é a perda acelerada de tecido duro dentário através do efeito combinado da erosão e da perda mecânica (abrasão e atrição) na superfície dentária. Entretanto, Shellis et al. (2011) sugerem que o termo erosão deva ser utilizado não apenas para desmineralização parcial inicial, mas também para a perda de superfície dentária causada exclusivamente por exposição prolongada à ácidos. Estes autores sugerem que a definição sugerida por Huysmans, Chew e Ellwood (2011) requerer modificações, pois a perda de esmalte pode resultar de um desafio erosivo

prolongado sem o envolvimento da abrasão. Outro fator para a mudança é que os desafios erosivos *in vivo* são breves e dessa forma talvez seja improvável que a erosão por si só seja uma das principais causas de perda de superfície dentária na vida real, sendo este processo de desgaste conseguido em modelos experimentais.

Na erosão os ácidos intrínsecos são oriundos do estômago em pacientes que apresentam anorexia, bulimia nervosa e problemas gastro-esofágicos (BARTLETT, D., 2006). A xerostomia também pode ter influência no aparecimento da lesão, devido à diminuição na liberação de saliva responsável pelo equilíbrio do pH (tamponamento dos ácidos) (HARA et al., 2006). Os ácidos de origem extrínseca incluem alimentos, bebidas, medicamentos e produtos ácidos advindos do ambiente de trabalho (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004). Atualmente, os ácidos extrínsecos têm sido considerados os principais fatores relacionados com a ocorrência de erosão dentária em função de uma mudança dos hábitos dietéticos da população, que tem consumido com maior frequência bebidas ácidas, como refrigerantes e sucos de fruta (LUSSI, 2006). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), para o Brasil, o consumo de refrigerantes aumentou em 490% de 1995 a 2003.

O ataque ácido conduz à perda irreversível de tecido mineralizado, acompanhada por amolecimento progressivo da superfície (LUSSI, 2006), sendo essa área amolecida mais susceptível a desgaste por forças mecânicas, tais como, abrasão (ATTIN; BUCHALLA; PUTZ, 2001; RIOS et al., 2006a), sendo que esse efeito é pequeno ou insignificante no tecido dentário sadio. A desmineralização ocorre pela interação entre os agentes erosivos e o substrato dentário. Para que ocorra essa desmineralização, o ácido deve difundir-se através da placa dentária (se presente) atingindo a película adquirida e, então, os próprios cristais (FEATHERSTONE; LUSSI, 2006; ZERO; LUSSI, 2005).

O processo químico que envolve a erosão pode ocorrer devido à dissolução dos cristais pelos íons hidrogênio derivados dos ácidos, ou pela ligação dos ânions como complexo de cálcio (FEATHERSTONE; LUSSI, 2006; ZERO; LUSSI, 2005). No esmalte, os ácidos promovem uma dissolução na área interprismática ou nos prismas de esmalte. Na dentina esse processo ainda não é totalmente compreendido, por ser mais complexo. Sabe-se que a desmineralização é iniciada na interface entre a dentina inter- e peritubular, com a extração dos minerais. Em seguida, a dentina peritubular é degradada, e os túbulos dentinários tornam-se mais

largos. Finalmente, uma camada superficial de matriz orgânica desmineralizada pode ser detectada, seguida por uma zona parcialmente desmineralizada, até o interior da dentina sadia ser alcançada (MEURMAN; DRYSDALE; FRANK, 1991). A difusão dos agentes desmineralizadores em regiões mais profundas é dificultada devido à presença da matriz orgânica (HARA et al., 2005), que tem uma capacidade tampão suficiente para promover o atraso da desmineralização (ZERO; LUSSI, 2005). Recentemente foi demonstrado que a preservação da matriz orgânica desmineralizada, pela utilização de inibidores de proteases da matriz, é capaz de reduzir a perda dentinária (KATO et al., 2012).

O declínio na prevalência da cárie dentária nos países industrializados, associado ao aumento da expectativa de vida da população, tem contribuído para a manutenção de um maior número de elementos dentais em adultos e idosos (NUNN, 1996). Com isso, mais superfícies dentárias ficam expostas, podendo sofrer desgaste, também conhecido como lesão do tipo não cariosa (ADDY; SHELLIS, 2006; JAEGGI; LUSSI, 2006b; LUSSI, 2006). Os desgastes dentários são frequentemente encontrados independentemente da idade da população examinada. Esses desgastes estão aumentando e sendo observado nos grupos etários mais jovens, levando a danos nos dentes permanentes ainda durante a infância, dessa forma comprometendo a dentição da criança e levando a repetidas restaurações e procedimentos cada vez mais complexos (LUSSI; JAEGGI, 2006c; TAJI; SEOW, 2010).

Diversos estudos epidemiológicos avaliando a prevalência e severidade do desgaste dentário foram realizados, a maioria com crianças e adolescentes em idade escolar devido à maior facilidade em recrutá-las.

Jaeggi e Lussi (2006) relatam que a presença de erosão é cada vez maior. Em crianças pré-escolares com idade entre 2 e 5 anos, 6-50% apresentaram erosão nos dentes decíduos. Já na idade de 5 a 9 anos, 14% dos casos observados tiveram lesões erosivas nos dentes permanentes. No grupo de adolescentes (com idade entre 9 e 17) 11-100% dos jovens examinados apresentavam sinais de erosão. Os dados de incidência (aumento de indivíduos com erosão) avaliados em três destes estudos foram de 12% em 2 anos, 18% em 5 anos e 27% mais de 1,5 anos. Em adultos (com idade entre 18 e 88), os dados de prevalência variaram entre 4 e 82%. Os dados de incidência são escassos; um único estudo foi encontrado e mostrou uma incidência de 5% para os mais jovens e 18% para os mais velhos (aumento de

superfícies com erosão). Os dados de prevalência indicaram que os homens tinham mais desgaste erosivo do que as mulheres. A distribuição de erosão mostrou um predomínio de superfícies oclusais (especialmente primeiros molares inferiores), seguido por superfícies vestibulares (dentes anteriores superiores). Erosão foi frequentemente encontrada em incisivos e caninos. No geral, os dados de prevalência não foram homogêneos. No entanto, existe uma tendência para uma taxa mais acentuada de erosão em grupos etários mais jovens. Portanto, é importante detectar pacientes de risco precocemente, para iniciar medidas preventivas adequadas.

Auad et al. (2007) avaliaram a prevalência de erosão dentária em uma amostra de adolescentes brasileiros com idade de 13 e 14 anos e a relação da erosão dental e das características sócio-demográficas. Uma amostra de conveniência de 458 crianças (190 meninos e 268 meninas) de 14 escolas em Três Corações, Minas Gerais, foi examinada. Dados sócio-demográficos foram coletados por auto-preenchimento de questionários. Erosão dentária foi observada em 34,1% dos adolescentes, envolvendo apenas esmalte e mostrando uma distribuição simétrica. As superfícies palatinas dos incisivos superiores foram as mais afetadas. A erosão afetava mais os meninos; alunos de escolas públicas; aqueles residentes em áreas rurais e os de classe econômica alta, mas nenhum deles foram estatisticamente significativas. Estes dados foram os primeiros a mostrar que em adolescentes escolares com idade de 13 e 14 anos, aproximadamente um terço dos examinados apresentavam erosão leve, exigindo aconselhamento clínico preventivo. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre erosão, gênero, e fatores socioeconômicos.

El Aidi et al. (2010) realizaram um estudo com adolescentes na Holanda para estimar a prevalência, incidência e progressão da erosão dentária ao longo de 3 anos. Eles também investigaram as influências da idade, gênero e condições socioeconômicas sobre a erosão. Durante o período, a erosão foi avaliada 3 vezes com intervalo de 1,5 anos entre as avaliações, em uma amostra de 622 indivíduos, com idade inicial entre 10 e 12 anos. A erosão dentária estava presente em 30,4% das crianças com 11 anos de idade, e 44,2% nas de 15 anos. O esmalte e a dentina estavam erodidos em 1,8% das crianças com 11 anos de idade e em 23,8% nos adolescentes de 15 anos. A erosão foi significativamente maior nos meninos do que nas meninas, assim como em crianças com baixo poder socioeconômico, quando

comparadas às outras. A incidência de novas superfícies dentárias com erosão, em crianças livres de erosão, diminuiu significativamente com a idade, enquanto a progressão em crianças com erosão não se alterou. Houve uma diminuição significativa da incidência nos incisivos superiores e primeiros molares inferiores com a idade. Os pesquisadores concluíram que a incidência de novas superfícies apresentando erosão, apenas em crianças livres de erosão, diminuiu significativamente com a idade. Em relação aos grupos de dentes, houve uma diminuição significativa na incidência com a idade para os incisivos superiores e primeiros molares inferiores.

Gurgel et al. (2011) avaliaram a prevalência de erosão dentária em adolescentes e investigaram a associação entre erosão e características sociodemográficas. O estudo consistiu de uma amostra única aleatória de 414 adolescentes (12 e 16 anos), de ambos os gêneros, de escolas públicas e privadas da cidade de Bauru, São Paulo, Brasil. Dois examinadores previamente calibrados ($\kappa=0,85$) usaram o índice O'Brien para avaliação da erosão dentária nas superfícies vestibular e palatina dos incisivos permanentes e nas superfícies oclusais dos primeiros molares permanentes. Os adolescentes preencheram um questionário com informações sobre gênero, tipo de escola, e renda média familiar. A prevalência de erosão dentária foi de 20% ($n=83$), com envolvimento apenas do esmalte (score 1). A superfície vestibular foi a mais afetada (16%). Não houve diferenças significativas entre a presença de erosão e o gênero, tipo de escola, e a renda média familiar. Os resultados indicaram que a erosão dentária restrita ao esmalte foi observada entre os adolescentes em Bauru, e não houve correlação entre esta condição e os fatores sociodemográficos.

A etiologia da erosão é multifatorial e está relacionada a diferentes fatores comportamentais (hábitos alimentares, consumo de bebidas, medidas de higiene oral, vômitos, drogas e ocupação), biológicos (saliva, película adquirida e biofilme, estrutura dentária e saúde geral) e químicos (pH, pK_a , capacidade tampão, tipo de ácido, ação quelante e presença de cálcio, flúor e fósforo) (MAGALHAES et al., 2009c).

A busca por um estilo de vida saudável tem levado a população a uma mudança de comportamento, com prática de exercícios físicos e um consumo maior de alimentos (frutas) e bebidas ácidas (LUSSI, 2006). Há muito tempo, sabe-se que alimentos e bebidas ácidas podem amolecer os tecidos duros do dente (LUSSI;

JAEGGI; ZERO, 2004). Um estudo realizado por Monteiro, Mondini e Costa (2000), no Brasil, avaliou as mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas entre os anos 1988 e 1996, sendo verificada uma redução no consumo de legumes, verduras, frutas e sucos naturais e um aumento no consumo de açúcar e refrigerantes, o que também tem sido relatado para outros países (TAHMASSEBI et al., 2006).

Huew et al, (2011) realizaram um estudo com crianças de escolas em Benghazi, na Líbia, para investigar a associação entre erosão dentária e os potenciais fatores de riscos alimentares e concluíram que a frequência de consumo de bebidas à base frutas e o tempo necessário para consumir bebidas ácidas foram os principais fatores de risco estatisticamente significativos para a erosão dentária. Já o estudo transversal de Manaf et al, (2012) verificou a associação entre a ocorrência de erosão e o consumo de alimentos e bebidas ácidas entre estudantes universitários da Universidade Kenbangsaan, da Malásia. Os autores observaram uma alta prevalência de erosão entre alunos e sugeriram que o aconselhamento dietético e aumento do consumo de leite em uma idade mais jovem, podem reduzir a ocorrência de erosão dentária nessa faixa etária.

Com a melhora na qualidade de vida da população, houve um maior acesso aos meios preventivos de higiene bucal. A escovação frequente com produtos abrasivos após o consumo de substâncias ácidas pode aumentar o desgaste dentário (ADDY; SHELLIS, 2006; RIOS et al., 2006a; RIOS et al., 2011). O estudo *in situ* realizado por Rios et al. (2006a) avaliou a influência da postergação da escovação, após um desafio erosivo, no amolecimento superficial do esmalte e no desgaste do esmalte bovino erodido. Foi observado que a postergação da escovação reduz significativamente o desgaste do esmalte erodido. No entanto, a escovação promoveu menor % perda de dureza superficial, devido à remoção da camada superficial de esmalte alterada.

Num outro estudo *in situ* realizado por Rios et al. (2011) foi avaliado se o tipo de bebida de cola (normal ou light) influenciava o desgaste do esmalte submetido à erosão seguida de abrasão. Em relação às características químicas, a coca-cola Light apresentou um pH de 3,0, 13,7 mg de Ca/L, 15,5 mg P/L e 0,31 mg F/L, enquanto a cola normal teve pH 2,6, 32,1 mg de Ca/L, 18,1 mg P/L, e 0,26 mg F/L. A coca-cola light promoveu menor perda de esmalte para ambas as condições (erosão com coca-cola light, 0,36 µm; erosão com coca-cola light associada à

abrasão, 0,39 μm) do que a normal (erosão com coca-cola, 0,72 μm ; erosão com coca-cola associada à abrasão, 0,95 μm). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre erosão e erosão mais abrasão para coca-cola Light. No entanto, para cola normal, a erosão mais abrasão resultou numa maior perda de esmalte do que a erosão sozinha. Sugerindo que a coca-cola light promoveu menor desgaste no esmalte, mesmo quando a erosão foi associada à abrasão.

Existem também outros fatores comportamentais importantes que aumentam o risco ao desenvolvimento de lesões de erosão tais como o consumo de algumas medicações ou de drogas ilícitas (LUSSI et al., 2006; LUSI; JAEGGI, 2008; MAGALHAES et al., 2009c). Pacientes que apresentam refluxo gastroesofágico, alcoolismo crônico e distúrbios psicossomáticos (anorexia ou bulimia) (BARTLETT, D., 2006) também são mais propensos a apresentarem erosão dentária.

Schlueter et al. (2012) avaliaram a perda de tecido dentário na dentina através da simulação de condições de bulimia. As amostras dos quatro grupos foram desmineralizadas ciclicamente, sendo 6 vezes de 2 minutos por dia, durante 9 dias, com uma solução HCl-pepsina, com pH 1,6 e 1,5 mg/mL de pepsina, e tratadas com uma solução de tripsina, 6 vezes de 10 minutos por dia, diretamente após. Um grupo foi o controle, sendo que as amostras dos outros três foram escovadas 2 vezes ao dia, por 15 s, após o primeiro e o último tratamento com a tripsina, com forças de 200 g, 300 g e 400 g. A perda de estrutura foi determinada por perfilometria, sendo ainda feita análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A perda de tecido mineralizado (μm , média $\pm$ desvio padrão) foi: 135,7 $\pm$ 10,9 μm (controle), 165,2 $\pm$ 30,8 μm (200 g), 168,0 $\pm$ 16,3 μm (300 g) e 174,9 $\pm$ 17,1 μm (400 g). A abrasão aumentou significativamente a perda de tecido, independentemente da força aplicada ($p\leq 0,001$). O MEV mostrou que a matriz dentinária foi igualmente diluída através da atividade enzimática, para todos os grupos, mas ainda estava presente como uma banda contínua. Os resultados indicaram que a escovação da dentina após o ataque do ácido e das enzimas aumentou a perda de tecido da dentina. Entretanto, a matriz permaneceu na superfície apesar do tratamento enzimático e da escovação com forças de até 400 g.

O ambiente de trabalho é outro fator que propicia o aparecimento da erosão (LUSSI; JAEGGI, 2006a). O contato frequente com ácidos inorgânicos ou orgânicos no ambiente de trabalho aumenta a ocorrência e a progressão da erosão (LUSSI; JAEGGI, 2006a). Suyama et al. (2010) avaliaram a erosão dentária em

trabalhadores expostos ao ácido sulfúrico em fábrica de bateria. No ano de 1991 os pesquisadores verificaram que a densidade de ácido sulfúrico no ambiente de trabalho estava acima do limite tolerável, que é de $1,0 \text{ mg/m}^3$, e que os trabalhadores mais antigos tinham erosão. Os trabalhadores que manuseavam o ácido sulfúrico passaram por um exame bucal, para se investigar as taxas de erosão dentária por tipo de dente, as taxas de erosão pelo número de anos de trabalho e as taxas de erosão pela densidade de ácido sulfúrico no ambiente de trabalho investigados. Um critério de diagnóstico foi utilizado para identificar o grau de erosão. A erosão era concentrada nos dentes anteriores da mandíbula, não havendo erosão nos dentes superiores. Após 10 anos de trabalho, as taxas de erosão dentária cresceram. As porcentagens de trabalhadores com o problema foram de 42,9% de 10 a 14 anos, 57,1% de 15 a 19 anos e 66,7 % para aqueles acima de 20 anos para um total de 22,5% de trabalhadores. Em relação à densidade do ácido sulfúrico no ambiente de trabalho, as porcentagens foram de 17,9% entre 0,5 e $1,0 \text{ mg/m}^3$, 25,0 % entre $1,0$ e $4,0 \text{ mg/m}^3$ e 50,0 % entre $4,0$ e $8,0 \text{ mg/m}^3$, sugerindo que a avaliação da densidade do ácido sulfúrico no ar das fábricas é tão importante quanto a avaliação da exposição ao ácido sulfúrico.

Dentro dos fatores biológicos, a saliva é considerada o mais importante para a prevenção da erosão devido às suas propriedades. A saliva tem uma ação direta sobre o agente erosivo diluindo, limpando, neutralizando os ácidos e ação de tamponamento, desempenha um importante papel na formação da película adquirida, reduz a taxa de desmineralização e melhora a remineralização fornecendo Ca, fosfato e F para o esmalte e dentina erodidos. A sua proteção começa antes mesmo do início do ataque ácido, com o aumento do fluxo salivar em respostas aos estímulos extra bucais, como olfato (ENGELIN et al., 2003; LEE; LINDEN, 1992) e visão (CHRISTENSEN; NAVAZESH, 1984). Esse aumento do fluxo salivar aumenta a capacidade de remineralização da superfície dental (EISENBURGER et al., 2001; RIOS et al., 2006b; RIOS et al., 2008a). A saliva é secretada por três pares de glândulas salivares maiores e pelas glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000), sendo constituída por componentes orgânicos e inorgânicos. O componente inorgânico bicarbonato está relacionado à capacidade tampão da saliva, enquanto o Ca e fosfato permitem a manutenção da integridade mineral do dente (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). Os componentes orgânicos incluem proteínas e glicoproteínas que podem influenciar em alguns aspectos da

saúde oral (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). Dentre as proteínas salivares, a estaterina mantém a supersaturação dos sais de Ca e fosfato. Assim, estes componentes proteicos contribuem grandemente para a manutenção de uma dentição intacta através da sua ligação e inibição da precipitação espontânea de fosfato de cálcio e do crescimento do cristal, enquanto, ao mesmo tempo, proporcionam possibilidades para heterogeneidades na colonização microbiana por meio de seus padrões específicos de ligação nas bactérias. No estudo *in situ* de Siqueira et al. (2010) foi encontrada histatina intacta na película adquirida, sendo atribuída a ela propriedades antidesmineralizantes quando fosforiladas. Parece que a ligação da histatina intacta com a superfície do esmalte ocorre antes da degradação proteolítica, e que a ligação ao mineral exerce um efeito protetor adicional contra a degradação proteolítica enzimática.

O principal componente orgânico da saliva submandibular e sublingual é a mucina, uma glicoproteína. Ela possui um alto grau de glicosilação e potencial de hidratação que previnem a dessecação, e suas propriedades viscoelásticas proporcionam lubrificação. A mucina pode se ligar a toxinas, bactérias aglutinadas, interagir com células hospedeiras e é um componente importante da película adquirida e da placa, contribuindo grandemente para o efeito protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012).

Na saliva encontramos também as metaloproteinases da matriz (MMPs) que em estudos recentes aparece implicada no processo de erosão (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; KATO et al., 2010; KATO et al., 2009; MAGALHAES et al., 2009b). As MMPs são as principais enzimas responsáveis pela degradação de quase todas as proteínas da matriz extracelular. Alguns estudos sugerem que a maioria delas vem do fluido crevicular gengival (INGMAN et al., 1994; SORSA et al., 1995; SREEBNY, 2000; UITTO; SUOMALAINEN; SORSA, 1990). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são secretadas pela glândula parótida, e também são encontradas na saliva total (INGMAN et al., 1994; MAKELA et al., 1994) e dentina (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2007; SULKALA et al., 2001). Quimicamente a matriz orgânica da dentina pode ser degradada por MMPs, que são uma família de enzimas proteolíticas zinco dependentes que degradam as proteínas da matriz extracelular, incluindo diferentes tipos de colágeno, nas formas nativa e desnaturada (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). A ativação de MMPs parece desempenhar um papel na progressão da

erosão dentária, uma vez que têm um papel crucial na decomposição do colágeno. Na dentina humana foram identificadas as MMPs-2, -3, -8 e -9 (KATO et al., 2011; MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2007; MAZZONI et al., 2011; SULKALA et al., 2007). As MMPs são secretadas como precursores inativos (pró-forma), requerendo a ativação para degradar componentes da matriz extracelular. O mecanismo pelo qual as MMPs são ativadas por baixo pH é relevante para a compreensão da erosão da dentina. Em pH baixo (4,5) ocorre a ativação das MMPs salivares humanas (-2, -8 e -9). No entanto, embora ativadas, não podem degradar a matriz orgânica da dentina em pH ácido, o que pode ocorrer seguindo a neutralização do pH pela saliva. A desmineralização da dentina é causada pelo baixo pH do agente erosivo, expondo as fibrilas colágenas. Concomitantemente, as MMPs salivares ou aquelas ligadas à dentina são ativadas. Quando o pH retorna aos níveis neutros, as MMPs ativas degradam a matriz orgânica desmineralizada, permitindo o progresso de perda da dentina (BUZALAF; KATO; HANNAS, 2012).

É importante ressaltar que os fatores preventivos e reparadores da saliva podem não ser suficientes para conter grandes desafios erosivos. Os fatores químicos como o pH, Ca e fosfato e em menor grau o F contido nas bebidas e nos alimentos são importantes fatores envolvidos no processo erosivo. Em relação às bebidas, o potencial erosivo não depende somente do valor do seu pH, mas do seu conteúdo mineral, da capacidade tampão e da sua propriedade quelante (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004). O grau de saturação de uma bebida ou alimento em relação aos minerais do dente é determinado pelo valor do pH, e pelas concentrações de íons relevantes para a apatita, como Ca, fosfato e F (LUSSI; JAEGGI, 2006) (LUSSI; JAEGGI, 2006b). Assim, quando a bebida for supersaturada em relação ao substrato dentário, seu potencial erosivo tende a ser baixo (LUSSI; JAEGGI, 2006b). A interação da saliva com as propriedades quelantes de um ácido pode aumentar o processo erosivo *in vivo*, bem como amolecer e dissolver o mineral do dente. As bebidas com propriedades quelantes em relação ao Ca aumentam o processo erosivo, pois se ligam aos íons Ca, removendo-os do dente e da saliva (LUSSI; JAEGGI, 2006b).

2.2 Medidas preventivas para erosão e abrasão dentária

Uma vez que o processo de perda de estrutura dentária por desafios erosivos e abrasivos é irreversível, medidas preventivas são de suma importância para o controle do desgaste de dentário. Essas medidas devem envolver um diagnóstico precoce e uma atenção aos fatores químicos, biológicos e comportamentais envolvidos na etiologia e patogênese da erosão (LUSSI, 2006; MAGALHAES et al., 2009c).

2.2.1. Fatores comportamentais

As estratégias preventivas envolvendo os fatores comportamentais englobam medidas para reduzir a exposição aos ácidos e reduzir o impacto mecânico. As medidas preventivas devem ser tomadas para reduzir o desafio erosivo e aumentar os fatores de proteção, restabelecendo o equilíbrio ao meio bucal. A redução da exposição aos ácidos é um dos fatores mais importantes para a prevenção da erosão dentária. Outras variáveis importantes são a frequência e a duração do contato do ácido com o dente.

Grando et al. (1996) estudaram, *in vitro*, a erosão do esmalte causada por refrigerantes (tipo cola e guaraná) e suco de limão em dentes decíduos humanos. A análise morfológica do esmalte afetado foi feita utilizando estereomicroscopia e MEV. O efeito nocivo de todos os produtos testados no esmalte decíduo foi claramente demonstrado. A estereomicroscopia mostrou perda de brilho e uma alteração na cor normal de esmalte, com perda irregular do tecido dental em graus variáveis. Tal perda tornou-se mais grave quando o tempo de incubação aumentava. Diferentes graus de solubilização dos prismas de esmalte foram demonstrados por MEV, afetando inicialmente as bainhas e as cabeças dos prismas e, mais tarde, suas caudas. As áreas de erosão aumentaram em proporção com o tempo de incubação. Todos os produtos mostraram um grande potencial erosivo no esmalte dentário em dentes decíduos humanos.

Eisenburger e Addy (2001) avaliaram, *in vitro*, o efeito de vários valores de pH do ácido cítrico e o tempo de erosão sobre a profundidade da desmineralização da subsuperfície do esmalte humano. Seis grupos (n=10) foram erodidos com 0,3% de ácido cítrico, durante 2 h, num pH 2,54, durante 2 ou 4 h num pH 3,2 e por 2, 4 e 8

h num pH 4,5. A profundidade da erosão foi medida por perfilometria. A camada desmineralizada foi removida por ultrasonicação e a perfilometria foi feita em 5, 30, 120, 240 e 480 s de tempo de ultrassom. A profundidade da erosão dependia claramente do valor de pH do ácido e do tempo do contato. Concluíram que a profundidade da desmineralização da subsuperfície e a morfologia da superfície não dependem da profundidade da erosão e que profundidades similares de desmineralização na subsuperfície podem ser produzidas por combinações adequadas de pH e tempo de contato.

Wiegand et al. (2007) realizaram um estudo para avaliar os efeitos erosivos de ácidos fluindo com diferentes velocidades e duração sobre a dentina previamente tratada com água destilada ou saliva humana. Os pesquisadores submeteram espécimes de dentina bovina ao ácido clorídrico ou cítrico (pH 2,3), durante 10 minutos, a uma boca artificial com taxa de fluxo salivar de 3, 2, 25, 1,5, 0,75 ou 0,15 mL/min ou em 30 mL do ácido respectivo sem movimentação. Metade dos espécimes de cada grupo foi tratada com água destilada ou saliva humana por 120 min, antes da desmineralização. Após 2, 5 e 10 min de desmineralização, a perfilometria foi realizada perpendicularmente à direção do fluxo de ácido em três locais com intervalos de 500 µm. O primeiro perfil foi realizado a uma distância de 1,5 mm a partir começo do fluxo do ácido sobre a amostra. O desgaste da dentina aumentou com o aumento da taxa de fluxo do ácido e do tempo de desmineralização e foi mais elevada para a desmineralização com ácido cítrico em comparação com ácido clorídrico. Para as taxas de fluxo indicadas de 0,15 a 3 ml/min, a perda de dentina foi maior para o local mais próximo do começo do fluxo decrescendo para os outros dois locais. Para todos os grupos, não houve diferença significativa da perda de dentina entre os espécimes pré-tratados com água destilada água ou saliva humana. Concluíram que tanto a duração de desmineralização como a taxa de fluxo de ácido influenciou no desgaste da dentina.

Além da redução à exposição, a adesividade e deslocamento dos líquidos podem influenciar na erosão, o aumento da aderência de uma substância ácida está associado a um maior tempo de contato com o dente (LUSI; JAEGGI, 2006b). A capacidade das bebidas de aderir ao esmalte é baseada na sua propriedade termodinâmica (IRELAND; MCGUINNESS; SHERRIFF, 1995). Os refrigerantes à base de cola com sacarose apresentam uma maior aderência à superfície dental do que a versão dietética da mesma bebida e do que o suco de laranja.

Segundo Magalhães et al. (2009c) para diminuir o risco da dieta induzir lesões erosivas, os pacientes devem ser aconselhados a não fazerem lanches com alimentos ácidos entre as principais refeições para que dê tempo de a saliva remineralizar as superfícies dos dentes erodidos. É sugerida ainda a mudança de alguns hábitos de consumo de líquidos, como não manter ou movimentar o líquido na boca antes de degluti-lo, e, quando for utilizado canudo, o mesmo deve ser colocado com a extremidade voltada para a região posterior da cavidade bucal, de modo a reduzir o contato do líquido com os dentes. É aconselhável ainda a redução ingestão de bebidas e alimentos ácidos, uma rápida deglutição das bebidas, que devem estar preferencialmente resfriadas. Deve-se ainda dar preferência àquelas bebidas com elevado teor de Ca, fosfato, F e xilitol. É importante que se avalie a etiologia da exposição ao ácido e que seja realizada terapia de distúrbios orgânicos ou psicossomáticos. Além da redução das dietas ácidas, os pacientes devem evitar os fatores relacionados ao estilo de vida não saudáveis como consumo de drogas, álcool e dieta lactovegetariana. Porém, como é difícil controlar o consumo de bebidas ácidas ou hábitos especiais de beber, outras estratégias têm sido desenvolvidas para a prevenção da erosão dentária.

A exposição ao ácido do meio ambiente, no caso de trabalhadores em fábricas de galvanização de baterias também é preocupante. Numa revisão sobre a erosão dentária ocupacional encontraram-se cinquenta e nove estudos, sendo que apenas quarenta e dois foram utilizados. Dezesete trabalhos demonstraram evidência de que a bateria, galvanização e associação dos trabalhadores expostos ao ácido sulfúrico ou clorídrico apresentavam maior risco de erosão dentária. Já para outros trabalhadores industriais, provadores de vinho e nadadores competitivos, existiam poucos estudos clínicos, não sendo possível tirar conclusões definitivas. Concluiu-se que a exposição aos ácidos ocupacionais pode aumentar o risco de erosão dentária. Nesse estudo foi observado que o uso de equipamentos de proteção pessoais (máscaras) e adesão aos valores limites recomendados pelas legislações de saúde ocupacional são importantes estratégias preventivas para redução da erosão ocupacional (WIEGAND; ATTIN, 2007).

A exposição aos ácidos intrínsecos em pacientes que apresentam refluxo gastroesofágico, alcoolismo crônico e distúrbios psicossomáticos (anorexia ou bulimia) deve ser controlada. Dessa forma, deve-se aumentar o fluxo salivar mastigando chicletes livres de açúcares, para pacientes com xerostomia. Se isto não

for suficiente, pode-se indicar um substituto para a saliva. Após o contato com o ácido deve-se lavar a cavidade bucal com água, leite ou soluções com baixa concentração de F, ou ainda pode-se consumir alimentos neutralizantes e também fazer a utilização de dentífricos, soluções ou géis fluoretados, com o intuito de reduzir a desmineralização e aumentar a remineralização (MAGALHÃES et al., 2009c).

O estudo realizado por Rytömaa et al. (1998) avaliou a condição dentária em pacientes com bulimia. Para tal, foram examinados clinicamente 35 bulímicos, diagnosticados nos ambulatórios de Psiquiatria e Psiquiatria de Adolescente do Hospital Central da Universidade de Helsínquia, e 105 controles, pareados por idade, gênero e nível de escolaridade. Os fatores associados à erosão dentária e cárie foram avaliados em uma entrevista. Nos pacientes bulímicos, a erosão dentária e a cárie dentária foram significativamente mais comuns do que nos pacientes controle. Os pacientes bulímicos apresentavam uma baixa taxa de fluxo salivar. A sensação de boca seca foi mais comum entre os bulímicos do que nos controles, e os bulímicos tinham um aumento de sensibilidade dentária ao frio e ao toque. Concluiu-se que mais medidas preventivas devem ser instauradas para proteger os dentes da erosão dentária entre bulímicos, porque a perda de tecido dentário permanece mesmo após o desaparecimento do transtorno alimentar.

Moazzez, Bartlett e Anggiansah (2005) avaliaram o efeito de se mascar um chiclete sem açúcar sobre o refluxo gastro-esofágico. Para essa avaliação foi dada uma refeição refluxogênica por duas vezes para 31 voluntários que apresentavam os sintomas de refluxo, os quais meia hora após as refeições mascaram chiclete. O pH esofágico foi medido, e os dados de pH foram analisados e comparados durante os períodos após as refeições por 2 horas nas duas ocasiões. Os valores de mediana para a % de tempo de pH<4, durante o período após as refeições sem e com goma de mascar foram 5,7 (1,7-13,5) e 3,6 (0,3 – 7,3), respectivamente (p=0,001). Os pesquisadores concluíram que mascar chicletes sem açúcar meia hora após uma refeição pode reduzir a permanência do pH baixo pelo tamponamento da saliva.

A redução do impacto mecânico é outra medida preventiva que pode ser tomada para a prevenção do desgaste dentário. Para a redução da abrasão, não escovar os dentes logo após o consumo de ácidos, aplicar uma pressão suave no uso de escovas dentais manuais ou elétricas e utilizar dentífricos fluoretados com

valores baixos da abrasão relativa ao esmalte e à dentina são medidas preventivas importantes (MAGALHÃES et al., 2009c).

No estudo de Attin et al. (2001) foi avaliado o efeito de diferentes períodos de remineralização para diminuir o desgaste do esmalte pela escovação. Participaram do estudo 8 voluntários que utilizaram um aparelho intraoral onde 6 amostras de esmalte humano foram embutidas nas faces vestibulares de cada um dos 8 aparelhos intraorais que foram utilizados por 21 dias. A desmineralização das amostras foi realizada duas vezes por dia com o aparelho imerso em 50 mL de Sprite Light® durante 90 s. Os tratamentos com Sprite Light® foram realizados, pelo menos, 1 h após as refeições. Então, as amostras foram escovadas com escova elétrica (Plak Control®, Braun Oral B, Kronberg i. Taunus, Alemanha), durante 15 s, em diferentes momentos (0, 10, 20, 30, 60 min) após o desafio erosivo, e uma não foi escovada (controle), utilizando 0,3 g do dentifrício (Elmex®, Wybert, LÖRACH, Alemanha) para cada amostra. Após 21 dias, o desgaste foi medido por um perfilômetro a laser. Os seguintes valores de desgaste (média $\pm$ desvio padrão, μm) foram obtidos: $6,78 \pm 2,71 \mu\text{m}$ (0 min); $5,47 \pm 3,39 \mu\text{m}$ (10min); $6,06 \pm 3,18 \mu\text{m}$ (20 min); $5,43 \pm 2,58 \mu\text{m}$ (30 min); $4,78 \pm 2,57 \mu\text{m}$ (60 min) e $0,66 \pm 1,11 \mu\text{m}$ (controle). A análise de variância revelou uma influência significativa do período de remineralização no desgaste abrasivo. Entretanto, mesmo após o período de 60 min o desgaste foi significativamente aumentado em comparação ao grupo controle. Os pesquisadores concluíram que a resistência à abrasão do esmalte amolecido aumentou com o período de remineralização e que para a escovação deve-se esperar pelo menos 60 min após um desafio erosivo.

Um estudo semelhante ao anterior, porém com amostras de dentina, foi realizado também por Attin et al. (2004). Os pesquisadores avaliaram o efeito de diferentes períodos de remineralização intraoral na susceptibilidade da dentina amolecida à abrasão pela escovação. Para realização do estudo, 11 voluntários utilizaram um aparelho intraoral com 6 amostras de dentina humana, durante 21 dias. As amostras foram desmineralizadas duas vezes ao dia, imergindo o aparelho em 50 mL de Sprite Light® durante 90 s. Os tratamentos com Sprite Light® foram realizados, pelo menos, 1 h após as refeições. A abrasão foi realizada com escova elétrica (Plak Control® Excel 3D, Braun Oral B, Kronberg i. Taunus, Alemanha), durante 15 s, em diferentes momentos (0, 10, 20, 30, 60 min – respectivamente grupos A, B, C, D e E) após o desafio erosivo, e uma amostra não foi escovada

(controle – grupo F), utilizando 0,3 g do dentifrício (Elmex®, Wybert, LÖRACH, Alemanha) para cada amostra. O desgaste foi medido por um perfilômetro. Os seguintes valores de desgaste (média $\pm$ desvio padrão, μm) foram obtidos das amostras: $23,6 \pm 16,7 \mu\text{m}$ (0 min); $37,9 \pm 29,7 \mu\text{m}$ (10min); $31,8 \pm 26,5 \mu\text{m}$ (20 min); $18,5 \pm 10,5 \mu\text{m}$ (30 min); $15,3 \pm 11,6 \mu\text{m}$ (60 min) e $12,6 \pm 6,7 \mu\text{m}$ (controle). Houve um aumento na perda de dentina estatisticamente significativo para os grupos A, B e C quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Entretanto, após os períodos de 30 e 60 min, a perda não foi significativamente maior do que o controle. Diante desses resultados concluíram que para a proteção da superfície da dentina, a escovação deve ocorrer pelo menos 30 min após o ataque ácido.

Vieira et al. (2006b) avaliaram o efeito da abrasão por escovação, simulação da fricção da língua e atrição no desgaste no esmalte bovino erodido *in vitro*. Quarenta e duas amostras de esmalte bovino foram divididas em sete grupos ($n=6$) e submetidos a 3 ciclos de um dos seguintes regimes: erosão e remineralização (er/remin); abrasão com escova de dentes e remineralização (abr/remin), erosão, abrasão por escovação e remineralização (er/abr/remin); atrição e remineralização (at/remin); erosão, atrição e remineralização (er/at/remin); atrição pela língua e remineralização (tg/remin); erosão, atrição pela língua e remineralização (er/tg/rem). A erosão ocorreu em uma solução de desmineralização (ácido cítrico 50 mM, pH 3) durante 10 min, sob agitação. A abrasão por escovação, fricção da língua e atrição foram simuladas usando um dispositivo de desgaste, por 1 min. A remineralização foi feita em saliva artificial, durante 2 h. Para a análise quantitativa da perda de estrutura do esmalte foi utilizada perfilometria óptica. A ANOVA indicou uma diferença significativa entre as quantidades de esmalte perdido devido aos diferentes regimes de desgaste ($p \leq 0,001$). A profundidade de desgaste encontrado para er/at/remin ($p \leq 0,001$) e er/tg/remin ($p \leq 0,001$) foi significativamente maior do que a encontrada para o grupo er/remin ($4,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$), o que não ocorreu para o grupo er/abr/remin ($p=0,075$). Diante dos resultados obtidos, os autores concluíram que os três fatores estudados removeram uma quantidade variada da camada amolecida formada pelas mudanças erosivas.

Um estudo foi realizado por Ganss et al. (2007) para investigar a eficácia dos períodos de espera entre a exposição ácida e a escovação dentária e também as aplicações de F na prevenção da abrasão da superfície do esmalte amolecido. O estudo *in situ*, cruzado, contou com 5 voluntários, que utilizaram um aparelho

intraoral contendo amostras de esmalte dentário humano, durante seis fases de 5 dias cada. A perda de estrutura foi medida por perfilometria. As amostras foram erodidas 2 x 20 min por dia, com ácido cítrico 0,05 M, escovadas 2 x 30 s por amostra e por dia com escova elétrica. Os grupos foram os seguintes: (1) somente erosão, (2) escovação com pasta de dentes sem F imediatamente após a erosão, (3) 2 horas após, ou (4) antes da erosão; a aplicação de F foi feita através de (5) escovação com pasta fluoretada ou (6) escovação com pasta ou gel fluoretado, e lavagem com um bochecho fluoretado. A perda média de esmalte foi: (1) $45,2 \pm 10,8$, (2) $79,3 \pm 7,8$, (3) $81,7 \pm 9,5$, (4) $69,7 \pm 13,8$ (5), $51,5 \pm 13,0$, e (6) $41,2 \pm 1,8$ μm . A escovação com a pasta sem F aumentou significativamente a perda do esmalte ($p \leq 0,001$) e a espera por 2 h não teve efeito protetor. A escovação antes da erosão diminuiu os valores da perda de esmalte apenas 12% (não significativo). A perda de esmalte foi significantemente menor nos grupos fluoretados do que naqueles escovados após a erosão com pastas sem F e comparável com os valores obtidos para a condição de erosão somente (não significativo). Os autores concluíram que os períodos de espera tiveram um efeito menor, enquanto que a aplicação de F pareceu promissora.

Outro estudo para avaliar se os pacientes devem realizar a escovação antes ou após um desafio ácido para minimizar o desgaste dentário também foi realizado por Wiegand, Egert e Attin (2008). Realizaram um estudo cruzado de 2 fases (A e B), com 14 dias cada, em que 10 voluntários utilizaram um aparelho intrabucal com três amostras de esmalte e três de dentina. Durante três vezes ao dia, com pelo menos 4 horas entre elas, os seguintes procedimentos foram realizados: fase A: 20 s de escovação em uma máquina de escovação automática, 5 min de exposição intrabucal das amostras, erosão extrabucal do esmalte e da dentina, durante 40 s ou fase B: erosão extrabucal por 40 s, 5 min de exposição intrabucal das amostras, 20 s de escovação em uma máquina de escovação automática. A perda de estrutura do esmalte e da dentina foi avaliada ao final de cada fase por perfilometria. Para todos os voluntários, a média de desgaste do esmalte e da dentina foi significativamente menor quando a escovação foi realizada antes de erosão (A: esmalte: $2,3 \pm 1,0$ μm , dentina: $4,1 \pm 1,6$ μm) do que quando foi aplicada a escovação após a erosão (B: esmalte: $6,4 \pm 3,0$ μm , dentina: $15,3 \pm 6,8$ μm). Esse estudo concluiu que pacientes que passarão por um ataque erosivo devem realizar a escovação previamente ao

desafio, ao invés de escovarem após o mesmo, para minimizar a perda de estrutura no esmalte e na dentina.

O impacto da abrasividade do dentífrico e da rigidez das cerdas da escova sobre a abrasão do esmalte erodido foi analisado por Wiegand et al. (2008). As amostras de esmalte foram erodidas com ácido clorídrico pH 2,6, durante 15 s, escovadas com 40 ciclos em uma máquina de escovação automática utilizando escovas manuais com diferente rigidez e com cerdas de diâmetros de 0,15, 0,20 ou 0,25 mm. Para a escovação, foram utilizados três tipos de *slurries*, sendo um controle (valor de abrasão relativa ao esmalte 2) outros 2 com valores de abrasão relativa ao esmalte de 6 ou 9. Após a erosão e abrasão, as amostras permaneciam em saliva artificial por 3 h. Os procedimentos foram realizados por 60 ciclos, e a cada 4 ciclos as amostras permaneciam na saliva durante 15 h. Ao final, a perda de esmalte foi medida por perfilometria. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA a um e dois critérios e testes Bonferroni/Dunn. Verificou-se que a perda de esmalte foi influenciada pela abrasividade do dentífrico, aumentando junto com o valor de abrasão relativa ao esmalte (valor 2: 0,0-0,2; valor 6: 2,1-3,3 e valor 9: 2,9-3,7 μm). A rigidez das cerdas da escova influenciou a abrasão, mas somente os grupos escovados com o dentífrico com valor de abrasão relativa 6 apresentaram diferença significativa entre as diferentes escovas. A maior perda de esmalte ocorreu com a utilização da escova com cerdas de diâmetro de 0,2 mm. O principal fator que influenciou a abrasão por escovação do esmalte erodido foi a abrasividade do *slurry* de dentífrico, sendo que a rigidez das cerdas da escova teve pouca influência.

Choi et al. (2012) examinaram *in vitro* os efeitos potenciais a curto prazo do tempo de escovação e do tempo de início da escovação após a desmineralização no desgaste da dentina de incisivos decíduos. Trinta e seis incisivos decíduos íntegros foram expostos inicialmente ao processo de desmineralização com coca-cola. O processo de abrasão foi realizada em 3 tempos de escovação (5,15 e 30 s) e os tempos de início da escovação após a erosão foram 0, 30, 60 e 120 min. A escovação da superfície de dentina amolecida levou a um aumento na fração tubular aberta e a alterações microestruturais na superfície dentinária. A abrasão realizada logo após a erosão resultou na maior perda irreversível de dentina, visto que a escovação 60 ou 120 min após o pré-tratamento resultou na menor perda de dentina. No entanto, o tempo de escovação não teve efeito sobre o desgaste da dentina. Com base nestes resultados experimentais, os autores sugerem que a

escovação deve ser realizada pelo menos 60 minutos após o consumo de coca-cola para conseguir a limpeza desejada dos dentes e evitar o início de lesões de superfície sobre a dentina.

2.2.2. Fatores biológicos

Em relação, aos fatores biológicos, as medidas preventivas estão relacionadas principalmente à qualidade e quantidade de saliva e película adquirida (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; DAWES, 2008; HANNIG; BALZ, 1999, 2001; HARA et al., 2006).

A saliva desempenha papel importante na formação da película adquirida, que é uma película com permeabilidade seletiva que impede o contato direto do ácido com o dente (HARA; LUSSI; ZERO, 2006; MEURMAN; FRANK, 1991; ZAHRADNIK; MORENO; BURKE, 1976), reduzindo a dissolução da hidroxiapatita. A composição, espessura e tempo de maturação da película influenciam na proteção da película ao dente, ou seja, quanto mais madura e espessa, maior será a proteção (AMAECHI et al., 1999; ZERO; LUSSI, 2005). Segundo Amaechi et al. (1999) a espessura da película varia entre os indivíduos e dentro das arcadas dentárias, o que poderia ajudar a explicar a sítio-especificidade encontrada na erosão dentária.

A qualidade da saliva está relacionada à concentração de seus componentes orgânicos e inorgânicos (CHEAIB; LUSSI, 2011; KARLINSEY et al., 2012). Já a quantidade de saliva pode ser diminuída por terapias de radiação na região de cabeça e pescoço, doenças das glândulas salivares (síndrome de Sjögren) e medicações, ou aumentadas por estimulação com chicletes (MAGALHAES et al., 2009c).

Foi realizado um estudo *in situ* para avaliar se a saliva estimulada pela goma de mascar poderia impedir ou reduzir o desgaste e a alteração percentual na microdureza (%PDS) do esmalte humano submetido à erosão seguida por escovação imediatamente ou após 1 h. Para tal, 9 voluntários usaram um aparelho intrabucal palatino contendo 12 espécimes de esmalte (6 bovino e 6 humanos), durante duas fases de 7 dias cada. Na primeira fase, os voluntários imergiram o dispositivo durante 5 minutos em 150 ml de coca-cola, 4 vezes por dia. Imediatamente após as imersões, nenhum tratamento foi realizado em 4 amostras, quatro outras amostras foram imediatamente escovadas (0 min) utilizando

dentífricio fluoretado, e o aparelho foi recolocado na boca. Após 60 minutos, os restantes quatro espécimes foram escovados. Na segunda fase, os procedimentos foram repetidos, mas depois das imersões, os voluntários estimularam o fluxo salivar mascando uma goma sem açúcar durante 30 min. A goma de mascar promoveu menor desgaste e %PDS. Uma diminuição da %PDS e um aumento no desgaste do esmalte foram observados nas seguintes condições: erosão, apenas 60 min e 0 min. O esmalte humano apresentou maior %PDS e menor desgaste em relação ao esmalte bovino. Os dados sugerem que a estimulação salivar após um ataque erosivo ou erosivo/abrasivo pode reduzir o desgaste dental e a %PDS (RIOS et al., 2006b). Estes blocos foram também avaliados por MEV (RIOS et al. 2008a). Nas superfícies submetidas à erosão ocorreu a dissolução do núcleo dos prismas de esmalte, enquanto que quando a erosão foi associada à abrasão, a superfície do esmalte encontrava-se mais homogênea, provavelmente devido à remoção da camada superficial alterada dos prismas. O padrão microscópico dos espécimes de esmalte foi similar para as outras variáveis (RIOS et al., 2008a).

Da Silva Marques et al. (2011) compararam as mudanças no pH da saliva e a eficácia da estimulação causada por dois diferentes estimulantes salivares, em pacientes com síndrome de Sjögren primária. Oitenta pacientes foram randomizados em dois grupos, sendo que alguns receberam um novo estimulante salivar contendo quantidade mais fraca de ácido málico, F e xilitol ou um tradicional à base de ácido cítrico. A coleta da saliva foi obtida por métodos estabelecidos em momentos diferentes. O pH da saliva foi determinado. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos, sendo que ambos os estimulantes salivares levaram a um aumento do fluxo salivar. A secreção salivar ocasionada pelo novo estimulante apresentou uma redução do risco de erosão de 52,78%, quando comparada com o tradicional. Assim, em pacientes com xerostomia devido à síndrome de Sjögren, os estimulantes gustativos para secreção de saliva à base de ácido málico somente com F e xilitol apresentaram capacidade de estimulação salivar similar quando comparados ao tradicional, além de uma redução significativa no número de ocasiões em que o pH da saliva caiu abaixo de 4,5, o que poderia estar relacionado a uma diminuição do risco de erosão dentária.

Em relação ao efeito protetor da película adquirida, Nekrashevych e Stösser (2003) relataram que a mesma protege a superfície do esmalte contra curtos períodos de erosão com ácidos orgânicos. O efeito protetor contra a erosão da

película adquirida formada em curtos períodos de tempo (3, 60 e 120 min) foi o objetivo do estudo realizado por Hanning et al., (2004). O estudo foi realizado com 6 voluntários que usaram um aparelho intrabucal com amostras de esmalte bovino fixadas na vestibular e palatina dos primeiros molares superiores e segundos pré-molares. As amostras foram imersas numa solução de ácido cítrico a 1,0%, sob agitação, por 60 s. Foi realizada a dureza de superfície Knoop inicial dos blocos de esmalte e logo após o desafio ácido. Analisou-se a quantidade perdida de Ca. O MEV foi utilizado para a análise micromorfológica das alterações erosivas da superfície do esmalte. Não houve diferenças significativas relacionadas com o tempo de formação da película e local intrabucal (ANOVA, $p < 0,05$). No entanto, uma proteção significativa da superfície de esmalte fornecida pela camada de película foi observada em todas as superfícies cobertas pela película quando comparado com as amostras de esmalte não recobertas (liberação de Ca: 25,6 mg/L por 10 mm²; perda de dureza 187,0 Δ KHN). Estes dados coincidem com as alterações morfológicas causadas por ácido cítrico nas amostras cobertas e não cobertas com a película. Os pesquisadores concluíram que a película salivar formada *in situ* dentro de um período de 3 min oferece proteção ao esmalte contra o ácido cítrico, sem no entanto inibir completamente sua ação erosiva.

Eisenburger et al. (2001) realizaram um estudo, *in vitro*, para determinar a influência do tempo de remineralização no reendurecimento da superfície do esmalte amolecido após a erosão com ácido cítrico. Para tal, 13 amostras de esmalte humano foram divididas em sete grupos. As amostras foram erodidas em ácido cítrico 0,3%, pH 3,2 durante 2 h e foi medida a perda de esmalte por perfilometria. Os grupos foram colocados individualmente em saliva artificial durante 1, 2, 4, 6, 9 ou 24 h. Um outro grupo foi colocado em solução salina isotônica durante 24 h. Após novas medidas de perfilometria, as amostras foram ultrasonicadas até 480 s e foram feitas medições por perfilometria em 5, 30, 120 240 e 480 s, para medir a profundidade de amolecimento superficial. O grupo controle apresentou uma média de camada de superfície amolecida de 2,9 μ m. Em todos os tempos de remineralização realizou-se MEV para verificação da deposição mineral. A exposição à saliva artificial por 1, 2 ou 4 h produziu um reendurecimento parcial do esmalte amolecido. As perdas adicionais de superfície produzidas por ultrasonicacção foram mais baixas e mais demoradas em relação ao grupo de controle. Espécimes remineralizados por 6, 9 e 24 h mostraram pouca evidência de

perda de superfície após ultrasonicação. Os dados sugeriram que um reendurecimento completo do esmalte amolecido *in vitro* é alcançado após um período de 6 h de remineralização.

Honório et al. (2010) avaliaram a influência da placa dentária na erosão do esmalte humano, *in situ*. Foram selecionados 13 voluntários que utilizaram um aparelho intrabucal palatino com quatro amostras de esmalte humano. As amostras foram selecionadas aleatoriamente e distribuídas em duas linhas verticais, correspondentes aos grupos: G1, erosão em amostras sem placa dentária, e G2, erosão em amostras cobertas por placa dentária (as amostras foram colocadas 1 mm abaixo do nível do aparelho e coberta com uma malha de plástico para permitir a acumulação de placa dentária). A erosão foi realizada durante 14 dias consecutivos, sendo provocada por 150 mL de coca-cola durante 5 min, três vezes ao dia. A perda de esmalte foi medida por perfilometria (profundidade do desgaste da superfície - μm) e dureza (porcentagem de perda de dureza superficial - % PDS). A %PDS e a profundidade do desgaste da superfície foram significativamente maiores para G1 ($87,82\% \pm 3,66$ e $4,70 \pm 1,65 \mu\text{m}$) do que para o G2 ($13,79\% \pm 4,22$ e $0,14 \pm 0,03 \mu\text{m}$), mostrando que a placa foi capaz de proteger o esmalte contra a erosão, reduzindo a profundidade do desgaste e a %PDS.

Nos últimos anos uma atenção maior tem se dado aos efeitos protetores da aplicação do laser na desmineralização do esmalte e da dentina (AZEVEDO et al., 2012; DE-MELO et al., 2011; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2012; MAGALHAES et al., 2008c; MAGALHAES et al., 2011a; MOSLEMI et al., 2009; RIOS et al., 2009; STEINER-OLIVEIRA et al., 2010; WEGEHAUPT et al., 2011; WIEGAND et al., 2010b). Com o aumento do conhecimento a respeito da interação do laser com os tecidos duros, vários tipos de laser como o ruby, dióxido de carbono (CO_2), neodímio (Nd:YAG), érbio e argônio começaram a ser testados (WILDER-SMITH et al., 1997; YAMADA et al., 2004). A utilização do laser provoca diversas alterações químicas na superfície do dente, entre elas a redução do teor de carbonato e a troca de hidroxiapatita por fluorapatita, quando aplicado juntamente com o F (NELSON et al., 1987). Além disso, ocorre um derretimento e uma solidificação na superfície dentária, criando uma superfície mais macia (NELSON et al., 1987). Assim, um crescimento de cristais pode acontecer nessa superfície derretida, reduzindo os espaços interprismáticos e, conseqüentemente, a difusão de ácidos durante um desafio ácido (CASTELLAN et

al., 2007). Todas essas mudanças podem levar a uma diminuição da susceptibilidade à desmineralização erosiva.

Outra medida preventiva contra a desmineralização na dentina é a utilização dos agentes inibidores de MMPs. Os polifenóis do chá verde, especialmente o galato de epigallocatequina (EGCG), têm distintas atividades inibitórias contra as MMPs (BUZALAF; KATO; HANNAS, 2012). Outro potencial inibidor de MMPs é a clorexidina, que mostrou inibir a atividade das MMPs 2, 8 e 9 (GENDRON et al., 1999), bem como produtos naturais como abacate, soja e ácido oleico (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Os inibidores de MMPs podem ser utilizados nas formas de soluções, géis ou dentifrícios.

Diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito dos inibidores de MMPs (HANNAS et al., 2010; KATO et al., 2010; KATO; HANNAS; BUZALAF, 2011; KATO et al., 2011).

Magalhães et al. (2009b) realizaram um estudo *in situ*, cruzado, duplo-cego para analisar o impacto de possíveis inibidores de MMPs (clorexidina e extrato de chá verde) sobre o desgaste da dentina induzida por erosão ou erosão associada à abrasão. Para tal, 12 voluntários participaram utilizando um aparelho intrabucal palatino contendo amostras de dentina bovina, durante 4 fases de 5 dias cada. As amostras foram submetidas à erosão (er) provocada com coca-cola, 4 vezes ao dia, durante 5 min, ou erosão associada a abrasão (er+abr) 2 vezes ao dia, com dentifrício sem F e escova dentária elétrica, durante 15 s por amostra. Então, o aparelho foi recolocado na cavidade oral e realizou-se um bochecho durante 60 s com: solução de 250 ppm F (SnF₂/AmF, pH 4,5, Meridol-Gaba, Suíça), diglutanato de clorexidina 0,12% (clorexidina 0,06%, pH 6,0, Periogard-Colgate, Brasil), solução de extrato de chá verde 0,61% (OM24, extrato da folha da *Camellia sinensis* 100%, concentração de catequina: 30% ± 3, pH 7,0, Omnimedica, Suíça) e água deionizada (pH 6,0, controle). A perda de estrutura da dentina foi avaliada por perfilometria (µm). Os dados foram analisados por ANOVA dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre as condições (er x er+abr, p<0,001) e entre as soluções (p<0,001). Todas as soluções reduziram significativamente a perda de dentina quando comparadas ao controle para ambas as condições. Não houve diferenças significantes entre as soluções de extrato de chá verde, a clorexidina e o F. Diante desses resultados, os autores

concluíram que os inibidores de MMPs testados parecem ser uma medida preventiva promissora para reduzir a erosão-abrasão na dentina.

Um estudo *in situ* realizado Kato et al. (2009) avaliou o efeito protetor do chá verde sobre a erosão (er) e erosão associada à abrasão (abr) na dentina. Foram selecionados 10 voluntários para utilizarem um aparelho intrabucal palatino contendo 6 amostras de dentina bovina submetidas a er ou er + abr por escovação imediatamente (er + I-abr) ou 30 min após a erosão (er + 30 min abr), durante 2 fases de 5 dias cada, com intervalo entre elas de 7 dias. Para a er, o aparelho foi mergulhado em 150 mL de coca-cola, durante 5 min. Após 5 min de desafio erosivo, os voluntários tomaram um gole da bebida (chá verde ou água), recolocaram o aparelho na cavidade bucal e realizaram um bochecho com 10 mL da bebida, durante 1 min. Então, o aparelho foi novamente removido da boca e foi feita a abr (er+ I-abr) com escova elétrica e dentifrício sem F, durante 30 s. O aparelho foi recolocado na boca e realizado o bochecho com 10 mL de água durante 5 s. Após 30 min da erosão, o tratamento abrasivo foi repetido para a 3^a fileira das amostras (er + 30 min abr). O desgaste na dentina foi medido por perfilometria. O chá verde reduziu significativamente o desgaste na dentina para todas as condições em relação ao controle. A er + I-abr levou a um desgaste muito mais elevado do que er, mas não foi significativamente diferente do er + 30 min abr. A er + 30 min abr provocou um desgaste significativamente maior do que a er, apenas para o tratamento com placebo. Diante dos resultados obtidos, os autores concluíram que o chá verde reduz o desgaste da dentina em condições erosivas e/ou abrasivas.

Em outro estudo de Kato et al. (2010) foi mostrado o efeito preventivo de géis contendo inibidores de MMPs (EGCG e clorexidina) sobre a erosão na dentina. Os dez voluntários usaram um aparelho intrabucal palatino contendo blocos de dentina bovina (n=10/grupo), tratados durante 1 min com 10 µm (EGCG 10) ou 400 µm (EGCG 400) de EGCG, clorexidina a 0,012%, F a 1,23% (NaF), ou nenhum veículo (placebo). A erosão foi realizada com coca-cola (5 min), 4 vezes ao dia, durante 5 dias. O desgaste da dentina foi avaliado por perfilometria (média ± dP, µm), e foi significativamente reduzido pelos géis contendo inibidores de MMPs (0,05 ± 0,02 µm, 0,04 ± 0,02 µm, e 0,05 ± 0,02 µm para EGCG10, EGCG400, e clorexidina, respectivamente) quando comparados com o NaF (0,79 ± 0,35 µm) e ao placebo (1,77 ± 0,35 µm).

Kim et al. (2011) verificaram a influência da clorexidina (CHX) na remineralização da dentina desmineralizada. Quarenta blocos de dentina foram desmineralizadas em solução de ácido fórmico 0,2 M. A quantidade de CHX na dentina foi medida num espectrofotômetro após o bloco ser embebido em soluções de 0,02%, 0,2%, 2% de CHX, durante 1 min. A mudança no módulo de elasticidade dos blocos de dentina armazenados em fluidos corporais simulados foi medida a 0, 2, 4, e 6 semanas após o armazenamento. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para se observar os aspectos micromorfológicos das amostras após 6 semanas de armazenamento. As concentrações maiores de CHX levaram a uma maior quantidade de CHX ligada aos blocos de dentina ($p < 0,05$). O grupo tratado com a CHX 2% apresentou menor diminuição no módulo de elasticidade em 2 semanas e um maior aumento em 4 e 6 semanas. Os blocos de dentina expostos a CHX 0,2% e 2% tiveram uma maior deposição de grânulos minerais ao longo das fibrilas colágenas em comparação ao grupo CHX 0,02%. A partir dos resultados puderam concluir que a aplicação de clorexidina a 0,2% e 2% pareceu ser mais eficaz em promover a remineralização da dentina desmineralizada.

2.2.3. Fatores químicos

Em relação às medidas preventivas para os fatores químicos, deve-se optar por bebidas com baixa concentração de ácido, diminuir o tempo de exposição ao ácido, controlar o pH e a capacidade tampão, e a concentração de fosfato, Ca e F. Os sucos de frutas, refrigerantes e chás gelados são altamente erosivos, com pH menor que 4,5, além de serem insaturados em relação à apatita e apresentarem uma elevada capacidade tampão (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

O efeito da temperatura, natureza, concentração e tempo de exposição aos ácidos alimentares sobre a erosão da dentina e esmalte foi avaliado *in vitro*. No estudo os pesquisadores utilizaram amostras de esmalte e dentina humana, de terceiros molares não erupcionados. Cinco espécimes por grupo foram colocados em ácido cítrico ao longo de um intervalo de temperatura entre 5 e 60° C durante 10 min e na sequência foram colocados em ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico ou ácido fosfórico (0,05, 0,1, 0,5 e 1% (p/v)) durante 10 min, e colocados nos mesmos três a 0,3% (p/v) ou ácido fosfórico a 0,1% (p/v), durante 3 x 10 min. A perda de tecido foi determinada por perfilometria. Os resultados mostraram que o aumento de

temperatura, concentração e tempo de exposição aumentou a erosão da dentina e esmalte. O estudo mostrou que, em condições altamente controladas, a erosão do esmalte e da dentina por ácidos alimentares pode ser fortemente influenciada, *in vitro*, pela temperatura, concentração, tipo de ácido e tempo de exposição. Esta informação deveria ser empregada de modo a se reduzir a erosividade de refrigerantes ácidos (WEST; HUGHES; ADDY, 2000).

Outra estratégia é a incorporação de minerais (Ca, fosfato e F) em algumas bebidas, uma vez que é difícil controlar a ingestão destas pelo paciente.

Hughes et al. (2002) compararam a erosão produzida por um suco de groselha modificado com adição de Ca (1040 mg Ca/L), suco de groselha tradicional (950 mg Ca/L), suco de laranja (controle positivo - 120 mg Ca/L) e água (controle negativo - 9,9 mg Ca/L). Para tal, realizaram um o estudo *in situ*, com 4 fases, com 12 voluntários que utilizaram um aparelho intrabucal palatino contendo 4 amostras de esmalte humano, sendo 3 polidas (2 amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura no 2º e 5º dia e não retornaram para o aparelho, 1 amostra foi avaliada por perfilometria) e 1 amostra não polida (microscopia). Os voluntários utilizaram o aparelho durante 10 dias, das 9 h às 17 h, sendo que nesse período, ingeriam 250 mL das bebidas, durante 4 vezes ao dia. Após o 5º, no lugar das amostras removidas para a microscopia colocou-se uma nova, a qual foi avaliada por perfilometria. Diferenças significativas na erosão causada pelas bebidas foi observada no 5º e 10º dia. Os dois sucos de groselha mostraram menor perda erosiva quando comparados ao controle positivo. O suco modificado mostrou maior perda erosiva em relação ao original, apenas no 10º dia. Os dois sucos de groselha não diferiram da água durante todo o período experimental. O efeito erosivo do suco de laranja aumentou 3 vezes, do 5º ao 10º dia. Diante dos resultados, os pesquisadores sugeriram que o suco de groselha não causou erosão significativa.

West et al. (2004) compararam o efeito erosivo de um novo suco de groselha e cálcio com goma xantana no esmalte *in situ*, com um produto de baixa erosividade, uma bebida de fruta convencional e água. O estudo compreendeu 4 fases, de 15 dias cada. Os voluntários utilizaram um aparelho intrabucal palatino com amostras de esmalte. Os tratamentos foram: (A) novo suco de groselha e Ca com goma (produto teste), (B) suco de groselha e Ca original, (C) suco de groselha convencional (controle positivo) e (D) água (controle negativo). Os voluntários bebiam 250 mL das bebidas, durante 4 vezes ao dia, entre 9 h e 17 h. Medidas

perfilométricas foram realizadas no início, no 5º, 10º e 15º dia. O produto teste causou significativamente menos perda erosiva do que o C, sem diferenças estatisticamente significativas de B em todos os tempos medidos. O produto manteve as propriedades de baixa erosividade semelhantes ao B, com benefícios adicionais de flexibilidade do gosto e estabilidade da bebida.

Attin et al. (2005) avaliaram, *in vitro*, o potencial erosivo de refrigerantes modificados no esmalte. Foram obtidas 144 amostras de esmalte dentário bovino. As superfícies vestibulares das amostras foram planificadas, polidas e cobertas com fita adesiva, deixando uma área exposta. As amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os tratamentos: (A) coca-cola®, (B) Sprite, (C) Sprite light, (D) suco de laranja. Foi adicionado às bebidas 1,0 mmol/L de Ca, ou uma combinação (comb) de 0,5 mmol/L de Ca mais 0,5 mmol/L de fosfato mais 0,031 mmol/L de F. As amostras de cada grupo foram subdivididas em três subgrupos (original, Ca e comb) para o tratamento com as bebidas originais ou modificadas. Ciclos de des e remineralização foram realizados em uma boca artificial. A perda de estrutura da superfície das amostras foi determinada utilizando perfilometria. A perda de esmalte foi observada em todos os grupos. A perda de esmalte registrada para as amostras lavadas com Sprite original e suco de laranja original foi significativamente maior em comparação com todas as outras soluções ($p=0,001$). A menor perda esmalte foi registrada para o grupo da Coca-Cola original ($p=0,001$). Com exceção da Coca-Cola, a desmineralização com as bebidas modificadas levou a perdas significativamente menores em comparação com as respectivas soluções originais. Concluíram que a modificação dos refrigerantes testados com baixas concentrações de Ca ou com uma combinação de Ca, fosfato e F pode exercer um significativo efeito protetor em relação à erosão dentária.

O efeito da suplementação com xilitol de bebidas, dentifrícios, vernizes também foi testado em alguns estudos (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; CHUNMUANG et al., 2007; ROCHEL et al., 2011; SOUZA et al., 2010). O xilitol age formando complexos com o Ca, penetrando no esmalte desmineralizado e interferindo com o transporte de íons da lesão para a solução desmineralizante, diminuindo o coeficiente de difusão dos íons cálcio e fosfato da lesão para a solução (MAGALHAES et al., 2009c).

Um estudo avaliou, *in vitro*, o efeito da suplementação de refrigerantes com extrato de chá verde em relação ao seu potencial erosivo sobre a dentina. Foram

utilizados diversos refrigerantes (coca-cola, guaraná Kuat, sprite e coca-cola light). Quarenta amostras de dentina, por grupo, foram divididas em 2 subgrupos: extrato de chá verde 1,2% (OM 24, extrato da folha da *Camellia Sinensis* 100%, concentração de catequina: $30\% \pm 3$, pH 7,0, Omnimedica, Suíça) ou não (controle). As amostras foram submetidas, durante 1 dia, a 4 ciclos de desmineralização e remineralização. As amostras foram imersas em 30 mL/bloco das bebidas originais ou suplementadas, durante 10 min e em 30 mL/bloco de saliva artificial, durante 60 minutos, sob agitação, para cada ciclo. A perda de estrutura da dentina foi medida por perfilometria (μm). Os dados obtidos foram analisados por ANOVA a dois critérios e teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Uma diferença significativa foi verificada entre as bebidas testadas, a sprite levou à maior perda de superfície e coca-cola light a menor, para ambas as com suplementação ou não. A redução da perda de superfície só foi significativa para a coca-cola. Assim, a suplementação de refrigerantes com extrato de chá verde poderia ser uma alternativa viável para reduzir o seu potencial erosivo sobre a dentina (BARBOSA; KATO; BUZALAF, 2011).

Muitos estudos analisaram a ação de tratamentos com F na progressão da erosão do esmalte e da dentina. Diversas formas de fornecimento de F têm sido descritas, como aplicações tópicas de géis, vernizes e soluções. Para melhorar a remineralização de superfícies erodidas e para prevenir a progressão adicional do desgaste dentário, aplicações de alta concentração de F, na forma de enxaguatórios, géis ou vernizes são recomendadas (LAGERWEIJ et al., 2006).

Em contraste com a aplicação de agentes altamente fluoretados, foi demonstrado que o dentífrico com 1000 ppm F teve um efeito benéfico limitado em comparação com dentífricos não fluoretados sobre a abrasão da dentina e esmalte erodido (MAGALHAES et al., 2007b; PONDURI; MACDONALD; ADDY, 2005). Em adição, a erosão dentária parece estar aumentando, apesar do fato da maioria dos cremes dentais serem fluoretados (LUSSI et al., 2008). Apesar da escovação com dentífrico fluoretado parecer reduzir o impacto mecânico causado pela erosão associado à abrasão (MAGALHÃES et al., 2007b), a utilização de dentífricos com alta concentração de F (5000 ppm F) tem efeito similar ao dentífrico convencional (1100 ppm F), tanto para o esmalte (MAGALHÃES et al., 2008d) quanto para a dentina (RIOS et al., 2008b).

Moretto et al. (2010) avaliaram, *in vitro*, o efeito de dentifrícios com diferentes concentrações de F e de um dentifrício de baixa concentração suplementado com trimetafosfato (TMP) sobre a erosão e a abrasão no esmalte. Para tal, 120 blocos de esmalte bovino foram alocados aos seguintes grupos: placebo, 1.100 µg F/g, 500 µg F/g, mais 3% de TMP e 5.000 µg F/g, os quais foram subdivididos em condições de erosão (er) e de erosão mais abrasão (er + abr). Durante 7 dias, os blocos foram submetidos a desafios erosivos com imersão em um refrigerante (10 mL por bloco, Sprite®, Companhia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil) 4 vezes por dia, durante 5 minutos cada vez, seguido por um período de remineralização (imersão em saliva artificial entre os desafios erosivos de 2 h). Depois de cada desafio erosivo, os blocos foram expostos a suspensões dos dentifrícios (10 mL/amostra durante 15 s). Sessenta dos blocos foram, adicionalmente, escovados com uma escova de dente elétrica (15 s). As alterações do esmalte foram quantificadas utilizando o teste de dureza Knoop e perfilometria (µm). Os dados foram analisados usando ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Na condição *in vitro*, os dentifrícios com 5.000 µg F/g e 500 µg F/g, mais 3% de TMP tiveram um maior efeito protetor quando comparados com o dentifrício com 1100 µg F/g, para ambas as condições, embora os dentifrícios sozinhos não sejam capazes de inibir completamente o desgaste.

O mecanismo de ação dos agentes fluoretados de alta concentração à base de fluoreto de amina ou de sódio parece ser devido à precipitação de um material semelhante ao fluoreto de cálcio (CaF_2) (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; MAGALHAES et al., 2011b). Essa camada formada parece agir como uma barreira física, dificultando o contato do ácido com o esmalte ou pode ainda agir como um reservatório mineral. O Ca e o F liberados aumentam o nível de saturação com respeito ao tecido duro dentário no líquido adjacente à superfície, promovendo a remineralização (MAGALHAES et al., 2011b). A formação da camada de material semelhante ao CaF_2 e seu efeito protetor na desmineralização depende do pH, concentração e tipo de sal de F (SAXEGAARD; ROLLA, 1988). Porém, o papel da aplicação de F na prevenção da erosão ainda é discutido (WIEGAND; ATTIN, 2003), pois o depósito de material semelhante ao CaF_2 formado com aplicações tópicas pode ser facilmente dissolvido por bebidas mais ácidas (GANSS; SCHLUETER; KLIMEK, 2007).

Vários estudos vêm sendo feitos para testar tratamentos com F na progressão da erosão do esmalte e da dentina, com o intuito de se encontrar um agente capaz de prevenir a erosão e que não dependa do controle dos fatores biológicos e comportamentais.

Ganss *et al.* (2001) avaliaram o efeito do F na progressão da desmineralização erosiva em esmalte e dentina humanos, utilizando um modelo de des e remineralização *in vitro*. O conteúdo mineral expresso em micrometros foi determinado diariamente por microrradiografia longitudinal (RML) e apresentado como perda mineral acumulativa ao longo de 5 dias. Para desmineralização erosiva, todas as amostras foram imersas em ácido cítrico 0,05 M (pH 2,3) por 6 x 10 min/dia e armazenados numa solução de remineralização. Medidas de fluoretação foram realizadas da seguinte forma: grupo 1: controle, sem fluoretação, grupo 2: dentífrico fluoretado 3 x 5 min/dia (NaF, 0,15% F), grupo 3: dentífrico fluoretado como o grupo 2 e, adicionalmente, aplicação de solução de bochecho com F (Olaflur/SnF₂, 0,025% F) 3x5 min/dia e nos dias 1 e 3 gel fluoretado (Olaflur/NaF; 1,25% F) por 1x5 min. Após o primeiro dia experimental, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. No entanto, depois de 5 dias, os valores de perda mineral do esmalte foram 147,5 ± 18,7 µm no grupo controle, 128,1 ± 15,0 µm no grupo 2 (p<0,05) e 116,1 ± 12,4 µm no grupo 3 (p≤0,001). Em dentina, os respectivos valores foram 136,7 ± 16,4 µm, 111,8 ± 26,9 µm (p≤0,001) e 60,3 ± 17,8 µm (p≤0,001). A fluoretação intensiva reduziu significativamente a progressão da erosão no esmalte, porém teve um efeito mais pronunciado sobre a dentina. Os resultados sugerem que os indivíduos com lesões erosivas devem usar uma medida de fluoretação intensiva.

Outro estudo realizado por Ganss et al. (2004) avaliou os efeitos do F sobre a perda erosiva em esmalte humano e dentina usando um modelo cíclico de desmineralização e remineralização *in situ*. O estudo foi cruzado com três tratamentos (5 dias cada), envolvendo voluntários saudáveis. As amostras de esmalte, (n=4) ou dentina (n=6) foram colocadas em aparelho intraoral palatino e foram desmineralizadas extraoralmente com 0,05 M de ácido cítrico (pH 2,3) durante 6 x 5 min por dia. A fluoretação foi realizada com o dentífrico (SnF₂/Olaflur; 0,14% F) durante 3 x 5 min por dia ou com dentífrico em combinação com uma solução para bochechar (SnF₂/Olaflur; 0,025% F) por 3 x 5 min associado à utilização de um gel (NaF/Olaflur, 1,25% F), nos dias 1 e 3, ao invés do dentífrico (fluoretação intensiva).

No grupo controle não foi realizada a fluoretação. A perda mineral (μm) foi determinada com o uso de microrradiografia longitudinal. Em esmalte a perda de mineral foi de $40,7 \pm 15,1 \mu\text{m}$ no grupo controle, $18,3 \pm 12,4 \mu\text{m}$ após a fluoretação com dentifrício e $5,0 \pm 12,2 \mu\text{m}$ após a fluoretação intensiva. Os valores para a dentina foram $49,0 \pm 15,4$, $35,0 \pm 15,5$ e $19,8 \pm 12,0 \mu\text{m}$. Todas as diferenças foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,001$). Os resultados indicam que a fluoretação intensiva foi eficaz na prevenção da perda mineral do esmalte e dentina, mesmo sob condições extremamente erosivas.

Lussi et al. (2004) avaliaram o efeito de uma enxaguatório de F de sódio/amina na prevenção da abrasão por escovação do esmalte erodido *in situ*. A erosão foi realizada imergindo as amostras em ácido cítrico 0,1 M (pH 3,5) durante 3 min. Oito indivíduos usaram um aparelho intrabucal, com 4 amostras de esmalte, durante 5 fases, divididas nos seguintes grupos: (1) sem erosão e sem enxaguatório fluoretado (controle), (2) erosão e sem enxaguatório fluoretado (controle 2), (3) erosão, enxague com solução enxaguatória de fluoreto de sódio/amina (250 ppm F), durante 30 s, e (4) enxague com solução enxaguatória de fluoreto de sódio/amina (250ppmF), durante 30 s, e erosão, (5) erosão, enxague com uma solução enxaguatória experimental contendo amina e flúor (250 ppm F), durante 30 s. Após a exposição de 60 min ao meio oral, os voluntários escovavam as amostras durante 30 s cada com dentifrício e realizou-se a medida da perda de substância dentária. Foram medidos a taxa de secreção da saliva em repouso e estimulada (com parafina), capacidade tampão e pH. A abrasão não foi significativamente menor com as soluções enxaguatórias fluoretadas antes ou após a erosão do esmalte em comparação aos grupos sem enxaguatório. A análise de regressão múltipla revelou que 57% da variação da abrasão podia ser atribuída à gravidade do amolecimento do esmalte ($p < 0,001$) e ao pH da saliva estimulada ($p < 0,001$). Desse modo, foi verificado que um único enxague de 30 s não teve nenhum efeito estatisticamente significativo sobre a abrasão pela escovação do esmalte erodido.

Um outro estudo avaliou o efeito, *in situ*, do verniz fluoretado na prevenção da erosão (er) e erosão associada à abrasão (er+abr). Os voluntários utilizaram, durante 3 semanas, nas horas de trabalho, aparelhos intrabucais contendo 2 amostras de esmalte humano tratados com o verniz fluoretado (FV) e 2 amostras controle (C). A erosão foi realizada 3 vezes ao dia, por 5 min cada, com refrigerante Sprite. Ao final de cada dia uma amostra de cada grupo foi escovada, durante 5 min

com dentifrício fluoretado. Realizou-se a perfilometria óptica nos 5º, 10º e 15º dias. Um aumento estatisticamente significativo na perda de esmalte foi encontrado para os grupos C-er ($p < 0,001$), C-er+abr ($p < 0,001$) e FV-er+abr ($p = 0,001$), mas não para o grupo FV-er ($p = 0,053$). Os valores de perda de volume acumulado ($\times 10^8 \mu\text{m}$) no 15º dia foram: C-er ($5,53 \pm 2,14$), C-er+abr ($5,70 \pm 2,07$) e FV-er+abr ($2,76 \pm 1,35$) e FV-er ($0,79 \pm 0,67$). Esses resultados indicaram que o verniz fluoretado é eficaz na redução do desgaste erosivo (VIEIRA et al., 2007).

Hara et al. (2009) testaram a hipótese de que o F e a abrasividade de dentifrícios poderiam interagir, modulando o desenvolvimento de lesões erosivas e abrasivas. Espécimes de dentina radicular e esmalte humano foram submetidos a ciclos de remineralização e desmineralização e escovados utilizando 6 dentifrícios formulados com três diferentes níveis de abrasividade: baixa (L), média (M) e alta (H) e com e sem F. Os espécimes foram analisados por perfilometria óptica. Os resultados para dentina foram $L < M < H$, para ambos os dentifrícios. No esmalte, os dentifrícios com F tiveram resultados semelhantes. Para as formulações sem F, os dentifrícios de abrasividade M e H não diferiram. O F reduziu a perda de esmalte em todos os níveis de abrasividade. Na dentina, esse efeito foi observado apenas para a formulação com baixa abrasividade. Os autores concluíram que para a perda de esmalte, tanto o F como a abrasividade foram importantes, enquanto que para dentina a abrasividade teve um impacto maior do que o F.

Austin et al. (2011) investigaram o efeito de uma única aplicação de soluções de SnF_2 e NaF altamente concentradas e um verniz de NaF/ CaF_2 no esmalte humano submetido à erosão com ácido hidrocloreídrico e abrasão por escovação. O tratamento foi realizado utilizando 40 amostras de esmalte humano, nas quais foram aplicadas soluções de NaF (9500 ppm, pH 8,0), SnF_2 (9500 ppm, pH 2,6); verniz Bifluorid 10® (42500 ppm, NaF a 5%, CaF_2 a 5%) e água deionizada (controle). Realizaram 3, 6 ou 9 ciclos, como descrito a seguir: erosão (HCl 0,01M, pH 2,2, por 2 min) + saliva artificial (1 h, pH 7,0) e erosão (HCl 0,01 M, pH 2,2, por 2 min) + saliva artificial (1 h, pH 7,0) + abrasão. O esmalte foi analisado usando dureza knoop, MEV e espectroscopia de energia dispersiva com detector de raios-x (EDS). Para a erosão, observaram uma redução significativamente menor apenas no grupo Bifluorid 10® após 3 e 6 ciclos de erosão ($p < 0,05$). A análise de EDS mostrou que apenas o grupo Bifluorid 10® teve F detectável após a erosão e erosão mais abrasão (0,1% peso e 0,2% peso, respectivamente). O F da superfície foi removido

após a erosão e erosão mais abrasão de todas as superfícies tratadas. Conclui-se que os precipitados formados na superfície do esmalte com aplicação de soluções de SnF_2 e NaF parecem não ser capazes de proteger contra a erosão e abrasão por escovação. O verniz de NaF/ CaF_2 promoveu uma proteção limitada contra a erosão, mas o seu papel na erosão e abrasão ainda não é certo.

Huysmans et al (2011) realizaram um estudo *in situ*, *split-mouth* (água ou escovação com dentífrico) e cruzado (tipo de dentífrico), duplo cego, para avaliar o efeito de dentífricos com fluoreto de estanho (SnF_2) na perda erosiva do esmalte. Durante três fases, doze voluntários utilizaram um aparelho intrabucal palatino contendo amostras de esmalte humano, durante 5 dias cada fase. Foram testados três dentífricos: dois contendo SnF_2 (codificados M e PE) e um contendo somente fluoreto de sódio (codificado C). No primeiro dia, os voluntários apenas utilizaram o aparelho para formação da película adquirida. Nos demais dias, as amostras foram tratadas. A erosão foi realizada três vezes ao dia com solução de ácido cítrico. A medida da perda de estrutura foi feita por perfilometria. A média da profundidade do desgaste erosivo das amostras controle foi 23 μm . Os dois dentífricos contendo SnF_2 reduziram significativamente a perda erosiva: M para 34% (dP 39 %) e PE para 26% (dP 25%). No dentífrico controle houve uma redução não significante da perda erosiva de 7% (dP 20%). Os pesquisadores concluíram que os dentífricos contendo SnF_2 foram capazes de reduzir a perda erosiva *in situ*.

White et al. (2012) realizaram um estudo para investigarem os efeitos protetores de soluções de NaF e bochechos comerciais na dissolução da hidroxiapatita (HAP) por ácido cítrico *in vitro*, com ou sem a película adquirida. A dissolução da HAP foi quantificada utilizando cromatografia de íons. Dois substratos de HAP foram selecionados, um pó de alta resolução e grânulos de 80 μm de diâmetro, e estudados na presença e ausência da película adquirida (saliva humana, 2h). Antes da exposição ao ácido, os substratos foram expostos a um dos pré-tratamentos que incluíam soluções aquosas de fluoreto (F) e enxaguatórios comercialmente disponíveis com F nas concentrações de 0, 1, 10, 50, 225 e 450 $\mu\text{g/g}$ F (NaF). Foi calculada a redução da dissolução em relação ao controle negativo de água deionizada. No caso das soluções aquosas e enxaguatórios, uma dose-resposta para o F foi observada com um patamar em torno de 100 $\mu\text{g/g}$ F para os dois substratos de HAP, com ou sem película. Até as concentrações mais baixas, a partir de 10 $\mu\text{g/g}$ F, reduziram significativamente a dissolução da HAP. O substrato

HAP teve um pequeno impacto na dose-resposta, e o F foi igualmente efetivo na presença ou ausência da película. De acordo com esses resultados o F reduziu significativamente a dissolução da HAP nas concentrações a partir de 10 µg/g F. Em baixas concentrações foi observada uma dose-resposta ao F.

Moron et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de fluoreto em dentifrícios líquidos neutros ou ácidos na proteção do esmalte e dentina no desgaste erosivo e abrasivo. Cento e trinta e duas amostras de esmalte e dentina bovino foram aleatoriamente distribuídas em 11 grupos (n=12): dentifrícios líquidos experimentais com 550 ppm F, 1100 ppm F, 5000 ppm F ou 0 ppm F/placebo (pH 4,5 e pH 7,0, cada), e dentifrício comercial com 550 ppm F (Colgate Baby, pH 7,0), 1100 ppm F (Crest, pH 7,0) e 5000 ppm F (Duraphat, pH 7,0). As amostras foram submetidas à erosão durante 90 s, 4 vezes/dia, durante 7 dias. Após o primeiro e último desafio erosivo, as amostras foram escovadas durante 15 s com um dos dentifrícios. A perda de estrutura dentária foi medida perfilometricamente (µm) e analisada por ANOVA (p<0,05). Todos os dentifrícios líquidos fluoretados reduziram significativamente a perda do esmalte em comparação ao placebo e os dentifrícios comerciais. Para dentina, apenas os dentifrícios líquidos com 1100 e 5000 ppm F reduziram significativamente a sua perda em comparação com o placebo. Não houve efeito do pH, mas a consistência teve um impacto significativo sobre o efeito dos dentifrícios. Os autores concluíram que o dentifrício líquido com alta concentração de F pode ser uma boa opção para prevenir o desgaste dentário.

Os agentes fluoretados testados na maioria dos estudos sobre erosão dentária são os mesmos utilizados ao longo dos anos para a prevenção da cárie: fluoreto de sódio (NaF), fluoreto fosfato acidulado (APF), fluoreto de estanho (SnF₂) e fluoreto de amina (AmF). Mais recentemente, o efeito preventivo de outros tipos de fluoreto, tais como tetrafluoreto de titânio (TiF₄), tetrafluoreto de zircônio e tetrafluoreto de háfnio nas concentrações entre 0,4 a 10%, pH 1-2, tem sido investigado em ensaios erosivos (BUYUKYILMAZ; OGAARD; ROLLA, 1997; HOVE, L. et al., 2006; HOVE, L.H. et al., 2007; MAGALHAES et al., 2009a; MAGALHAES et al., 2008b; MAGALHAES et al., 2007c; SCHLUETER et al., 2007; TEZEL; ERGUCU; ONAL, 2002; TVEIT et al., 1983; VAN RIJKOM et al., 2003; VIEIRA et al., 2006a; VIEIRA; RUBEN; HUYSMANS, 2005; WIEGAND et al., 2009; YU et al., 2010).

Magalhães et al. (2008a) avaliaram o efeito na erosão do esmalte, de um verniz experimental de TiF₄ comparando-o aos vernizes comerciais de NaF e outro

de NaF/CaF₂ e solução de TiF₄ 4%. Para isso, 72 espécimes de esmalte bovino foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: verniz de NaF (2,26% F), verniz de NaF/CaF₂ (5,63% F), verniz de TiF₄ 4% (2,45% F), verniz sem F (placebo), solução de TiF₄ 4% (2,45% F) e controle (sem tratamento). Foi aplicada uma camada fina dos vernizes, os quais foram removidos após 6 h. A solução foi aplicada sobre a superfície do esmalte durante 1 min. Em seguida, os espécimes foram submetidos ao desafio erosivo 6 vezes/dia durante 5 dias, à temperatura de 37°C. A desmineralização foi realizada com Sprite® (1 min, 3 mL/min) e a remineralização em saliva artificial (durante o dia: 59 min entre os ciclos, 0,5 ml/min, durante a noite: 0,1 ml/min). Os valores da média diária da erosão e da erosão acumulativa (µm) foram significativamente menores para o grupo verniz de TiF₄ 4%, levando à conclusão de que o verniz de TiF₄ parece ser um tratamento promissor para reduzir a perda de esmalte sob condições erosivas moderadas.

Em outro estudo de Magalhães et al. (2010) foi analisado o efeito de uma única aplicação de vernizes e soluções de TiF₄ e NaF na proteção contra a erosão na dentina. Para tal, amostras de dentina radicular foram pré-tratadas com verniz de NaF (Duraphat - 2,26% F, pH 4,5), verniz de NaF/CaF₂ (Duofluorid - 5,63% F, pH 8,0), verniz experimental de NaF (2,45% F, pH 4,5), verniz experimental de TiF₄ (2,45% F, pH 1,2), solução de NaF (2,26% F, pH 4,5), solução de TiF₄ e verniz placebo TiF₄ (2,45% F, pH 1,2), (pH 5,0, verniz controle sem fluoreto). Nos controles não houve tratamento. Durante 5 dias, 10 amostras de cada grupo foram submetidas à erosão com Sprite Zero, 4 vezes ao dia, durante 90 s cada e para remineralização foi utilizada a salivar artificial. Após o pré-tratamento e o primeiro, terceiro e quinto dia, a perda de estrutura da dentina foi medida por perfilometria. A melhor opção para reduzir parcialmente a erosão na dentina parece ser o verniz Duraphat. Entretanto, após sucessivos desafios erosivos esse efeito foi limitado.

Wiegand et al. (2010a) realizaram um estudo *in situ* para analisarem o impacto de diferentes tetrafluoretos (TiF₄, ZrF₄ e HfF₄) e do AmF sobre a erosão e erosão associada à abrasão em esmalte e dentina. Durante 8 fases de 3 dias cada, 8 voluntários utilizaram um aparelho intrabucal palatino contendo 2 amostras de esmalte e 2 de dentina bovina. Uma amostra de esmalte e um de dentina foi pré-tratada por uma única vez com TiF₄, ZrF₄, HfF₄ ou AmF (todos com 0,5 M de F), durante 60 s, sendo que as outras amostras serviram de controles. Na sequência, todas as amostras foram submetidas à erosão (4 vezes ao dia, durante 90 s) ou à

erosão associada à abrasão (2 vezes ao dia, 30 s cada amostra). A escovação foi realizada 90 min após a primeira e a última erosão com escova elétrica e dentifrício fluoretado. A perda de estrutura das amostras foi medida por perfilometria (μm). Os resultados mostraram que todas as soluções fluoretadas reduziram significativamente a perda de esmalte e dentina em comparação ao controle, sendo que o efeito protetor foi semelhante para o esmalte e para dentina. Concluíram que tanto os tetrafluoretos quanto o AmF foram capazes de reduzir a erosão e a erosão associada à abrasão *in situ*, com praticamente a mesma eficiência.

O estudo *in vitro* de Comar et al. (2012) comparou o efeito de dentifrícios contendo TiF_4 , NaF e SnF_2 na erosão associada à abrasão. Cento e vinte amostras de esmalte e cento e vinte de dentina foram distribuídas em 10 grupos: dentifrício experimental placebo (sem F), NaF (1450 ppm F), TiF_4 (1450 ppm F), SnF_2 (1450 ppm F), SnF_2 (1100 ppm F) + NaF (350 ppm F), TiF_4 (1100 ppm F) + NaF (350 ppm F), dentifrício comercial Pro-Saúde (SnF_2 - 1100 ppm F + NaF - 350 ppm F, Oral B), dentifrício comercial Crest (NaF - 1.500 ppm F, Procter & Gamble), abrasão sem dentifrício e apenas erosão. A erosão foi realizada 4 vezes ao dia, com Sprite Zero, durante 90 s. A abrasão foi feita com escova elétrica e solução dos dentifrícios 2 vezes ao dia, por 15 s. A remineralização foi realizada em saliva artificial. A perda de estrutura dentária foi avaliada usando perfilometria (μm), após 7 dias. As pastas de dentes experimentais com NaF, TiF_4 , SnF_2 e Pro-Saúde mostraram uma redução significativa no desgaste do esmalte (entre 42% e 54%). O Pro-Saúde também reduziu significativamente o desgaste da dentina. Para o esmalte, os melhores resultados para a redução do desgaste (62-70%) foram obtidos para os dentifrícios SnF_2/NaF e TiF_4/NaF , e para dentina foram TiF_4 , SnF_2 , SnF_2/NaF e TiF_4/NaF (64-79%). Os pesquisadores concluíram que os dentifrícios experimentais contendo tanto fluoreto convencional como metálico reduziram o desgaste dentário.

A aplicação de produtos ricos em Ca pode ser outra estratégia preventiva no combate à erosão e abrasão. O aumento da concentração de Ca salivar pode aumentar a deposição de F sobre os tecidos dentários, formando um reservatório *CaF₂-like* (MAGALHAES et al., 2009c).

Pesquisas sobre os agentes bioativos à base de produtos lácteos têm sido realizadas durante 60 anos (PREWITT, 1950; SHAW; ENSFIELD; WOLLMAN, 1959). Hoje, diversas fórmulas de pasta estão disponíveis, tais como Tooth Mousse

(GC Internacional Tóquio, Japão), Topacal C-5 (NSI Dental, Hornsby, Austrália) e MI Paste Plus (GC Internacional).

Um estudo recente, *in vivo*, mostrou que um chiclete contendo fósfopeptídeo de caseína – fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) é capaz de aumentar significativamente a concentração de Ca e fosfato na saliva, durante um período prolongado de tempo, o que pode ajudar na remineralização das superfícies dentárias (SANTHOSH et al., 2012).

Min, Kwon e Kim, (2011) realizaram um estudo *in vitro*, utilizando esmalte bovino, para examinar o potencial erosivo e desmineralizante de uma bebida esportiva contendo nanopartículas de hidroxiapatita como aditivo. As soluções experimentais utilizadas foram o Powerade (PA) somente e PA adicionado com 0,05%, 0,10% e 0,25% de nanopartículas de hidroxiapatita. O pH, a acidez titulável, a concentração de Ca e fosfato de cada solução foram analisados, além do grau de saturação em relação ao esmalte dentário (DS(EM)). Para tal, utilizaram doze amostras de esmalte para cada grupo, tratadas durante 7 dias, em ciclagem de pH com 60 min na solução experimental. Análises de dureza na superfície do esmalte foram feitas para determinar o potencial erosivo. A profundidade da perda de estrutura e a camada desmineralizada foram analisadas por microscopia confocal de varredura a laser e as mudanças morfológicas na superfície dentária foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Houve um aumento no pH e DS(EM) com o aumento da concentração de nanopartículas de hidroxiapatita nas bebidas, e a acidez titulável diminuiu. Houve diferenças significativas na dureza entre o PA sozinho e os grupos com nanopartículas de HAP acima de 0,10%. A microscopia confocal de varredura a laser mostrou que não houve erosão no grupo com 0,25% nanopartículas. A superfície do esmalte, observada pela MEV, permaneceu intacta com o aumento da concentração de nanopartículas de HAP. A erosão dentária foi prevenida com o aumento na concentração de nanopartículas de HAP, sendo prevenida com a adição de 0,25% nanopartículas de HAP à bebida.

Os estudos realizados adicionando o CPP-ACP a bebidas mostraram uma redução do seu potencial erosivo (PANICH; POOLTHONG, 2009; RAMALINGAM; MESSER; REYNOLDS, 2005). Manton et al. (2010) investigaram o efeito sobre a erosão do esmalte humano da adição de CPP-ACP a 0,2% em quatro refrigerantes, sendo dois carbonatados. Na superfície das amostras de esmalte (n=27) foi deixada uma janela de 1 mm², sendo o restante coberto com esmalte de unha cosmético.

Foram testados quatro refrigerantes com sabor cítrico (pH 2,2 a 2,4) e água destilada deionizada (DDW). As bebidas foram testadas com e sem a adição de CPP-ACP a 0,2%. As amostras foram colocadas em 50 mL da solução, durante 30 min, à temperatura de 37° C, removidas da solução, lavadas com DDW e removido o esmalte. A profundidade da perda de estrutura foi medida por perfilometria de luz branca. Todos os refrigerantes testados causaram erosão no esmalte, porém a adição de CPP-ACP a 0,2% reduziu significativamente a profundidade do desgaste erosivo em comparação às bebidas originais. As profundidades dos desgastes erosivos para os refrigerantes com adição de CPP-ACP a 0,2% não diferiram significativamente dos DDW.

O CPP-ACP vem sendo pesquisado quanto ao seu efeito preventivo em relação à erosão dentária. A explicação do seu potencial preventivo tem sido baseada na habilidade do fosfopeptídeo de caseína (CPP) estabilizar o fosfato de cálcio por ligação ao fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), formando aglomerados de CPP-ACP. Esses aglomerados atuam como um reservatório de Ca e fosfato, que se ligam às superfícies dos dentes (YENGOPAL; MICKENAUTSCH, 2009). As caseínas são fosforiladas durante a biossíntese do leite via atividade de quinases presentes nas glândulas mamárias (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2012). A maioria dos produtos comerciais disponíveis com CPP é preparada a partir da caseína com hidrólise enzimática utilizando atividades proteolíticas (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2012).

Alguns estudos foram feitos com a pasta ou o mousse contendo CPP-ACP para investigar o seu efeito preventivo na erosão dentária. O mousse (Tooth Mousse) mostrou-se efetivo na redução da erosão da dentina em condições envolvendo atrição severa na superfície do esmalte dentário, em um estudo *in vitro* (RANJITKAR et al., 2009c). Em outro estudo, a perda erosiva da dentina foi reduzida com a aplicação do Tooth Mousse após uma simulação *in vitro* do desgaste da dentina e esmalte seguido pela abrasão com escovação (RANJITKAR et al., 2009a).

Tantbirojn et al. (2008) demonstraram a efetividade da pasta com CPP-ACP (ProspecTM, MI Paste) na erosão dentária quando esta foi aplicada tópicamente por quatro vezes. Para tal, vinte quatro dentes bovinos, sendo que em cada metade do dente foi realizado o tratamento e o controle, foram imersos em refrigerante de cola (Coca-cola®), durante 8 min, em seguida foram gotejadas (0,4 mL/min) várias soluções substitutas de saliva (SLS) com 1 ppm F, SLS sem F e o enxaguatório

Biotene®. A pasta de CPP-ACP foi aplicada na metade das superfícies dentárias, durante 3 min, 0, 8, 24 e 36 h após a imersão no refrigerante. A dureza da superfície foi analisada (Knoop) no início, após 24 e 48 h de contato com a SLS. Com a erosão, a dureza do esmalte diminuiu significativamente (ANOVA, $p < 0,05$). Após o contato com as SLS durante 48 h, os esmaltes tratados com a pasta CPP-ACP estavam significativamente mais duros que os não tratados, independentemente da presença de 1 ppm de F na solução. O enxaguatório Biotene® amoleceu significativamente a superfície do esmalte. Houve um efeito significativo da aplicação da pasta CPP-ACP e o tipo de SLS na dureza do esmalte. A aplicação da pasta de CPP-ACP com a contínua exposição a SLS durante 48 h aumentou a dureza do esmalte. Esses resultados estão de acordo com outro estudo que comparou a dureza do esmalte sadio com o erodido por coca-cola® e o esmalte remineralizado por CPP-ACP, saliva artificial, associação de ambos ou água deionizada. Os tratamentos com CPP-ACP aumentaram em 13% a dureza do esmalte (PANICH; POOLTHONG, 2009).

O estudo realizado por Piekarz et al. (2008) mostrou que várias aplicações do Tooth Mousse reduziram a profundidade da erosão no esmalte e na dentina humana, quando estas foram expostas, *in vitro*, à erosão com vinho branco (White Riesling, pH=3,5, a 21,2°C).

Com relação a aplicações do mousse, o trabalho realizado por Ranjitkar et al. (2009c) também obteve resultados satisfatórios quando a aplicação do mousse com CPP-ACP (Tooth Mousse) foi feita diversas vezes. A erosão foi provocada por ácido cítrico 0,3%, durante 10 min, seguida pela abrasão com solução de dentifrício sem F e escova dentária. Então as amostras foram imersa em saliva artificial, durante 2 h, entre os ciclos. Esse ciclo foi repetido por 10 vezes. As amostras foram alocadas aos seguintes grupos: 1 - Tooth Mousse aplicado no início de cada ciclo erosivo, durante 5 min, 2 - Tooth Mousse sem CPP-ACP e 3 – sem mousse (controle). A perda de estrutura foi realizada por perfilometria a laser. Houve uma redução do desgaste erosivo e abrasivo no esmalte e na dentina.

O efeito sinérgico do fluoreto com o CPP-ACP na remineralização do esmalte humano erodido foi observado num estudo. Cinco voluntários utilizaram um aparelho intrabucal palatino contendo duas fileiras com três amostras de esmalte erodido cada. A erosão foi realizada por 5 mL de refrigerante tipo cola, durante 8 min. As amostras foram submetidas a três diferentes protocolos de remineralização com:

grupo1 – CPP-ACP (Tooth Mousse), grupo 2 – CPP-ACP com 900 ppm F (Tooth Mousse Plus), grupo 3 – saliva. Foi realizada dureza Vickers no início e final do tratamento. O Tooth Mousse e o Tooth Mousse Plus remineralizaram o esmalte amolecido, sendo que com o Tooth Mousse Plus mostrou o maior potencial de remineralização (SRINIVASAN; KAVITHA; LOGANATHAN, 2010).

Ao contrário dos resultados citados anteriormente, outras pesquisas mostraram que o CPP-ACP não apresentou efeito protetor para a erosão. Wegehaupt; Attin, (2010) investigaram o efeito de vários compostos fluoretados e CPP-ACP na redução da erosão/abrasão. Quarenta amostras de esmalte bovino foram divididas em quatro grupos: grupo 1 - sem tratamento (controle), grupo 2 – gel fluoreto de sódio/amina (pH 4,8, 12.500 ppm), grupo 3 – gel de fluoreto de sódio (pH 7,1, 12.500 ppm) e grupo 4 – mousse contendo CPP-ACP, todos os tratamentos foram realizados durante 2 min/dia. Durante 20 dias, as amostras passaram por 6 ataques erosivos por 20 s/dia com ácido clorídrico (pH 3,0). Então, foram armazenadas em saliva artificial durante os desafios e a noite. Realizou-se a abrasão por escovação durante 15 s, com solução do dentífrico, feita a cada dia antes da primeira e após 1 h do último ataque erosivo. Medidas dos perfis de superfície inicial e final foram utilizadas. Apenas os grupos 2 e 3 diferiram significativamente em relação ao controle, não havendo diferença significativa no desgaste dentário entre os grupo 2 e 3. A aplicação do mousse contendo CPP-ACP foi pouco efetiva em relação ao desgaste dentário, sendo que a aplicação diária dos géis fluoretados reduziu significativamente o desgaste. Recentemente, outro estudo de Wegehaupt et al. (2012) investigou o potencial do mousse contendo CPP-ACP (Tooth Mousse®) e bochecho fluoretado para o endurecimento do esmalte amolecido pela erosão e avaliar a influência da aplicação intraoral ou extraoral. Concluiu-se que a aplicação intrabucal de Tooth Mousse® ou solução fluoretada não reduziu significativamente a erosão/abrasão do esmalte bovino *in situ*. Para esse estudo foram selecionados 10 voluntários para utilizar um aparelho intrabucal, durante 5 fases. Quatro amostras foram imersas em 30 mL de Sprite light®, durante 2 min e o aparelho colocado na boca por 5 min. Então, as amostras foram tratadas com solução de AmF/SnF₂ 250 ppm (Meridol) (grupo 1 e 3) ou Tooth Mousse® (grupo 2 e 4). Nos grupos 1 e 2 o tratamento foi feito extraoralmente, e nos grupos 3 e 4, intraoralmente. No grupo 5 não houve tratamento (controle). Após 4 h de utilização do aparelho foi realizada medição da dureza Knoop (KHN) inicial, após o

amolecimento e ao término. Não foi encontrada diferença significativa nos valores de dureza inicial, enquanto a imersão em Sprite light® reduziu significativamente os valores de microdureza. Em todos os grupos observou-se um endurecimento significativo após a exposição intraoral, mas alcançando os valores de microdureza inicial não foi atingido. No grupo 2 os valores de KHN foi significativamente maior do que nos grupos 1 e 5. Nenhuma diferença significativa nos de valores de microdureza foi observado entre os grupos 3, 4 e 5. Resultados similares foram encontrados por Wang et al. (2011) que investigaram, *in vitro*, o efeito protetor de quatro novos agentes contra erosão. Para a realização desse estudo utilizaram-se 90 coroas dentárias humanas, distribuídas em 9 grupos. As amostras foram incubadas em saliva humana durante 2 h para formação da película adquirida e após, durante 4 dias, submetidas a um ciclo de desmineralização em suco de laranja (pH 3,6), e remineralização com a solução do dentifrício contendo um dos agentes testados, ambos por 3 min cada, 2 vezes ao dia. Os agentes testados foram: (1) DenShield Tooth, princípio ativo – 7,5% p/p NovaMin® (fosfosilicato de cálcio e sódio); (2) Nanosensitive hca, princípio ativo – 7,5% p/p NovaMin®; (3) GC Tooth Mousse, princípio ativo – 10% Recaldent™ (CPP-ACP); (4) GC MI Paste Plus, princípio ativo – 10% Recaldent™, 900 ppm F. Acrescentou-se um grupo controle. A aplicação dos produtos foi realizada em dois momentos, antes ou após o ataque erosivo. A perda de estrutura dentária foi medida através da realização de nanodureza (SNH) da superfície após a formação da película e ao término do tratamento diário. Para todos os grupos houve uma diminuição significativa da SNH ao final do experimento. Não houve diferenças significativas, antes ou após o ataque erosivo, entre agentes testados e o grupo controle.

Apesar de todos os estudos realizados em relação à erosão e abrasão, os resultados obtidos sobre a ação dos produtos preventivos existentes são conflitantes, necessitando de mais pesquisas e desenvolvimento de novos produtos.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar o potencial preventivo de pastas à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e a abrasão do esmalte e dentina bovinos *in vitro* e *in situ*.
2. Avaliar o efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio antes da escovação com dentifrício fluoretado sobre a erosão associada ou não à abrasão do esmalte e dentina bovinos *in vitro* e *in situ*.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi subdividido em 2 estudos intitulados:

1. Avaliação do efeito de pastas à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos *in vitro* e *in situ*.
2. Avaliação do efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de dentifrício fluoretado a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovino *in vitro* e *in situ*.

Para a parte *in situ* foi obtida a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru (processo 083/2009, Anexo A).

4.1 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos

Para a realização deste estudo foram utilizados incisivos bovinos extraídos recentemente de gado da raça Nelore, com idade média de 36 meses, abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru, SP. Após a extração, os dentes foram mantidos em solução de timol a 0,1%.

Para o preparo dos dentes, primeiramente foram removidas as raízes, com o auxílio de um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni/ Série 16223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e com. Ltda, Petrópolis, RJ), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes. Na sequência, as coroas foram fixadas com godiva termoativada (Kerr Corporation, U.S.A.) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm), a qual foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, USA) (Figura 1), contendo dois discos diamantados dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102,0x0,3x12,7 mm (Extex Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm)

entre os discos. Os cortes foram realizados com velocidade de 300 rpm, sob refrigeração com água deionizada, sendo obtidos blocos de esmalte 4x4 mm da porção mais plana da coroa, através de uma secção dupla nos sentidos cérvico-incisal e méso-distal (Figura 2).

Figura 1. Cortadeira ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA).

Figura 2 . Corte da coroa bovina e secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido méso-distal para obtenção dos blocos de esmalte 4x4 mm.

Após o corte de todos os blocos de esmalte bovino, deu-se o prosseguimento ao preparo dos blocos de dentina radicular bovina. Primeiramente, foram obtidas fatias de dentina radicular na porção cervical, através de secções no sentido méso-distal com a utilização dos dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 4 mm. Após a obtenção das fatias de dentina, dois espécimes 4 x 4 mm foram obtidos através da secção no sentido vestibulo-lingual (Figura 3).

Figuras 3. Sequência de corte da dentina radicular para obtenção de bloco de dentina. **A** – fatia de dentina radicular na porção cervical; **B** – fatia de dentina fixada a placa de acrílico para corte no sentido vestibulo-lingual; **C** – placa de acrílico presa a máquina de corte; **D** – fatia de dentina radicular cortada no sentido vestibulo-lingual; **E** – blocos de dentina.

Após o corte, os blocos foram polidos. Para isto, eles foram fixados com cera pegajosa e com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a face de esmalte ou dentina externa voltada para o disco, para que a planificação da dentina interna fosse realizada. O conjunto (disco/dente) foi adaptado a uma Politriz Metalográfica (Figura 4), permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico no qual foram fixados os espécimes. A planificação da dentina interna foi realizada com uma lixa de carbeto de silício de granulação 320 (Extec. Corp.), sob refrigeração com água deionizada, em baixa velocidade, por 30 s - 2 min, respectivamente, até que os blocos ficassem com espessura aproximada de 3 mm (Figura 5).

Figura 4. Politriz Metalográfica.

Figura 5. Bloco colado para planificação da dentina interna e planificado.

Em seguida, os blocos foram removidos do disco de acrílico e os discos limpos com xilol (Pharmácia Específica manipulação de fórmulas, Bauru, SP), para remover resíduos de cera. Posteriormente, foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico com a face de esmalte (ou dentina externa + cimento) exposta, para que fosse feita a planificação e o polimento, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base. Novamente o conjunto foi adaptado à politriz e o esmalte (ou dentina externa) foi desgastado inicialmente com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (Extec. Corp.), sob refrigeração com água deionizada, com 2 pesos (166,52 g), em velocidade baixa (2 minutos - esmalte e 1 minuto - dentina). O polimento do esmalte e da dentina foi então realizado com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp.), sob refrigeração, com 2 pesos, em velocidade alta (3 minutos - esmalte e 2 minutos - dentina). Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Extec Corp.) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μ m (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, USA), durante 3 min, com 2 pesos, em velocidade alta (Figura 6).

Figura 6. Bloco polido.

Entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi lavado com água deionizada em aparelho de ultrassom T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), com frequência de 40 KHz, durante 2 min. Ao final do polimento os blocos foram lavados por 5 min com água deionizada em aparelho ultra-som. Os blocos de esmalte e de dentina apresentaram superfície plana e com aspecto vítreo ao final do polimento.

Após esses procedimentos, apenas os blocos de esmalte passaram por teste de dureza (diamante KNOOP, 25 g, 10 s, HMV-2; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) através da realização de 5 endentações com uma distância de 200 μ m entre

elas, a partir do centro do bloco. Os blocos de esmalte que apresentaram a média de dureza superficial entre 330-380 KHN foram aleatoriamente divididos nos grupos experimentais (Figura 7). Para a dentina não foi feita análise de dureza.

Figura 7. Microdurômetro e endentação.

Então, as superfícies dos blocos de esmalte e dentina foram protegidos, sendo que 2/3 da superfície tanto do esmalte como da dentina (uma faixa de cada lado) com esmalte cosmético de unha vermelho, para obtenção de uma superfície controle (Figura 8). As laterais dos blocos, assim como a dentina interna também foram protegidas.

Figura 8. Bloco protegido com esmalte cosmético de unha.

4.2 Estudo 1 - Avaliação do efeito de pastas à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos *in vitro* e *in situ*.

4.2.1 *Design* experimental do tratamento *in vitro*

Para a fase *in vitro* foram utilizados 110 blocos de esmalte bovino padronizados pela dureza superficial e 110 blocos de dentina bovina (4x4x3 mm), sendo que todos os blocos foram expostos a quatro ciclos de erosão associada à abrasão por escovação com escova elétrica acoplada a um dispositivo auxiliar para controle da força e solução (*slurry*) do dentífrico sem F (0,5 mL por bloco) durante 10 s, 2x/dia, após o primeiro e o último ciclo erosivo. Os grupos variaram em função do agente presente na pasta e a porcentagem de nanopartículas: pasta experimental (10% de nanopartículas de cálcio e fósforo (HAP)) sem F (10% HAP), pasta experimental (10% de nanopartículas de cálcio e fósforo) com F (10% HAP + 0,2% NaF), pasta experimental (20% de nanopartículas de cálcio e fósforo) sem F (20% HAP), pasta experimental (20% de nanopartículas de cálcio e fósforo) com F (20% HAP + 0,2% NaF), pasta experimental (20% de nanopartículas de cálcio e fósforo) com F (20% HAP+ 2% NaF), pasta experimental placebo sem F (Placebo), pasta experimental placebo com F (0,2% NaF), pasta experimental placebo com F (2% NaF), *MI paste* sem F (*MI paste*), *MI paste plus* com F (0,2% NaF) (*MI paste plus*) e sem tratamento (controle). Todas as pastas experimentais apresentavam a mesma composição, com exceção dos ingredientes ativos e foram fabricadas pela empresa Dentscare (Joinville, SC, Brasil). O número de blocos por condição experimental foi 10.

A pasta experimental continha em sua composição básica os seguintes ingredientes: ativos (nanopartículas de hidroxiapatita, fluoreto de sódio e nitrato de potássio) e inativos (água destilada, espessante, tensoativo, umectante, aroma, adoçante e conservante).

4.2.2 Design experimental do tratamento *in situ*

Doze voluntários adultos, previamente selecionados, utilizaram um aparelho palatino com 4 blocos de dentina radicular e 4 blocos de esmalte bovinos (4x4x3 mm), divididos em duas fileiras horizontais de acordo com as condições: erosão (n=2 esmalte e 2 dentina), lado esquerdo da cavidade bucal e erosão+abrasão (n=2 esmalte e 2 dentina), lado direito da cavidade bucal (figura 9). Os voluntários foram divididos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: pasta experimental 10% HAP, pasta experimental 10% HAP + 0,2% NaF, MI paste plus e Placebo.

Figura 9. Disposição dos blocos no aparelho palatino.

Colunas 1 e 3 correspondem aos blocos de esmalte e as colunas 2 e 4, aos blocos de dentina.

De acordo com o delineamento cruzado, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos, de acordo com o fluxograma (Figura 10) abaixo:

Figura 10. Fluxograma mostrando o delineamento do estudo.

As variáveis de resposta foram perfilometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectroscopia por energia dispersiva de raio x (EDS).

4.3 Estudo 2 - Avaliação do efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de dentifrício fluoretado na erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos *in vitro* e *in situ*.

4.3.1 Design experimental do tratamento *in vitro*

A fase *in vitro* foi realizada utilizando-se 120 blocos de esmalte bovino padronizados pela dureza superficial e 120 blocos de dentina bovina (4x4x3 mm), sendo que os blocos de esmalte e de dentina foram expostos a quatro ciclos de erosão, e em apenas metade desses blocos a erosão foi associada à abrasão por escovação com escova elétrica acoplada (Oral-B Pro-Saúde Power) a um dispositivo auxiliar para controle da força, durante 5 dias. O estudo foi composto de acordo com os seguintes tratamentos (n=15): bochecho com Ca e uso de dentifrício fluoretado (BCa + DF), bochecho com Ca e uso de dentifrício placebo (BCa + DP), bochecho com água deionizada e uso de dentifrício fluoretado (BP + DF) e bochecho com água deionizada e uso de dentifrício placebo (BP + DP).

Durante 5 dias, 4 vezes por dia, a erosão foi provocada por um refrigerante tipo cola (90 s cada). Entre a erosão e a abrasão, os blocos foram imersos em 10 mL de água deionizada ou solução de lactato de cálcio 150 mM por 1 min, sob agitação, 2x/dia (antes da escovação). A abrasão foi realizada na superfície vestibular dos blocos de esmalte, e para isso, os blocos foram escovados, utilizando-se escova elétrica (Oral-B Pro Saúde Power) e solução do dentífrico que foi utilizada para cada grupo (1:3 água, 0,5 mL/bloco), durante 10 s, 2x/dia. Entre os desafios erosivos e abrasivos os blocos foram expostos à remineralização em saliva artificial (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982). A saliva artificial foi renovada a cada dia para cada grupo. Entre cada etapa os blocos foram lavados com água deionizada.

O número de blocos por grupo experimental foi de 15. A variável de resposta foi a perfilometria (μm).

4.3.2 Design experimental do tratamento *in situ*

Doze voluntários adultos, previamente selecionados, utilizaram um aparelho palatino com 4 blocos de dentina radicular e 4 blocos de esmalte bovinos (4x4x3 mm), divididos em duas fileiras horizontais de acordo com as condições: erosão (n=2 esmalte e 2 dentina) e erosão+abrasão (n=2 esmalte e 2 dentina). Os voluntários foram divididos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: bochecho com Ca e uso de dentífrico fluoretado (BCa + DF), bochecho com Ca e uso de dentífrico placebo (BCa + DP), bochecho com água deionizada e uso de dentífrico fluoretado (BP + DF) e bochecho com água deionizada e uso de dentífrico placebo (BP + DP). De acordo com o delineamento cruzado, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos, de acordo com o fluxograma (Figura 11) abaixo:

Figura 11. Fluxograma mostrando o delineamento do estudo.

O desafio erosivo foi realizado, 4x/dia, através da imersão do aparelho em 150 mL de um refrigerante à base de cola (pH 2,6) durante 90 s cada imersão. Na fileira correspondente à erosão+abrasão, a abrasão foi realizada através da escovação com escova elétrica Oral-B Pro Saúde Power e solução de dentífrico fluoretado (1:3 água), por 15 s cada bloco, 2x/dia. Entre a erosão e abrasão, os voluntários realizaram um bochecho com 10 mL de água deionizada ou solução de lactato de cálcio 150 mM, por 1 minuto, 2x/dia.

A variável de resposta foi a perfilometria (µm).

4.4 Protocolo detalhado dos estudos *in vitro*

4.4.1 Estudo 1

Os grupos foram submetidos a 4 ciclos de erosão diários, durante 5 dias, em um recipiente fechado (Figura 12). Cada ciclo foi composto por:

- Erosão pela bebida Coca-Cola[®] (Coca-Cola Company Spal, Porto Real, RJ, Brazil, pH 2,3, 30 mL/espécime, sem agitação, 25°C) recentemente aberta quatro vezes ao dia durante 90 s cada;
- Lavagem dos blocos com água deionizada, por 5 s;
- Abrasão por escovação com escova elétrica (Colgate Motions Multi-action) acoplada a um dispositivo auxiliar e solução (*slurry* 1:3) do dentífrico idêntico ao Crest (Proctor & Gamble, Cincinnati, OH, EUA) sem F (0,5 mL por bloco) durante 10 s, 2x/dia, após o primeiro e o último ciclo erosivo.
- Lavagem dos blocos com água deionizada, por 5 s;
- Aplicação das pastas sobre todos os blocos com o auxílio de um microaplicador (Cavibrush, FGM) (Figura 13), por 3 minutos, duas vezes ao dia (no primeiro e último ciclos), seguida da remoção do excesso do material com um cotonete limpo, sem a posterior lavagem dos espécimes (TANTBIROJN et al., 2008). A quantidade média de pasta aplicada através deste procedimento era 0,0114 g.
- Imersão em saliva artificial (pH 6,8, 30 mL/bloco, 25°C) durante 2 h. Após o último tratamento erosivo - abrasivo, os blocos foram estocados de um dia para o outro em saliva artificial. A saliva artificial foi renovada diariamente e continha glicose 0,2 mM, NaCl 9,9 mM, CaCl₂.2H₂O 1,5 mM, NH₄Cl 3 mM, KCl 17 mM, NaSCN 2 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, ureia 3,3 mM, NaH₂PO₄ 2,4 mM e ácido ascórbico (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982).

As escovas elétricas foram fixadas em um dispositivo construído com base em um modelo da Universidade de Zürich (Departamento de Periodontia, Odontologia Preventiva e Cariologia) que permite que as cabeças das escovas fiquem alinhadas e paralelas à superfície dos blocos (Figura 14). A cabeça da escova foi pesada com uma balança de precisão (Pesola, Suíça) e o peso convertido em força (1Kg~9,80665 N, F=1,5 N) (VORONETS et al., 2008). Além disso, a força da escovação foi padronizada usando elásticos envolvendo o dispositivo para todos os grupos, esse elástico foi trocado diariamente para a manutenção da força aplicada. As cabeças das escovas de dente foram substituídas diariamente para cada grupo. O protocolo está detalhado na Figura 15.

Figura 12. Recipientes com saliva, coca-cola e dispositivo com os blocos para a realização dos desafios erosivo.

Figura 13. Aplicação da pasta sobre os blocos com auxílio de microbrush.

Figura 14. Escova elétrica fixada no dispositivo para padronizar a força.

Figura 15. Desenho esquemático do protocolo *in vitro* do estudo 1

4.4.2 Estudo 2

Os grupos foram submetidos a 4 ciclos de erosão diários, durante 5 dias, em um recipiente fechado. Cada ciclo foi composto por:

- Erosão pela bebida Coca-Cola® (Coca-Cola Company Spal, Porto Real, RJ, Brasil, pH 2,3, 30 mL/espécime, sem agitação, 25°C) recentemente aberta quatro vezes ao dia durante 90 s cada;

- Lavagem dos blocos em água deionizada, por 5 s;
- Entre a erosão e a abrasão, os blocos foram imersos em 10 mL de água deionizada ou solução de lactato de cálcio 150 mM para cada bloco, por 1 min, sob agitação numa mesa agitadora (Nova técnica NT 145, Piracicaba, SP, Brasil), 2x/dia, no primeiro e último ciclos (antes da escovação);
- Após a imersão em água deionizada ou solução de lactato de cálcio, os blocos foram secos com papel absorvente;
- Nos blocos submetidos apenas à erosão, a solução do dentifrício foi pipetada sobre cada bloco, permanecendo por 10 s (1:3 água, 0,5 mL/bloco), 2x/dia;
- Nos blocos submetidos à abrasão, ela foi realizada por escovação: 10 s com a escova elétrica (Oral-B Pro Saúde Power) e solução do dentifrício correspondente a cada grupo (1:3 água, 0,5 mL/bloco), 2x/dia. As escovas elétricas foram fixadas em um dispositivo que permite que as cabeças das escovas fiquem alinhadas e paralelas à superfície dos blocos. A cabeça da escova foi pesada com uma balança de precisão (Pesola, Suíça) e o peso convertido em força (1Kg~9,80665 N, $F=1,5$ N) (VORONETS et al., 2008). Além disso, a força da escovação foi padronizada usando elásticos envolvendo o dispositivo para todos os grupos. As cabeças das escovas de dente foram substituídas diariamente para cada grupo;
- Lavagem dos blocos em água deionizada, por 5 s;
- Imersão em saliva artificial (pH 6,8, 30 mL/bloco, 25°C) durante 2 h. Após o último tratamento erosivo, os blocos foram estocados de um dia para o outro em saliva artificial. A saliva artificial foi renovada diariamente e continha glicose 0,2 mM, NaCl 9,9 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM, NH_4Cl 3 mM, KCl 17 mM, NaSCN 2 mM, K_2HPO_4 2,4 mM, ureia 3,3 mM, NaH_2PO_4 2,4 mM e ácido ascórbico (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982).

Os dentifrícios placebo e fluoretado foram preparados pela empresa Ice Fresh (Bauru, São Paulo), e tiveram sua concentração de fluoreto analisada com o eletrodo

íon específico, antes de serem utilizados na pesquisa. O protocolo do estudo encontra-se detalhado na Figura 16.

Figura 16. Desenho esquemático do protocolo in vitro do estudo 2

4.5 Seleção dos voluntários

Doze voluntários adultos foram selecionados para participar de cada estudo, todos residentes em área fluoretada (BUZALAF et al., 2013), apresentavam boa saúde geral e saúde bucal.

Os critérios de exclusão considerados na anamnese para a composição da amostra foram: gestantes, fumantes, portadores de lesões de cárie ativa ou desgaste dentário acentuado, trabalhadores em ambientes poluídos por compostos de baixo pH, portadores de doenças sistêmicas, má nutrição, problemas gastro-esofágico, usuários de medicamentos que afetam o fluxo salivar.

Somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (Anexo A), os voluntários tomaram ciência deste estudo ao receberem a “Carta de informação ao voluntário” (Anexo B e C) e então foram obtidas as assinaturas de anuência dos voluntários ao “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”.

Os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato (Jeltrat® Dustless, Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ) para a confecção do modelo de gesso pedra e do aparelho intrabucal palatino em resina acrílica (Jet acrílico auto polimerizante, artigos odontológicos Clássico Ltda, Campo Limpo Paulista, São Paulo), no qual foram realizados 8 nichos (6x6x3 mm), sendo 4 de cada lado (esquerdo e direito), sendo acoplados 2 blocos de esmalte e 2 blocos de dentina radicular bovinos em cada fileira correspondentes ou à erosão ou à erosão+abrasão na mesma altura da resina (Figura 17). A distribuição aleatória dos blocos, nos diferentes grupos, voluntários e posições no aparelho. Para o estudo 1, os voluntários participaram de 4 fases cruzadas e duplo-cegas correspondentes aos tratamentos: pasta experimental 10% HAP, 10% HAP + F, MI paste plus e Placebo. Para o estudo 2, os voluntários participaram de 4 fases cruzadas e duplo-cegas correspondentes aos tratamentos: BCa + DF, BCa + DP, BP + DF e BP + DP.

Figura 17. Aparelho intrabucal palatino em resina acrílica com os blocos dentários posicionados.

4.6 Protocolo *in situ*

4.6.1 Estudo 1

Uma semana antes do início da fase *in situ* e durante os períodos de descanso entre as fases experimentais (“wash out” de 7 dias), os voluntários utilizaram dentifrício fluoretado (Sorriso Fresh Plus, 1.100 ppm F, NaF, sílica), na tentativa de simular o que ocorre em uma situação clínica. O aparelho foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene, para permitir a formação da película adquirida.

Durante os 5 dias de cada fase experimental, os voluntários só removiam o aparelho para a realização de 4 refeições (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 1 h no máximo cada refeição), ocasião em que o dispositivo ficava envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento. O intervalo entre as refeições era de pelo menos 2 a 3 h. Após as refeições, a higiene bucal era realizada com a escova (Bitufo Class 28 extramacia, IPH&C, Itupeva, SP, Brasil), dentifrício (Sorriso Fresh plus, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil) e fio dental (Sanifill, Pocket 25 m, Curitiba, Pr, Brasil) cedidos pelo pesquisador. Na sequência, o aparelho era recolocado na cavidade bucal e os voluntários esperavam 30 minutos para a realização do experimento.

Após os 30 minutos, os voluntários removiam o aparelho da cavidade bucal e imergiam-no *ex vivo*, 4x/dia (aproximadamente às 8 h, 12 h, 16 h e 20 h), em um recipiente contendo 150 mL de um refrigerante à base de cola (Coca-Cola, Spal, Porto Real, RJ, Brasil, pH 2,6) recém aberto, em temperatura ambiente, durante 90 segundos cada e então, lavavam o aparelho em água corrente de torneira por 10 s. No lado da cavidade bucal correspondente à erosão associada à abrasão, a abrasão era realizada através da escovação com escova elétrica (Oral-B® Pro-Saúde Power, Procter & Gamble) e solução de dentifrício fluoretado (1:3 em água, Sorriso, 1.100 ppm F, NaF, sílica), por 10 s cada bloco, 2x/dia. Para tal, os voluntários gotejavam a solução de dentifrício (1 gota/bloco) em todos os blocos e acionavam a escova elétrica sobre os blocos da fileira erosão associada à abrasão, sem exercer força exacerbada, após o primeiro e último desafio erosivo (2x/dia), *ex vivo*. Para a padronização da força de escovação, os voluntários foram treinados em relação à

execução dos procedimentos. Em seguida, removiam o excesso de dentifrício através do enxágue do aparelho.

Após a escovação, o tratamento era realizado através da aplicação de uma quantidade pré-determinada das pastas sobre todos os blocos com a utilização de um cotonete para cada bloco, por 3 minutos (TANTBIROJN et al., 2008), 2x/dia, após o primeiro e último desafios (PULIDO et al., 2008), *ex vivo*. A opção da utilização do cotonete para a aplicação das pastas foi para que houvesse uma padronização na quantidade de pasta aplicada ao bloco pelos voluntários. Para a padronização da quantidade os voluntários mergulhavam a metade da cabeça do cotonete na pasta e realizavam um movimento de 180 graus. A quantidade média de pasta aplicada através deste procedimento era 0,0115 g. O excesso da pasta sobre os blocos era removido com a utilização de um cotonete para cada bloco e o aparelho recolocado na cavidade bucal (Figura 18).

Figura 18. Desenho esquemático do protocolo in situ do estudo 1

Os voluntários foram orientados a usar o aparelho por todo período experimental, removendo-o somente para os experimentos e refeições. Além disso, foram proibidos de usar produtos fluoretados ou antibacterianos, durante a fase *in situ*. Para confirmar que o estudo era cego, as pastas foram colocadas em frascos J10, com identificação por códigos.

Para cada fase, os voluntários recebiam uma escova dental, um refil para a escova elétrica, gaze e a pasta para o tratamento (Figura 19). Na frente de cada kit foram coladas as instruções resumidas dadas aos voluntários para que pudessem segui-las, evitando, assim, qualquer esquecimento (Anexo D). As instruções mais detalhadas foram impressas e também dadas aos voluntários.

O experimento iniciava-se sempre na segunda-feira pela manhã. Assim, o voluntário já dormia com o aparelho na noite do domingo, e a remoção ocorria no sábado pela manhã. Os voluntários entregavam o aparelho utilizado para o pesquisador na segunda pela manhã e então recebiam uma escova dental para utilizá-la na semana de descanso e durante a próxima fase.

Figura 19. A. Kit entregue aos voluntários; B. Kit dentro da embalagem em que foi entregue com as instruções.

4.6.2 Estudo 2

O protocolo foi semelhante ao Estudo 1, porém o dentifrício utilizado durante a semana antes do início da fase *in situ* era o dentifrício correspondente ao tratamento que iria se iniciar, ou seja o placebo Ice Fresh® (Pet's Produtos Alimentícios, Bauru, SP) ou fluoretado (1.100 ppm F, NaF, sílica pH 6,8, Crest - Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA). Ambos os dentifrícios foram colocados em bisnagas iguais para não serem identificados, sendo codificados para posterior identificação, caracterizando um estudo cego. O voluntário foi treinado para padronização da quantidade de dentifrício a ser utilizado para escovação de seus dentes, sendo adotada a técnica transversal (aproximadamente 0,5 g).

A higiene bucal foi realizada com a escova dentária (Oral-B®, Procter & Gamble do Brasil, Louveira, SP, Brasil), dentífrico e fio dental (Oral-B®, Procter & Gamble do Brasil, Louveira, SP, Brasil) cedidos pelo pesquisador.

O desafio abrasivo foi realizado durante 15 s para cada bloco, 2x/dia, após o primeiro e o último desafios erosivos.

Entre os desafios erosivos e abrasivos (2x/dia), com o aparelho posicionado na boca, os voluntários realizaram um bochecho com 10 mL de solução placebo (água deionizada) ou de solução de lactato de cálcio 150 mM, por 1 minuto. Os voluntários não enxaguaram a boca após o bochecho, apenas cuspiram o excesso. A solução foi dada ao voluntário em frascos de 10 mL, sendo utilizado 1 frasco para cada bochecho (Figura 20).

Figura 20. Desenho esquemático do protocolo in situ do estudo 2

Para cada fase, os voluntários receberam uma escova dental, um refil para a escova elétrica, gaze, frascos com a solução de bochecho e a pasta para o tratamento (Figura 21). Como no estudo 1, foram coladas, na frente de cada kit, as instruções dadas aos voluntários (Anexo E).

Figura 21. Kit entregue aos voluntários.

4.7 Análise de perfil

A análise de perfil foi realizada para os 2 estudos.

Nas partes *in vitro* dos estudos, os perfis das superfícies do esmalte e dentina foram obtidos com um perfilômetro (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha) (Figura 22), após o término de cada parte. Já para as partes *in situ*, foram obtidos após todas as fases *in situ*. As áreas controle (protegidas por esmalte cosmético de unha) foram marcadas com lâmina de bisturi, para permitir o exato posicionamento da área controle, caso o esmalte cosmético de unha se destacasse. Se isto ocorresse, imediatamente o pesquisador protegeria a área controle. Em cada leitura, cinco varreduras (2 mm) foram realizadas no centro da superfície do esmalte ou dentina a uma distância de 250 μm cada. Para a determinação da alteração do perfil da superfície após os desafios erosivo/abrasivo *in vitro* e *in situ*, o esmalte cosmético de unha foi removido com auxílio de espátula e de uma solução de acetona (1:1 – acetona:água) para limpeza da superfície, e 5 leituras foram realizadas.

A determinação da profundidade da área sob a curva na região exposta foi medida levando em conta a diferença de altura (μm) entre a área de referência e a exposta para cada varredura e uma média dos cinco valores foi feita (Software Mahr Surf XT20, versão 2009, Mahr, Göttingen, Alemanha).

Figura 22. Perfilômetro (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha) do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP e bloco posicionado para leitura.

4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura associada a espectroscopia de energia dispersiva com detector de raio-x

Essa análise foi realizada apenas para a parte *in situ* do estudo 1. Após os tratamentos e a análise de perfilometria, os blocos de esmalte e dentina de dois voluntários foram cuidadosamente desidratados em concentrações ascendentes de álcool etílico 25%, 50%, 75%, 95%, por 1 h em cada concentração, e adicionalmente em álcool etílico 100% por 2 h. Foram então levados a um dessecador a vácuo contínuo durante um período de dois dias e logo após foram metalizados com cobertura de ouro (Figura 23). Em seguida, todos os blocos foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura-MEV (InspectTM S50, filamento de tungstênio; FEI Company, Hillsboro-Oregon, USA) em que foram avaliados nos modos de imagens de elétrons retro-espalhados (BSE) e elétrons secundários (SE). Assim, fotos digitais foram obtidas com a distribuição das fases formadas nas superfícies tratadas do esmalte. A caracterização química da superfície do esmalte foi realizada pela quantificação dos elementos presentes na superfície em porcentagem (Ca, P, F, Mg, Na, Cl, O e C), utilizando-se um detector de microanálise EDX acoplado ao MEV (Figura 24). Foram realizadas duas microanálises por bloco, em regiões diferentes, e as determinações foram realizadas usando análise quantitativa com correção ZAF (MAGALHAES et al., 2008b).

As análises por MEV-EDS foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural, Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, na cidade de São Carlos-SP.

Fotos digitais foram obtidas nos aumentos de 60, 200, 1.000, 10.000 e 30.000 x de cada amostra e então selecionadas as imagens representativas para os blocos de cada tratamento.

Figura 23. A – Equipamento para metalização dos blocos; B – Blocos metalizados com cobertura de ouro

Figura 24. Detector de microanálise EDS acoplado ao MEV

4.9 Análise estatística

Os dados referentes à superfície do esmalte e dentina foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel. Para análise estatística, foram utilizados os *softwares* GraphPad InStat 2.0 e Software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). Verificou-se se os dados apresentavam distribuição normal e se eram homogêneos (testes de Kolmogorov e Smirnov e teste de Bartlett, respectivamente). O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%

4.9.1. Estudo 1

Para o estudo *in vitro*, no caso do esmalte, os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de desvios-padrão e foram analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais. Já para a dentina, os dados apresentaram distribuição normal mas não houve homogeneidade dos desvios-padrão, mesmo após transformação logarítmica. Devido a isto, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais.

Os resultados da análise de perfil do estudo *in situ* foram analisados pelos testes ANOVA de medidas repetidas e Tukey para comparações individuais. Foram aplicados 4 testes, sendo as condições e substratos analisados separadamente. Esta abordagem foi realizada devido à ausência de diferenças significativas para o esmalte e dentina submetidos à erosão associada à abrasão. Neste caso, não fazia sentido comparar esmalte com dentina e sim os grupos de tratamento para cada substrato, daí a abordagem estatística escolhida.

Os dados das microanálises foram tabulados em planilhas do Excel e as médias e desvios-padrão das porcentagens de cada elemento presente na superfície de cada amostra foram calculados.

Para as análises dos elementos Ca, P, F, Mg, Na, Cl, O e C, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

4.9.2. Estudo 2

Na parte *in vitro*, os blocos de esmalte e dentina submetidos à erosão associada à abrasão foram analisados pelo teste ANOVA. Os blocos de esmalte submetidos apenas à erosão foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey para comparações individuais e para os blocos de dentina na mesma condição, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o de Dunn para comparações individuais.

Os resultados da análise de perfil do estudo *in situ* foram analisados pelos teste ANOVA a dois critérios (condição e tratamento) de medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni para comparações individuais, individualmente para esmalte e dentina.

5 Resultados e Discussões

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As condições erosivas provocaram visualmente uma alteração na superfície dos blocos dentários expostos, sendo que a diferença de brilho entre as superfícies desgastadas e protegidas por esmalte cosmético pôde ser observada a olho nu. O gráfico produzido pelo perfilômetro confirma essa observação clínica, já que pôde ser visto um degrau formado entre as áreas controle e a que passou pela ciclagem erosiva (Figura 25).

Figura 25. A - Gráfico obtido através do perfilômetro; B – Gráfico transformado em linhas e com os pontos para a medição

5.1. Avaliação do efeito de pastas à base de hidroxiapatita (nanopartículas de fosfato de cálcio) sobre a erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovinos *in vitro* e *in situ*.

Optou-se por utilizar a MI Paste como controle positivo no estudo 1 pelo fato de a mesma possuir na sua composição o CPP-ACP. Os fosfopeptídeos de caseína (CPP) estabilizam o Ca e o fosfato, preservando-os numa forma amorfa ou solúvel, conhecida como fosfato de cálcio amorfo (ACP). Seu mecanismo de ação se baseia no fato de o Ca e o fosfato serem componentes essenciais do esmalte e dentina, formando complexos altamente insolúveis. Entretanto, na presença do CPP eles permanecem solúveis e biologicamente ativos. Os complexos CPP-ACP podem ser aplicados nos dentes na forma de gomas de mascar, pastas (como a MI Paste),

soluções para bochecho ou *sprays*, tendo sido amplamente testados na literatura, principalmente no que diz respeito ao seu potencial cariostático, tanto em estudos *in vitro* como *in situ* e clínicos (para revisão, ver (LLENA; FORNER; BACA, 2009)). Uma revisão sistemática com meta-análise relatou o efeito remineralizador do CPP-ACP (YENGOPAL; MICKENAUTSCH, 2009). Assim, quando se pretende testar um produto cujo princípio ativo contenha cálcio e fosfato, como é o caso da pasta experimental, a MI Paste, por ser composta à base de CPP-ACP, parece ser o produto ideal.

As nanopartículas de hidroxiapatita são consideradas um dos materiais mais biocompatíveis e bioativos. Elas são amplamente aplicadas na medicina e na odontologia como um substituto do osso e para a remineralização de lesões de cárie dentária (HUANG, S. et al., 2011; HUANG; GAO; YU, 2009; TSCHOPPE et al., 2011). As nanopartículas possuem morfologia, estrutura e cristalinidade semelhantes à apatita dentária (VANDIVER et al., 2005). Pastas com diferentes concentrações de nanopartículas de hidroxiapatita (1%, 5%, 10% e 15%) têm mostrado serem efetivas quando comparadas a grupo sem tratamento em protocolos envolvendo desafio cariogênico, sendo que a concentração que apresentou melhor efetividade na remineralização do esmalte foi a 10% de nano-hidroxiapatita (HUANG; GAO; YU, 2009). Em relação à utilização de nanopartículas de hidroxiapatita para prevenção da erosão dentária, o estudo de Min, Kwon e Kim, (2011) concluiu que a erosão foi eficazmente prevenida com a adição de nanopartículas de hidroxiapatita a 0,25%.

No estudo 1 *in vitro* foram testadas 2 concentrações de nanopartículas, isoladamente ou em combinação com duas concentrações de F. Os resultados em relação ao desgaste médio das superfícies erodidas (esmalte e dentina) submetidas a desafios erosivos com refrigerante tipo cola e abrasivos e tratadas com diferentes pastas remineralizantes ou não são mostrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Para o esmalte, a ANOVA detectou diferenças significantes entre os grupos ($F=9,74$, $p<0,0001$). Todos os tratamentos diferiram significativamente do controle, que apresentou a maior média de desgaste ($3,77 \pm 0,71 \mu\text{m}$). No entanto, apenas as pastas contendo 10% HAP e 20% HAP reduziram significativamente a perda de esmalte em comparação com placebo. A adição de F na pasta experimental reduziu seu efeito preventivo sobre a erosão e abrasão, apesar da diferença não ter sido significativa quando comparada com a pasta contendo apenas HAP. O aumento na

concentração de HAP nas pastas experimentais não foi capaz de aumentar seu efeito preventivo sobre a erosão associada à abrasão (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μ m) do esmalte submetido a desafios erosivos (com refrigerante tipo cola) e abrasivos e tratado com diferentes pastas remineralizantes ou não *in vitro*.

Erosão associada à Abrasão	
Esmalte	
Tratamentos	Desgaste médio
Controle	3,77 $\pm$ 0,71 c
Placebo	2,73 $\pm$ 0,67 b
10% HAP	1,85 $\pm$ 0,44 a
20% HAP	1,84 $\pm$ 0,51 a
0,2% NaF	2,32 $\pm$ 0,52 ab
10% HAP + 0,2% NaF	2,12 $\pm$ 0,57 ab
20% HAP + 0,2% NaF	2,41 $\pm$ 0,47 ab
20% HAP + 2% NaF	2,60 $\pm$ 0,41 ab
2% NaF	2,87 $\pm$ 0,65 b
MI Paste	2,28 $\pm$ 0,49 ab
MI Paste Plus	2,37 $\pm$ 0,27 ab

n=10. Valores seguidos por letras distintas indicam diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Já para os blocos de dentina, o perfil foi diferente quando comparado com o visto para o esmalte. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos (KW=90,98, $p < 0,0001$). O menor desgaste foi observado quando as pastas contendo 2% NaF foram utilizadas, independentemente da presença de HAP (1,68 $\pm$ 0,40 e 1,89 $\pm$ 0,32 μ m para as pastas contendo 20% HAP + 2% NaF e 2% NaF, respectivamente). Apesar destas pastas terem levado a um desgaste cerca de duas vezes menor que o observado para as pastas experimentais contendo 0,2% NaF (3,24 $\pm$ 0,64 μ m) e 10% HAP + 0,2% NaF (4,13 $\pm$ 0,63 μ m), a diferença não apresentou significância estatística. Os tratamentos realizados com estas quatro pastas experimentais foram os únicos que diferiram significativamente daqueles feitos com o controle (6,63 $\pm$ 0,96 μ m). As pastas experimentais contendo 20% HAP

+ 2% NaF, 2% NaF e 0,2% NaF reduziram significativamente o desgaste quando comparadas com a placebo ($6,47 \pm 1,51 \mu\text{m}$). As pastas MI paste ($5,71 \pm 0,42 \mu\text{m}$) e MI paste plus ($6,88 \pm 0,62 \mu\text{m}$) não diferiram do placebo e do controle (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) e da mediana da dentina submetida a desafios erosivos com refrigerante tipo cola e abrasivos e tratada com diferentes pastas remineralizantes ou não *in vitro*.

Erosão associada à Abrasão	
Dentina	
Tratamentos	Desgaste médio (μm) $\pm$ Desvio padrão Mediana
Controle	$6,63 \pm 0,96$ 6,63 a
Placebo	$6,47 \pm 1,51$ 6,56 ab
10% HAP	$5,19 \pm 1,44$ 5,54 abc
20% HAP	$4,78 \pm 0,53$ 4,90 abcd
0,2% NaF	$3,24 \pm 0,64$ 3,43 cd
10% HAP + 0,2% NaF	$4,13 \pm 0,63$ 4,17 bcd
20% HAP + 0,2% NaF	$4,61 \pm 0,60$ 4,58 abcd
20% HAP + 2% NaF	$1,68 \pm 0,40$ 1,59 d
2% NaF	$1,89 \pm 0,32$ 1,86 d
MI Paste	$5,71 \pm 0,42$ 5,59 ab
MI Paste Plus	$6,88 \pm 0,62$ 7,13 a

n=10. Valores seguidos por letras distintas indicam diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

A parte *in vitro* desse estudo mostrou efeito protetor das nanopartículas de HAP sobre o esmalte, independentemente da sua concentração, o que está de acordo com outros estudos *in vitro* que também encontraram o mesmo resultado (KARGUL; ALTINOK; WELBURY, 2012; PANICH; POOLTHONG, 2009; RANJITKAR et al., 2009a; TANTBIROJN et al., 2008). Pode ser que para o esmalte, tenha ocorrido uma deposição dos íons cálcio e fosfato na superfície, assim, tornando o esmalte mais resistente ao ataque erosivo/abrasivo.

Já para a dentina, o efeito protetor parece ter sido devido à presença de F, de forma dose-dependente, sendo que o melhor efeito foi encontrado quando as pastas contendo 2% NaF foram utilizadas, independente da presença de nanopartículas de HAP. Sabe-se que o efeito preventivo do F na erosão da dentina parece ser dependente da presença da matriz orgânica (GANSS et al., 2010; HARA et al., 2005; MAGALHAES et al., 2011b). A matriz orgânica desmineralizada da dentina pode ser degradada quimicamente pelas MMPs que estão presentes na dentina ou na saliva (TJÄDERHANE et al., 1998). Tem sido relatado que a utilização de inibidores de MMPs, como o EGCG e a clorexidina, é capaz de reduzir a progressão da erosão em dentina, por preservar a matriz orgânica desmineralizada (BUZALAF et al., 2012). Em estudos empregando estes inibidores, o NaF foi empregado como controle, devido ao efeito remineralizador conhecido do F. Entretanto, um gel à base de NaF foi capaz de evitar a degradação da matriz orgânica desmineralizada por collagenase bacteriana (KATO et al., 2012). Devido a isto, pensou-se que talvez o NaF pudesse ter um efeito como inibidor de proteases, o que foi confirmado num estudo recente, no qual o NaF foi incluso no tampão de zimografia (KATO et al., 2013). Estes resultados podem ajudar a explicar porque a ação do F para evitar a erosão da dentina é dependente da manutenção da camada orgânica desmineralizada, porém como esse mecanismo funciona ainda precisa ser pesquisado.

Os resultados obtidos na parte *in situ* do estudo com as pastas de nanopartículas estão representados na tabela 3, que mostra os valores médios de desgaste obtidos no esmalte e dentina bovinos submetidos à erosão e erosão associada à abrasão.

Para a erosão do esmalte, a ANOVA de medidas repetidas encontrou diferenças significativas entre os tratamentos ($F=3,58$, $p=0,024$). O teste de Tukey

revelou que apenas o tratamento 10% HAP ($3,23 \pm 1,06 \mu\text{m}$) diferiu significativamente do placebo ($4,95 \pm 1,46 \mu\text{m}$), sendo que para as demais comparações não houve diferenças significativas.

Já para a erosão em dentina, a ANOVA de medidas repetidas também detectou diferenças significativas entre os tratamentos ($F=3,41$, $p=0,0287$). A única diferença significativa foi encontrada entre os grupos que apresentaram o menor (MI paste plus; $0,99 \pm 1,23 \mu\text{m}$) e o maior desgaste (10% HAP + 0,2% NaF; $2,48 \pm 1,60 \mu\text{m}$), sendo que para as demais comparações não houve diferença significativa.

No caso da erosão associada à abrasão, tanto para o esmalte como para a dentina, não houve diferenças significativas entre os grupos ($F=0,552$, $p=0,650$ e $F=1,408$, $p=0,258$, respectivamente).

Tabela 3. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão e erosão associada à abrasão e tratados com diferentes pastas remineralizantes ou não *in situ*.

Tratamentos	Erosão		Erosão + Abrasão	
	Desgaste Médio (μm)		Desgaste Médio (μm)	
	Esmalte	Dentina	Esmalte	Dentina
MI paste plus	$3,92 \pm 1,32$ ab	$1,30 \pm 0,60$ a	$2,95 \pm 1,74$ a	$1,51 \pm 0,85$ a
10% HAP + 0,2% NaF	$3,81 \pm 0,99$ ab	$2,48 \pm 1,60$ b	$3,57 \pm 1,13$ a	$2,06 \pm 1,13$ a
10% HAP	$3,23 \pm 1,06$ b	$2,18 \pm 1,01$ ab	$3,55 \pm 1,51$ a	$2,08 \pm 0,82$ a
Placebo	$4,95 \pm 1,46$ a	$2,36 \pm 0,91$ ab	$3,66 \pm 1,43$ a	$2,17 \pm 0,71$ a

Valores seguidos por letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas (ANOVA de medidas repetidas e Tukey, $p<0,05$). $n=12$.

Os resultados do estudo *in situ* com as pastas de nanopartículas de Ca e P (hidroxiapatita) para a erosão do esmalte nos mostraram que os melhores resultados foram encontrados com o tratamento 10% HAP ($3,23 \pm 1,06 \mu\text{m}$) que diferiu significativamente do placebo ($4,95 \pm 1,46 \mu\text{m}$), ou seja, o maior efeito preventivo parece ter sido devido à presença de HAP, independentemente da presença de F, o

que está de acordo com alguns trabalhos (HUANG, S.B.; GAO; YU, 2009; MIN; KWON; KIM, 2011) e de certa forma concorda com a parte *in vitro* do presente trabalho (Tabela 1), embora os dados *in vitro* sejam correspondentes à erosão associada à abrasão. Convém ressaltar que a MI Paste Plus não apresentou potencial protetor contra a erosão em esmalte, diferentemente do relatado na literatura (PIEKARZ et al., 2008; RANJITKAR et al., 2009a), mas vindo de encontro a outros achados da literatura (WEGEHAUPT et al., 2012). Estes achados contraditórios podem ser explicados pela diferença entre os protocolos empregados nos diferentes estudos.

Já para a erosão em dentina, o melhor resultado foi o tratamento MI paste plus ($1,30 \pm 0,60 \mu\text{m}$), que, entretanto, não diferiu do grupo placebo ($2,36 \pm 0,91 \mu\text{m}$), indicando que o CPP-ACP mostrou uma tendência para ser mais efetivo que o placebo, embora a diferença não tenha sido significativa. Talvez um delineamento experimental incluindo um número amostral maior pudesse detectar diferenças significativas entre o grupo placebo e o grupo da MI Paste Plus, uma vez que a diferença numérica entre ambos é da ordem de 70%. Por outro lado, os resultados *in situ* para a dentina indicam que as nanopartículas de HAP parecem não ser efetivas para reduzir a erosão deste substrato.

No caso da erosão associada à abrasão tanto para o esmalte como para a dentina não houve diferenças significativas entre os grupos. A razão para isto pode ter sido o fato do dentifrício fluoretado ter contribuído para a redução da erosão como pode ser observado em estudos (MAGALHAES et al., 2008d; RIOS et al., 2008b), mascarando o efeito dos tratamentos com as pastas. Quando se observa a tabela 3, pode-se observar que os valores de desgaste observados para a condição er+abr foram em geral mais baixos que aqueles encontrados para a condição er apenas. Assim, a pequena diferença entre os diferentes tratamentos que foi observada para a condição er apenas parece ter sido “diluída” pela ação do dentifrício fluoretado. Ressalte-se que a opção por utilizar dentifrício fluoretado no estudo *in situ* foi para simular o que ocorreria na condição clínica, uma vez que as pastas contendo nanopartículas não são indicadas para escovação, e sim para aplicação tópica. No estudo de erosão associada à abrasão *in vitro*, o melhor efeito para a dentina foi obtido com a utilização de pastas contendo NaF, independentemente da presença de nanopartículas de HAP, sendo que foi observada dose-resposta, ou seja, as pastas contendo NaF 2% foram as que

apresentaram os melhores efeitos. A grande vantagem dos protocolos *in vitro* é, sem dúvida, a possibilidade de se testarem vários tratamentos, o que já é uma limitação dos estudos *in situ*. Conforme o delineamento do presente estudo, para reduzir o número de fases experimentais no estudo *in situ*, os voluntários utilizaram os dispositivos de acrílico contendo blocos de dentina e esmalte ao mesmo tempo, de forma que tivemos que selecionar, para a fase *in situ*, tratamentos que apresentassem os melhores resultados para ambos os substratos dentários na fase *in vitro*. Para o esmalte, os melhores resultados foram obtidos para as pastas contendo 10 e 20% HAP (que tiveram performance bastante similar uma à outra), enquanto que para a dentina, as pastas contendo 2% NaF foram as que deram os melhores resultados. Por estes dados apenas seria difícil escolher os tratamentos a serem testados na fase *in situ*, uma vez que a eficácia dos tratamentos foi diferente para esmalte e dentina. Outro fator levado então em conta foi a indicação de uso dos produtos, ou seja, optamos por avaliar pastas indicadas para uso caseiro, que são aquelas sem F ou com baixa concentração deste elemento. Desta maneira, as pastas testadas *in situ* foram 10% HAP e 10% HAP + 0,2% NaF. A seleção da pasta 10% HAP + 0,2% NaF permitiu uma comparação mais fácil com a pasta controle MI Paste Plus, que tem a mesma concentração de NaF. É possível que se tivesse sido utilizada no estudo *in situ* uma pasta experimental contendo 2% NaF, poderiam ter sido encontrados melhores resultados pelo menos para a dentina, o que merece ser testado em estudos futuros.

A análise por microscopia eletrônica de varredura associada à espectroscopia de energia dispersiva com detector de raio-x foi realizada e através das imagens geradas pelo MEV não foi possível verificar diferenças entre as condições, para o mesmo tratamento. A observação da superfície das áreas erodidas para ambas as condições e substratos mostrou que não houve deposição de material sobre a superfície erodida (Figuras 26 e 27). No caso dos blocos de dentina, não houve obstrução dos túbulos dentinários. Essas imagens estão de acordo com os resultados obtidos pela análise por perfilometria, exceto para o grupo 10% HAP, na condição de erosão, que pela análise por perfilometria diferiu do placebo e através das imagens do MEV não podemos observar essa diferença.

Figura 26. Imagens representativas, obtidas por MEV da superfície do esmalte dos diferentes grupos e condições (erosão e erosão+abrasão) *in situ*, com aumento de 30.000x.

Figura 27. Imagens representativas, obtidas por MEV da superfície da dentina dos diferentes grupos e condições (erosão e erosão+abrasão), *in situ* com aumento de 30.000x.

Em relação aos elementos encontrados sobre a superfície das amostras (microanálise por EDS), as alterações entre os grupos de tratamentos foram vistas para os elementos Ca e P, apenas na dentina, entre os grupos MI paste plus e 10% HAP + 0,2% NaF, quando ela foi submetida ao desafio erosivo associado ao abrasivo, porém esses grupos não diferiram do placebo (Tabela 4). Na dentina submetida à erosão associada abrasão (Tabela 5), as porcentagens de Ca e P foram significativamente maiores para o grupo 10% HAP + 0,2% NaF do que para o grupo MI paste plus. Entretanto, a diferença entre esses grupos só foi vista nessa condição e para a dentina, sugerindo que pode ser uma variabilidade existente nos próprios blocos dentários.

Tabela 4. Média (desvio-padrão) e mediana da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte submetidos à erosão e erosão associada à abrasão tratadas com diferentes pastas remineralizantes ou não in situ

EROSÃO								
	C	O	F	Na	Mg	P	Cl	Ca
MI paste plus	19,33	41,80	0,38	1,26	0,42	18,12	0,44	18,11
	(2,51)	(1,75)	(0,19)	(0,14)	(0,09)	(0,36)	(0,06)	(0,37)
	19,57a	41,75a	0,38a	1,29a	0,48a	18,19a	0,45a	18,13a
10% HAP + 0,2% NaF	20,40	41,24	0,47	1,21	0,48	17,80	0,41	17,79
	(4,75)	(2,05)	(0,14)	(0,24)	(0,13)	(1,22)	(0,07)	(1,37)
	18,65a	41,75a	0,50a	1,33a	0,55a	18,27a	0,36a	18,61a
10% HAP	23,67	39,31	0,23	1,51	0,56	17,09	0,36	17,27
	(2,88)	(1,42)	(0,17)	(0,18)	(0,05)	(0,73)	(0,07)	(1,14)
	23,67a	39,91a	0,29a	1,58a	0,52a	16,94a	0,31a	16,79a
Placebo	20,15	41,18	0,42	1,26	0,47	18,06	0,44	18,04
	(3,38)	(0,89)	(0,11)	(0,12)	(0,03)	(1,02)	(0,06)	(1,51)
	19,07a	41,04a	0,45a	1,29a	0,49a	18,46a	0,44a	18,76a
EROSÃO ASSOCIADA À ABRASÃO								
	C	O	F	Na	Mg	P	Cl	Ca
MI paste plus	18,93	42,09	0,56	1,55	0,70	19,13	0,54	16,51
	(3,17)	(1,88)	(0,26)	(0,22)	(0,18)	(0,89)	(0,10)	(0,87)
	17,72a	42,33a	0,52a	1,49a	0,77a	19,39a	0,54a	16,71a
10% HAP + 0,2% NaF	19,55	39,68	0,27	1,37	0,54	18,44	0,46	17,72
	(3,36)	(1,57)	(0,07)	(0,18)	(0,09)	(1,05)	(0,07)	(0,88)
	17,78a	41,43a	0,71a	1,40a	0,60a	19,92a	0,47a	17,45a
10% HAP	19,55	39,68	0,27	1,37	0,53	18,44	0,39	19,78
	(3,36)	(1,57)	(0,07)	(0,18)	(0,09)	(1,05)	(0,12)	(2,46)
	18,27a	39,57a	0,27a	1,40a	0,55a	18,93a	0,41a	19,84a
Placebo	18,29	41,98	0,39	1,36	0,59	18,49	0,39	18,52
	(0,87)	(1,14)	(0,10)	(0,12)	(0,23)	(0,35)	(0,06)	(0,99)
	18,32a	41,63a	0,41a	1,33a	0,56a	18,48a	0,38a	18,52a

* Para as análises dos elementos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna apontam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento na mesma condição.

Tabela 5. Média (desvio-padrão) e mediana da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de dentina submetidas à erosão e erosão associada à abrasão tratadas com diferentes pastas remineralizantes ou não in situ

EROSÃO								
	C	O	F	Na	Mg	P	Cl	Ca
MI paste plus	35,15	37,78	0,84	0,86	0,85	13,04	0,08	11,40
	(5,48)	(2,76)	(0,10)	(0,26)	(0,09)	(1,26)	(0,06)	(1,17)
	36,16a	37,48a	0,84a	0,87a	0,88a	12,69a	0,10a	11,01a
10% HAP + 0,2% NaF	33,82	38,02	1,27	0,88	1,07	13,37	0,02	11,56
	(6,09)	(2,81)	(0,39)	(0,11)	(0,09)	(1,44)	(0,02)	(1,50)
	33,47a	38,00a	1,18a	0,90a	1,09a	13,51a	0,01a	11,78a
10% HAP	36,64	37,44	0,99	1,19	1,13	12,18	0,04	10,44
	(1,23)	(1,13)	(0,07)	(0,19)	(0,14)	(0,34)	(0,02)	(0,43)
	36,82a	37,66a	0,99a	1,18a	1,09a	11,91a	0,03a	10,39a
Placebo	31,66	39,52	1,10	0,92	0,85	14,11	0,07	11,78
	(2,85)	(1,75)	(0,28)	(0,17)	(0,06)	(0,57)	(0,03)	(0,53)
	32,34a	39,16a	0,97a	0,89a	0,86a	14,22a	0,08a	11,84a
EROSÃO ASSOCIADA À ABRASÃO								
	C	O	F	Na	Mg	P	Cl	Ca
MI paste plus	35,18	38,26	1,27	1,06	1,21	13,54	0,11	9,38
	(3,36)	(1,64)	(0,21)	(0,26)	(0,32)	(0,78)	(0,07)	(0,60)
	35,62a	37,88a	1,34a	1,11a	1,19a	13,59a	0,10a	9,46a
10% HAP + 0,2% NaF	25,66	38,90	1,64	1,48	1,54	17,15	0,12	13,50
	(1,71)	(1,31)	(0,46)	(0,23)	(0,21)	(1,14)	(0,07)	(1,67)
	26,23a	39,16a	1,61a	1,55a	1,48a	16,75b	0,15a	12,81b
10% HAP	29,34	39,64	0,98	1,28	1,39	14,56	0,04	12,78
	(5,34)	(2,55)	(0,51)	(0,39)	(0,14)	(1,35)	(0,03)	(1,17)
	27,05a	40,63a	0,96a	1,31a	1,40a	15,15ab	0,04a	12,74ab
Placebo	28,24	40,43	1,41	1,12	1,04	15,43	0,02	12,30
	(2,50)	(0,92)	(0,35)	(0,16)	(0,08)	(0,85)	(0,02)	(0,96)
	27,71a	40,67a	1,36a	1,18a	1,02a	15,47ab	0,02a	12,20ab

* Para as análises dos elementos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna apontam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento na mesma condição.

A fim de permitir uma melhor interpretação dos resultados do presente estudo, foi realizada a análise bioquímica do cálcio e fosfato disponíveis nas pastas avaliadas (dados não mostrados). Os resultados mostraram que a quantidade dos mesmos é bastante reduzida quando comparada àquela presente na pasta placebo, enquanto que quantidades expressivamente maiores destes íons são observadas nas pastas MI Paste e MI Paste Plus. Talvez por este motivo as pastas não tenham sido eficientes para a prevenção da erosão associada ou não à abrasão, já que talvez não tenham fornecido cálcio e fosfato livres em quantidades suficientes para que o organismo os reorganizasse na forma de hidroxiapatita.

Em resumo, os dados obtidos neste estudo, quando analisados em conjunto, sugerem que, dentre os tratamentos preventivos testados, apenas a pasta contendo 10% HAP apresenta um efeito protetor contra a erosão do esmalte. Para a erosão da dentina, bem como para a erosão associada à abrasão para ambos os substratos, as pastas experimentais não parecem ter potencial protetor, a menos que sejam associadas a alta concentração de F (2% NaF), o que poderia proteger a dentina, embora seja necessário que isto seja confirmado utilizando protocolo *in situ*.

5.2 Avaliação do efeito de um bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de dentifrício fluoretado na erosão e abrasão do esmalte e dentina radicular bovino *in vitro* e *in situ*.

A tabela 6 mostra os valores médios de desgaste obtidos no esmalte e dentina bovinos submetidos à erosão e tratamentos com bochecho de cálcio ou não e dentifrício fluoretado ou não *in vitro*. A ANOVA encontrou diferenças significativas entre os grupos para os blocos de esmalte ($F=6,384$, $p=0,0008$). O teste de Tukey revelou que o tratamento BCa + DF ($2,07\pm0,77$ μm) foi o único que diferiu significativamente do BP + DP ($3,19\pm0,87$ μm). Para a dentina, o teste de Kruskal-Wallis também encontrou diferenças significativas entre os grupos ($KW=37,420$, $p<0,0001$). O teste de Tukey revelou que os tratamentos BCa + DF ($2,40\pm0,33$ μm) e BP + DF ($2,62\pm0,37$ μm) diferiram significativamente do BP + DP ($4,20\pm0,93$ μm), ou seja na presença de dentifrício fluoretado, independentemente do bochecho, houve uma redução significativa do desgaste.

Tabela 6. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão e bochecho de lactato de cálcio ou não *in vitro*.

Tratamentos	Erosão	
	Esmalte	Dentina
	Desgaste Médio (μm)	Desgaste Médio (μm) Mediana
BCa + DF	2,07 $\pm$ 0,77 a	2,40 $\pm$ 0,33 2,41 a
BP + DF	2,60 $\pm$ 0,56 ab	2,62 $\pm$ 0,37 2,59 ab
BCa + DP	2,84 $\pm$ 0,65 b	2,98 $\pm$ 0,31 3,02 bc
BP + DP	3,19 $\pm$ 0,87 b	4,20 $\pm$ 0,93 4,18 c

Valores seguidos por letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas. ANOVA (esmalte) e Kruskal-Wallis (dentina), $p < 0,05$. $n=15$

A tabela 7 mostra os valores médios de desgaste obtidos para os blocos de esmaltes e dentina submetidos à erosão associada à abrasão e tratamentos com bochecho de cálcio ou não e dentifrício fluoretado ou não *in vitro*. Não houve diferenças significativas entre os grupos para ambos esmalte e dentina ($F=2,242$, $p=0,094$ e $F=0,814$, $p=0,492$, respectivamente).

Tabela 7. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) do esmalte e da dentina submetidos à erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não *in vitro*.

Tratamentos	Erosão + Abrasão	
	Desgaste Médio (μm)	
	Esmalte	Dentina
BCa + DF	3,79 $\pm$ 0,90	3,03 $\pm$ 0,64
BP + DF	3,63 $\pm$ 0,76	3,53 $\pm$ 0,85
BCa + DP	4,07 $\pm$ 0,93	3,36 $\pm$ 0,93
BP + DP	4,44 $\pm$ 1,08	3,33 $\pm$ 1,09

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$). $n=15$.

As tabelas 8 e 9 mostram os valores médios de desgaste obtidos para os blocos de esmalte e dentina, respectivamente, submetidos à erosão e à erosão associada à abrasão e tratamentos com bochecho de cálcio ou não e dentifrício fluoretado ou não *in situ*, respectivamente. Para esmalte, a ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos ($F=0,868$, $p=0,4624$), mas sim entre as condições ($F=13,26$, $p=0,0014$), não havendo interação significativa entre ambos ($F=0,307$, $p=0,8203$). Apesar de na condição erosão associada à abrasão o desgaste ter sido maior que aquele observado na condição erosão apenas (Tabela 8), o teste de Bonferroni não detectou significância estatística entre as condições, para nenhum dos tratamentos.

O mesmo perfil foi observado para a dentina, ou seja, a ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos ($F=0,119$, $p=0,9486$), mas sim entre as condições ($F=6,966$, $p=0,0115$), não havendo interação significativa entre ambos ($F=0,599$, $p=0,6191$). Da mesma maneira que para o esmalte, apesar de na condição erosão associada à abrasão o desgaste ter sido maior que aquele observado na condição erosão apenas (Tabela 9), o teste de Bonferroni não detectou significância estatística entre as condições, para nenhum dos tratamentos.

Tabela 8. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) do esmalte submetido à erosão ou erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não *in situ*.

Tratamentos	Esmalte	
	Desgaste Médio (μm)	
	Erosão	Erosão e Abrasão
BCa + DF	2,09 $\pm$ 0,87	2,56 $\pm$ 1,24
BP + DF	2,07 $\pm$ 0,70	3,04 $\pm$ 1,17
BCa + DP	1,74 $\pm$ 0,56	2,56 $\pm$ 0,81
BP + DP	2,07 $\pm$ 1,46	3,01 $\pm$ 1,06

Não foram detectadas diferenças significativas (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas e teste de Bonferroni, $p>0,05$). $n=12$.

Tabela 9. Valores de desgaste médio ($\pm$ dP, μm) da dentina submetida à erosão ou erosão associada à abrasão e bochecho de lactato de cálcio ou não *in situ*.

Tratamentos	Dentina	
	Desgaste Médio (μm)	
	Erosão	Erosão e Abrasão
BCa + DF	2,13 $\pm$ 0,56	3,00 $\pm$ 0,90
BP + DF	2,46 $\pm$ 1,12	2,55 $\pm$ 1,05
BCa + DP	2,28 $\pm$ 0,56	2,91 $\pm$ 0,83
BP + DP	2,13 $\pm$ 1,02	2,82 $\pm$ 0,67

Não foram detectadas diferenças significativas (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas e teste de Bonferroni, $p > 0,05$). $n=12$.

Quando a utilização de produtos ricos em cálcio é associada aos dentifrícios fluoretados há que se considerar o papel do fluoreto cálcio (CaF_2) ou material semelhante ao CaF_2 contaminado com fosfato, que é o maior produto de reação durante o tratamento tópico com F dos tecidos dentais mineralizados. O CaF_2 é formado não só na superfície, mas também no interior do esmalte, sendo que a concentração mínima de F para a formação do CaF_2 ainda não é bem conhecida e pode depender da disponibilidade de Ca a partir do fluido do biofilme ou mesmo da dissolução dos tecidos dentais mineralizados. Além disto, a adsorção superficial de F aos cristais pode elevar as concentrações locais, atingindo-se os níveis necessários para a formação de CaF_2 . Tem-se sugerido que o CaF_2 atue como um reservatório de F controlado pelo pH. O fosfato e proteínas, são os responsáveis por este controle e estabilizariam o CaF_2 em pH neutro. Em pHs mais baixos, os grupamentos fosfato se ligam a prótons, o que provoca dissolução do CaF_2 , levando a uma liberação de íons Ca e F, que podem acelerar a remineralização e inibir a desmineralização. O aumento da concentração de F do agente e do tempo de exposição a ele, ou o uso de um agente com baixo pH, uma vez que o CaF_2 formado em pH mais baixo contém menos fosfato interno e é menos solúvel, são fatores que aumentam a formação de CaF_2 (OGAARD, 2001; ROLLA, 1988; TEN CATE, 1997).

No estudo *in vitro* no esmalte bovino submetido à erosão apenas, o tratamento BCa + DF ($2,07 \pm 0,77 \mu\text{m}$) diferiu estatisticamente do BP + DP ($3,19 \pm 0,87 \mu\text{m}$), o que sugere que a utilização do bochecho de cálcio possa ter aumentado o reservatório de CaF_2 sobre a superfície dentária, e que ele foi capaz de servir como

uma barreira mecânica para a difusão dos ácidos durante o desafio erosivo. Seria interessante avaliar a concentração de F álcali-solúvel formado sobre estes blocos de esmalte, a fim de se comprovar esta hipótese.

Já para os blocos de dentina submetidos à erosão *in vitro*, observou-se que os tratamentos com dentifrício fluoretado (BCa + DF; $2,40 \pm 0,33 \mu\text{m}$ e BP + DF; $2,62 \pm 0,37 \mu\text{m}$) diferiram do duplo placebo (BP + DP; $4,20 \pm 0,93 \mu\text{m}$), sem efeito adicional do bochecho de cálcio. Na dentina, como mencionado anteriormente, o efeito do F poderia ser não só apenas interferindo nas reações de des e remineralização, mas possivelmente também auxiliando na preservação da matriz orgânica desmineralizada, conforme sugerido por Kato et al. (2013), embora este novo mecanismo de ação recentemente proposto deva ser melhor estudado, especialmente se o mesmo ocorre para concentrações de F como aquelas presentes no dentifrício utilizado no presente estudo.

Entretanto, quando os blocos de esmalte e dentina foram submetidos à erosão associada à abrasão *in vitro*, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para ambos. Talvez o reservatório de CaF_2 sobre a superfície dentária não tenha sido suficiente para servir como uma barreira mecânica à ação da escovação, visto que a concentração e a frequência do fluoreto foi baixa.

Os resultados do estudo *in situ* mostraram que, nas condições experimentais avaliadas, nenhum dos tratamentos foi eficaz para a prevenção do desgaste dentário. Seria esperado que houvesse diferença significativa entre os grupos BP + DP e BP + DF, ou seja, que o dentifrício fluoretado tivesse uma maior capacidade preventiva do desgaste dentário, como foi relatado por Magalhães et al. (2007). A provável causa para a ausência de diferença significativa no presente estudo pode ser devida ao diferente protocolo experimental utilizado. Em ambos os estudos foi empregado um protocolo *in situ* utilizando dentes bovinos sendo os desafios erosivos foram em geral similares. Em ambos os estudos foi utilizada imersão dos dispositivos acrílicos em Coca-Cola, sendo que no estudo de Magalhães et al. (2007), foram feitas 4 imersões de 5 min nesta bebida por 7 dias, enquanto que no presente estudo foram 4 imersões de 90 s por dia durante 5 dias. No presente estudo a abrasão foi conduzida com escova elétrica e *slurry* do dentifrício já o estudo de Magalhães et al. (2007) não utilizou escova elétrica e *slurry* do dentifrício, mas escova manual com 30 cursos de escovação e uma porção do dentifrício (0,3 g), desta forma tanto o desafio erosivo como abrasivo foi mais severo. No presente

estudo, a baixa frequência de escovação com o slurry e o curto período de exposição e podem ter sido as causas da ausência de diferença entre o DF e o DP na fase *in situ*.

O dentifrício fluoretado utilizado foi o Crest cavity protection que tem como agente de ligação do Ca o surfactante lauril sulfato de sódio (LSS), que pode ter precipitado algum depósito adicional de Ca na superfície dentária após o bochecho com solução de lactato de cálcio. Porém, após o enxague do dentifrício das amostras, a água pode ter removido os reservatórios de Ca e F da superfície dentária antes que eles tenham tido tempo de se fixarem à estrutura dentária (VOGEL; CHOW; CAREY, 2008). A disponibilidade do íon Ca e consequentemente a absorção do F durante a utilização de um dentifrício pode ser afetada pelo LSS, pela sua afinidade com o Ca (PESSAN et al., 2006). Um estudo mostrou que quando o LSS estava presente numa solução contendo fluoreto de sódio, menos fluoreto solúvel em álcali foi depositado na superfície do esmalte, e a solubilidade do CaF_2 em água foi aumentada devido à presença do LSS (BARKVOLL; ROLLA; LAGERLOF, 1988). Talvez se fosse feita a associação entre o bochecho com solução de lactato de cálcio seguido pelo uso de um bochecho com solução fluoretada os resultados tivessem sido diferentes, conforme mostrou o estudo de Vogel; Chow; Carey (2008). Utilizando dentifrício fluoretado, talvez fosse necessário alterar sua formulação, de modo a reduzir a concentração de surfactantes de ligação ao Ca (LSS), a fim de que os resultados pudessem ser melhores.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Em resumo, diante do exposto pode-se concluir que:

- *In vitro*, as pastas à base de hidroxiapatita (10 e 20%) foram efetivas na prevenção da erosão associada à abrasão apenas para o esmalte, independentemente da presença ou ausência do F. Já para a dentina, o efeito protetor foi encontrado apenas para as pastas contendo F, sendo maior para aquelas com concentração mais alta de F. Entretanto, *in situ*, apenas a pasta contendo 10% HAP foi efetiva para reduzir a erosão em esmalte quando comparada à pasta placebo. Nas demais condições testadas (erosão em dentina e erosão associada à abrasão para ambos os substratos), nenhuma das pastas utilizadas diferiu significativamente da pasta placebo.
 - Para o segundo estudo, o bochecho com cálcio associado ao dentifrício fluoretado teve um efeito protetor apenas para a erosão de esmalte e dentina *in vitro*. Para a erosão associada à abrasão *in vitro*, assim como no estudo *in situ*, não houve diferença significativa entre os tratamentos.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Absi EG, Addy M, Adams D. Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. *J Clin Periodontol.* 1987;14(5):280-4.

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

Al-Jobair A. The effect of repeated applications of enamel surface treatment on vitro bovine enamel hardness after multiple exposures to cola drink. *Pakistan Oral & Dental J.* 2010;30(1):154-58.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. *Arch Oral Biol.* 1998;43(2):157-61.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res.* 1999;78(12):1821-8.

Attin T, Buchalla W, Putz B. In vitro evaluation of different remineralization periods in improving the resistance of previously eroded bovine dentine against tooth-brushing abrasion. *Arch Oral Biol.* 2001;46(9):871-4.

Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. *Caries Res.* 2001;35(3):216-22.

Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Res.* 2004;38(1):62-6.

Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis.* 2005;11(1):7-12.

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.

Austin RS, Stenhagen KS, Hove LH, Dunne S, Moazzez R, Bartlett DW, et al. A qualitative and quantitative investigation into the effect of fluoride formulations on enamel erosion and erosion-abrasion in vitro. *J Dent*. 2011;39(10):648-55.

Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli Jdos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J*. 2012;23(2):104-9.

Badr SBY, Ibrahim MAI. Protective effect of three different fluoride pretreatments on artificially induced dental erosion in primary and permanent teeth. *J Am Sci*. 2010;6(11):442-51.

Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MA. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J*. 2011;56(3):317-21.

Barkvold P, Rolla G, Lagerlof F. Effect of sodium lauryl sulfate on the deposition of alkali-soluble fluoride on enamel in vitro. *Caries Res*. 1988;22(3):139-44.

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

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. *J Dent Res*. 2006;85(4):306-12.

Brown LJ, Wall TP, Lazar V. Trends in total caries experience: permanent and primary teeth. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(2):223-31.

Buyukyilmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*. 1997;105(5 Pt 2):473-7.

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

Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):72-6.

Buzalaf MA, Moraes CM, Olympio KP, Pessan JP, Grizzo LT, Silva TL, et al. Seven years of external control of fluoride levels in the public water supply in Bauru, São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(1):92-8.

Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RM, Mendes FM, De PEC, et al. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):85-90.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22-32.

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

Choi S, Park KH, Cheong Y, Moon SW, Park YG, Park HK. Potential effects of tooth-brushing on human dentin wear following exposure to acidic soft drinks. *J Microsc.* 2012;247(2):176-85.

Christensen CM, Navazesh M. Anticipatory salivary flow to the sight of different foods. *Appetite.* 1984;5(4):307-15.

Chunmuang S, Jitpukdeebodindra S, Chuenarrom C, Benjakul P. Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro. *J Oral Sci.* 2007;49(4):293-7.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomao PA, Grizzo LT, Magalhaes AC. Effect of NaF, SnF(2), and TiF(4) Toothpastes on Bovine Enamel and Dentin Erosion-Abrasion In Vitro. *Int J Dent.* 2012;2012:134350.

da Silva Marques DN, da Mata AD, Patto JM, Barcelos FA, de Almeida Rato Amaral JP, de Oliveira MC, et al. Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow in patients with Sjogren's syndrome: a randomized controlled trial. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(10):785-92.

Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008;139 Suppl:18S-24S.

de-Melo MA, Passos VF, Alves JJ, Barros EB, Santiago SL, Rodrigues LK. The effect of diode laser irradiation on dentin as a preventive measure against dental erosion: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011;26(5):615-21.

Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. *Clin Oral Investig.* 2001;5(2):108-11.

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. Dynamics of tooth erosion in adolescents: a 3-year longitudinal study. *J Dent.* 2010;38(2):131-7.

Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, van der Bilt A, Bosman F. The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiol Behav.* 2003;78(1):165-9.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent.* 2011a;39(6):414-21.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Prevention of toothbrushing abrasion of acid-softened enamel by CO₂ laser irradiation. *J Dent.* 2011b;39(9):604-11.

Esteves-Oliveira M, Yu H, de Paula Eduardo C, Meister J, Lampert F, Attin T, et al. Screening of CO₂ laser (10.6 μ m) parameters for prevention of enamel erosion. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(6):331-8.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schurmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2004;38(6):561-6.

Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001;35(5):325-30.

Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):931-5.

Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res.* 2005;39(3):178-84.

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res.* 2010;44(3):248-52.

Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J. Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ. *Caries Res.* 2007;41(2):146-51.

Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol.* 2007;52(1):9-14.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437-9.

Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH. In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1996;30(5):373-8.

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.

Hannas AR, Kato MT, Magalhães AC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Toothpastes with MMP inhibitors reduce dentin erosion in vitro [abstract 1966]. *J Dent Res.* 2010; 89(Spec Iss B). Presented at IADR 88th General Session 2010, Barcelona, Espanha. Disponível em: www.dentalresearch.org.

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 properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res.* 2001;35(2):142-8.

Hannig M, Fiebiger M, Guntzer M, Dobert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):903-10.

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res.* 2005;39(2):134-8.

Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res.* 2006;85(7):612-6.

Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Parmar M, Eckert GJ, Zero DT. Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion-abrasion. *J Dent.* 2009;37(10):781-5.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:88-99.

Honorio HM, Rios D, Santos CF, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of dental plaque on human enamel erosion: in situ / ex vivo study. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(2):179-84.

Hove L, Holme B, Ogaard 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.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The erosion-inhibiting effect of TiF₄, SnF₂, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(5):259-64.

Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011;45(5):460-8.

Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater.* 2009;4(3):034104.

Huew R, Waterhouse PJ, Moynihan PJ, Kometa S, Maguire A. Dental erosion and its association with diet in Libyan schoolchildren. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011;12(5):234-40.

Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M, et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. A study in situ. *Caries Res.* 2002;36(1):70-4.

Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:60-8.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. *Caries Res.* 2011;45(6):518-23.

Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Kontinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1994;21(1):26-31.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/condição-de-vida/pof/2002analise/pof2002analise.pdf>

Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M. An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res.* 1995;29(6):470-6.

Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res.* 1999;33(6):455-61.

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

Kargul B, Altinok B, Welbury R. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel surface rehardening. An in vitro study. *Eur J Paediatr Dent.* 2012;13(2):123-7.

Karlinsey RL, Mackey AC, Blanken DD, Schwandt CS. Remineralization of eroded enamel lesions by simulated saliva in vitro. *Open Dent J.* 2012;6:170-6.

Kato MT, Bolanho A, Tjaderhane L, Buzalaf M. Sodium fluoride inhibits matrix metalloproteinases [abstract 1224]. *J Dent Res.* 2013; 92(Spec Iss A). Presented at

IADR/AADR/CADR 91st General Session 2013, Seattle, Washington. Disponível em: www.dentalresearch.org.

Kato MT, Hannas AR, Buzalaf M. Gels containing matrix metalloproteinase inhibitors prevent dentin erosion-abrasion in situ [abstract 1665]. J Dent Res. 2011; 90(Spec Iss A). Presented at IADR/AADR/CADR 89th General Session 2011, San Diego, California. Disponível em: www.dentalresearch.org.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. Caries Res. 2011;45(5):429-34.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. J Dent Res. 2010;89(5):468-72.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MA. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. J Dent Res. 2012;91(12):1119-23.

Kato MT, Magalhaes AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):560-4.

Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. J Dent. 2011;39(12):855-62.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. Caries Res. 1982;16(2):156-61.

Kumar VL, Itthagarun A, King NM. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. Aust Dent J. 2008;53(1):34-40.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. Caries Res. 2006;40(2):148-53.

Lee VM, Linden RW. An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. Exp Physiol. 1992;77(1):221-4.

Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE. Tooth wear: attrition, erosion, and abrasion. *Quintessence Int.* 2003;34(6):435-46.

Llena C, Forner L, Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *J Contemp Dent Pract.* 2009;10(3):1-9.

Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8.

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. Occupation and sports. *Monogr Oral Sci.* 2006a;20:106-11.

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

Lussi A, Jaeggi T. Dental erosion in children. *Monogr Oral Sci.* 2006c;20:140-51.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig.* 2008;12 Suppl 1:S5-13.

Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B. Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. *Caries Res.* 2004;38(6):567-71.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44.

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. *Caries Res.* 2008;42(1):62-7.

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

Magalhaes AC, Furlani Tde A, Italiani Fde M, Iano FG, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially

demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Arch Oral Biol.* 2007a;52(12):1155-60.

Magalhaes AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The effect of an experimental 4% Tif4 varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF4 solution on dental erosion in vitro. *Caries Res.* 2008a;42(4):269-74.

Magalhaes 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 Dent.* 2010;38(2):153-7.

Magalhaes AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2007b;41(1):77-9.

Magalhaes AC, Rios D, Honorio HM, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on the erosion of permanent and deciduous human enamel: an in situ/ex vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2009a;17(1):56-60.

Magalhaes AC, Rios D, Honorio HM, Jorge AM, Jr., Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol.* 2008b;53(5):399-404.

Magalhaes AC, Rios D, Machado MA, Da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, et al. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008c;26(6):559-63.

Magalhaes AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. *Caries Res.* 2008d;42(2):112-6.

Magalhaes AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, et al. Effect of a single application of TiF4 and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2011a;29(8):537-44.

Magalhaes AC, Stancari FH, Rios D, Buzalaf MA. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. *J Dent.* 2007c;35(11):858-61.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011b;22:158-70.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009b;37(12):994-8.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Honorio HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009c;17(2):75-86.

Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994;73(8):1397-406.

Manaf ZA, Lee MT, Ali NH, Samynathan S, Jie YP, Ismail NH, et al. Relationship between food habits and tooth erosion occurrence in Malaysian University students. *Malays J Med Sci.* 2012;19(2):56-66.

Manton DJ, Cai F, Yuan Y, Walker GD, Cochrane NJ, Reynolds C, et al. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate added to acidic beverages on enamel erosion in vitro. *Aust Dent J.* 2010;55(3):275-9.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000;45(9):757-65.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007;86(5):436-40.

Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent.* 2011;39(3):231-7.

Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res.* 1991;99(6):457-62.

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

Min JH, Kwon HK, Kim BI. The addition of nano-sized hydroxyapatite to a sports drink to inhibit dental erosion: in vitro study using bovine enamel. *J Dent*. 2011;39(9):629-35.

Moazzez R, Bartlett D, Anggiansah A. The effect of chewing sugar-free gum on gastro-esophageal reflux. *J Dent Res*. 2005;84(11):1062-5.

Monteiro CA, Mondini L, Costa RBL. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Rev Saúde Pública* 2000;34(3):251-8.

Moretto MJ, Magalhaes AC, Sassaki KT, Delbem AC, Martinhon CC. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res*. 2010;44(2):135-40.

Moron BM, Miyazaki SS, Ito N, Wiegand A, Vilhena F, Buzalaf MA, et al. Impact of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on tooth erosion/abrasion in vitro. *Aust Dent J*. 2013;58(1):106-11.

Moslemi M, Fekrazad R, Tadayon N, Ghorbani M, Torabzadeh H, Shadkar MM. Effects of ER,Cr:YSGG laser irradiation and fluoride treatment on acid resistance of the enamel. *Pediatr Dent*. 2009;31(5):409-13.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JFL. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Pública* 2006;19(6):385-93.

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

Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JD. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. *Caries Res*. 1987;21(5):411-26.

Nongonierma AB, Fitzgerald RJ. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Res*. 2012;46(3):234-67.

Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2 (Pt 2)):156-61.

Ogaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res.* 2001;35 Suppl 1:40-4.

Panich M, Poolthong S. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on in vitro enamel hardness. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(4):455-60.

Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SM, Whitford GM, Buzalaf MA. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6):489-93.

Petersson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4 (Pt 2)):436-43.

Piekarz C, Ranjitkar S, Hunt D, McIntyre J. An in vitro assessment of the role of Tooth Mousse in preventing wine erosion. *Aust Dent J.* 2008;53(1):22-5.

Ponduri S, Macdonald E, Addy M. A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. *Int J Dent Hyg.* 2005;3(1):7-12.

Prewitt GH. The milk stool, an aid to caries control. *Am J Orthod.* 1950;36(8):616-9.

Pulido MT, Wefel JS, Hernandez MM, Denehy GE, Guzman-Armstrong S, Chalmers JM, et al. The inhibitory effect of MI paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent.* 2008;33(5):550-5.

Ramalingam L, Messer LB, Reynolds EC. Adding casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to sports drinks to eliminate in vitro erosion. *Pediatr Dent.* 2005;27(1):61-7.

Ranjitkar S, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC. The effect of CPP-ACP on enamel wear under severe erosive conditions. *Arch Oral Biol.* 2009a;54(6):527-32.

Ranjitkar S, Narayana T, Kaidonis JA, Hughes TE, Richards LC, Townsend GC. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive dentine wear. *Aust Dent J.* 2009b;54(2):101-7.

Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent*. 2009c;37(4):250-4.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. *Braz Oral Res*. 2006a;20(2):148-54.

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

Rios D, Honorio HM, Magalhaes 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*. 2008a;22(2):132-8.

Rios D, Magalhaes AC, Machado MA, da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, et al. In vitro evaluation of enamel erosion after Nd:YAG laser irradiation and fluoride application. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):743-7.

Rios D, Magalhaes AC, Polo RO, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. *J Am Dent Assoc*. 2008b;139(12):1652-6.

Rios D, Santos FC, Honorio HM, Magalhaes 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.

Rochel ID, Souza JG, Silva TC, Pereira AF, Rios D, Buzalaf MA, et al. Effect of experimental xylitol and fluoride-containing dentifrices on enamel erosion with or without abrasion in vitro. *J Oral Sci*. 2011;53(2):163-8.

Rolla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. *Acta Odontol Scand*. 1988;46(6):341-5.

Rytomaa I, Jarvinen V, Kanerva R, Heinonen OP. Bulimia and tooth erosion. *Acta Odontol Scand*. 1998;56(1):36-40.

Santhosh BP, Jethmalani P, Shashibhushan KK, Subba Reddy VV. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate containing chewing gum on salivary concentration of calcium and phosphorus: an in-vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012;30(2):146-50.

Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988;96(6):523-35.

Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2007;41(2):141-5.

Schlueter N, Glatzki J, Klimek J, Ganss C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1176-82.

Shaw JH, Ensfield BJ, Wollman DH. Studies on the relation of dairy products to dental caries in caries-susceptible rats. *J Nutr.* 1959;67(2):253-73.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:69-77.

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

Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995;22(9):709-17.

Souza JG, Rochel ID, Pereira AF, Silva TC, Rios D, Machado MA, et al. Effects of experimental xylitol varnishes and solutions on bovine enamel erosion in vitro. *J Oral Sci.* 2010;52(4):553-9.

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

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

Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO2 laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2010;55(2):127-33.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007;52(2):121-7.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545-9.

Suyama Y, Takaku S, Okawa Y, Matsukubo T. Dental erosion in workers exposed to sulfuric acid in lead storage battery manufacturing facility. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2010;51(2):77-83.

Tahmassebi JF, Duggal MS, Malik-Kotru G, Curzon ME. Soft drinks and dental health: a review of the current literature. *J Dent.* 2006;34(1):2-11.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.

Taji S, Seow WK. A literature review of dental erosion in children. *Aust Dent J.* 2010;55(4):358-67; quiz 475.

Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *J Dent.* 2008;36(1):74-9.

ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Interações químicas entre dentes e fluidos bucais. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005. cap.4, p. 49-69.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5 Pt 2):461-5.

Tezel H, Ergucu Z, Onal B. Effects of topical fluoride agents on artificial enamel lesion formation in vitro. *Quintessence Int.* 2002;33(5):347-52.

Tschope P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent*. 2011;39(6):430-7.

Tveit AB, Hals E, Isrenn R, Totdal B. Highly acid SnF₂ and TiF₄ solutions. Effect on and chemical reaction with root dentin in vitro. *Caries Res*. 1983;17(5):412-8.

Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res*. 1990;25(3):135-42.

van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin GJ, Mulder J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(3):253-7.

Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. *Biomaterials*. 2005;26(3):271-83.

Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MC. Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. *Caries Res*. 2007;41(1):61-7.

Vieira A, Lugtenborg M, Ruben JL, Huysmans MC. Brushing abrasion of eroded bovine enamel pretreated with topical fluorides. *Caries Res*. 2006a;40(3):224-30.

Vieira A, Overweg E, Ruben JL, Huysmans MC. Toothbrush abrasion, simulated tongue friction and attrition of eroded bovine enamel in vitro. *J Dent*. 2006b;34(5):336-42.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 2005;39(5):371-9.

Vogel GL, Chow LC, Carey CM. Calcium pre-rinse greatly increases overnight salivary fluoride after a 228 ppm fluoride rinse. *Caries Res*. 2008;42(5):401-4.

Vogel GL, Chow LC, Carey CM, Schumacher GE, Takagi S. Effect of a calcium pre-rinse on salivary fluoride after a 228-ppm fluoride rinse. *Caries Res*. 2006a;40(2):178-80.

Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. *J Dent Res.* 1997;76(3):761-7.

Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC, Takagi S. In vivo fluoride concentrations measured for two hours after a NaF or a novel two-solution rinse. *J Dent Res.* 1992;71(3):448-52.

Vogel GL, Schumacher GE, Chow LC, Takagi S, Carey CM. Ca pre-rinse greatly increases plaque and plaque fluid F. *J Dent Res.* 2008;87(5):466-9.

Vogel GL, Shim D, Schumacher GE, Carey CM, Chow LC, Takagi S. Salivary fluoride from fluoride dentifrices or rinses after use of a calcium pre-rinse or calcium dentifrice. *Caries Res.* 2006b;40(5):449-54.

Voronets J, Jaeggi T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Res.* 2008;42(4):286-90.

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

Wang Z, Sa Y, Sauro S, Chen H, Xing W, Ma X, et al. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine permeability measurement and SEM in vitro study. *J Dent.* 2010;38(5):400-10.

Wegehaupt FJ, Attin T. The role of fluoride and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate in the prevention of erosive/abrasive wear in an in vitro model using hydrochloric acid. *Caries Res.* 2010;44(4):358-63.

Wegehaupt FJ, Sener B, Attin T, Schmidlin PR. Anti-erosive potential of amine fluoride, cerium chloride and laser irradiation application on dentine. *Arch Oral Biol.* 2011;56(12):1541-7.

Wegehaupt FJ, Taubock TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odontol Scand.* 2012;70(3):177-83.

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

West NX, Hughes JA, Parker D, Weaver LJ, Moohan M, De'Ath J, et al. Modification of soft drinks with xanthan gum to minimise erosion: a study in situ. *Br Dent J*. 2004;196(8):478-81; discussion 67.

White AJ, Jones SB, Barbour ME, Churchley DR, Gracia LH, Rees GD. Inhibition of erosive dissolution by sodium fluoride: evidence for a dose-response. *J Dent*. 2012;40(8):654-60.

Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res*. 2005;39(2):100-7.

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

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

Wiegand A, Bichsel D, Magalhaes AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. *J Dent*. 2009;37(8):591-5.

Wiegand A, Egert S, Attin T. Toothbrushing before or after an acidic challenge to minimize tooth wear? An in situ/ex vivo study. *Am J Dent*. 2008;21(1):13-6.

Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhaes AC, Roos M, Attin T. Effect of TiF₄, ZrF₄, HfF₄ and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. *Arch Oral Biol*. 2010a;55(3):223-8.

Wiegand A, Magalhaes AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MA, et al. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. *Photomed Laser Surg*. 2010b;28(2):219-26.

Wiegand A, Schwerzmann M, Sener B, Magalhaes AC, Roos M, Ziebolz D, et al. Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel - an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2008;66(4):231-5.

Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T. Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent*. 2007;35(1):21-7.

Wilder-Smith P, Lin S, Nguyen A, Liaw LH, Arrastia AM, Lee JP, et al. Morphological effects of ArF excimer laser irradiation on enamel and dentin. *Lasers Surg Med*. 1997;20(2):142-8.

Yamada MK, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Watari F. Three-dimensional topographic scanning electron microscope and Raman spectroscopic analyses of the irradiation effect on teeth by Nd:YAG, Er: YAG, and CO(2) lasers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71(1):7-15.

Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(6):321-32.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 2010;44(4):390-401.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res*. 1976;55(4):664-70.

Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J*. 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

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

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 083/2009

Bauru, 30 de junho de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Avaliação in situ dos efeitos de tratamentos remineralizadores na erosão e abrasão do esmalte da dentina"**, de autoria de Cíntia Maria de Souza Silva, que será desenvolvido, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 24 de junho de 2009 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alves Capelozza
Vice-Coordenadora, em exercício

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A erosão dentária é a perda de uma camada da superfície dos dentes devido à ingestão de bebidas ácidas. Esta perda pode ser intensificada pela abrasão, que é a perda de uma camada superficial dos dentes causada por forças mecânicas, como a escovação dos dentes. Como estas patologias têm aumentado nos últimos tempos, tem-se buscado estratégias para preveni-las. Dentre elas, a utilização de materiais odontológicos ou bochechos com determinadas soluções. Assim, estamos solicitando sua participação neste projeto de pesquisa. Você colocará na boca um aparelho de resina acrílica, contendo blocos de dente bovino, previamente esterilizados e incapazes de transmitir qualquer patologia. Em adição, não machucará sua boca. O experimento compreenderá quatro etapas de cinco dias cada e descanso de 7 dias entre elas. Você deverá utilizar o aparelho constantemente, removendo-o apenas para as refeições, período em que deve permanecer envolvido por gaze umedecida. Após as refeições, você realizará os tratamentos por nós indicados para aquela fase. Para o tratamento, você deverá mergulhar o aparelho em um recipiente contendo coca-cola. Em uma das fileiras de dentes do aparelho, você deverá escovar os dentes bovinos com uma escova elétrica e dentífrico fluoretado. Depois disto, você deverá fazer aplicação de uma quantidade pré-determinada das pastas, de acordo com cada fase, sobre **todos os blocos dentários**. Todo o material utilizado (coca-cola, dentífricos, pastas, escovas) será fornecido por nós e você não terá despesa nenhuma.

Quanto aos benefícios oferecidos a você, no início do estudo será feito um exame clínico em relação às condições bucais e o resultado deste exame será prontamente informado a você. Caso seja detectado algum problema, faremos o encaminhamento à clínica responsável da FOB. Além disto, no final do estudo, serão dadas instruções sobre higiene bucal, por escrito e verbalmente. Poderá existir um desconforto na utilização constante do aparelho removível, mas os riscos são inexistentes.

A participação será voluntária e a qualquer momento você poderá fazer perguntas relativas aos procedimentos ou mesmo negar-se a continuar participando da pesquisa, sem penalidade alguma.

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

Caso você queira apresentar alguma reclamação a respeito da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (no prédio da Biblioteca) ou pelo telefone (14) 3235-8356 ou ainda direto com os pesquisadores (14) 3222-3469, (14) 9171-3038 ou (14) 3235-8246.

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-SP, _____ de _____ de 2011.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Cíntia Maria de Souza e Silva
Autor

ANEXO C – Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A erosão dentária é a perda de uma camada da superfície dos dentes devido à ingestão de bebidas ácidas. Esta perda pode ser intensificada pela abrasão, que é a perda de uma camada superficial dos dentes causada por forças mecânicas, como a escovação dos dentes. Como estas patologias têm aumentado nos últimos tempos, tem-se buscado estratégias para preveni-las. Dentre elas, a utilização de materiais odontológicos ou bochechos com determinadas soluções. Assim, estamos solicitando sua participação neste projeto de pesquisa. Você colocará na boca um aparelho de resina acrílica, contendo blocos de dente bovino, previamente esterilizados e incapazes de transmitir qualquer patologia. Em adição, não machucará sua boca. O experimento compreenderá quatro etapas de cinco dias cada e descanso de 7 dias entre elas. Você deverá utilizar o aparelho constantemente, removendo-o apenas para as refeições, período em que deve permanecer envolvido por gaze umedecida. Após as refeições, você realizará os tratamentos por nós indicados para aquela fase. Para o tratamento, você deverá mergulhar o aparelho em um recipiente contendo coca-cola. Depois deverá com o aparelho na sua boca bochechar a solução que lhe será dada. E então, em uma das fileiras de dentes do aparelho, você deverá escovar os dentes bovinos com uma escova elétrica e solução do dentífrico indicado pelo pesquisador e nas outras fileiras apenas pingar a solução do dentífrico. Todo o material utilizado (coca-cola, dentífricos, fio dental, escovas) será fornecido por nós e você não terá despesa nenhuma.

Quanto aos benefícios oferecidos a você, no início do estudo será feito um exame clínico em relação às condições bucais e o resultado deste exame será prontamente informado a você. Caso seja detectado algum problema, faremos o encaminhamento à clínica responsável da FOB. Além disto, no final do estudo, serão dadas instruções sobre higiene bucal, por escrito e verbalmente. Poderá existir um desconforto na utilização constante do aparelho removível, mas os riscos são inexistentes.

A participação será voluntária e a qualquer momento você poderá fazer perguntas relativas aos procedimentos ou mesmo negar-se a continuar participando da pesquisa, sem penalidade alguma.

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

Caso você queira apresentar alguma reclamação a respeito da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (no prédio da Biblioteca) ou pelo telefone (14) 3235-8356 ou ainda direto com os pesquisadores (14) 3222-3469, (14) 9171-3038 ou (14) 3235-8246.

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-SP, _____ de _____ de 2012.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Cíntia Maria de Souza e Silva
Autor

ANEXO D – Instruções resumidas dadas aos voluntários do estudo 1

Protocolo Experimental Resumido**1ª exposição (Manhã): Erosão + Abrasão:**

- Após a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.
- **Erosão:**
 - Remover o aparelho de sua boca.
 - Realizar a imersão do aparelho em um copo com 150 mL de Coca, por 90 segundos (total de 1 garrafa de 600 mL/dia, 4x/dia, aproximadamente às 8h, 12h, 16h e 20h).
 - Lavar o aparelho por 10 s.
- **Abrasão:** Os frascos com a solução de pasta de dente deverão ser agitados antes do uso. Você deverá gotear (1 gota /bloco) uma solução de pasta de dente sobre os blocos indicados com a cor **azul** (4 blocos) deverão ser abrasionados (escovados) fora da boca. Escovar os blocos indicados com a cor **azul**, durante 10s cada bloco.
- Lavar o aparelho por 10 s.
- **Tratamento:** Após a escovação dos blocos, aplicar a pasta que esta no pote J10 sobre **todos os blocos** (os 8 blocos) com **cotonete** (utilizando um por bloco) por 3 minutos.
 - Remover o excesso da pasta com cotonete (um por bloco) (**não lavar**) e recolocar o aparelho em sua boca.

2ª exposição (Tarde): Erosão:

- Após o almoço e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.
- **Erosão:**
 - Remover o aparelho de sua boca.
 - Realizar a imersão do aparelho em um copo com 150 mL de Coca, por 90 segundos (total de 1 garrafa de 600 mL/dia, 4x/dia, aproximadamente às 8h, 12h, 16h e 20h).
 - Lavar o aparelho por 10 s.

3ª exposição (Tarde): Erosão:

- Após o lanche e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.
- **Erosão:** repetir a 2ª exposição

4ª exposição (noite): Erosão + Abrasão:

- Após o jantar e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.
- **Erosão:** repetir a 1ª exposição
- **Abrasão:** repetir a 1ª exposição
- **Tratamento:** repetir a 1ª exposição

OBS.: o aparelho deve ser usado por 20h. Não é permitida a ingestão de alimentos durante este período, exceto água (sem o aparelho). Usar as 4 h restantes do dia para as refeições, escovar os dentes e fazer o tratamento.

ANEXO E – Instruções resumidas dadas aos voluntários do estudo 2

Protocolo Experimental Resumido

1ª exposição (Manhã): Erosão + Bochecho + Abrasão:

- Após a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.

- **Erosão:** Remover o aparelho de sua boca.

Realizar a imersão do aparelho em um copo com 150 mL de Coca, por 90 segundos (total de 1 garrafa de 600 mL/dia, 4x/dia, aproximadamente às 8h, 12h, 16h e 20h).

Lavar o aparelho por 10 s.

- **Tratamento:** Com o aparelho na sua cavidade bucal, você deve realizar um bochecho (AGITAR O FRASCO ANTES) com 10 mL de uma solução dada pelo pesquisador, por 1 minuto e cuspir o excesso.

- **Abrasão:** Os frascos com a solução de pasta de dente deverão ser agitados antes do uso. Você deverá gotejar (1 gota /bloco) de uma solução de pasta de dente sobre todos os blocos e apenas os indicados com a cor **AZUL** (4 blocos) deverão ser abrasionados (escovados) fora da boca. Escovar os blocos indicados com a cor **AZUL**, durante 15s cada bloco.

Lavar o aparelho por 10 s.

Recolocar o aparelho em sua boca.

2ª exposição (almoço): Erosão:

- Após o almoço e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.

- **Erosão:**

- Remover o aparelho de sua boca.

- Realizar a imersão do aparelho em um copo com 150 mL de Coca, por 90 segundos.

- Lavar o aparelho por 10 s. Recolocar o aparelho em sua boca.

3ª exposição (Tarde): Erosão:

- Após o lanche e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.

- **Erosão:** repetir a 2ª exposição

4ª exposição (noite): Erosão + Bochecho + Abrasão:

- Após o jantar e a higiene bucal, recolocar o aparelho e esperar 30min para fazer o experimento.

- **Erosão:** repetir a 1ª exposição

- **Tratamento:** repetir a 1ª exposição

- **Abrasão:** repetir a 1ª exposição

OBS.: o aparelho deve ser usado por 20h. Não é permitida a ingestão de alimentos durante este período, exceto água (sem o aparelho). Usar as 4 h restantes do dia para as refeições, escovar os dentes e fazer o tratamento.