TATIANE ALEXANDRE DE OLIVEIRA

Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental

São Paulo

2012

TATIANE ALEXANDRE DE OLIVEIRA

Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós – Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Oliveira, Tatiane Alexandre de.
Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental / Tatiane Alexandre de Oliveira ; orientador Maria Angela Pita Sobral. -- São Paulo, 2012.
102 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida

1. Higiene bucal. 2. Erosão de dente - Prevenção e controle. 3. Esmalte dentário. I. Sobral, Maria Angela Pita. II. Título.

Oliveira TA. Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____Assinatura: _____

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

Julgamento: _____Assinatura: _____

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

Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÒRIA

*A **Deus**, por iluminar e guiar os meus caminhos.*

"Espera pelo Senhor, tem bom ânimo e fortifique-se o teu coração; espera, pois pelo Senhor (Salmo 27:14)."

*À minha **mãe,** que desde sempre me apoiou em todas as decisões e incentivou a conquistar sempre mais. Tudo que fiz na vida até agora tem muito de você. Obrigada por tudo que fez por mim. Te amo muito, sempre e mais!!*

*À minha **família**...*

*Meu **pai,** que a seu modo, sempre se orgulhou das minhas conquistas.*

*Meus **irmãos** que muitas vezes abdicaram das coisas em prol deles mesmos para garantir meu futuro e felicidade. A dívida é eterna!!*

*Àqueles que iluminaram os meus dias e noites quando chegava cansada e desanimada, seu sorriso dava-me a energia de que precisava.... **Arthur, Henry e Lívia**....A titia ama muito vocês!!! Não tem como não pensar em ser melhor vendo esses lindos sorrisos e essa alegria!!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral**, por depositar sua confiança em mim, espero ter atendido às expectativas. Obrigada por ser uma professora fantástica, que me ensinou científica, acadêmica e pessoalmente. As palavras apreendidas estão guardadas para sempre. Muito obrigada por tudo.

À **Dra. Taís Scaramucci**, por estar sempre disposta a me ajudar, orientar e incentivar. Tenho orgulho de ser sua amiga, de ter você como parte deste trabalho e principalmente tenho orgulho das suas conquistas.

Ao **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira**, por ter participado da minha qualificação e daí em diante muito me ajudar na execução desse trabalho, atendendo-me prontamente todas as vezes que o procurei.

À minha turma de pós – graduação: Anely, Bruna, Carol, Cynthia, Juliana, Lívia, Mayra, Thayane, Thayne e Thaysa. Um agradecimento especial às amigas que jamais imaginei que poderia encontrar: **Ny, Bru, Cy, Lí, Ma, Thayane e Thaysa**. Gatas, já estou com saudades de tanta amizade, gentileza, alegria e festa!! Vocês fizeram essa caminhada muito mais suave e divertida.

À **Lívia** que além de sempre acompanhar o meu ritmo de estudos, fez a gentileza de me acompanhar a milhões de jantares só para que eu não ficasse esperando o trânsito passar sozinha, além da valiosíssima ajuda na formatação dessa dissertação. Muito obrigada por toda a amizade e gentileza. Adoro você gorda!!!

Às minhas companheiras de orientadora, **Karina, Stella e Dani**. A convivência enriqueceu muito o meu aprendizado. Faço um agradecimento especial à **Karina**, que é a pessoa mais doce, alegre e fofa que eu já vi. Muito obrigada por toda a ajuda e pelas muitas risadas.

Às minhas amigas (os): **Clau, Jee, Jú, Ka, Toshi e Jú A**. por todas as conversas e incentivos, amo muito vocês.

À minha amiga irmã **Jee Hee Park**, que dividiu comigo desde o começo dessa caminhada as dificuldades de uma pós – graduação e uma residência. Foram muitos telefonemas, jantares, conversas, incentivos e choros. Assim como eu estou conseguindo, tenho certeza que você será brilhante. Obrigada por tudo!! Amo você!!!

À **Eneida Greggio**, por toda a confiança depositada, compreensão e ensinamentos. Mesmo sem ser professora, com você aprendo um pouco a cada dia.

Aos meus **colegas de pós – graduação** pela agradável convivência e troca de experiências. Desejo muito sucesso á vocês.

Ao Professor **Prof. Dr. Edgard Michel Crosato**, do departamento de odontologia social da FOUSP, por sua prontidão em me ajudar na estatística inicial do trabalho. Você fez por mim, o que muitos não fariam.

À **Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves**, por disponibilizar o aparelho de espectrometria e por dispor de seu tempo para calibrar e me ajudar a utilizar a máquina, bem como ao **Prof. Titular Dr. Victor Elias Arana – Chavez** por liberar a utilização de seu laboratório.

À todos os **professores do departamento de Dentística**, por me darem a oportunidade de participar desta pós-graduação e dividirem comigo um pouco dos seus conhecimentos.

À **Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, ex- coordenadora do programa de pós-graduação, e a atual coordenadora e chefe de departamento **Profa. Titular Dra. Márcia Martins Marques**, pelos recursos disponibilizados e incentivo profissional.

À **todos os funcionários da USP** que tiveram participação direta ou indireta na execução desta dissertação. Principalmente a técnica Sônia, que sempre me recebeu com um sorriso no rosto e mostrou-se pronta a ajudar, ao secretário de pós-graduação **Davi,** á secretária **Selma**, ao **Fábio** do setor de convênios e as bibliotecárias que fizeram a correção deste trabalho.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

Bom Mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.

Charlie Chaplin

Oliveira TA. Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da USP; 2012. Versão Original.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar, *in vitro*, empregando diferentes métodos de análise, a ação de superfície de alguns enxaguatórios bucais experimentais para a prevenção/controle da erosão dental causada por ácido clorídrico incorporando-se diferentes princípios ativos. Um enxaguatório bucal experimental sem aditivos, um enxaguatório para erosão disponível comercialmente, Elmex Erosion® (AmF/NaF/$SnCl_2$) (ELM), e um enxaguatórios acrescidos de 4 diferentes aditivos foram testados quanto a sua capacidade de proteção contra erosão em um modelo de erosão-remineralização, onde as variáveis resposta foram a alteração da micro e da nanodureza e as quantidades de cálcio e fosfato liberadas em solução, determinadas por espectrometria de emissão óptica. Os aditivos utilizados foram: Caseína (CAS 5 g/L), Hexametafosfato de sódio (HMP 0,2 g/L), Tetrafluoreto de titânio (TiF_4 3,4g/L) e Fluoreto estanhoso (SnF_2 8,7g/L). Espécimes de esmalte bovino foram incluídos em resina acrílica e polidos. Esses foram distribuídos nos grupos (n=8) e ciclados da seguinte forma: (**1)** Imersão em 20 ml de ácido clorídrico (HCl) a 0,01M pH = 2,4 por 10 s, **(2)** imersão em 20 ml de saliva artificial por 60 s, **(3)** imersão em 20 ml de solução teste por 30 s e **(4)** imersão em 20 ml de saliva artificial por 60 s. Este ciclo foi repetido por 3 vezes por um dia e as soluções utilizadas foram armazenadas para posterior avaliação. Para microdureza, os espécimes tratados com ELM e SnF_2 apresentaram os maiores valores de dureza, os quais foram significantemente diferentes de TiF_4, que apresentou o menor valor. O ELM, SnF_2, CAS e HMP foram semelhantes estatisticamente ao C. Para nanodureza, o TiF_4 apresentou menor valor médio de dureza e significantemente diferente do C. O SnF_2, ELM, CAS e HMP apresentaram-se estatisticamente

semelhantes ao C. Na análise de perda de cálcio da ciclagem final, ELM e HMP resultaram em menor perda de cálcio e estatisticamente diferentes do C. Na primeira imersão, todos os grupos testados, exceto a caseína, mostraram significantemente menor perda que o C e, na segunda, não foi constatada diferença estatística significante. Na análise de perda de fosfato da ciclagem final, ELM e TiF_4 apresentaram as menores perdas de íons, sendo significantemente diferente do C. Na primeira e segunda imersões, somente ELM mostrou-se estatisticamente diferente do C. Conclui-se que o ELM, o HMP e o TiF_4 protegeram a superfície de esmalte quanto a perda de íons porém os testes de dureza não detectaram essa proteção.

Palavras–Chave: Erosão dentária. Esmalte dental. Produtos para higiene pessoal. Ácido clorídrico. Flúor. Dureza. Fosfatos.

Oliveira, TA. Comparison of action of an oral rinse embedded with active principles to prevention/control of dental erosion. [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da USP; 2012. Original version..

ABSTRACT

The objective of this study was to compare, *in vitro*, using different methods of analysis, the effect on surface of an experimental mouthrinse modified with different active ingredients for the prevention / control of dental erosion caused by hydrochloric acid. An experimental mouthrinse without additives, a commercially available mouthwash for erosion Elmex Erosion ® (AmF/NaF/SnCl2) (ELM) and four mouthrinses added 4 different additives were tested for their ability to protect against erosion in a model of erosion-remineralization, where the response variables were the change of micro-and nanohardness and the quantities of released calcium and phosphate in solution, determined by optic emission spectrometry. The additives used were: casein (CAS 5 g/L), sodium hexametaphosphate (HMP 0.2 g/L), titanium tetrafluoride (TiF4 3.4 g/L) and stannous fluoride (SnF2 8.7 g/L). Bovine enamel specimens were embedded in acrylic resin and polished. They were ramdomily distributed in groups (n=8) and submitted to the following cycle: **(1)** immersion in 20 ml of 0,01M hydrochloric acid (HCl), pH = 2.4 10 s, **(2)** immersion in 20 ml of saliva artificial for 60 s, **(3)** immersion in 20 ml of test solution for 30 seconds and **(4)** immersion in 20 ml of artificial saliva for 60 s. This cycle was repeated three times during the same day and the solutions were stored for later evaluation. For microhardness, the specimens treated with ELM and SnF_2 showed the highest values of hardness, being significant different from TiF4 solution, which presented the lowest value. The ELM, SnF_2, CAS and HMP were statistically similar to C. For nanohardness, the TiF4 had the lowest value of hardness, being significant different from C. The SnF_2, ELM, CAS and HMP were statistically similar to C. In the calcium analysis after the last cycle, ELM and HMP resulted in less calcium loss, which was significantly different from C. After the first immersion, all groups tested, except

casein, showed statistically lower calcium loss when compared to group C and there was no difference in statistical analysis of loss of phosphate in the second. In analysis of phosphate loss after the final cycle, ELM TiF4 showed the lowest losses being significant different from C. After the first and the second cycles, only ELM was statistically different from C. It can be concluded that the ELM, HMP and TiF_4 protect the enamel surface against ions loss but the hardness tests could not detect this protection.

Key-Words: Tooth erosion. Dental enamel. Personal hygiene products. Hydrochloric acid. Fluorine.Hardness. Phosphates.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 Erosão Dental 16
2.1.1 Erosão por ácidos extrínsecos 18
2.1.2 Erosão por ácidos intrínsecos 20
2.2 Película Salivar 22
2.3 Métodos de Controle da Erosão Dental 26
2.3.1 Caseína 26
2.3.2 Polifosfatos 31
2.3.3 Fluoretos 37
2.4 Enxaguatórios Bucais 44
3 PROPOSIÇÃO 46
4 MATERIAL E MÉTODOS 47
4.1 Delineamento Experimental 47
4.2 Seleção dos Dentes 47
4.3 Preparo dos espécimes 48
4.4 Coleta de Saliva Humana e formação da película adquirida 49
4.5 Seleção dos Espécimes 51
4.6 Preparo das Soluções 52
4.6.1 Obtenção do pH das Soluções 54
4.7 Preparo de Dispositivo para a Uniformização dos Tempos de Imersão 54
4.8 Desafio erosivo 55
4.9 Determinação da Dureza Superficial 58
4.9.1 Teste de Microdureza 58
4.9.2 Teste de Ultramicrodureza 59
4.10 Determinação da Quantidade de Cálcio e Fosfato por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES) 60
4.11 Análise Estatística 62

5 RESULTADOS 63
5.1 Valores de pH obtidos 63
5.2 Análise das Variáveis 63
5.2.1 Microdureza de Superfície 66
5.2.2 Nanodureza de Esmalte 67
5.2.3 Análise de Cálcio 69
5.2.4 Análise de Fosfato 73
5.2.5 Correlação entre as variáveis 77
6 DISCUSSÃO 80
6.1 Fluoretos 81
6.2 Caseína 86
6.3 Hexametafosfato de Sódio 88
6.4 Correlação entre as Variáveis 89
7 CONCLUSÕES 90
REFERÊNCIAS 91
ANEXOS 99

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, a doença cárie foi considerada como o principal fator causador das perdas de estrutura dental. Nos últimos anos, com a fluoretação das águas de abastecimento e dos dentifrícios e com o maior acesso aos serviços de saúde e informação, a incidência dessa doença vem diminuindo (Attin et al., 1998). Como resultado, observa-se uma permanência dos dentes na boca por um tempo maior que no passado, tornando-os mais suscetíveis a ocorrências que antes não eram tão frequentes, como as perdas de estrutura conhecidas como lesões não cariosas (LNCs).

As LNCs podem atingir tanto a coroa quanto as raízes dos dentes, sendo classificadas de acordo com os diferentes processos que as originaram em: abfração, abrasão, atrição, erosão ou a combinação dessas (Grippo et al., 2004). O processo de erosão é definido como a dissolução química da superfície dental causada por ácidos não bacterianos (Eccles, 1982). A dissolução química dos dentes ocorre tanto pela ação dos íons hidrogênio derivados de ácidos fortes e fracos ou por ânions, que podem se ligar ou complexar ao cálcio do dente.

A erosão dental pode ser classificada de acordo com sua origem: como *erosão de origem intrínseca ou extrínseca* (Lussi, 1996). As lesões de erosão de origem extrínseca formam-se por meio de consumo excessivo de ácidos advindos da dieta, tais como os provenientes de sucos, frutas, vinho, energéticos, medicações entre outros (Zero, 1996). As lesões de origem intrínsecas são formadas pelo ácido provenientes do suco gástrico e ocorrem quando o paciente apresenta vômitos recorrentes ou distúrbios gástricos como refluxo, hérnia de hiato e bulimia (Scheutzel, 1996; Bartlett, 2006). Quando a lesão de erosão é de origem intrínseca, o ácido que age no processo é o clorídrico, originado do aparelho digestivo. O suco gástrico puro, quando alcança a cavidade bucal, tem o pH aproximado de 1,5 (Young; Tenuta, 2011).

A saliva tem sido considerada o fator biológico protetor mais importante no processo de erosão dental. Esse fluido tem a capacidade de agir diretamente sobre

os ácidos erosivos causando a sua diluição, limpeza, netralização e tamponamento. Ela também forma a película adquirida, uma membrana de proteção sobre a estrutura dental, além de reduzir a taxa de desmineralização e aumentar a de remineralização, fornecendo cálcio, fosfato e flúor tanto para lesões de esmalte quanto para as de dentina (Hara et al., 2006).

Evidências sugerem que a prevalência de erosão dental vem aumentando em vários países (Nunn et al., 2003; El Aidi et al., 2010; Bardolia et al., 2010). Nos últimos anos, o enorme número de estudos sobre erosão dental demonstra a necessidade de melhor entendimento do processo de desenvolvimento da lesão, assim como de medidas preventivas, para o controle e tratamento deste problema.

Apesar do grande número de pesquisas, existem poucas alternativas eficientes de tratamento e prevenção dessa condição. Para a erosão de origem extrínseca, existe a possibilidade de a fonte ácida causadora ser eliminada ou controlada. No entanto, para a erosão de origem intrínseca, o controle é muito mais complexo, já que não há como remover os ácidos provenientes do aparelho digestivo. Em muitos casos resta ao clínico restaurar a perda da estrutura dental, sendo necessário buscar métodos que possam controlar ou prevenir a evolução da lesão.

Várias substâncias têm sido sugeridas pela literatura com o objetivo de diminuir, controlar e remineralizar lesões de erosão.

A caseína, uma proteína derivada do leite, e, alguns de seus derivados, como os fosfopeptídeos de caseína (CPP), são amplamente pesquisados com relação a sua ação protetora contra a erosão dental. Acredita-se que esta proteína forme uma película protetora em volta dos tecidos duros dentais, protengendo-os contra a desmineralização.

O hexametafosfato de sódio (HMP) vem sendo utilizado na indústria como agente para evitar a formação do cálculo dental, porém estudos mostram que este composto também tem grande utilidade na prevenção da erosão dental. Acredita-se que o HMP liga-se ao cálcio na superfície dental também formando uma barreira física protetora contra ataques acidos (Hooper et al., 2007).

Vários tipos de compostos de flúor vêm sendo testados com essa finalidade. Dentre os fluoretos mais utilizados estão o fluoreto de sódio (NaF), fluoreto estanho (SnF_2) e o tetra fluoreto de titânio (TiF_4), que demonstraram diferentes níveis de proteção. Nesse contexto, resultados muito promissores foram obtidos com o TiF4 e o SnF2 (Hove et al., 2006; Hove et al., 2007; Schlueter et al., 2007).

Tendo em vista os resultados promissores com o uso desses compostos na prevenção da erosão dental, elaborou-se a hipótese desse trabalho, na qual a incorporação desses princípios ativos à um enxaguatório bucal pode ser um alternativa para pacientes com lesões de erosão, principalmente os que possuem lesões de origem intrínseca, inclusive os assintomáticos, os quais não tem disponíveis muitas opções de tratamento para sua condição e que poderiam utilizar esses bochechos antes e após os episódios de vômitos para reduzir a perda de estrutura dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erosão Dental

As perdas de estrutura dental não cariosa são causadas por processos como abrasão, atrição, abfração, reabsorção e erosão, podendo ser de origem multifatorial. Em uma classificação mais atual, Grippo et al. (2012), divide os fatores modificantes das LNCs em salivares (capacidade tampão, fluxo, viscosidade, pH e composição) dentais (composição, forma, estrutura, mobilidade, remineralização, formato do arco), faces (vestibular, lingual e oclusal), hábitos nocivos, dieta (composição, frequência e bebidas ácidas), questões médicas e modos de aplicação de forças.

As LNCs devem ser designadas, não somente por um único mecanismo de ação, mas sim por um complexo mecanismo de interação entre degradação química, forças oclusais e fricção, devendo ser consideradas toda a etiologia e fatores modificantes antes de fazer-se o diagnóstico completo e iniciar o tratamento (Grippo et al., 2012).

Erosão dental é a perda de estrutura dental resultante de um processo químico de dissolução ácida que não envolve ácidos de origem bacteriana (ten Cate; Imfeld, 1996; Imfeld, 1996; Moss, 1998). Essa condição tem etiologia multifatorial pela interação de fatores químicos, biológicos e comportamentais (Lussi et al., 2004). Alguns autores (Grippo; Simring, 1995) classificam esse termo como inadequado e sugerem os termos corrosão ou estresse corrosivo como sendo melhores descritores dos efeitos químicos dos ácidos nos tecidos duros dentais.

Os fatores químicos estão ligados ao pH, capacidade tampão, tipo de ácido, adesão, propriedades quelantes e concentração de íons (Lussi et al., 2004); os fatores biológicos estão ligados as características do próprio indivíduo como anatomia e oclusão dental e saliva (fluxo, composição, película adquirida) (Hara et

al., 2006), já os fatores comportamentais estão relacionados ao modo de vida do individuo como ingerir bebidas ácidas e escovar os dentes em seguida, consumo excessivo de bebidas acidas e etc (Lussi; Jaeggi, 2006).

A erosão dental pode ser classificada de acordo com sua origem: como *erosão de origem intrínseca ou extrínseca. As lesões de erosão de origem extrínseca formam-se a partir de ácidos advindos da dieta tais como: sucos, frutas, vinhos, energéticos e medicação* (Zero, 1996; Lazarchik; Filler, 1997), *além de fatores ambientais, biológicos e socioeconômicos* (Mahoney; Kilpatrick, 2003; Lussi; Jaeggi, 2006).

As lesões de origem intrínsecas são formadas por ácidos provenientes do suco gástrico e ocorrem quando o paciente apresenta vômitos recorrentes ou distúrbios gástricos como refluxo, hérnia de hiato, bulimia e anorexia (Scheutzel, 1996; Bartlett, 2006). Quando a lesão de erosão é de origem intrínseca, o ácido que age no processo é o ácido clorídrico, originado do aparelho digestivo. O suco gástrico puro tem o pH entre 0,9 e 1,5 (Young; Tenuta, 2011), porém o pH do suco gástrico regurgitado é de aproximadamente 2,0 (Demeester et al., 1976).

Os íons de hidrogênio (H^+) podem reagir com os cristais de mineral dos dentes, tanto pela ligação com os íons de carbonato, e hidroxilas, quanto de fosfato causando sua dissolução (Featherstone; Lussi, 2006; Bartlett, 2006). O pH é o fator dominante para a dissolução (Barbour et al., 2011). Durante a erosão por ácido e / ou agentes quelantes, estes agentes interagem com a superfície dos cristais de minerais, mas apenas depois de difundirem-se através da placa (se houver), através da película, e através do revestimento de proteína / lipídio sobre os cristais individuais próprios (Featherstone; Lussi, 2006).

O esmalte dental é formado por uma hidroxiapatita muito reativa. Alguns íons cálcio são substituídos por outros íons metálicos, e hidroxilas por flúor, porém a maior substituição ocorre com o fosfato, que pode ser substituído por carbonatos em proporções diferentes de 1:1, desestabilizando a estrutura (Featherstone; Lussi 2006).

A erosão química dos dentes ocorre na presença de H^+ derivados de ácidos fortes e fracos, ou ânions que podem se ligar ou complexar o cálcio (quelantes). No

caso do ácido clorídrico (HCl), este dissocia-se em água em H^+ e Cl^- (cloreto), onde os íons H^+ atacam diretamente os cristais de mineral da estrutura dental dissolvendo-os por combinação com os carbonatos e/ou fosfatos, liberando os íons da região superficial do cristal. Já o ácido cítrico quando em meio aquoso forma uma mistura de íons H^+, ânions e moléculas ácidas não dissociadas, que protelam sua ação. Porém deve-se considerar que além do efeito desmineralizador do H^+, há o efeito do citrato que age complexando o cálcio da superfície do cristal (Featherstone; Lussi, 2006).

Morfologicamente, as lesões de erosão têm inicialmente uma superfície "amolecida" e brilhante, e, com sua progressão, as áreas convexas dos dentes tornam-se planas e podem ocorrer concavidades com largura maior que a profundidade (Ganss; Lussi, 2006). Nas faces vestibulares, as lesões são caracterizadas por borda gengival intacta (Lussi et al., 2004).

2.1.1 Erosão por ácidos extrínsecos

Em 1984, Birkhed avaliou o efeito de diferentes bebidas ácidas (coca-cola, gatorade e sucos de laranja) sobre a placa dental, demonstrando que apesar de os efeitos relacionados à cariogenicidade desses alimentos serem semelhantes, a forma de consumo da coca-cola influenciava na queda do pH bucal.

Jarvinen et al. (1991) realizaram um estudo com pacientes, sendo que 106 desses pacientes apresentavam lesões de erosão e 100 eram isentos. Neste estudo, os indivíduos eram questionados quanto à dieta e histórico médico. A saliva estimulada e não estimulada era coletada e o pH, a quantidade de cálcio e fosfato e proteínas dessa saliva eram determinados. Os autores observaram uma associação entre os fatores erosão dental e o consumo de sucos cítricos por mais de duas vezes ao dia e vinagre de maçã, refrigerante ou bebidas isotônicas diariamente. Pacientes que apresentavam vômitos, distúrbios gástricos ou baixo fluxo salivar não estimulado demonstraram ter alto risco de erosão.

Moazzez et al. (2000) investigaram a relação entre erosão dental pH e hábitos de ingestão de bebidas em um grupo de adolescentes. Assim, 11 pacientes com erosão e 10 controles sem a doença tiveram o pH da superfície de 4 de seus dentes medidos antes, durante e após a ingestão de 330 ml de uma bebida à base cola. O fluxo salivar, a maneira e o tempo em que a bebida foi ingerida foram também analisados. Os resultados mostraram que os adolescentes que apresentavam erosão bebiam mais refrigerante que os outros e o faziam diretamente da lata. Também o pH permaneceu mais baixo por mais tempo nos incisivos desses pacientes que nos que não apresentavam erosão dental. Concluíram que o padrão do pH bucal foi diferente entre os 2 grupos de pacientes analisados após a ingestão das bebidas ácidas, o que influenciaria o padrão de erosão nestes pacientes.

Em 2005, Hanning et al., investigaram os efeitos erosivos de diferentes ácidos (cítrico, málico, lático, tartarico, oxalico, acetico e cloridrico), com valores de pH de 2,0, 2,3 e 3,0. Espécimes de esmalte bovino foram imersos nesses ácidos de 1 a 5 min. A dissolução do esmalte foi quantificada pelo conteúdo de cálcio presente em solução após o desafio ácido. Esses ácidos também tiveram a sua titulação ácida determinada. Os resultados demonstraram que o ácido lático foi o mais erosivo e que a ação de todos os ácidos (exceto oxálico) foi pH – dependente. Concluíram que durante um curto tempo de exposição, com pH constante, os efeitos erosivos dependem principalmente do pH e do tipo de ácido utilizado, porém não dependem da quantidade de titulação ácida.

White et al. (2010) compararam o efeito do desafio erosivo com ácido cítrico em diferentes tempos de 2 s a 1 h. No teste de nanoendentação a medição foi realizada nos tempos de 2 a 60 s de exposição ao ácido e para o teste de perfilometria foram utilizados os tempos de 1 a 60 min de exposição ao ácido sobre o esmalte humano e o bovino. A nanoendentação, que foi utilizada para medir a desmineralização do esmalte, demostrou haver um “amolecimento” estatisticamente significante da superficie após 2 s (humano) e 5 s (bovino), também puderam constatar que não houve diferenças significativas de redução de dureza para os 2 substratos utilizados (humano e bovino) em qualquer ponto. A perfilometria mostrou que a perda de estrutura de esmalte foi significativa após 20 min (humano) e 10 min (bovino). A perda em tecido de esmalte bovino progrediu 30% mais rápido que em humano.Os autores concluíram que o esmalte bovino pode ser utilizado como

substituto ao humano em estudos de erosão moderados, com a ressalva de que a exposição ao ácido em tempos moderados tem progressão 30% mais rápida. A nanoendentação pode ser utilizada para determinar a dissolução do esmalte em escalas de tempo comparáveis ao tempo de permanência de bebidas no meio bucal.

2.1.2 Erosão por ácidos intrínsecos

Pacientes que sofrem de distúrbios alimentares estão classificados como grupo de alto risco de desenvolvimento de erosão dental (ten Cate; Imfeld, 1996; Bartlett et al., 1996). Em um recente estudo, Johansson et al. (2012) descreveram uma divisão das desordens alimentares em três categorias diferentes. A anorexia nervosa é caracterizada por subpeso e restrição alimentar. A bulimia nervosa é caracterizada por um abuso na alimentação que é compensado pelo vômito induzido, uso de laxantes e excesso de exercícios físicos. A terceira desordem alimentar não é claramente definida, mas parece ser uma mistura heterogênea da anorexia e da bulimia.

O refluxo gastroesofágico foi definido por um grupo de consenso global (Vakil et al., 2006) como sendo uma condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo do estômago causa sintomas incômodos ou reações. Em um recente estudo clínico utilizando 108 pacientes, sendo 54 portadores de desordens alimentares e 54 utilizados como controle, Johansson et al. (2012) observaram que a severidade da lesão de erosão dental foi 5,5 vezes maior no grupo que possuía algum distúrbio alimentar em relação ao grupo controle.

Em 1994, Meurman et al. investigaram as manifestações bucais e dentais de pacientes com refluxo gastroesofágico em 117 pacientes. Nenhuma alteração na mucosa oral pode ser observada em relação ao refluxo. A severidade do refluxo foi mais marcante em pacientes com erosão dental e os parâmetros salivares não demonstraram diferença estatística. O refluxo severo por longo tempo foi considerado como sendo parcialmente lesivo à estrutura dental, levando-se em

consideração que formas mais leves da doença não causaram necessariamente efeitos colaterais nos dentes.

Bartlett et al. (1996) observaram que condições como anorexia e bulimia nervosa, alcoolismo e desordens gástricas causam erosão na região palatina dos dentes. O fator comum a todas essas condições é o papel desempenhado pelo estômago e esôfago na movimentação do ácido, sendo que em alguns pacientes esse movimento torna-se crônico podendo provocar dor. Também Scheutzel (1996) estudou a erosão de origem intrínseca constatando que esta é causada pelo ácido gástrico que alcança a cavidade bucal e os dentes como resultado de vômito. As manifestações clínicas dessa erosão só são percebidas após uma ação regular por vários anos do ácido.

Bartlett e Coward, em 2001, compararam o efeito erosivo do suco gástrico (pH 2,92 e titulação 0,68 ml) com o efeito de um refrigerante de cola (pH 2,45 e titulação 0,29 ml) sobre o esmalte e a dentina. Para tanto, os espécimes foram imersos em 2 ml dos respectivos ácidos por 2 minutos, seguidos por lavagem com água totalizando 9 ciclos. A quantidade média de cálcio liberado nas soluções foi calculada para o suco gástrico (69,6 μl^{-1} para o esmalte e 62,4 μl^{-1} para a dentina) e o refrigerante (18,7 μl^{-1} para esmalte e 18,6 μl^{-1} para a dentina). Os autores concluíram que o suco gástrico tem maior potencial erosivo que o refrigerante de cola.

Em 2004, Jensdottir et al. determinaram a prevalência de erosão dental em jovens adultos islandeses (19 a 22 anos) e pacientes com refluxo gastroesofágico A prevalencia foi também relacionada ao consumo de bebidas ácidas. 80 pacientes responderam a um questionário detalhado sobre o seu consumo de bebidas e passaram por exame clínico. A erosão recebeu “scores” para incisivos e molares separadamente. Os autores constataram que não havia diferença na prevalência de erosão dental entre os 2 grupos, e que a prevalência de erosão nos pacientes com GORD foi baixa. Porém, quando combinados os 2 grupos. Foi encontrado um risco 3 vezes maior de erosão em molares e incisivos para jovens que bebiam refrigerante de cola 3 ou mais vezes durante a semana. Concluíram que a frequência de consumo de refrigerantes de cola é um forte fator de risco no desenvolvimento de erosão dental.

Em um estudo de revisão de literatura realizado no ano de 2008, Pace et al. puderam constatar que a erosão dental é a manifestação oral mais presente em pacientes com distúrbios gastroesofágicos, sendo a face lingual a mais afetada. Levando-se em conta a prevalência da erosão dental, esta mostrou - se 50% maior em pacientes com distúrbios gastroesofágicos do que na população em geral.

Além da desmineralização causada pelo ácido clorídrico, pacientes com distúrbios gástricos apresentam o agravante da liberação de enzimas estomacais. Schlueter et al. (2010a), em um estudo realizado com dentina humana através de ciclagem des-remineralizante com acréscimo de enzimas estomacais, puderam constatar que a ação combinada entre a pepsina e a tripsina intensifica a erosão dentinária *in vitro*, o que poderia ser uma razão para a rápida progressão do processo de erosão nesses pacientes.

Tantbirojn et al. (2012) desenvolveram um estudo clínico longitudinal para analisar a perda de estrutura dental em pacientes com o refluxo gastroesofágico. Neste estudo, os autores avaliaram clinicamente 12 voluntários que possuíam o distúrbio e compararam com 6 participantes controle. Para tanto, as avaliações clínicas foram feitas no momento inicial e após 6 meses. O resultado mostrou que a média de volume perdido por participante e por dente foi maior que a média do grupo controle, sendo que 9 entre os 12 participantes com refluxo apresentaram no total 38 dentes com perda de estrutura resultantes de erosão. Tanto os dentes anteriores quanto posteriores eram afetados e a perda oclusal por erosão era duas vezes maior quando combinada com atrição.

2.2 Película Salivar

A película salivar começa a ser formada assim que o dente erupciona na cavidade bucal. Ela pode ser removida, mas é constantemente regenerada ao longo da vida. Esta película é derivada de proteínas e lipídios da saliva presente no meio

bucal, tendo a capacidade de se aderir a superfície dental e formar uma barreira de difusão, que protege contra o ataque ácido (Mandel, 1989).

Segundo ten Cate e Imfeld (1996), no ambiente bucal, a saliva possui um importante fator protetor, inibindo ou diminuindo a erosão dental. O aumento do fluxo salivar pode ser induzido pelo ácido que estimula as glândulas salivares. A saliva por sua vez pode neutralizar os ácidos através de sua capacidade de tamponamento.

A saliva é um dos fatores modificadores biológicos mais importantes na modulação do processo de erosão, pois além de limpar, diluir, neutralizar e tamponar os ácidos, ela também é responsável por manter a supersaturação de cálcio e fosfato ao redor do dente. Também pode formar a película adquirida que funciona como um filme protetor contra a ação dos ácidos. Também contém cálcio, fosfato e flúor que são necessários no processo de remineralização (Moss, 1998).

Vários estudos têm mostrado que a formação da película salivar é uma condição desejável para promover proteção contra a erosão dental (Hanning; Balz, 2001; Hanning et al., 2003; Hanning et al., 2004; Hanning et al., 2005; Hove et al., 2007a; Hove et al., 2007b; Wang et al., 2011).

Hove et al. 2007a e Hove et al. 2007b demonstraram, em um estudo *in vitro*, que o efeito protetor contra a desmineralização do TiF_4 em esmalte submetido à ciclagem por erosão é aumentado na presença de película salivar. Normalmente, em superfícies lisas (as mais afetas por erosão) há pouca ou nenhuma placa bacteriana, isto faz com que a película salivar seja a primeira barreira contra a erosão (Featherstone; Lussi, 2006).

Para Hara et al. (2008) a saliva pode afetar o processo de erosão-abrasão dental, reduzindo a desmineralização, aumentando a remineralização, e agindo como lubrificante. Os autores realizaram um estudo onde testaram o efeito de substitutos da saliva humana em um modelo de ciclagem de erosão, abrasão, projetado para esmalte e dentina radicular. Espécimes foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: (1) saliva artificial, (2) saliva artificial + mucina, (3) água deionizada (controle negativo), e (4) saliva humana. Cada grupo foi submetido a um ciclo de 5 min em 1% de ácido cítrico (pH=3,75), seguido por 30 min nas soluções de teste, e escovação com dentifrício fluoretado (1100 ppm de NaF).

Este ciclo foi repetido 3 vezes por dia, durante 3 dias. A perda de substrato foi medida diariamente por meio de perfilometria óptica. Os resultados mostraram haver um aumento significativo de perda de esmalte e de dentina para todos os grupos. Ao final do estudo, o desgaste de esmalte para cada grupo foi classificado em escala da menor perda para a maior como: saliva artificial < saliva artificial + mucina e saliva humana < água deionizada, com saliva artificial + mucina não diferindo de saliva humana estatisticamente. Para a dentina, os grupos saliva artificial e saliva artificial + mucina não diferiram entre si e nem do grupo água deionizada, porém mostraram desgaste significativamente maior do que o grupo saliva humana. Concluíram que a saliva artificial com mucina mostrou um bom potencial como substituto para a saliva humana no modelo de ciclagem de erosão-abrasão. Para dentina, nenhuma das salivas artificiais comportou-se de forma semelhante à saliva humana.

Hanning et al., em 2009, realizaram um estudo *in situ* com o objetivo de investigar alterações ultraestruturais, bem como as propriedades de proteção da camada de película durante o consumo de bebidas ácidas. Para o estudo, espécimes de esmalte bovino foram fixados em aparelhos individuais nas regiões vestibular e palatinas e, a seguir, expostos nas cavidades orais de três indivíduos, durante 120 min. Após, os indivíduos ingeriram suco de laranja, coca-cola light ou sprite light. Metade dos espécimes foi removida do aparelho, enquanto a outra foi exposta aos fluidos orais por mais 120 min. O esmalte bovino foi então avaliado através da microdureza Knoop de superfície. Além disso, a ultraestrutura da película foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os autores observaram que durante o consumo rápido de bebidas ácidas, os efeitos erosivos no esmalte bovino revestido pela película são moderados e os efeitos causados pelos sucos parecem ser menos prejudiciais, em comparação com os refrigerantes de baixo pH. Concluíram que a formação da película pode influenciar no processo de remineralização, através do preenchimento das lacunas erodidas com proteínas.

Para Bruvo et al. (2009) as proteínas salivares exercem efeito protetor para os dentes contra o processo de desmineralização, os quais as estruturas dentais são submetidas, por meio da formação de uma película. No entanto, estes autores afirmam que pouco se sabe sobre as variações que o gênero e a etnia podem exercer sobre esse efeito protetor. Portanto, com o objetivo de determinar se estes fatores possuem influência no efeito dessa película, foi realizado um estudo com 10

jovens escandinavos e 10 jovens não-escandinavos, onde blocos de esmalte bovino previamente revestidos com proteínas salivares (parótida e submandibular), por 12 h, foram expostos a uma solução ácida. A microdureza de superfície de esmalte foi realizada antes e após a exposição. Os resultados mostraram que as películas formadas a partir de proteínas salivares de não-escandinavos obtiveram melhores resultados quanto à proteção do esmalte quando comparadas as películas de escandinavos ($p<0,001$). Dentro dos grupos, os efeitos protetores da película salivar da parótida e submandibular eram semelhantes. Indivíduos com alta proteção de películas de saliva da parótida também tiveram alta proteção de películas de saliva submandibular. Os autores concluíram que variações individuais podem influenciar na proteção que a película exerce contra desafios erosivos e que tais variações parecem não ser devido a diferenças de um único componente de proteína.

Hemingway et al., no ano de 2010, realizaram um estudo in vitro com o objetivo de investigar os efeitos de duas proteínas (caseína e ovalbumina) sobre a erosão em esmalte dental humano. Os autores mensuraram a erosão por meio de perfilometria sem contato. Neste estudo foram utilizadas soluções de ácido cítrico (pH 2,8), maléico (pH 3,2), láctico (pH 3,8) e cinco refrigerantes comercialmente disponíveis para o desafio erosivo. Antes, os espécimes foram expostos à saliva humana por 2 horas para a criação da película salivar. Os autores utilizaram 2 tipos de saliva (congelada e fresca). A caseína e a ovalbumina foram adicionadas às soluções de ácido e aos refrigerantes em uma concentração de 0,2% em peso por volume. A ovalbumina reduziu o potencial erosivo de algumas soluções, mas a magnitude da redução foi menor do que a caseína. Uma maior redução no potencial de erosão foi observada no ácido cítrico quando comparada aos ácidos maléico ou lático. Não houve diferença entre a saliva congelada e a fresca. Os autores postularam que o mecanismo de proteção da caseína e da ovalbumina envolve adsorção destas proteínas com a película ou a superfície do esmalte, formando um filme de proteína com melhores propriedades inibidoras da erosão. Em conclusão, a caseína e, em menor extensão, a ovalbumina mostraram grande potencial anti-erosivo como aditivos de bebidas.

2.3 Métodos de Controle da Erosão Dental

2.3.1 Caseína

O leite possui além de cálcio e fosfato, compostos como a caseína e outras proteínas que são considerados fatores cariostáticos e anticariogênicos (World Health Organization, 2003). Segundo Aimutis (2004) o leite possui 2 grupos maiores de proteínas, distinguidos por sua solubilidade: a caseína (insolúvel) e proteínas pesadas (solúveis). A caseína responde por 80% do total de proteínas do leite e tem como função formar um complexo micelar de estabilização do cálcio e fosfato. São relativamente hidrofóbicas e, os produtos que contém caseína ou seus derivados têm mostrado ação na redução da desmineralização em esmalte e favorecimento da remineralização.

Pearce e Bibby (1966b), com o objetivo de comparar as propriedades de adsorção de várias proteínas, incluindo a caseína, no esmalte bovino em condições idênticas, adicionaram 400 mg de esmalte bovino em pó em 3ml de soluções com diferentes tipos de proteínas e um controle (sem esmalte). Estes foram colocados em tubos, hermeticamente fechados, mantidos em banho de água por 1 hora e, posteriormente, centrifugados em intervalos de 10 minutos. Após esse processo a quantidade de proteína adsorvida era medida. Os resultados em relação à caseína mostraram que ela foi adsorvida em maior quantidade no esmalte. Esta também produziu um efeito hidrofóbico pronunciado no esmalte (partículas expostas a essa proteína flutuando na água por vários dias antes de afundar). O fato de proteínas de alto peso molecular ter maior adsorção ao esmalte pode ser a explicação para os melhores resultados terem sido encontrados com a caseína.

Em seguida, estes mesmos autores (Pearce; Bibby, 1966a) resolveram testar os efeitos sobre as proteínas causados pelo tempo, área de superfície, pH e alguns íons no esmalte bovino. Os resultados mostraram que aproximadamente 50% da caseína adsorvida no esmalte em uma hora é adsorvida nos 2 primeiros minutos e

que essa adsorção cresce conforme cresce o tamanho da partícula de hidroxiapatita. Com relação ao pH, a adsorção foi menor em pH 8,0 e teve uma tendência geral de aumentar conforme o pH diminuía.

Em 1987, Reynolds testou a habilidade de prevenção da desmineralização da subsuperfície de esmalte bovino e mudança na composição da placa pela caseína em um modelo intra-oral. Para tanto foi utilizado um aparelho removível contendo blocos de esmalte bovino simulando as áreas proximais com formação de placa supragengival. Enquanto alguns foram expostos a soluções de açúcar e salinas, outros foram expostos a soluções de açúcar e caseína. O caseinato de sódio a 2% preveniu a desmineralização subsuperficial por um período de 10 dias, a prevenção também foi notada quando ocorriam 2 exposições a várias frações de caseína por dia. A habilidade da caseína e peptídeos trípiticos em prevenir a desmineralização do esmalte estava relacionada à sua incorporação na placa, aumentando assim o fosfato de cálcio na placa e a capacidade tampão do ácido e indiretamente o catabolismo da bactéria da placa.

Ainda Reynolds no ano de 1997, estudou *in vitro* a remineralização de lesões de subsuperfície de esmalte por meio de soluções de fosfopeptídeo de caseína (CPP) estabilizado por fosfato de cálcio (ACP). Esse autor investigou o efeito remineralizador desse composto, a sua concentração e o pH. Para tanto, espécimes com lesões de esmalte foram remineralizados por 10 dias, em seguida, foram seccionados e submetidos a microrradiografia e microdensitometria. Os resultados mostraram que a capacidade de remineralização foi maior nas soluções com os níveis mais elevados de CPP estabilizado livre de íons cálcio e fosfato. A remineralização foi significantemente correlacionada com a perda de saturação para o fosfato de dicalcio diidratado. O CPP estabilizado pelo fosfato de cálcio em solução mantém uma concentração alta de gradientes de íons cálcio e fosfato e pares de íons para a lesão de subsuperfície e, portanto, proporciona altas taxas de remineralização do esmalte.

Em 2001, Grenby et al., caracterizaram e investigaram *in vitro* os componentes anti-cárie existentes no leite e seus derivados e descobriram que a remoção de lactose, gordura, caseína e outras proteínas tiveram pouca influencia no efeito protetor das frações do leite. Ainda mostraram que além de cálcio e fósforo, o

leite possui outros fatores protetores poderosos, os quais foram identificados como frações de “proteose-peptona”

Hay e Thomson (2002) fizeram um ensaio clínico com o objetivo de comparar a eficácia na prevenção de cárie de uma solução de derivados de caseína acoplados com cálcio e fosfato (CP-CD) com um enxaguatório com 0,05% de NaF em indivíduos com disfunção salivar. A incidência de cárie coronária foi maior no grupo NaF que no CP-CD, porém não foi encontrada diferença estatística. Os autores hipotetisaram que os CP-CDs são uma promessa como agentes preventivos de cárie para indivíduos com boca seca, porém outros estudos eram necessários para uma conclusão definitiva.

Com a intenção de comparar os efeitos dos produtos a base de leite na solubilidade ácida do esmalte, Weiss e Bibby (1996a) utilizaram blocos de esmalte bovino que passavam por 2 processos de desmineralização iniciais seguidos pelo tratamento com os produtos a base de leite (leite fresco pasteurizado, natural, leite em pó integral e desnatado, nata e soro). Na primeira descalcificação, os blocos eram imersos em 20 ml de ácido acético a 0,1M, pH = 4,0 por 15 min, e, em seguida, esses eram lavados e secos. Na segunda, a descalcificação ocorreu da mesma foram que na primeira, porém os espécimes eram submetidos anteriormente a uma imersão em 20 ml do tratamento teste por 15 min, sob agitação. Uma terceira descalcificação era feita após os blocos serem lavados por 1 min. O leite de vaca reduziu a solubilidade do esmalte em mais de 20%, independente de sua condição (pasteurizado, fresco, integral ou desnatado). Comparando o efeito individual dos constituintes do leite na solubilidade do esmalte, a caseína foi a única que produziu redução significante da solubilidade. Estes mesmos autores (Weiss; Bibby, 1966b), ao investigar o efeito de proteínas na solubilidade do esmalte em soluções ácidas, perceberam que concentrações menores que 0,05% de caseína reduziram a solubilidade do esmalte e que a associação com cálcio e fosfato parece ser benéfica.

Kawasaki et al. (1999), desenvolveram um método para investigar a molhabilidade de superfícies de hidroxiapatita cobertas por proteínas. Os resultados mostraram que o mecanismo de adsorção das proteínas, incluindo a caseína, à superfície dental está ligado a concentração e ao tempo empregados. Sendo assim,

o tempo necessário para a adsorção e rearranjo dessa camada formada pelas proteínas é grande quando a concentração de caseína é pequena e vice - versa.

Com o objetivo de investigar o efeito da caseína como potencial aditivo na redução da erosão dental provocada por ácido cítrico, Barbour et al. (2008) utilizou discos de hidroxiapatita que passaram ou não por processo de formação de película salivar, e 2 soluções de ácido cítrico: 0,3% sem aditivo e e esse ácido com 0,02% com caseína, em diferentes pHs (2,8; 3,0; 3,2; 3,4 e 3,6). Os autores também testaram soluções de ácido cítrico com o mesmo pH (3,2) com diferentes concentrações de caseína (0,002; 0,02 e 0,2%). À solução de acido cítrico 0,02% com pH = 3,2 foram adicionadas varias concentrações de cloreto de cálcio dihidratado (5, 10, 20 e 50mM). Em todos os pHs testados, a adição de caseína 0,02% reduziu cerca de 54% a dissolução da hidroxiapatita e a concentração de caseína não afetou a taxa de dissolução, respectivamente. A adição de caseína e de cálcio (5 e 10mM) provocou redução de 60-70% a taxa de dissolução. A película salivar influenciou positivamente na redução da dissolução da hidroxiapatita. Concluíram que a redução na taxa de dissolução está relacionada à adsorção da caseína na superfície da hidroxiapatita, que estabilizou o cristal e inibiu o desprendimento dos íons.

Hemingway et al. (2010) estudaram os efeitos de duas proteínas alimentares comuns (caseína e ovalbumina) no esmalte humano como agentes anti-erosivos. A erosão foi mensurada por perfilometria óptica. Os ácidos utilizados foram o cítrico, málico e lático nos seguintes valores de pH = 2,8, 3,2 e 3,8, e 5 refrigerantes, na presença de película salivar. Concentrações de 0,2% das proteínas foram adicionadas as soluções ácidas e foram comparadas com as soluções sem aditivos. Os espécimes foram imersos em 100 ml de solução por 10 min, sob agitação. Os resultados mostraram que a caseína reduziu significantemente a erosão em todas as soluções nas quais ela foi adicionada. Nos valores de pH 2,8 e 3,2 a caseína reduziu mais a erosão do que a ovalbumina. Os efeitos das subfrações da caseína testadas em ácido cítrico pH 3,2 foram iguais aos encontrados para a caseína total. Uma redução proporcional da erosão foi encontrada para o ácido cítrico, mas não nos ácidos málico e o lático. Os autores postularam que o mecanismo protetor da das proteínas envolve a sua adsorção de proteínas à película ou à superfície de esmalte, formando um filme proteico com propriedades de inibição de erosão aumentadas. O

íon citrato pode desempenhar um papel estabilizador ativo, visto que a redução da erosão foi menor do que para os outros ácidos. Concluíram que a caseína e, em menor extensão, a ovalbumina mostram-se como potenciais aditivos anti-erosivos em bebidas.

Setarehnejad et al. (2010), analisaram o efeito protetor de macropeptídeos de caseína (MPC) e suas frações contra erosão dental. Para isso, hidroxiapatita era pré-tratada com MPC antes de exposição a tampões de citrato em pH = 2,5, 3,5 e 4,5. Os resultados mostraram que os MPCs tem efeito protetor contra a erosão dental *in vitro*. O CMP protege a hidroxiapatita em pH ácido e para algumas frações o efeito aumenta com o aumento do pH. Concluíram que embora o MPC não reduza a dissolução mineral em 100% em pH baixo, sua incorporação em alimentos e bebidas ácidas pode resultar em potencial redução na dissolução mineral *in vivo*.

Cheaib e Lussi (2011), verificaram se a adição de proteínas (caseína e mucina) poderia melhorar o efeito protetor da película dental contra a erosão causada por acido cítrico (1 min). Utilizaram 100 espécimes de esmalte que foram divididos em 5 grupos (n=20) e receberam os seguintes tratamentos: água deionizada, umidade, mucina, caseína, combinação de mucina e caseína. Cada grupo foi exposto a 3 ciclos de 2 horas de imersão em saliva humana seguida de 2 horas de tratamento nas soluções teste e 1 min no ácido cítrico. As análises demonstraram que a mistura de caseína e mucina aumentou significativamente as propriedades de inibição da erosão da película. A adição das proteínas individualmente não influenciou na função da película. Os autores concluíram que os resultados sugerem que a interação proteína-proteína pode desempenhar um importante papel na efetividade da película para prevenir a erosão dental.

White et al. (2011) avaliaram a capacidade de inibição da erosão dental de proteínas do leite disponíveis comercialmente e seus derivados. Soluções aquosas de 0,5% de caseína, 0,5% de fosfopeptídeo de caseína (CPP) ou 0,05% de glicomacropeptídeo (GMP) com e sem 300 ppm de flúor (NaF) foram investigados quanto ao amolecimento e a perda de estrutura dental. Essas soluções foram comparadas com água deionizada (DIW) como controle negativo, e 300 ppm de flúor como controle positivo. Dentes bovinos que passaram por teste de nanodureza tinham um tempo tratamento de 10 min, seguido por 1min de erosão. Os espécimes

avaliados com perfilometria passaram por 10 min de tratamento seguido por 10 min de erosão. Esse ciclo foi repetido por mais 9 vezes. Neste estudo, todos os aditivos avaliados com a perfilometria foram capazes de proteger a superfície dental. Em relação aos testes de nanodureza de superfície, apenas a caseína 0,5% sem ou com flúor foi capaz de fornecer essa proteção. Concluíram que solução 0,5% w/v de caseína, CPP ou GMP reduziram o amolecimento e a erosão em modelos de erosão *in vitro*. A Adição de 300 ppm de F a solução 0,5% de caseína resultou em maior redução da perda de tecido, mas não de amolecimento. Concluíram que a caseína e seus derivados podem encontrar aplicação como agentes tópicos de inibição de erosão dental.

2.3.2 Polifosfatos

Os polifosfatos são polímeros de fosfato formados por grupos fosfato $(PO_4)^-$. O tripolifosfato e o hexametafosfato são formados por cadeias P-O-P de fórmula $Na_{n+2}P_nO_{3n+1}$ (Harris et al., 1967). Seu mecanismo de ação contra a ação do ácido estaria ligado a sua adsorção à superfície dental no lugar dos íons $(HPO_4)^{2-}$, impedindo o deslocamento de íons para o meio (Barbour et al., 2005b).

Em 1946, Phillips e Hine, verificaram os possíveis efeitos nocivos do hexametafosfato de sódio tanto para esmalte quanto para dentina. Pesos constantes de espécimes de esmalte e dentina foram determinados por técnica desenvolvida por Phillips e suspensos em solução de hexametafosfato de sódio por curtos períodos de tempo. Os resultados mostraram que a imersão dos espécimes em HMP 20% por 20 dias mostrou média de perda de peso de 10,3% para o esmalte e 39,4% para dentina enquanto que os oito espécimes de coroas imersos em solução de HMP 1% ganharam uma média de 152%. Os resultados indicam que soluções concentradas de HMP podem causar perda de peso mensurável em espécimes de dentina e ligeira perda em espécimes de esmalte. Em soluções fracas, a perda de peso dos dentes foi insignificante após 40 dias de imersão. Os resultados sugerem

que o uso de soluções concentradas de HMP é questionável, mas soluções de baixa concentração são provavelmente de uso relativamente seguro.

Já no ano de 1967, Harris et al. compararam os efeitos dos sais de sódio de cinco tipos de fosfato no controle do desenvolvimento da cárie dental quando adicionados a dieta de ratos jovens. Os fosfatos utilizados foram: ortofosfato, pirofosfato, tripolifosfato, hexametafosfato e trimetafosfato de sódio. Os ratos foram alimentados por 23 semanas com essa dieta. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos com relação ao peso ganho, consumo da dieta e conteúdo de fósforo no soro inorgânico. Os resultados indicaram que o pH ácido serviu para aumentar a incorporação de fosfato. Em comparação com o grupo controle a porcentagem de redução no desenvolvimento da cárie se deu da seguinte forma: 29 % para o pirofosfato, 33% para o ortofosfato, 46% do tripolifosfato, 51% para o hexametafosfato e 78% para o trimetafosfato (todas significantes). O HMP foi 2 vezes mais efetivo como agente cariostático do que qualquer outro tipo, já o trimetafosfato apresentou a maior atividade cariostática dentre todos os testados.

McDonald e Stookey (1973) estudaram a eficácia cariostática do fosfato monossódico (NaH_2PO_4) . Ratos foram mantidos sob dieta com fosfato por 8 semanas e depois sacrificados para a remoção e análise dos molares. As lesões eram classificadas de acordo com a severidade da seguinte maneira: 1=pequenas lesões envolvendo esmalte, 2= lesões que estendiam-se até a dentina, 3=lesões que estendiam-se até a polpa. Uma estimativa numérica da quantidade de substancia dental destruída também foi realizada. A adição de NaH_2PO_4 na dieta com conteúdo de Ca e P de 0,3%, 0,6% e 1,2% resultou em redução de 13,4%, 21,8% e 40,2% na incidência de cárie dental. A adição de NaH_2PO_4 causou significante ($p<0,05$) redução (40,2%) na incidência de cárie dental. O grau de eficácia aumentou conforme as concentrações inerentes de Ca e P eram aumentadas na dieta.

Reussner at al. (1975) avaliaram o efeito na erosão dental da adição de fosfatos em bebidas ácidas. Para tanto, utilizaram ratos que receberam 20 ml da bebida por 20 h diárias durante 2 semanas. Os aditivos de fosfato utilizados foram: 0,15% de hexametafosfato de sódio, 0,15% de trimetafosfato de sódio, 0,21% de ortofosfato monosódico, 0,03% de monofluorofosfato e 0,15% de cloreto de cálcio. Com essas concentrações, as soluções apresentavam uniformemente 0,5mg/L de

fostato e cálcio. Concluíram que as bebidas com apresentação em pó, de baixo pH, contendo fosfato monocálcico causam menos erosão do que suco de laranja gelado e suco de uva, quando consumidos em excesso. O fosfato monocálcico é solúvel em bebidas ácidas e não aterá seu sabor.

Com o objetivo de estudar o potencial de redução da erosão dental pela modificação de produtos, Grenby, em 1996, fez uma revisão de literatura onde concluiu que há grande ênfase na suplementação de alimentos para diminuir seus efeitos erosivos. O principio de ação do cálcio e fosfato adicionados a bebidas depende da “Lei de Ação de Massas”, na qual, a taxa de reação química é proporcional a concentração das substancias reativas (cálcio e fosfato) presentes a qualquer momento. Assim, no caso do processo de cárie ou da erosão, a presença inicial dos produtos da reação (Ca2+ e PO43-, HPO42-, H2PO4-, dependendo do pH) tendem a diminuir a extensão e taxa de desmineralização de esmalte.

Barbour et al. (2005b) testaram alguns ingredientes alimentares comuns e aditivos (0,02%) com relação ao seu efeito na taxa de dissolução da hidroxiapatita (HA) numa solução de ácido cítrico 1,3% (pH = 3,2) representativa de um refrigerante. Os fosfatos testados foram: pirofosfato de sódio, tripolifosfato de sódio e polifosfato de sódio, além de uma solução contendo goma xantana e 0,02% de polifosfato. Cinco das soluções teste provocaram uma redução estatisticamente significante da dissolução de HA. Pirofosfato, tripolifosfato, polifosfato, goma xantana e a combinação de goma xantana e polifosfato foram testadas para determinar se a taxa de redução da dissolução da HA persistia após a exposição. A goma xantana e o pirofosfato mostraram pouca persistência de ação, já o polifosfato mostrou um substancial efeito prolongado. Os autores concluíram que o polifosfato e uma mistura de polifosfato com goma xantana foram mais efetivos do que 10 mM de cálcio na redução da taxa de dissolução da HA num desafio com ácido cítrico pH = 3,2. Concluíram que devido ao negativo impacto da adição de cálcio ao sabor, estes compostos poderiam ser uteis como aditivo para a redução da erosão em bebidas ácidas.

Em 2007, Hooper et al., pesquisaram *in situ* os efeitos de refrigerantes ácidos contendo polímeros alimentares aprovados sobre o esmalte dental. O desenho do estudo foi cego, randomizado com 5 tratamentos “crossover”. Espécimes de

terceiros molares foram acoplados a aparelhos removíveis e entregues a 15 voluntários saudáveis. As bebidas utilizadas foram bebidas contendo ácido sem modificação, bebida ácida experimental com 0,02% de polifosfato, com 0,02% de polifosfato e 0,01% de cálcio, com 0,02% de polifosfato e 0,03% de goma xantana, e água mineral. As bebidas (250 ml) foram consumidas as 9, 11, 13 e 15 horas durante 10 min, sob supervisão, por 10 dias. A análise foi feita através de perfilometria. Os resultados mostraram a seguinte ordem de erosão do mais para o menos erosivo: bebida sem modificação, bebida + polifosfato, bebida + polifosfato + goma, refrigerante + polifosfato + cálcio, água mineral. A bebida experimental ácido + polifosfato e polifosfato + goma foram estatisticamente mais erosivos do que a água mineral, embora a diferença seja pequena. Polifosfato + cálcio não diferiu estatisticamente da água mineral.

Hooper et al. (2007), investigaram *in situ* e *in vitro* o efeito protetor de um dentifrício experimental de flúor contendo HMP contra a erosão de esmalte causada por suco de laranja (pH = 3,8). As pastas utilizadas foram: pasta de NaF (pH = 7,0), formulação teste (SnF_2 e HMP) (pH = 5,8) e controle negativo (pH = 7,8) (água). Foram utilizados aparelhos que permaneciam na boca dos voluntários das 9 às 17 h. Cada voluntário lavava o seu aparelho por 1 min com “slurry” de uma das pastas ou água às 9 h, seguido pelo consumo de 250 ml de suco de laranja 1 e 3 h depois. No total eram 2 aplicações de pastas ou água e 4 ingestões de suco de laranja por dia, durante 15 dias. Os resultados mostraram que os danos provocados pela erosão aumentaram com o passar do tempo e foi mais acentuada no controle. O dentifrício experimental causou significantemente menos perda que a pasta com NaF, tanto nos testes *in situ* quanto *in vitro*.

Magalhães et al. (2010) estudaram a adição de íons de cálcio (lactato de cálcio; 1 mmol/L), fosfato (NaH_2 PO_4.2H2); 1 mmol/L, ferro ($FeSO_4$; 1 mmol/L), flúor (NaF; 0,047 e 0,89 ppm) e suas combinações em uma solução de ácido cítrico (50 mmol/L) de pH 2,5. Espécimes de esmalte bovino foram preparados e imersos em 30 ml das respectivas soluções teste durante 1 min., 6x durante 1 dia. Os espécimes foram armazenados em saliva artificial. A análise foi realizada por meio de perfilometria. A média da perda de superfície causada pelo controle foi de 1,74 µm, do ácido cítrico com cálcio foi de 1,31 µm, com fosfato foi de 1,17 µm, com ferro de

1,43 µm e de fluor de 0,87 µm. Concluíram que nenhuma das soluções de ácido cítrico testadas foi capaz de reduzir significantemente a erosão.

Manarelli et al. (2011) avaliaram o efeito de soluções enxaguatórias com trimetafosfato de sódio (TMP) e fluoretos (F^-) no esmalte erodido. Espécimes de esmalte bovino foram submetidos a desafios erosivos com refrigerante de limão, 4 vezes ao dia durante 5 minutos, seguido por imersão nas soluções teste por 30s: placebo, 225µg F^-/ml, 100 µg F^-/ml, 100 µg F^-/ml e TMP (0,2, 0,4 e 0,6%). Na sequencia, os espécimes eram armazenados em saliva artificial por 5 dias. Os resultados de microdureza mostraram valores maiores para todos os grupos quando comparados com o placebo. O grupo 100 F^- + TMP a 0,2% mostrou-se significantemente menor que os grupos 100, 225 e 100 F^- + TMP a 0,6%, mas similar ao grupo 100 F^- + TMP a 0,4%. A menor perda foi observada no grupo F^- + 100 TMP a 0,2%, 100 F^- + TMP a 0,4% e 100 F^- + TMP a 0,6% quando comparados com os outros grupos. Os grupos 100 e 225 F^- mostraram similar quantidade de perda de esmalte. Os autores concluíram que a adição de TMP na proporção molar de TMP: NaF entre 1,24: 1 e 3,72: 1 em um enxaguatório bucal (100 µg F^-/ml) produziu um efeito protetor maior sob condições de erosão que o enxaguatório que continha 225 µg F^-/ml sem a presença de TMP.

Em um estudo recente, Scaramucci et al. (2011), avaliaram *in vitro* o potencial erosivo de um suco de laranja modificado por aditivos alimentares em esmalte e dentina. Os aditivos utilizados foram: lactato de cálcio penta-hidratado (CLP), goma xantana (XG), polifosfato de sódio linear (LPP), pirofosfato de sódio tetrabasico (PP), tripolifosfato de sódio (STP) e algumas combinações. Suco de laranja puro (C-) e suco de laranja modificado com cálcio (C+) foram utilizados como controle. O estudo foi divido em 3 fases, na primeira 15 sucos experimentais foram testados quanto ao seu potencial erosivo por meio do método pH - Stat. Na segunda fase os aditivos que obtiveram bons resultados na primeira fase e em estudos prévios foram testados com ciclagem erosão–remineralização. Na terceira fase, a erosão e remineralização foram estudadas separadamente. Os testes utilizados foram a microdureza de superfície e a perfilometria óptica. Na fase 1, somente a goma xantana não apresentou redução no potencial erosivo do suco. Na fase 2, não houve perda detectável para CLP, LPP e CLP + LPP. A combinação de CLP e LPP mostrou os maiores valores de dureza, seguidos pelo CLP. Na fase 3, CLP, LPP e

CLP + LPP protegeram contra a erosão, porém nenhum dos compostos pareceu interferir no processo de remineralização. Os autores concluíram que para o esmalte, o lactato de cálcio penta-hidratado e os polifosfatos de sódio forneceram os melhores resultados para a redução da erosão e suas associações parecem aumentar os efeitos individuais. Para dentina, a proteção só foi alcançada pela associação de lactato de cálcio com os polifosfatos. No entanto, nenhuma das formulações forneceu redução da erosão alcançada com o suco de laranja comercial acrescido de cálcio.

Estes mesmos autores (Scaramucci et al., 2012) decidiram investigar, *in situ*, os potencial efeito erosivo do suco de laranja modificado por aditivos alimentares. Os aditivos estudados foram: 0,4g/l de cálcio (Ca), 0,2g/l de LPP ou sua combinação (Ca +LPP). Estes foram adicionados a um suco de laranja comercial e os controles foram os mesmos do estudo anterior. O estudo possuía 5 fases e em cada fase os voluntários colocavam os aparelhos com espécimes de esmalte bovino e faziam os desafios ácidos por 0 (controle), 10, 20 e 30 min. Dois espécimes eram removidos dos aparelhos a cada período de desafio. Ao final dos desafios, o esmalte foi avaliado por microdureza de superfície e os sucos passaram por teste de sabor. O grupo controle positivo apresentou a menor porcentagem de diminuição de dureza, seguida por Ca + LPP e controle negativo. O teste de sabor detectou diferenças em todos os grupos. Concluíram que redução significante do potencial erosivo foi conseguida pela adição de Ca, mesmo em pequenas quantidades. O LPP não demonstrou proteção nas concentrações testadas. Concluíram que sucos modificados podem ser alternativas úteis e apropriadas para pacientes com alto risco de erosão dental, desde que as diferenças no gosto não sejam detectáveis.

2.3.3 Fluoretos

Apesar dos efeitos benéficos do flúor em relação à cárie ser conhecido e estabelecido, sua utilização na prevenção da erosão dental ainda é muito controverso.

Em 1972, Mundorff et al. realizaram um estudo com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual o TiF_4 reduz a solubilidade do esmalte. Os resultados mostraram que uma variedade de tratamentos com este flúor produz uma “capa protetora” no esmalte, mesmo quando submetidos ao HCl ou tricloreto de titânio. A formação dessa capa dar-se-ia pela formação de uma ponte organometálica entre as moléculas de flúor e esmalte. Concluíram que o TiF_4 reage de 2 formas com o esmalte: quimicamente (diminuindo a solubilidade do esmalte e aumentando o conteúdo de flúor) e fisicamente (formando uma barreira protetora por sobre o esmalte). Tveit et al. (1988) também observaram a formação de uma capa protetora quando utilizaram TiF_4. Apesar de terem demonstrado alta estabilidade dessa ação, pouco sabia-se sobre sua durabilidade no esmalte humano e meio bucal.

Com o objetivo de investigar a reação entre o SnF_2 e a hidroxiapatita (HAP), Babcock et al. (1978) realizaram um estudo utilizando água deionizada, pó de SnF_2 e HAP, analisado por difração de raio-x. A reação aquosa entre a HAP e o SnF_2 formou 4 produtos cristalinos: CaF_2; $SnOHPO_4$ (TPH); $Sn3F3PO_4$ (TFP) e $Ca(SnF_3)^2$. Este último composto foi relatado pela primeira vez e só foi encontrado em conjunto com o TFP e quando altas concentrações de SnF_2 haviam sido utilizadas. Nas soluções que formaram $Ca(SnF_3)^2$, foi difícil encontrar CaF_2, porém, este é formado em todas as reações, já os outros 3, somente em condições específicas.

Segundo ten Cate e Featherstone (1991), quando o flúor é introduzido em uma solução contendo cálcio e fosfato, pode-se formar CaF_2 (fluoreto de cálcio) ou HAF (hidroxiapatita fluoretada), dependendo do pH e da concentração de cada espécie iônica. Em altas concentrações de flúor, CaF_2 e HAF são estáveis, mas a formação de CaF_2 é favorecida cineticamente. Este é dissolvido em soluções aquosas e o fosfato inibe a indução dessa dissolução quando em pH superior a 5,0.

A deposição de apatita mineral em superfícies amolecidas foi observada em concentrações maiores que 4 ppm de flúor e mais flúor é retido no esmalte desmineralizado do que hígido. Assim, também Larsen e Richards (2002) concluíram que a saturação de CaF_2 em bebidas potencialmente erosivas reduz a erosão em até 28% quando o pH é de no mínimo 3. Lagerweij et al. (2006) acreditam que quanto maior a frequência de aplicação do flúor, maior prevenção da erosão e, quanto menor o seu pH, mais CaF_2 é depositado na superfície do esmalte. Para Featherstone e Lussi (2006), se no processo de remineralização, além de cálcio e fosfato houver também o flúor, pode-se formar HAF, que é menos solúvel. Isso, desde que o desafio erosivo não seja muito grande, para que não ocorra rompimento da barreira e corrosão do esmalte.

Dessa forma, Gu et al. (1996), em um estudo da influência das condições da superfície na incorporação de TiF_4 *in vitro*, também observaram que quando pré-tratavam os espécimes com ácido fosfórico 37% antes da utilização de fluoreto de titânio com o objetivo de obter proteção contra erosão, eram encontrados melhores resultados do que quando essas superfícies não haviam sido tratadas. Concluíram que os componentes orgânicos do dente contribuem para o aumento da incorporação do flúor e a formação de um precipitado de dióxido de titânio na superfície de esmalte, aumentando a resistência aos desafios ácidos.

Em 1997, Büyükyilmaz et al., com o objetivo de examinar se o tratamento com TiF_4 em concentração de 1% e 4% poderia proteger o esmalte contra a exposição ao HCl (pH=1,0) por 1 min ou 5 min, observaram por meio de microscopia eletrônica de varredura, que na superfície da estrutura de esmalte formou-se uma camada maciça e resistente ao HCl mesmo após 5 min Apesar disso, observaram também que houve redução nos valores de microdureza desses espécimes. Concluíram que o TiF_4 4% forma uma camada protetora no esmalte dental, espessa e estável, porém delicada.

Tezel et al. (2002) pesquisaram o efeito de agentes tópicos fluoretados no esmalte que havia passado por processo de formação artificial de lesão de erosão. Utilizaram TiF_4 1%, NaF 2,26% e AmF (fluoreto de amina) 1,25%, ambos por 4 min e sua liberação de cálcio e flúor foi analisada durante 4, 8, 12 e 16 dias. Concluíram

que o TiF_4 mostrou ser mais efetivo que o NaF e o AmF na prevenção de lesões e na perda de íons.

Ainda investigando agentes tópicos contra erosão, Jones et al. (2002), estudaram, *in vivo – in vitro*, 2 tipos de flúor: fluorfosfato acidulado em gel (AFP) 1,23% e gel de NaF 2,2% na prevenção de erosão. Sendo assim, erosão pode submeter os dentes a níveis de pH bem abaixo de 4,5 por tempos variados, no qual mesmo a fluorapatita e a apatita enriquecida com flúor vão se dissolver; consequentemente o potencial de diminuição da erosão por flúor tópico é menor do que para cárie. Sugeriram então, a aplicação de AFP gel por 4 min antes dos episódios de contato com o acido gástrico para controlar os efeitos da erosão de origem endógena.

Willumsen et al., em 2004, verificaram os efeitos do pré tratamento com fluoreto de estanho versus fluoreto de sódio no esmalte exposto ao ácido clorídrico 0,1 e 0,01M. Para isso, dentes foram imersos em soluções de 2% de NaF, 0,4% de SnF_2 e controle por 2 min e 16 h; e em HCl por 30 min em diferentes molaridades e pHs. A aplicação previa de SnF_2 (tanto 2 min quanto 16h) foi capaz de prevenir a erosão dental, sendo que o melhor resultado foi obtido quando o pH do ácido era de 2,2.

Já Ganss et al. (2004), em um estudo *in situ*, com o objetivo de avaliarem os efeitos do flúor na perda de mineral na erosão em esmalte e dentina humanos, utilizaram uma ciclagem 6x5 com ácido cítrico 0,05M (pH 2,3) e enxaguatório bucal com SnF_2 e flúor; pasta de dente de SnF_2 ou flúor; ou gel de NaF. Notaram que, tanto a fluoretação da pasta dentifrícia intensivamente reduziram significativamente a perda de mineral quando comparada ao controle. Concluíram que altas concentrações de flúor são capazes de reduzir a perda mineral por erosão em esmalte e dentina mesmo em condições severas de erosão com acido cítrico.

Em 2006, Young et al. estudaram *in vivo* o efeito do SnF_2 em pasta dentifrícias em lesões de erosão dental. Para isso era aplicado o fluoreto de sódio em alguns dentes e SnF_2 em outros, antes e após a aplicação de acido cítrico em diferentes concentrações. A avaliação foi feita por perda de quantidade de cálcio. Quando o ácido cítrico utilizado foi de 10mmol, a pasta de SnF_2 4% provocou significante proteção se comparado ao NaF; já quando o ácido foi de 100mmol, nem

o SnF_2, nem o NaF conseguiram reduzir a dissolução do esmalte. Concluíram que pastas dentifrícias com SnF_2 são capazes de proteger o esmalte contra o desafio ácido fraco.

Também em 2006, Hove et al., estudaram a viabilidade da utilização de SnF_2 (pH 2,6), TiF_4 (pH 1,3) e NaF (pH 8,0) por 2 min em proteger a superfície de esmalte contra lesões de erosão por ácido cítrico também por 2 min, em 3 ciclos. Após exposição ao ácido por 6 min, os espécimes tratados com TiF_4, SnF_2 e NaF mostraram 88%, 50% e 25% de redução nas profundidades médias de corrosão em comparação ao grupo controle. Uma “capa” foi observada nas superfícies de esmalte tratadas com SnF_2 e TiF_4, nas quais observavam-se rachaduras quando o tempo de erosão era aumentado.

Hove et al. (2007b) estudaram o efeito do tratamento com TiF_4 em dentes recobertos pela película dental e submetidos ao HCl. Inicialmente, formava-se uma película por 2 h, a seguir o esmalte era pré-tratado com TiF_4 0,5M pH = 1,0 por 2 min e em seguida em 3 imersões consecutivas de 4 min em HCl 0,01M pH = 2,2. A análise de íons cálcio mostrou que não houve diferença nos resultados entre os dentes bovinos e humanos. Tratar o esmalte por 2 min com TiF_4 diminuiu significantemente a perda de cálcio do esmalte bovino em 63% e humano em 51%.

Wiegand et al. (2008b) investigou o efeito de diferentes tetrafluoretos (de titânio - TiF_4, de háfnio – HfF^4 e de zircônio - ZrF_4) contra a erosão em espécimes de esmalte e dentina com e sem formação de película salivar. Para o esmalte, os efeitos protetores dos tetrafluoretos (exceto 0,4% de HfF_4) foram limitados a 1min de exposição ao ácido. Não houve diferença na proteção com TiF_4 entre esmalte com e sem película e nenhum fluoreto na forma de gel funcionou. Concluíram que soluções de 0,4 % e 1% de TiF_4, 1% de ZrF_4 e 1% HfF_4 podem diminuir a perda de cálcio do esmalte e dentina durante a erosão, mas efeitos a longo prazo foram limitados a dentina.

Wiegand et al. (2008a) estudaram dentes bovinos pré-tratados com tetrafluoretos (TiF_4, ZrF_4 e HfF_4) nas concentrações de 4 e 10% por períodos de 10 e 15 min com posterior desafio erosivo com HCl 1% pH = 2 em 6 intervalos consecutivos de 15s. Os autores concluíram que a concentração dos agentes não

afetou significantemente a sua eficácia e todos os tratamentos puderam proteger o esmalte contra a erosão de curto prazo.

Com o objetivo de estudar o efeito de vernizes de TiF_4 (4%) comparados com vernizes de NaF e soluções de TiF_4 (4%), Magalhães et al. (2008), submeteram dentes bovinos a boca artificial com desafio erosivo realizado com refrigerante de limão pH=2,6 numa ciclagem de 5 dias, 6 x ao dia. Foram avaliados por perfilometria de contato. Os resultados mostraram que a solução de TiF_4 produziu significante perda de esmalte quando comparada ao “baseline”; já o verniz provocou significante aumento da superfície.

Combinações de flúor e outros compostos também vêm mostrando resultados nas pesquisas de erosão. Schlueter et al. (2009a) testaram 3 formulações contendo uma mistura de AmF, NaF e SnCl2 variando as concentrações de Sn por meio de ciclagem com ácido cítrico 0,05M pH=2,3 aplicando a mistura após o primeiro e o último período de erosão de 2 min 6 vezes ao dia , durante 10 dias. Todas as soluções contendo Sn foram capazes de reduzir significantemente a perda de tecido dental. Sustentam a hipótese de que essas soluções formam barreiras contra ácidos baseados na incorporação de Sn e F no tecido duro dental, resultando em uma ampla zona estruturalmente modificada.

Do mesmo modo, Schlueter et al. (2009c), avaliaram *in vitro* a eficácia de vários enxaguatórios bucais contendo Sn e flúor em concentrações reduzidas como agentes anti - erosivos no esmalte. Os resultados mostraram que quando a concentração de Sn era aumentada todos os enxaguatórios reduziram significantemente a perda de tecido se comparados ao controle, e quando a concentração de Sn era diminuída também todos os enxaguatórios diminuíram a perda de tecido dos espécimes. Concluíram que a concentração de aditivos pode ser reduzida sem sacrificar a eficácia do aditivo. A combinação de 800 ppm de Sn e 500 ppm de flúor parece estar mais adequada a eficácia e a aceitação do produto.

Segundo Schlueter (2009b), as concentrações de flúor também influenciam em sua ação. Num estudo com o objetivo de comparar a eficiência de misturas de AmF, NaF e SnF_2 em diferentes concentrações e pH ajustado para 4,5, para redução de erosão por ciclagem des/remineralização com ácido cítrico e avaliação por perfilometria, constataram que em todas as concentrações testadas a

composição foi capaz de reduzir a erosão dental, mas que seu resultado não variava muito após uma certa concentração. Observaram que a ação destes fluoretos não depende somente da concentração, mas também da razão entre estes íons, sendo a razão de 1,8 a mais eficiente. Concluíram que com isso, poderiam reduzir a concentração dos íons na solução para serem usadas como enxaguatório bucal, maximizando sua estabilidade e o sabor.

Ainda avaliando enxaguatórios, Gracia et al. (2010), investigaram a eficácia *in vitro* de um enxaguatório contendo 450 ppm de flúor e outros enxaguatórios por meio de perfilometria e microendentação, além de comparar a incorporação do flúor por lesões erosivas por espectrometria de massa de íon secundaria. Os espécimes de esmalte humano eram tratados por 60 s com o enxaguatório e imersos em acido cítrico 1% pH=3,8 por 300 s ou 30 min. Os resultados mostraram que a eficácia anti–erosiva dos enxaguatórios está positivamente correlacionada com a concentração de flúor. Enxaguatórios com 450 ppm de flúor conferiram proteção contra o ácido cítrico *in vitro*. Enxaguatórios com AmF, NaF e SnCl2 mostraram níveis significantemente altos de incorporação de flúor em comparação com o enxaguatório que continha somente 400 ppm de flúor.

Também Yu et al. (2010) demonstraram eficácia do enxaguatório contendo AmF, NaF e SnCl2 em reduzir a perda de cálcio significantemente até 6 min de erosão com ácido cítrico 1% pH=2,3.

Schlueter et al. (2010b) compararam a eficácia de um enxaguatório experimental com Sn e outro com NaF, ajustando-se sua concentração de flúor para 500 mg/Kg e pH=4,5, em reduzir a erosão por ácido cítrico. Os resultados mostraram que todas as soluções que continham SnF_2 reduziram significativamente mais que o grupo controle positivo (AmF/SnF_2) a perda de tecido por erosão em esmalte. Em dentina todas as soluções reduziram significantemente essa perda. Concluíram que a eficácia anti–erosiva dos enxaguatórios no esmalte depende do cátion do flúor utilizado.

Em 2011, Ganss et al., investigaram e compararam algumas pastas dentifrícias convencionais (NaF) e produtos com Sn a respeito de seu efeito de proteção contra erosão e erosão/abrasão. Os espécimes foram ciclados durante 10 dias em um regime de 6x2 min/dia. O ácido utilizado foi o cítrico. O estudo foi

dividido em 2 partes: na primeira os espécimes recebiam o “slurry” por 2x2 min/dia e eram armazenadas; na segunda, os espécimes passavam por escovação durante 15s após a imersão no “slurry”. A avaliação foi feita por perfilometria e os resultados mostraram que quando os espécimes não foram submetidos à escovação todas as pastas (NaF) e uma sem aditivo reduziram significativamente a perda de estrutura, sendo que aquela que continha Sn foi a mais efetiva. Após a escovação, somente 4 pastas contendo 450 ppm de NaF revelaram resultado significante quando comparados a pasta sem aditivo. Concluíram que pastas convencionais (NaF) reduzem a erosão, porém têm efeito limitado de prevenção quando sob regime de escovação.

Vieira et al. (2011) com o objetivo de comparar a perda de estrutura superficial empregando a aplicação diária ou única de soluções de baixa concentração de TiF_4 para a redução da erosão em esmalte. Dividiram 60 dentes bovinos em 2 grupos (diária x única) e depois os subdividiram em grupo controle (0%), 0,1%, 0,5%, 0,75% e 1% de TiF_4. Estes foram imersos em 10 ml de solução por 5 min sendo que os espécimes de aplicação diária a recebiam antes de cada ciclo erosivo (4 ciclos de 6 imersões por 2 min em refrigerante sabor limão). Os resultados mostraram que 0,5% de TiF_4 demonstrou a menor perda e 1% a maior perda. Essa redução só foi significante para o grupo que passou por ciclagem. Concluíram que múltiplas aplicações de solução de TiF_4 0,5% significantemente reduzem a erosão dental in vitro e não causam perda de esmalte durante sua aplicação.

Para verificar a prevenção contra a erosão dental por acido cítrico empregando pastas dentifrícias contendo SnF_2, em um estudo duplo cego *in situ* foi conduzido por Huysmans et al. (2011). Selecionaram 20 voluntários que utilizaram aparelhos adaptando espécimes de esmalte para a formação de película salivar. Estes então eram submetidos ao ciclo erosivo com ácido cítrico, fora da boca e os voluntários escovavam os espécimes durante 5 min, 3 vezes ao dia, por um período de 4 dias com as pastas dentifrícias. Todas as pastas continham no total 1400 ppm de flúor, sendo que a primeira continha SnF_2 e AmF, a segunda SnF_2 e NaF e a terceira NaF. Os resultados mostraram que as pastas que continham SnF_2 reduziram significativamente a perda de erosão, a que possuía NaF em sua composição não foi capaz de reduzir a perda.

2.4 Enxaguatórios Bucais

Em 1996, Grenby afirmou que não encontrou na literatura reformulações de medicamentos e preparações para higiene bucal com a finalidade de auxiliar a diminuir ou proteger a estrutura dental contra a erosão. Apontou que os produtos de higiene oral são geralmente levemente ácidos com valores de pH de 5 a 7 para os enxaguatórios bucais e de 5,8 a 7,25 para os dentifrícios.

Bhatti et al. (1994) fizeram um estudo que media o pH e a quantidade de álcool presente em alguns tipos de enxaguatórios bucais disponíveis para publico em geral, constatando que a grande maioria destes enxaguatórios apresentavam o pH ácido, alguns apresentavam o pH menor do que 3,4. A quantidade de etanol variou entre 0 e 27% .

Em 2001, Lussi e Hellwig, pesquisaram os potenciais efeitos erosivos de alguns produtos para cuidados bucais na forma de “slurry”. Nesta pesquisa, puderam concluir que apenas 1 dos produtos apresentou efeito erosivo, este possuía além de baixo pH (característica comum a quase todos os produtos estudados), pouquíssima concentração de flúor. Puderam concluir que, apesar do baixo pH, os produtos contendo flúor não apresentaram potencial erosivo mensurável.

Meyer-Lueckel e Tschoppe (2010), testaram 2 tipos de enxaguatório bucal (fluoreto de amina, estanhoso e de potássio) e 2 tipos de gel de flúor (fluoreto de sódio, fluoreto de amina) combinados com substituintes de saliva em dentes bovinos desmineralizados. Concluíram que os enxaguatórios fluoretados foram capazes de reduzir a desmineralização.

Wang et al. (2011) testaram o efeito protetor de 4 novos agentes contra a erosão dental disponíveis comercialmente. Os espécimes passaram por formação prévia de película salivar por 2 h e em seguida foram submetidos à desmineralização com suco de laranja pH=3,6 por 3 min e remineralização com “slurry” contendo um dos agentes também por 3 min. O ciclo teve duração de 4 dias

com 2 imersões por dia. Os agentes testados foram 2 tipos de Novamin® 7,5 % (fosfosilicato de cálcio e sódio), enxaguatório de Recaldent® 7,5 % (CPP–ACP) e pasta de Recaldent + 900 ppm F^-. A aplicação aconteceu previamente e após o desafio erosivo. A análise foi realizada por meio de nanodureza de superfície. Como resultado, estes observaram que nenhuma dessas misturas foi capaz de produzir efeito preventivo ou de reparação do tecido perdido, independentemente da presença de flúor.

Num desafio ácido de 5 dias, foram testadas 2 soluções enxaguatórias com concentrações diferentes de fluoreto de sódio, e 3 soluções enxaguatórias com fluoreto de sódio (100 µgF/ml) e trimetafosfato (TMP) em concentrações variadas. A forma de análise foi a microdureza e perfilometria. Os autores (Manarelli et al., 2011) concluíram que a adição de TMF a um enxaguatório fluoretado foi capaz de proteger melhor a superfície do que os que continham somente flúor.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi comparar, *in vitro*, empregando diferentes métodos de análise, o efeito de um enxaguatório bucal experimental para a prevenção/controle da erosão dental causada por ácido clorídrico incorporando-se diferentes princípios ativos: caseína, hexametafosfato de sódio, tetrafluoreto de titânio, fluoreto estanhoso II e um enxaguatório bucal disponível comercialmente (Elmex Erosion).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP/FOUSP 111/11) (Anexo A) e certificação de isenção após Análise da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA/ICB 166/2011) (Anexo B).

4.1 Delineamento Experimental

Um enxaguatório bucal experimental recebeu quatro diferentes princípios ativos e os efeitos protetores desses aditivos foram comparados com os efeitos de um produto de referência disponível comercialmente em um modelo de erosão/mineralização, utilizando 48 espécimes de esmalte bovino (n=8). A variável resposta foi a microdureza de superfície, a nanodureza de superfície e a quantidade de cálcio e fosfato liberada pelos espécimes nas soluções ácidas.

4.2 Seleção dos Dentes

Inicialmente foram selecionados 80 dentes incisivos bovinos hígidos que foram mantidos em água destilada a 4°C até sua utilização.

Os dentes foram limpos com curetas do tipo Gracey 13-14 para remoção de eventuais tecidos residuais aderidos e, em seguida, foram submetidos à profilaxia

com escovas do tipo Robson e taça de borracha, utilizando uma mistura de água e pedra-pomes. Ao final, os dentes foram lavados com jato de água/ar, seguido de banho em lavadora ultrassônica digital (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil) por 1 minuto (Barbour et al., 2011).

Empregando uma lupa estereoscópica (SZ-PT/SZ40, Olympus, Tóquio, Japão), os dentes foram examinados com aumento de 10x para eliminação de dentes com trincas ou anomalias de estrutura. Foram selecionados 66 dentes e mantidos em água destilada e refrigerados a temperatura de 4°C.

4.3 Preparo dos espécimes

Para a confecção dos espécimes, os dentes foram seccionados transversalmente, para separar a coroa da raiz, em uma cortadeira metalográfica (Labcut 1010 Extec, EUA). Numa cortadeira do tipo Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), foram montados dois discos diamantados (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com espaçamento de 6 mm entre eles. As coroas foram fixadas no suporte da máquina com cera utilidade e este suporte foi posicionado de forma a obter um fragmento de 6 mm de largura. Este fragmento era novamente posicionado com cera utilidade e um corte na transversal era feito para obtenção de um fragmento de 6 x 6 mm. A seguir, estes fragmentos foram pré- planificados em uma lixadeira Politriz (Ecomet 3 Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com discos abrasivos de granulação 400, sob refrigeração, para facilitar a posterior inclusão em resina acrílica.

Os espécimes foram fixados com cera utilidade em “sample cups” vaselinados e submetidos ao processo de inclusão com resina acrílica. Estes espécimes foram, então, polidos, sequencialmente, com discos abrasivos de carboneto de silício de granulação 400, 600, 800, 1200 e 4000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) por 1 minuto cada e sob-refrigeração. Após a utilização de cada lixa, os espécimes eram lavados com água deionizada e passavam por um banho de ultrassom durante 1 min Para finalizar, foi utilizado um disco de feltro com pasta diamantada de granulação de 3

µm (MetaDi II, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) obtendo - se uma superfície plana, lisa e polida.

Uma fita adesiva de UPVC de cor azul foi utilizada para a delimitação da área a ser exposta, obtendo-se uma janela de 3x3 mm. Os espécimes foram numerados de 1 a 66 para identificação e ao término dos procedimentos, os espécimes foram armazenados em ambiente úmido a 4°C (Figura 4.1).

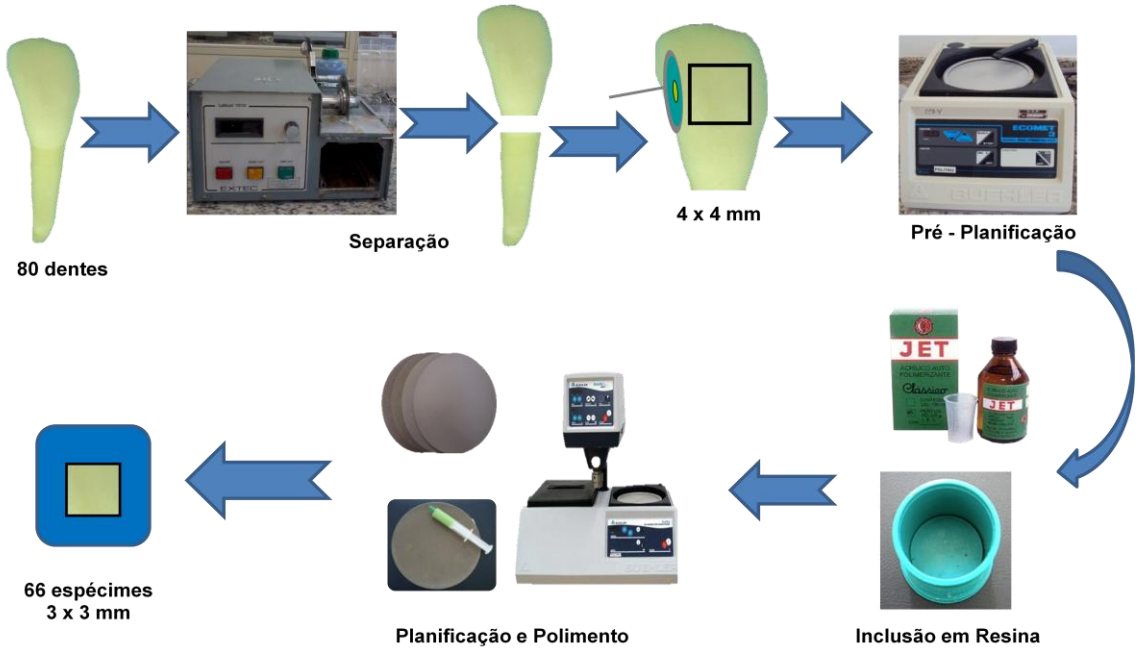


Figura 4.1 - Preparo dos espécimes

4.4 Coleta de Saliva Humana e formação da película adquirida

Para a formação da película adquirida nas superfícies dos espécimes, foi coletada saliva humana de 7 voluntários previamente selecionados e que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para a doação da saliva (Anexo C). Os voluntários selecionados possuíam idade entre 21 e 30 anos e eram livres de

doença periodontal, lesões de cárie não tratadas ou lesões de erosão. Estes também não podiam ter-se alimentado ou ingerido qualquer bebida por no mínimo 1 hora antes da coleta.

A coleta foi realizada em tubos de ensaio do tipo Falcon, que foram previamente adaptados a um recipiente com gelo para prevenir a perda de dióxido de carbono, e consequente alteração do pH da saliva coletada (Amaech; Higham, 2001; Wang et al., 2011). Para a coleta era utilizado um funil de vidro acoplado ao tubo de ensaio e recebia uma gaze com a finalidade de filtrar e separar a espuma da saliva coletada.

O protocolo utilizado foi o de Salivação Total Estimulada, onde os doadores deveriam bochechar água destilada por 30 segundos, cuspir e estimular a salivação através da mastigação de Parafilm M (American National Can, Chicago, IL, EUA) por 30 segundos e então engolir a saliva e começar a coleta, que tem duração de no máximo 10 minutos.

As coletas foram feitas durante 3 dias, nos mesmos horários e local, com temperatura ambiente e pelos mesmos doadores, obtendo-se assim, 3 tubos de coleta de cada doador.

A saliva coletada foi misturada de modo a formar um pool salivar e armazenada em refrigerador para que as quantidades pré-determinadas fossem descongeladas, conforme necessidade de uso durante os procedimentos experimentais.

Os sessenta e seis espécimes selecionados foram imersos na saliva coletada, sob agitação em agitador magnético 78 HW (LabMachine – Jiangsu, China) a 37°C por 2 horas, com a finalidade de formar a película adquirida. Logo após a imersão, estes foram gentilmente lavados com água deionizada e secos com jato de ar por 5 segundos (Figura 4.2).

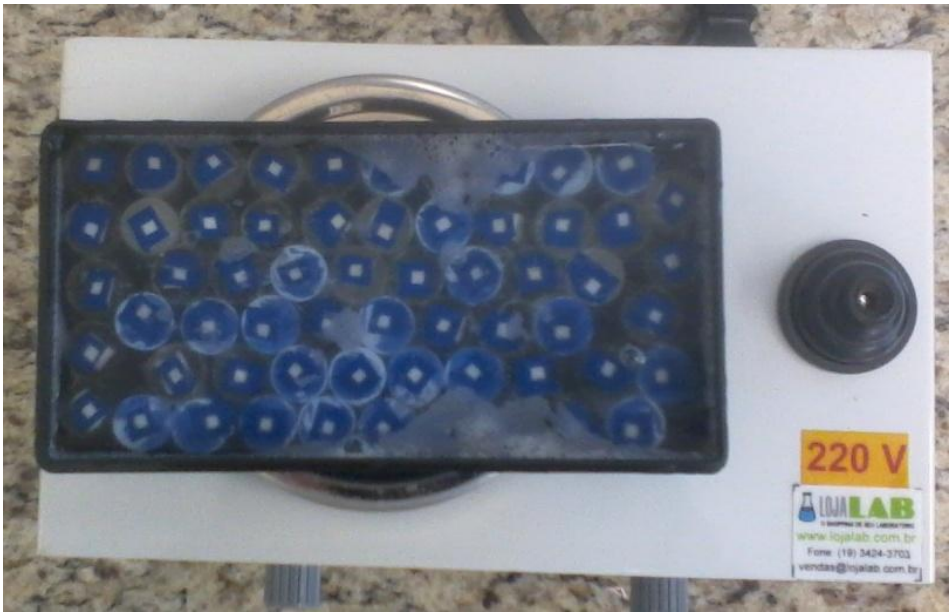


Figura 4.2 – Formação de Película Adquirida

4.5 Seleção dos Espécimes

Para a seleção dos espécimes foi aplicado o teste de microdureza do tipo Knoop empregando Microdurômetro HMV – 2000 – Shimadzu (Kyoto, Japão), com carga de 50g por 15 s (Scaramucci et al., 2012) e nanodureza com penetrador piramidal triangular (Bercovich) empregando Ultra-microdurômetro DUH – W211S (Shimadzu Co., Tokyo, Japão) com 5 µN de carga (White et al., 2011) e a taxa de aplicação de força foi de 0,01mN/seg.

Para a seleção dos espécimes que deveriam ser empregados no experimento, foram realizadas em cada espécime cinco mensurações de dureza. Após a obtenção dos resultados de dureza de cada espécime foram selecionados os 48 espécimes com valores de dureza (tanto de nano quanto de microdureza) mais semelhantes e, assim, foram removidos 8 espécimes que apresentaram os resultados de dureza mais afastados da média.

Para a confirmação de que os 48 espécimes selecionados apresentavam dureza semelhante realizou-se teste estatístico de normalidade e homogeneidade

com nível de significância de 5%. A seguir, empregou-se o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Após a constatação de que não havia diferença estatística nos valores de microdureza entre os 48 espécimes, estes foram distribuídos, aleatoriamente, nos seis grupos propostos, através de teste de amostragem aleatória sem reposição (n=8).

4.6 Preparo das Soluções

Para o preparo das soluções teste, foi utilizada uma formulação manipulada básica de enxaguatório bucal sem princípio ativo (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil). O enxaguatório bucal comercial (Elmex Erosion) utilizado para prevenir a erosão foi empregado nesta pesquisa como produto referência. As composições do Enxaguatório Bucal Base e do Enxaguatório Bucal Elmex encontram-se no quadro 4.1.

O enxaguatório base foi separado em cinco recipientes, sendo que 1 destes recipientes foi armazenado sem a adição de nenhum princípio ativo para ser utilizado como controle negativo. Aos demais foram adicionados os princípios ativos de acordo com as concentrações previamente determinadas criando os grupos experimentais apresentados no quadro 4.2.

Soluções	Composição
Enxaguátório Bucal Base	Aroma de menta, aroma de canela, sacarina sódica, tween 20, sorbitol, glicerina, salicilato de metila e nipagim.
Enxaguatório Bucal Elmex®	Água, glicerina, gluconato de sódio, óleo de rícino hidrogenado PEG-40, Olaflur, Aromatizante, cloreto estanhoso, fluoreto de sódio, betaína cocamidopropyl, sacarina sódica, ácido hidroclorídrico. Contém dois derivados de flúor (500 ppm F): fluoreto de amina e fluoreto de sódio.

Quadro 4.1-Soluções enxaguatórias e suas respectivas composições

Os aditivos utilizados neste estudo foram a Caseína (Labsynth, Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), o Hexametafosfato de Sódio (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA), o Tetrafluoreto de Titânio 0,34% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e o Fluoreto de Estanho (II) 0,87% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). As quantidades de aditivo utilizadas foram obtidas em publicações prévias (Hooper et al., 2007; Hjortsjo et al., 2010; Barbour et al., 2011) e o pH obtido em cada solução foi medido e não foi ajustado, afim de não perder as propriedades de ação de cada aditivo.

Grupo e Código	Concentrações (g/L)
Controle Negativo (C-)	Enxaguatório sem aditivos
Controle Positivo (ELM)	Elmex Erosion® (AmF e NaF – 500 ppm F^-)*
Caseína (CAS)	5*
Hexametafosfato de sódio (HMP)	0,2**
Tetrafluoreto de Titânio (TiF_4)	3,4***
Fluoreto Estanhoso (SnF^2)	8,7***

Quadro 4.2-Grupos experimentais e seus respectivos códigos, aditivos e concentrações utilizadas*Barbour et al., 2011, **Hooper, et al., 2007, *** Hjortsjo et al., 2010

4.6.1 Obtenção do pH das Soluções

Após o preparo das soluções foi realizada a mensuração do pH de cada uma. Para esta etapa utilizou-se um medidor de pH devidamente calibrado (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) e 20 ml de cada solução foram submetidos a 3 analises, sob leve agitação e a temperatura ambiente.

4.7 Preparo de Dispositivo para a Uniformização dos Tempos de Imersão

Para padronizar o tempo de imersão e ciclagem de cada espécime, tampas de tubos de ensaio do tipo Falcon de 45 ml foram fixadas com cola quente em uma placa de isopor. Fios de ortodontia de 7mm foram fixados nestas tampas para a então fixação dos espécimes (Figura 4.3).

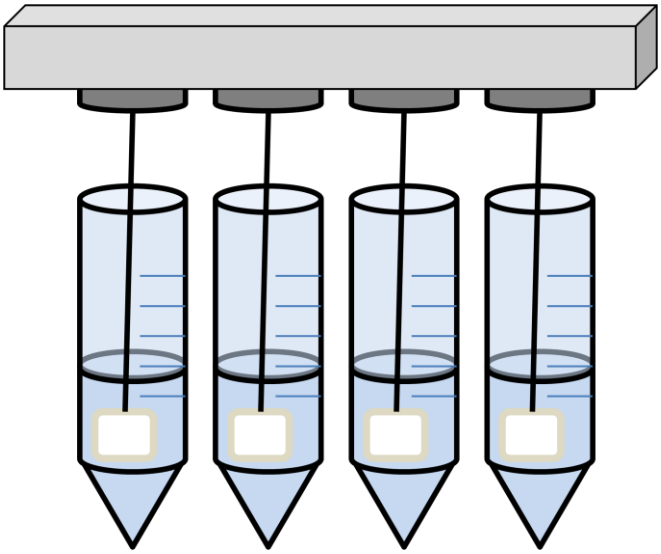


Figura 4.3 - Individualização dos espécimes

4.8 Desafio erosivo

O desafio erosivo foi realizado com Ácido Clorídrico 0,01M com pH de 2,4 que simularia um processo de erosão intrínseca (Willumsen et al., 2004; Hove et al., 2006).

Para a realização da ciclagem além das soluções já mencionadas, foi preparada saliva artificial de composição conhecida (Scaramucci et al., 2011). A composição da saliva encontra-se no quadro 4.3.

Composição	Quantidades (g/L)
$CaCl_2*H_2O$	0,213
KH_2PO_4	0,738
KCl	1,114
NaCl	0,381
Tris Buffer	12
Porcine Gastric Mucin	2,2

Quadro 4.3-Componentes e respectivas concentrações da Saliva Artificial. O pH foi ajustado para 7,0 com HCl concentrado

Um ciclo completo de desafio erosivo dava-se da seguinte forma: **(1)** Imersão dos espécimes em 20 ml de HCl 0,01M pH 2,4 por 10 seg, **(2)** imersão em 20 ml de saliva artificial por 60 seg, **(3)** imersão em 20 ml de solução teste por 30 s e **(4)** imersão em 20 ml de saliva artificial por 60 s (Figura 4.4). Este ciclo foi repetido por 3 vezes durante o mesmo dia e os espécimes foram armazenados em geladeira. Cada imersão, era feita em 1 recipiente diferente, sendo assim, ao final do desafio haviam 3 recipientes de solução desmineralizante (ácido clorídrico) para cada espécime.

A primeira imersão em HCl tinha como objetivo, simular um dente que já tivesse começado a passar pelo processo de erosão dental e a primeira imersão em solução com aditivos tinha a finalidade de tentar proteger o esmalte contra o ácido que seria aplicado na sequencia e assim por diante.

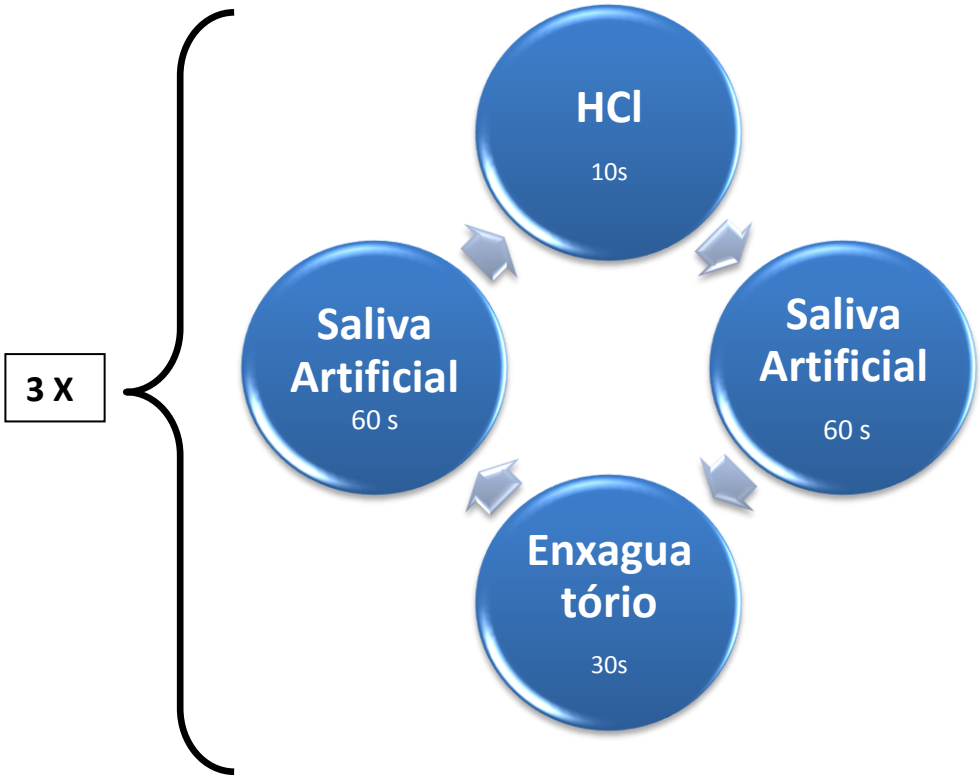


Figura 4.4 - Ciclo de desmineralização - remineralização

Após a realização da ciclagem, cada solução desmineralizante (1°, 2°, 3° imersão) foi armazenada separadamente e mantida congelada, para não ser contaminada por bactérias e fungos até o momento de sua utilização.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Em sequencia todas as amostras foram filtradas com papel de filtro, acoplado a um funil de vidro, empregando-se um filtro para cada solução. Foi selecionada uma amostra de 10 ml de cada solução, totalizando 144 amostras de soluções desmineralizantes.

4.9 Determinação da Dureza Superficial

Cada um dos espécimes foi avaliado quanto a sua dureza superficial em dois diferentes aparelhos, o Microdurômetro HMV 2000 (Shimadzu Co. Kyoto, Japão) e o Ultramicrodurômetro DUH W211S (Shimadzu Co., Tokyo, Japão).

4.9.1 Teste de Microdureza

Para a avaliação da microdureza superficial de esmalte, os espécimes foram submetidos ao teste em um microdurômetro equipado com um endentador do tipo Knoop.

Inicialmente, com o auxílio de uma morsa universal e um paralelômetro, os espécimes foram fixados e posicionados em um plano paralelo à mesa do microdurômetro e perpendicular à ponta endentadora.

Em cada espécime foram realizadas cinco endentações, com distância de 100 µm entre elas. Os parâmetros utilizados foram a carga de 50g por um tempo de 15s. (Scaramucci et al., 2011).

Os testes foram realizados por um único operador e o equipamento havia passado por recente calibração. A carga e o tempo foram programados no software CAMS – WIN (Newage Testing Instruments, Inc – Southampton, PA) do computador acoplado ao microdurômetro e a leitura foi realizada com a lente de magnificação de 50x (Figura 4.5).

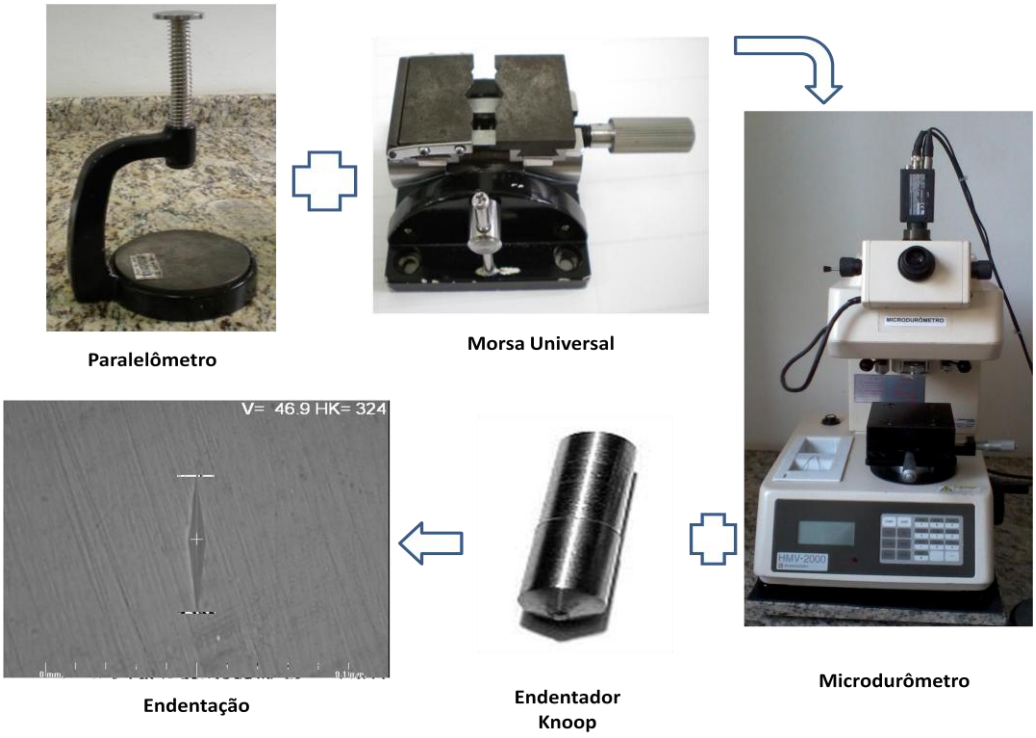


Figura 4.5 – Teste de Microdureza de superfície

4.9.2 Teste de Ultramicrodureza

Para a análise de nanodureza de esmalte, os espécimes foram submetidos ao teste em uma máquina de teste dinâmico de ultramicrodureza DUH – W211S.

O local da endentação era escolhido por meio da imagem feita por um microscópio óptico acoplado ao equipamento com aumento de 100X. A ponta endentadora do tipo pirâmide triangular com ângulo de 115° (Bercovich) era posicionada na região de interesse, para então, serem feitas as marcações, que neste caso totalizaram 5 em cada Espécime.Os parâmetros aplicados foram de 5 µN (White et al., 2011) e a taxa de aplicação de força foi de 0,01mN/s (Figura 4.6).

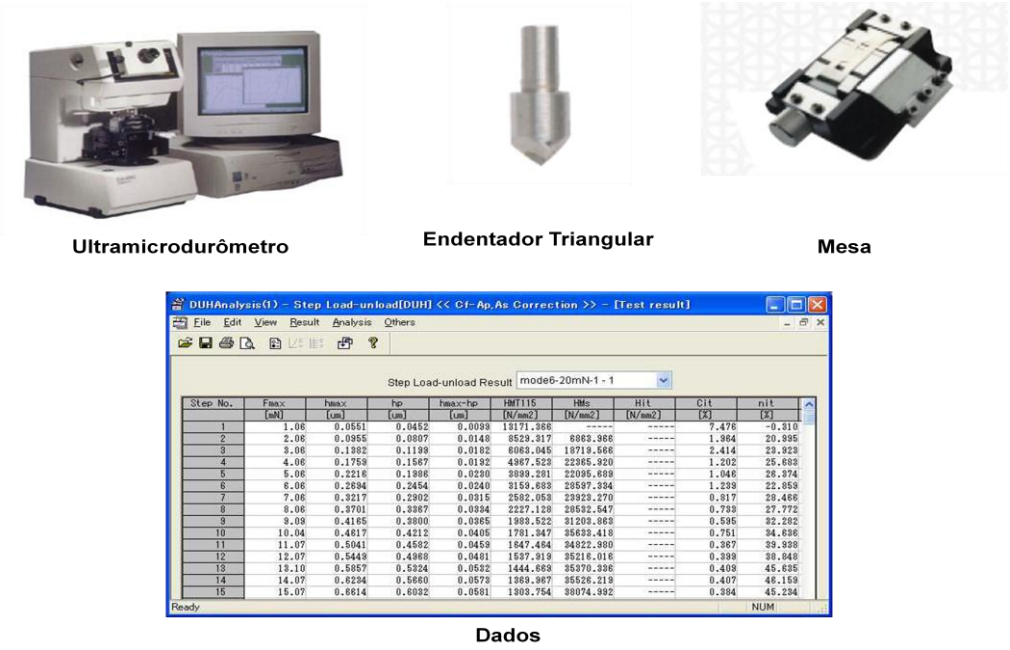


Figura 4.6 – Teste de Nanodureza de Superfície

4.10 Determinação da Quantidade de Cálcio e Fosfato por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP – OES)

A perda de cálcio e fosfato foi obtida a partir das soluções de ácido clorídrico submetidas ao desafio erosivo. A quantidade de cálcio e fosfato presente em cada solução foi determinada empregando-se o espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio 700 Series ICP – OES, (Agilent Technologies, EUA) do Laboratorio de Biologia Oral do Departamento de Materiais Dentários da FOUSP (Figura 4.7).

O espectrômetro de emissão atômica é um equipamento para leitura qualitativa e quantitativa de elementos químicos de uma solução. Esta técnica de análise química instrumental de cerca de 70 elementos químicos que faz uso de uma fonte de excitação de plasma de argônio a altas temperaturas (7.000 – 10.000 K). Para produzir, em uma amostra introduzida sob forma de neblina no centro do

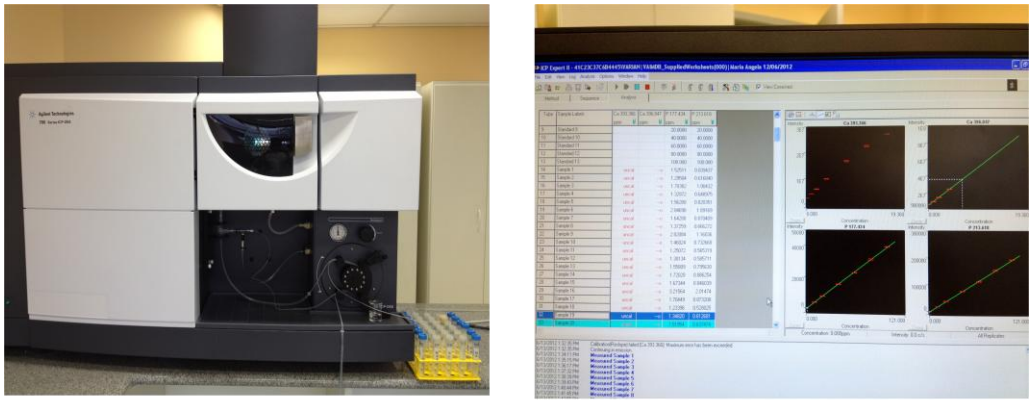
plasma, átomos excitados que emitem radiação em comprimentos de onda na faixa de 125 a 950 nm, característicos dos elementos nela presentes.

As radiações emitidas, após a separação de seus comprimentos de onda por sistemas ópticos, têm suas intensidades respectivas medidas por meio de detectores de radiação específicos e correlacionadas às concentrações correspondentes através de curvas analíticas obtidas pela medição prévia de soluções padrão.

Foram analisadas as quantidades de cálcio e fosfato de cada uma das soluções desmineralizantes (HCl) utilizadas durante a ciclagem. Também foram analisados os ácidos “brancos”, ou seja, os ácidos em que não houve contato com os espécimes. A leitura do branco serve para se obter a quantidade de cálcio presente no ácido original, servido como padrão de referência.

Foi aspirada 2,5 ml de cada solução coletada e transportada até o nebulizador, no interior do espectrômetro, para que a amostra no estado líquido fosse transformada em um gás que, então, era ionizado.

Os dados foram processados em escala de ppm (partículas por milhão) através do software ICP Expert II (Agilent Technologies, EUA). Os parâmetros utilizados para as leituras de cálcio e fosfato estabelecidos por teste piloto foram o comprimento de onda de 393,366 nm para o cálcio e 177,434 nm para o fosfato.



ICP - OES **Software**

Figura 4.7 – Análise de Íons

4.11 Análise Estatística

A análise estatística foi dividida em três partes e realizada pelo software estatístico Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA):

- Análise estatística das variáveis microdureza, nanodureza e quantidade de cálcio, por meio do teste paramétrico de análise de variância.
- Análise estatística da variável quantidade de fosfato, através do teste não paramétrico de análise de variância.
- Análise estatística da correlação entre os diferentes métodos empregados.

Os valores de dureza obtidos durante as medições de microdureza e nanodureza, bem como os de perda de cálcio e fosfato, foram separados de acordo com os respectivos grupos experimentais e tiveram suas médias calculadas.

Para a verificação da normalidade da amostra, os dados obtidos durante a pesquisa foram submetidos ao teste estatístico de Shapiro-Wilks e para verificação da homogeneidade da amostra, os dados foram submetidos ao teste estatístico de Hartley, ambos com nível de significância de 5%.

A distribuição dos dados das variáveis de microdureza, nanodureza e perda de cálcio apresentaram-se normais e homogêneas, portanto, foi utilizada a análise de variância estatística de ANOVA de 1 fator, seguida de teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Apesar de apresentar-se homogênea, a distribuição dos dados da variável de perda de fosfato não foi normal para o teste de Shapiro-Wilk, portanto utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido de teste de Tukey com nível de significância de 5%, para a análise de variância entre os grupos.

Para verificar se houve correlação entre as quatro variáveis estudadas, utilizou-se o teste de Correlação Linear de Pearson.

5 RESULTADOS

5.1 Valores de pH obtidos

Os valores de pH das soluções utilizadas neste estudo para a ciclagem estão apresentados na tabela 5.1. O Enxaguatório Base acrescido de TiF_4 foi a solução que apresentou o menor pH (1,99). A solução de ácido clorídrico, proposta para simular a desmineralização, apresentou pH de 2,46. A solução base acrescida de HMP apresentou pH de 6,88.

Tabela 5.1 - Soluções empregadas na ciclagem des/remineralização e respectivos valores de pH

Soluções	pH
HCl 0,01M	2,46
Enxaguatório Base	5,94
Elmex Erosion®	4,45
Enxaguatório Base + Caseína	5,05
Enxaguatório Base + HMP	6,88
Enxaguatório Base + TiF_4	1,99
Enxaguatório Base + SnF_2	3,13

5.2 Análise das Variáveis

Para a análise dos resultados foram consideradas as quatro variáveis: microdureza, nanodureza, quantidade de cálcio e quantidade de fosfato. Para cada

variável, o fator de variação é o tratamento de superfície em seis níveis: Controle negativo (C), Elmex Erosion (ELM), Caseína (CAS), Hexametafosfato de sódio (HMP), Tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e Fluoreto estanhoso (SnF_2) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Estatística descritiva das variáveis estudadas

Variável	Média	DP	N	Máx	Min
Microdureza	329	33,7	48	411	245
Nanodureza	260	67	48	390	127
Quantidade de Cálcio Total (ppm)	20	3,5	48	28	13
Quantidade de Fosfato Total (ppm)	2,2	1	48	6	1

DP (desvio-padrão), N (número total de espécimes), Máx (valor máximo de média de dureza ou perda de íons) e Min (valor mínimo de média de dureza ou perda de íons).

Considerando a dureza de esmalte, é possível observar que os valores de microdureza final variaram de 245 a 411, apresentando uma média de 329 com desvio padrão de 33,7; já os valores de nanodureza variaram de 127 a 390, com média de 260 e desvio padrão de 67.

Os valores da análise de íons por espectrometria demonstram que houve perda total em média de 20 ppm de cálcio e 2,2 ppm de fosfato nas soluções ácidas.

O teste estatístico de normalidade de Shapiro-Wilk para os grupos experimentais de acordo com as variáveis utilizadas e nível de significância de 5%, constataram que os valores de fosfato obtidos na análise de íons no espectrômetro não demonstraram distribuição normal (Tabela 5.3), o que justificou a utilização do

teste estatístico de Kruskall Wallis com a finalidade de obter-se a análise de variância para a comparação entre os grupos.

Tabela 5.3 - Teste de Normalidade de Shapiro - Wilks (w) para todas as variáveis estudadas

Variável	Estatistica (w)	Significância	Distribuição Normal (5%)
Microdureza	0,98	0,95 (p> 0,05)	Sim
Nanodureza	0,96	0,36 (p> 0,05)	Sim
Análise de Cálcio Total	0,96	0,36 (p>0,05)	Sim
Análise de Fosfato Total	0,85	0,009 (p<0,05)	Não

Na tabela 5.4, apresentamos as homogeneidades de Barlett para cada variável com nível de significância de 5%, demonstrando que todos os grupos apresentaram-se homogêneos.

Tabela 5.4 - Teste de Homogeneidade de Hartley para todas as variáveis estudadas.

Variável	Estatistica (w)	Significância	Distribuição Homogênea (5%)
Microdureza	3,2	(p> 0,05)	Sim
Nanodureza	4,6	(p> 0,05)	Sim
Análise de Cálcio Total	5	(p>0,05)	Sim
Análise de Fosfato Total	1,67	(p<0,05)	Sim

5.2.1 Microdureza de Superfície

A tabela 5.5 e figura 5.1 apresentam as médias finais dos valores de microdureza e seus respectivos desvios padrão dos 6 grupos experimentais.

Tabela 5.5 - Médias dos Valores de Microdureza Knoop e respectivos desvios-padrão

TRATAMENTOS	MF	DP
C	331	21
ELM	353	22
CAS	330	23
HMP	319	32
TiF_4	292	34
SnF_2	351	33

Desvio - padrão (DP). Controle negativo (C), Controle positivo (ELM), Caseína (CAS), Hexametafosfato de sódio (HMP), Tetrafluoreto de titâneo (TIF_4) e Fluoreto estanhoso (SnF_2).

Os dentes submetidos às soluções ELM E SnF_2 apresentaram os maiores valores médios de dureza e diferentes estatisticamente da solução de TiF_4 que apresentou o menor valor. Ainda o ELM, SnF_2, C, CAS e HMP são semelhantes estatisticamente.

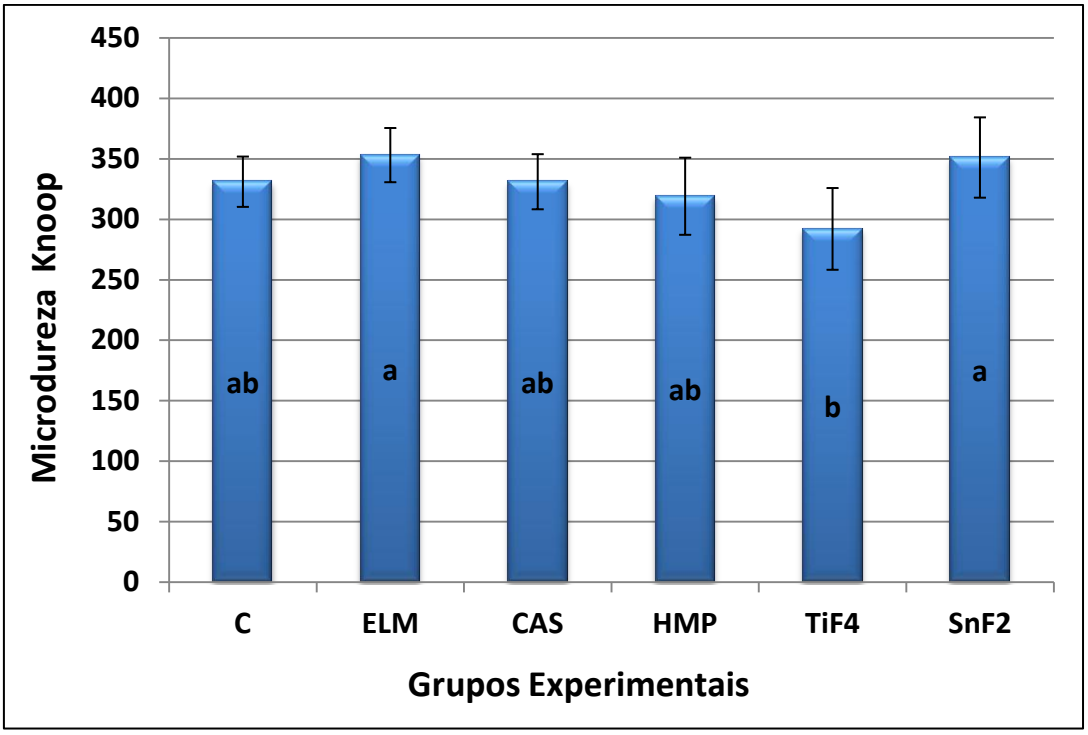


Figura 5.1 - Comparação das médias dos valores de microdureza final entre os grupos experimentais. As barras representam os desvios-padrão de cada grupo. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística (p<0,05)

5.2.2 Nanodureza de Esmalte

A análise dos dados de nanodureza de esmalte (Tabela 5.6) mostra que o grupo que obteve maior valor foi o tratado com o SnF_2 (323), apresentando juntamente com a CAS o maior desvio padrão (65). Novamente o grupo tratado com TiF_4, demonstrou o menor valor de dureza (173).

Tabela 5.6. - Médias dos Valores de Nanodureza e respectivos desvios-padrão

TRATAMENTOS	NF	DP
C	280	40
ELM	284	51
CAS	255	65
HMP	243	36
TiF_4	173	39
SnF_2	323	65

Desvio - padrão (DP) Nonodureza Final (NF)

A figura 5.2 mostra que o grupo tratado com a solução contendo SnF_2 foi a que apresentou o maior valor médio de nanodureza e é estatisticamente diferente dos grupos tratados com as soluções contendo HMP e TiF_4 que apresentaram menores valores. Os grupos em que os espécimes foram tratados com SnF_2, C, ELM e CAS apresentaram valor médio de dureza estatisticamente semelhante.

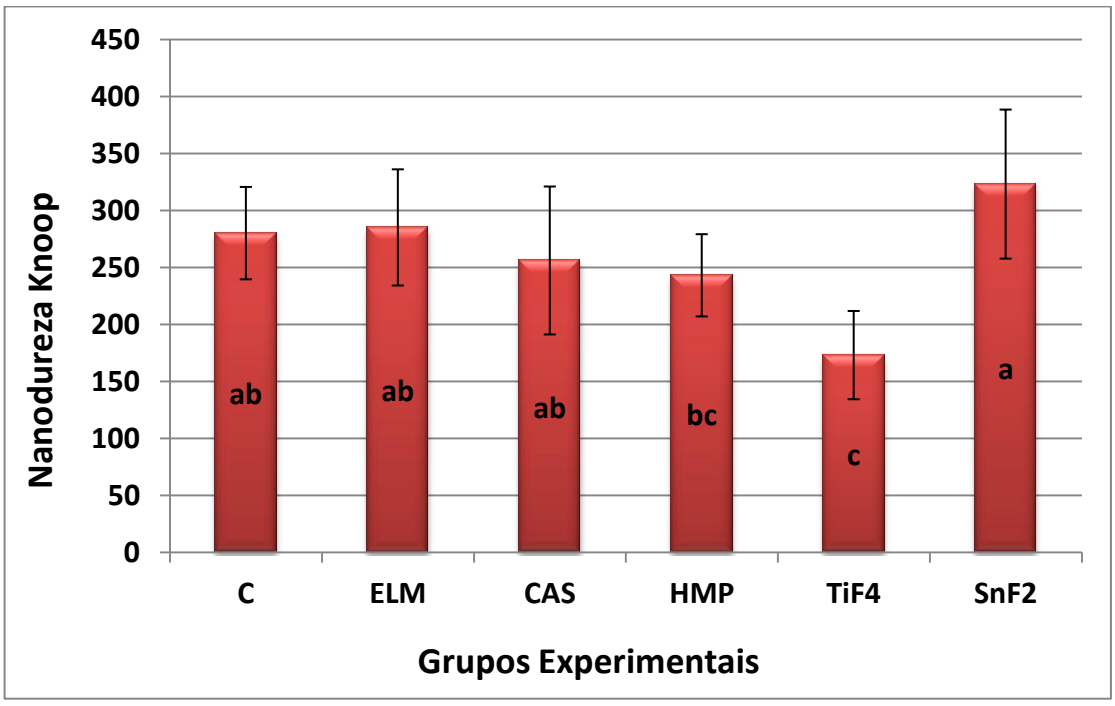


Figura 5.2 - Comparação das médias dos valores de nanodureza entre os grupos experimentais. As barras representam o desvio-padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p<0,05$).

5.2.3 Análise de Cálcio

A tabela 5.7 apresenta as médias dos valores de perda de cálcio e seus respectivos DP para cada grupo experimental em cada uma das duas imersões Na primeira imersão a maior perda de íons cálcio (13,27±3,1) ocorreu no grupo C. A menor perda ocorreu no grupo ELM (9,31± 2,0). Na segunda imersão a maior perda de íons cálcio (10,86 ± 3,0) ocorreu no grupo CAS seguida pelo grupo C (10,32 ± 2,6).

Tabela 5.7 - Médias dos valores de perda de cálcio e seus respectivos DP nas 2 imersões realizadas

TRATAMENTOS	PRIMEIRA IMERSÃO		SEGUNDA IMERSÃO	
	Cálcio	DP	Cálcio	DP
C	13,27	3,1	10,32	2,6
ELM	9,31	2,0	9,37	1,8
CAS	10,66	1,8	10,86	3,0
HMP	9,62	1,8	9,18	2,6
TIF_4	9,53	1,1	9,61	2,6
SNF_2	10,06	1,5	9,88	1,0

A figura 5.3 apresenta a comparação das médias dos valores de perda de cálcio e seus respectivos DP após a primeira imersão em solução com aditivo. Pode-se observar que o grupo C apresentou a maior média de perda de íons cálcio em relação a todos os outros grupos experimentais, sendo estatisticamente semelhante ao grupo CAS. Os grupos ELM, HMP, TIF_4 e SNF_2 mostraram ser estatisticamente semelhantes e diferentes do grupo C.

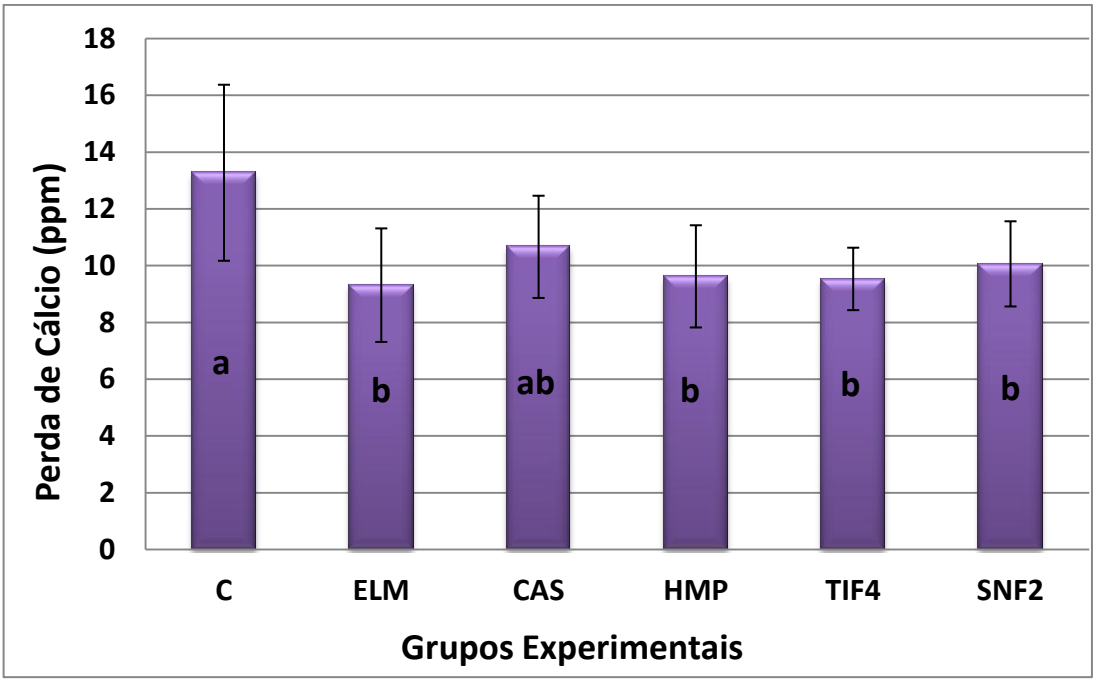


Figura 5.3 - Análise da média da quantidade de cálcio perdido na primeira imersão Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

A figura 5.4 apresenta a comparação das médias dos valores de perda de cálcio e seus respectivos DP após a segunda imersão. Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) entre nenhum dos grupos estudados, sendo todos eles semelhantes ao grupo C.

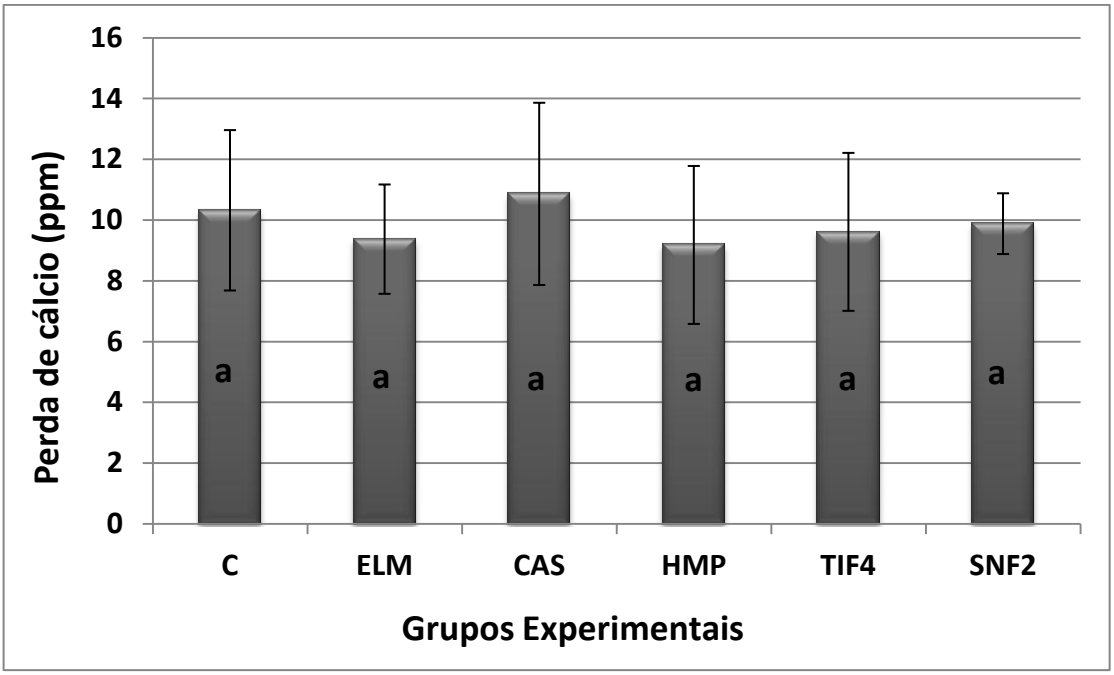


Figura 5.4 - Análise da quantidade de cálcio perdido na segunda imersão em HCl após imersão nos respectivos grupos experimentais. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$)

A tabela 5.8 apresenta a média dos valores de perda de cálcio total (soma da primeira e segunda imersão) e seus respectivos desvios-padrão para cada grupo experimental. O grupo C foi o que demonstrou maior perda de íons cálcio (23 ± 4,7) e maior desvio padrão. Os grupos ELM e TiF_4 obtiveram a menor perda de íons cálcio (19) e desvio-padrão de respectivamente 3 e 2,7.

Tabela 5.8. - Valores de Perda de Cálcio Total e DP

TRATAMENTOS	Ca (ppm)	DP
C-	23	4,7
ELM	19	3
CAS	20	2,5
HMP	18	3
TiF_4	19	2,7
SnF_2	20	2,2

A figura 5.5 mostra que o grupo C obteve a maior média de valor de perda de cálcio entre todos os grupos, apresentando-se estatisticamente diferente dos grupos ELM e HMP, que apresentaram os valores de menor perda. Os grupos CAS, TiF_4, SnF_2 e C- mostram ser estatisticamente semelhantes.

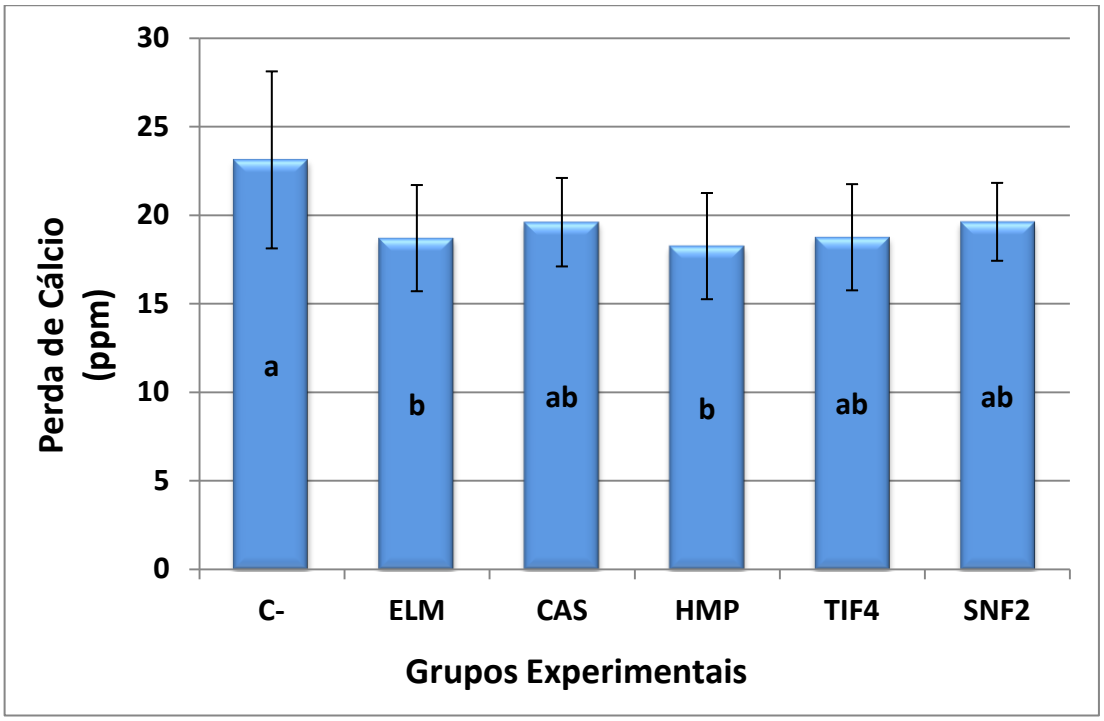


Figura 5.5 - Comparação da quantidade de perda de cálcio total entre os grupos experimentais em ppm. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p<0,05$)

5.2.4 Análise de Fosfato

A tabela 5.9 apresenta as médias de valores de perda de fosfato e seus respectivos DP para cada grupo experimental em cada uma das duas imersões.

Na primeira imersão a maior perda de íons fosfato ocorreu no grupo controle (2,08 ± 1,0), sendo a menor perda encontrada no grupo ELM (1,08 ± 0,6). Na segunda imersão as perdas variaram entre 1,87 (C) e 1,07 (ELM) com DP entre 0,8 (SNF2) e 0,5 (C e HMP).

Tabela 5.9.-Médias dos valores de perda de fosfato e seus respectivos DP nas 2 imersões realizadas

TRATAMENTOS	PRIMEIRA IMERSÃO		SEGUNDA IMERSÃO	
	Fosfato	DP	Fosfato	DP
C	2,08	1,0	1,87	0,5
ELM	1,08	0,6	1,07	0,8
CAS	1,44	0,1	1,76	0,7
HMP	1,36	0,7	1,30	0,5
TIF_4	1,20	0,7	1,27	0,7
SNF_2	1,37	0,6	1,25	0,8

A figura 5.6 apresenta a comparação das médias dos valores de perda de fosfato e seus respectivos DP após a primeira imersão. Observa-se que o grupo ELM apresentou menor perda de íons fosfato, sendo estatisticamente diferente do grupo C que, por sua vez, mostrou-se estatisticamente semelhante a todos os outros grupos estudados (CAS, HMP, TIF_4 e SNF_2).

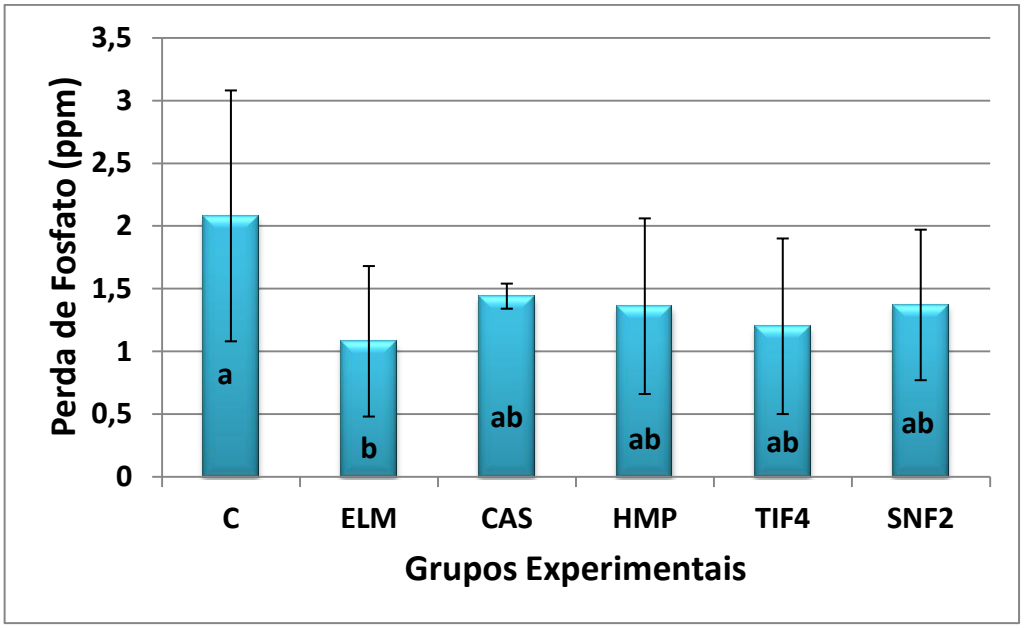


Figura 5.6. - Análise da quantidade de fosfato perdido na primeira imersão em HCl. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$)

A figura 5.7 apresenta a comparação das médias dos valores de perda de íons fosfato e seus respectivos DP após a segunda imersão. Percebe-se que os resultados foram semelhantes aos obtidos na primeira imersão, sendo o grupo ELM estatisticamente diferente do grupo C que, por sua vez, apresentou-se estatisticamente semelhante aos demais grupos experimentais estudados.

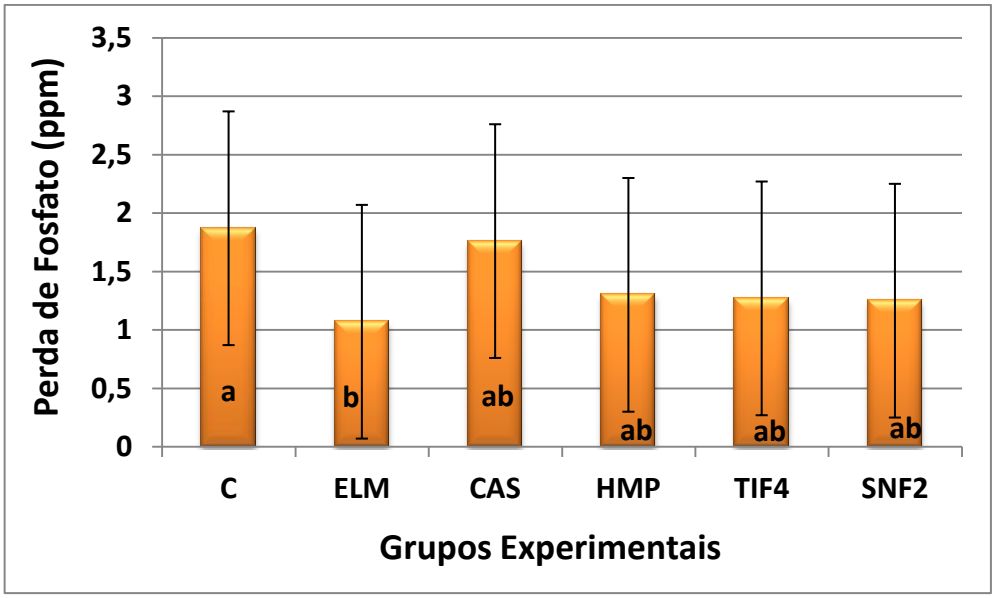


Figura 5.7 - Análise da quantidade de fosfato perdido na segunda imersão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (p<0,05)

A tabela 5.10 e apresenta as médias dos valores de perda do fosfato total (soma da primeira e segunda imersão) e seus respectivos desvios-padrão para cada grupo experimental. O grupo C foi o que mais perdeu fosfato (4,0) seguido pelo grupo CAS (3,2), já o ELM apresentou o menor valor de perda (1,2). Já os grupos HMP, TiF_4 e SnF_2 apresentaram valores que variaram de 2,5 a 2,0. Os SP variaram de ± 0,6 (HMP) a ± 1,4 (TiF_4).

Tabela 5.10 - Médias dos Valores de Perda de Fosfato Total e respectivos DP

TRATAMENTOS	PO (ppm)	DP
C	4,0	1,0
ELM	1,2	1,2
CAS	3,2	1
HMP	2,5	0,6
TiF_4	2,0	1,4
SnF_2	2,2	1,2

A figura 5.8 apresenta a comparação entre a perda total de fosfato dos grupos experimentais e o controle. ELM e TiF_4 mostram as menores perdas de íons fosfato, sendo estatisticamente diferentes do grupo C. Já a CAS, o TiF4 e o SnF_2 mostraram-se semelhantes ao grupo controle.

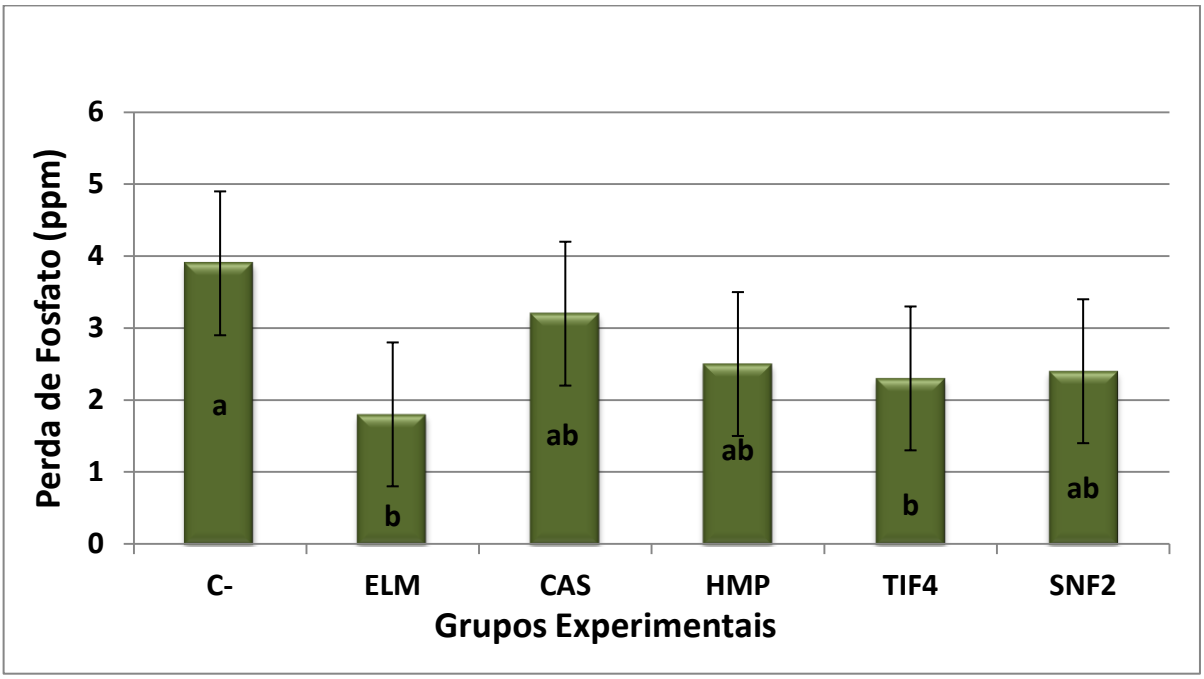


Figura 5.8 – Comparação da quantidade de perda de fosfato total entre os grupos experimentais em ppm. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p<0,05$)

5.2.5 Correlação entre as variáveis

A tabela a seguir (Tabela 5.11), apresenta a média final de cada um dos grupos e testes experimentais utilizados para a confecção do Teste de Correlação de Pearson.

Tabela 5.11-Valores de médias das Variáveis para o Teste de Correlação de Pearson

GRUPOS	MICRODUREZA	NANODUREZA	CÁLCIO TOTAL	FOSFATO TOTAL
C	331	280	23.6	3.9
ELM	353	285	18.6	1.2
CAS	331	256	21.5	3.2
HMP	319	243	18.8	2.5
TIF_4	292	173	19.1	1.9
SNF_2	351	323	19,9	2.2

Para verificar se havia correlação entre as quatro variáveis testadas, foi executado o teste de Correlação Linear de Pearson. Os resultados encontram-se na tabela 5.12. Estes dados também podem ser visualizados nos gráficos 5.1 e 5.2.

Tabela 5.12 - Correlação Linear de Pearson para todas as variáveis

CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS						
VARIÁVEIS	**MICRO X NANO**	**MICRO X CÁLCIO**	**MICRO X FOSFATO**	**NANO X CÁLCIO**	**NANO X FOSFATO**	**CÁLCIO X FOSFATO**
r (Pearson)	0.94	0.08	-0.1	0.24	0.1	0.9
p=	0.004	0.87	0.84	0.63	0.84	0.01
SIGNIFICÂNCIA	5%	ns	ns	ns	ns	1%

Coeficiente de correlação (r).

Foi aplicado o Test t aos níveis de 5 e 1%, informando-se que as correlações são lineares. Observa-se que houve correlação estatística entre as variáveis microdureza e nanodureza e entre a análise da perda de cálcio e perda de fosfato.

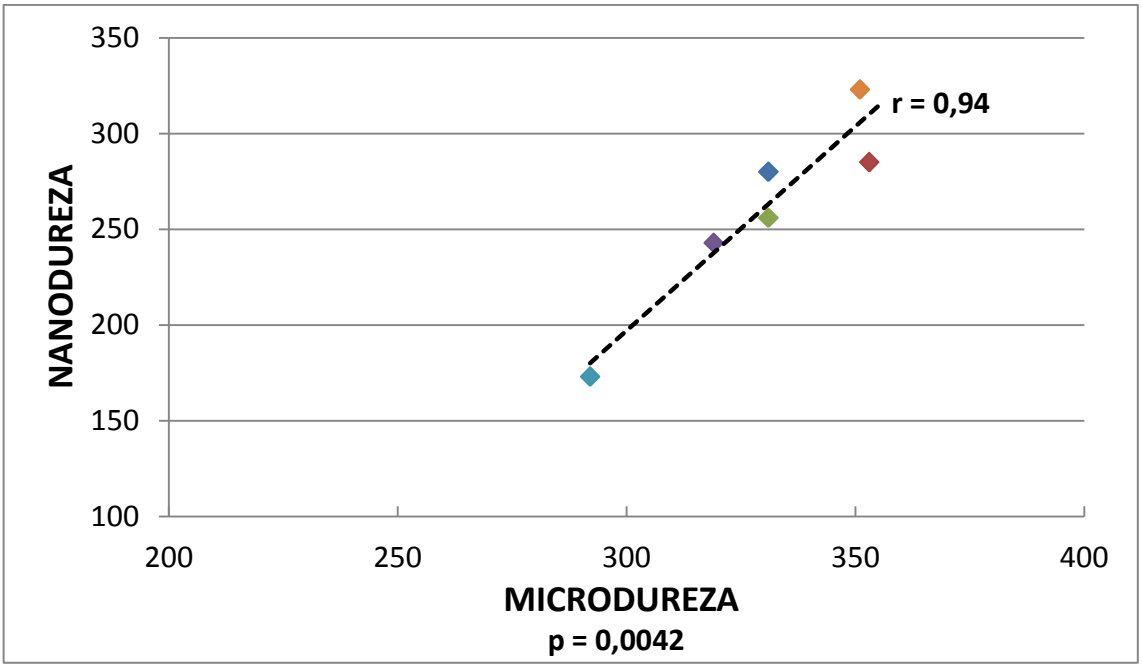


Gráfico 5.1-Correlação Linear de Pearson para Microdureza e Nanodureza. Coeficiente de correlação (r)

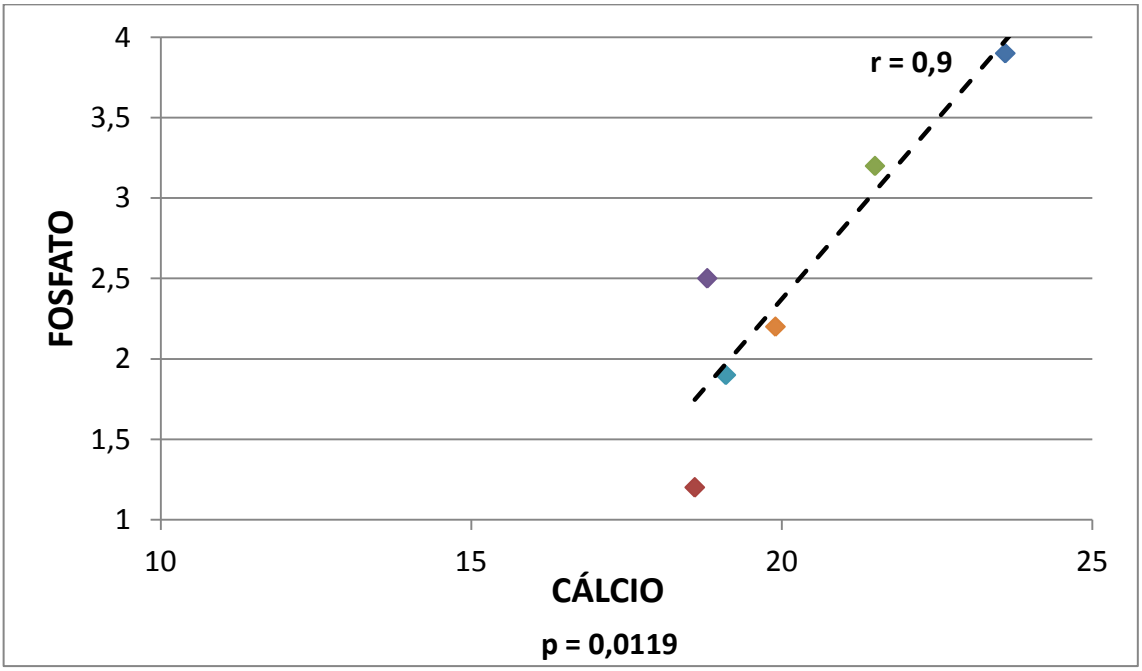


Gráfico 5.2-Correlação Linear de Pearson para Perda de cálcio e fosfato. Coeficiente de correlação (r)

6 DISCUSSÃO

Hoje o mercado dispõe de diversos produtos de higiene bucal para prevenção e controle da cárie dentária, como pastas dentifrícias e enxaguatórios bucais. Enxaguatórios bucais são ótimas opções para complementação da higiene bucal, mas também poderiam ser uma alternativa para pessoas que necessitam controlar a perda de estrutura dental causada pela erosão, principalmente aqueles portadores de doenças que causam uma alteração gástrica como: bulimia, hérnia de hiato, anorexia, gastrite, regurgitação e refluxo gastresofágico.

Atualmente, existe somente um enxaguatório bucal, disponível comercialmente, específico para erosão dental. Este é produzido à base de fluoreto de sódio, fluoreto de amina e cloreto estanho, e é comercializado somente na Europa (Elmex Erosion®) e que foi empregado como um dos grupos experimentais neste estudo.

Vários princípios ativos (caseína, flúor, fosfatos, cálcio, compostos de flúor e etc) para controlar a erosão dental têm sido pesquisados, mas a literatura cientifica ainda apresenta muitas dúvidas quanto aos efeitos protetores e/ou remineralizadores destes. Alguns destes princípios ativos mais promissores foram selecionados a partir da literatura e foram avaliados neste estudo com finalidade de serem incorporados a um enxaguatório bucal. A literatura apresenta poucos estudos que propõem ou avaliam enxaguatórios com a finalidade de prevenir ou controlar a erosão dental.

6.1 Fluoretos

Os resultados obtidos com relação as análise de micro e nanodureza mostraram não haver diferença estatística entre os dentes submetidos aos enxaguatórios com aditivos e o controle negativo, exceto pelo TiF_4, que apresentou médias de valores de dureza menores do que o grupo C, sendo essas médias estatisticamente significantes quando o teste realizado foi o de nanodureza.

O flúor já tem efeito comprovado de ação na prevenção e remineralização de esmalte dental em processos cariosos (ten Cate et al., 1997; Lagerweij; ten Cate, 2002) e vem sendo amplamente estudado quanto a seus efeitos no esmalte desmineralizado em diferentes concentrações, sais, consistências, formas de aplicação e por processos de erosão de diferentes etiologias (Lagerweij; ten Cate, 2002; Larsen; Richards, 2002;; Bartlett et al., 2004; Hove et al., 2006; Hove et al., 2007a; Hove et al., 2007b; Wiegand et al., 2008a; Wiegand 2008b; Schlueter et al., 2009a; Schlueter et al., 2009b; Schlueter et al., 2009c; Gracia et al., 2010; Vieira et al., 2011; Wegehaupt et al., 2012) .

O fato de a solução de TiF_4 ter apresentado os menores valores de dureza pode estar ligado ao seu pH, que neste estudo foi de 1,99. Sendo assim, além da solução de HCl o esmalte também sofreu amolecimento pela ação do pH da solução de TiF_4, apresentando-se estatisticamente perceptível no teste de nanodureza, onde o endentador penetra menos profundamente que o endentador utilizado para a realização da microdureza, captando pequenas mudanças na superfície. Barbour et al. (2005a), demonstraram que a nanodureza pode detectar o amolecimento dental a partir de 30 s de exposição ao ácido cítrico, em pH de 3,3, reforçando que essa técnica de análise é sensível o bastante para estudos iniciais de erosão (Schlueter et al., 2011).

Recentemente, Venasakulchai et al. (2010) compararam enxaguatórios bucais com e sem flúor através de ciclagem com ácido cítrico e obtiveram efeito positivo entre a utilização de flúor e microdureza. Também observaram que o aumento na concentração destes aditivos conduz a menor perda de estrutura ao empregar

perfilometria. Talvez essa relação não tenha sido encontrada neste trabalho, porque o tipo de ácido utilizado foi o HCl. Este ácido promove uma desmineralização muito mais acentuada que o ácido cítrico.

O efeito do ataque direto do íon de hidrogênio ocorre por combinação com os carbonatos (CO_3) e/ou fosfatos (PO_4) liberando todos os íons dessa região da superfície do cristal levando a uma erosão direta da superfície. O ácido cítrico em meio aquoso é uma mistura de íons de hidrogênio, ácidos e moléculas ácidas não dissolvidas, o H+ age diretamente sobre o dente, mas também há a ação de complexação do cálcio. O HCl em meio aquoso dissocia-se em H^+ e Cl^- (cloreto) e, rapidamente e diretamente, dissolve e remove a superfície mineral (Featherstone e Lussi, 2006).

O baixo pH do flúor é desejável para potencializar os efeitos de proteção causados pelo mesmo. Isso pode ser observado analisando-se os pHs das soluções, onde ELM, TiF_4 e SnF_2 tem pH abaixo do crítico para desmineralização, mostrando-se potencialmente capazes de produzir dissolução. Neste estudo, optamos por não ajusta-los para não alterar sua possível ação. O baixo pH da solução de fluoreto causa desmineralização do esmalte e forma ácido fluorídrico (HF), o que aumenta a penetração dos íons de fluoreto e promove a formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) (Gron, 1977).

Gu et al. (1996), pesquisando a influência das condições de superfície dental na incorporação de flúor pelo esmalte, mostrou que quando os espécimes eram tratados com ácido fosfórico 37% antes de receber o tratamento com flúor (TiF_4 1%) a incorporação deste era maior do que quando aplicado sozinho. Dessa forma, após o “condicionamento”, mais componentes orgânicos estão expostos e há maior área de superfície, contribuindo para o aumento da incorporação de flúor. Além disso, há a formação de uma camada de dióxido de titânio na superfície de esmalte, o que aumentaria a resistência do mesmo.

Segundo Mundorff et al. (1972) o fluoreto de titânio interage com a superfície dental de duas formas: quimicamente, diminuindo a solubilidade do esmalte e aumentando o conteúdo de flúor; e fisicamente, formando uma “capa” de proteção em toda a superfície do esmalte. Esta capa seria formada por uma ponte organometálica de moléculas de flúor e esmalte. Büyüikylmaz et al. (1997),

analisando a resistência do esmalte humano tratado com TiF_4 (1% e 4%) em um desafio erosivo com HCl (0,1 M pH 1,2), observaram, por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura, uma camada maciça e resistente ao ácido recobrindo a superfície de esmalte. Apesar da presença dessa camada protetora, uma ligeira queda nos valores de microdureza pôde ser constatada. Assim, concluíram que essa camada é mais espessa e aderente quando utilizado o TiF_4 em concentração de 4% e apesar de ser uma camada "delicada" é bastante estável. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, pois apesar das análises de leitura de cálcio das soluções de TiF_4 apresentarem menor perda de íons que o controle na primeira imersão, foi observada diminuição da dureza nas análises de micro e nanodureza.

O efeito protetor do TiF_4 pode ser observado na análise de cálcio na primeira imersão, onde este mostrou-se estatisticamente diferente do C- e semelhante ao ELM, SnF_2 E HMP. Na segunda imersão não pode ser observado esse efeito, pois não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos. Quando foi somada a perda de cálcio das 2 imersões, o TiF_4 não apresentou diferença estatística se comparado ao controle. Estes resultados sugerem um efeito inicial do TiF_4 que não se mantém ao longo dos episódios ácidos, mesmo com a reaplicação do enxaguatório. Resultados semelhantes foram encontrados por Hove et al. (2007b) que utilizaram HCl 0,01M pH=2,2 em diferentes tempos de imersão, onde o TiF_4 reduziu significantemente o efeito erosivo do ácido, porém nestes estudos o flúor foi aplicado somente uma vez. Esta proteção foi melhor na primeira exposição e foi declinando gradualmente após a segunda e terceiras imersões. Os autores sugeriram que essa proteção só dura por 3 exposições consecutivas ao ácido. Esta tendência de diminuição do efeito do TiF_4 também foi encontrada por Hove et al. no ano de 2006. O fato de a proteção ser diminuída nas seguintes exposições ao enxaguatório e ao ácido, pode ser explicado pelo flúor necessitar de uma superfície pré-condicionada para se aderir, sendo assim, as superfície dos espécimes utilizados no presente estudo possivelmente ainda possuíam a película formada pelo flúor, o que pode ter diminuído a eficácia de formação de uma nova película.

Com o objetivo de estudar o efeito de vernizes de TiF_4 (4%) comparados com vernizes de NaF e soluções de TiF_4 (4%), Magalhães et al. (2008), submeteram dentes bovinos a boca artificial com desafio erosivo realizado com refrigerante de

limão pH=2,6 numa ciclagem de 5 dias, 6 x ao dia. Neste estudo a solução de TiF_4 não apresentou efeito preventivo contra a erosão durante os 5 dias, porém quando em forma de verniz ele promoveu esta proteção. Os autores acreditam que este efeito foi possível, pois o verniz fica mais concentrado na superfície e durante mais tempo, prolongando a reação do fluoreto com o esmalte. Estes resultados mostram que a forma de apresentação também pode influenciar na ação do tetrafluoreto o que pode ter influenciado nos resultados obtidos no presente estudo.

O efeito protetor do TiF_4 em variadas concentrações e metodologias de avaliação já foi demonstrado em vários estudos (Büyükyilmaz et al., 1997; Tezel et al., 2002; Schlueter et al., 2007; Vieira et al., 2011), porém pouco se sabe sobre a durabilidade dessa película formada por ele (Tveit et al., 1988).

Resultados semelhantes aos encontrados para o TiF_4 foram encontrados quando avaliou-se a ação do SnF_2 quanto a perda de cálcio nas 2 imersões e na soma de todas elas.

Segundo Young et al. (2006), é provável que o mecanismo de inibição da erosão do SnF_2 seja baseado na combinação dos íons de Sn e fluoreto de cálcio, onde os íons estanhosos formam uma camada de íons Sn adsorvidas a superfície dental e a deposição de fluoreto de cálcio sobre a camada de estanho. Hove et al. (2006) avaliaram SnF_2 e TiF_4 quanto a proteção da superfície submetida ao ácido cítrico. O SnF_2 mostrou 50% de redução nas profundidades das lesões e o TiF_4 88 %. Os dois fluoretos mostraram uma capa de proteção sobre a superfície, nas quais foram observadas rachaduras quando o tempo de erosão foi aumentado.

Willumsen et al. (2004) verificaram os efeitos do pré-tratamento com SnF_2 contra a exposição ácida ao HCl 0,1 e 0,01M e concluíram que essa aplicação prévia foi capaz de prevenir a erosão, principalmente quando o pH do ácido era de 2,2. Wiegand e Attin (2003) e Ganss et al. (2004) também encontraram essa proteção, porém em altas concentrações do SnF_2. Já, Young et al. (2006) estudando, *in vivo*, o efeito de pastas dentifrícias com SnF_2 em lesões de erosão dental observaram que estas são capazes de proteger o esmalte quando o ácido cítrico era de 10 mmol, porém quando a concentração era de 100 mmol não foi observado nenhum efeito. Concluíram que estas pastas com SnF_2 são capazes de proteger o esmalte desde que contra um ácido fraco. Este efeito positivo de pastas

dentifrícias com SnF_2 também foi encontrado por Huysmans et al. (2011). Como o ácido utilizado no presente estudo foi um ácido forte (HCl), esta pode ser uma explicação para a ausência de efeito após a primeira imersão.

Schlueter et al. (2010b) compararam a eficácia de um enxaguatório experimental com SnF2 e outro com NaF.Neste estudo, todas as soluções que continham SnF2 reduziram significativamente mais a erosão do que o grupo controle. Estes mesmos autores (2009b) compararam a eficiência de misturas de AmF, NaF e SnF2 em diferentes concentrações para a redução de erosão por ácido cítrico. Em todas as concentrações a composição foi capaz de reduzir a erosão dental. Nestes 2 estudos o pH das soluções foi ajustado para 4,5 e no presente estudo o SnF2 tinha o pH de 3,13. Talvez este fluoreto apresente melhores resultados quando em pH menos ácido, pois neste pH, a remineralização não pode acontecer e seu efeito fica dependente somente da camada protetora.

O ELM apresentou esse pH de aproximadamente 4,5 e foi o mesmo utilizado nos estudos anteriores. Este composto, disponível comercialmente vem apresentando bons resultados quanto a proteção da erosão dental. Como seu princípio ativo é baseado no flúor e no cloreto de estanho, supõe-se que sua ação seja também a de formação de uma película protetora sobre a superfície do dente. Sendo assim, o ELM não apresentou resultados positivos quanto à análise de dureza, pelos mesmos motivos já apresentados anteriormente. Quando o ELM foi analisado quanto à perda de íons na solução, este apresentou proteção contra a erosão quanto comparada com o controle, em todas as imersões (exceto a segunda de cálcio) e tanto para perda de cálcio quanto de fosfato.

Os resultados do grupo ELM (AmF/SnCl2/NaF) obtidos no presente estudo, estão de acordo com o apresentado na literatura. Gracia et al. avaliaram este enxaguatório no ano de 2010 e concluíram que este, mostrou níveis de incorporação de flúor significantemente altos contra o ácido cítrico. Esse efeito protetor também foi encontrado neste mesmo ano por Yu et al. reduzindo a perda de cálcio por erosão com ácido cítrico por até 6 min.

Schlueter et al. 2009a, testaram os compostos empregados no ELM (AmF/SnCl2/NaF) em diferentes concentrações com exposição ao ácido cítrico. Os resultados mostram que a deposição de estanho na superfície dental foi alta tanto

para os espécimes que sofreram erosão quanto o controle, porém este último não incorporou o estanho ao esmalte. A incorporação foi mais profunda quando em altas concentrações. Concluíram que a eficácia dessas soluções parece ser dependente principalmente da incorporação do estanho no esmalte. Estes mesmos autores (2009c) concluíram que a concentração de Sn pode ser reduzida sem reduzir sua eficácia.

O fato de na análise de fosfato, tanto na primeira imersão quanto na segunda, ter mostrado perda semelhante entre o controle e todos os outros grupos (exceto ELM), pode estar ligada ao fato de algumas dessas soluções possuírem baixo pH o que potencializa o efeito do HCl. Este se dissocia e seus íons H+ ligam-se aos fosfatos do dente, o que aumentaria sua concentração na solução. No caso do HMP, as concentrações de fosfato na solução são semelhantes ao controle provavelmente pelo fato de este possuir fosfato em sua composição e talvez o ELM tenha se mantido melhor por apresentar pH um pouco mais alto que os outros fluoretos testados.

É interessante observar que os resultados encontrados tanto na análise de cálcio quanto na análise de fosfato nos permitem perceber que, quando comparadas entre si, todas as soluções que continham fluoretos (ELM, TiF_4 e SnF_2) comportaram-se de maneira semelhante. E mesmo quando não apresentavam diferença estatística em relação ao grupo controle, mostravam tendência a perder menos íons.

6.2 Caseína

Apesar de estudos (Barbour et al., 2008; Kanekanian et al., 2008; Hemingway et al., 2010; White et al., 2011;) apresentarem efeitos benéficos da Caseína em relação à erosão dental, neste trabalho, em nenhuma das análises realizadas, a

Caseína conseguiu produzir um efeito protetor da superfície contra a desmineralização ou perda de íons.

White et al. (2011) avaliaram a capacidade de inibição da erosão dental pela caseína e seus derivados. Dentes bovinos que passaram por teste de nanodureza tinham um tempo de tratamento de 10 min e de erosão de 1min; já os que eram avaliados com perfilometria, eram ciclados por 10 min tanto de tratamento quanto de erosão, sendo a ciclagem repetida por 9 vezes. Neste estudo, todos os aditivos que foram avaliados quanto à perfilometria foram capazes de proteger a superfície dental, já com relação à nanodureza de superfície, apenas a caseína 0,5% sozinha ou com flúor foi capaz de fornecer essa proteção.

O fato de os resultados do presente estudo conflitar com os apresentados pode ser explicado pela metodologia empregada, tanto de análise quanto de tratamento de superfície. Segundo Kawasaki et al. (1999), o mecanismo de adsorção das proteínas (caseína) à superfície dental está ligado a concentração e ao tempo empregados. Sendo assim, o tempo necessário para a adsorção e rearranjo dessa camada formada pelas proteínas é grande quando a concentração de caseína é pequena e vice-versa. O fato de os estudos anteriores terem utilizado tempos de imersão superiores ao do presente estudo, sugerem que talvez fosse necessária uma concentração maior de caseína para que houvesse resultado. Reforçando essa hipótese, o fato de ter-se utilizado HCl (um ácido forte) para o desafio erosivo pode ter limitado ainda mais o efeito da caseína pois os demais estudos utilizaram ácido cítrico (ácido fraco). O HCl dissocia-se totalmente em meio aquoso e age imediatamente sobre a estrutura dental, não havendo tempo para a formação da camada de proteínas.

Cheaib e Lussi (2011), com o objetivo de verificar se a adição de proteínas (caseína e mucina) poderia melhorar o efeito protetor da película dental contra a erosão causada por acido cítrico (1 min), avaliando a microdureza de superfície, observaram que a adição da caseína em conjunto com a mucina foi capaz de proteger a estrutura, porém quando sozinha, a caseína não foi capaz de aumentar essa proteção. O fato de as proteínas só demonstrarem efeito quando em conjunto pode reforçar a hipótese de Kawasaki et al., pois em conjunto, a concentração de proteínas é maior do que quando separadas e atrelado a isso também havia o tempo

de ação pequeno, tempo esse que era necessário para que houvesse apenas um amolecimento da superfície e não houvesse perda de estrutura, proporcionando a leitura de dureza sem falsos resultados.

6.3 Hexametafosfato de Sódio

O fato de o HMP ter apresentado um resultado superior quanto à análise de cálcio e um efeito nulo na dureza superficial, pode significar que nem sempre os efeitos dos aditivos nas superfícies dentais ocorrem no sentido de remineralizar/endurecer essa superfície. Pode-se supor que o HMP promova a formação de alguma barreira/película física nessa superfície que protegeria o dente. No caso dos testes de dureza, a película pode "amortecer" a ponta penetradora do aparelho, justificando os resultados pouco satisfatórios para este teste descrevendo uma dureza menor que a convencional. Schlueter et al. (2011) comentam que quando um material é depositado sobre uma superfície, neste caso o HMP, a medida de dureza pode não ser representativa, sendo essa uma das limitações do método.

Segundo Hesaraki et al. (2009) o HMP age adsorvendo-se a superfície de partículas carregadas positivamente por ligações iônicas e eletrostáticas. Seu mecanismo de ação contra a exposição a ácidos está ligada a sua adsorção a superfície no lugar dos íons $(HPO_4)^{2-}$ (Barbour et al., 2005b).

As análises de perda de cálcio revelam que o HMP comporta-se de maneira semelhante ao ELM, diminuindo a perda de cálcio tanto na primeira quanto na soma das imersões. Estes resultados estão de acordo com os efeitos protetores encontrados por Barbour et al. (2005b), que encontrou redução de 64% de dissolução de hidroxiapatita quando o HMP foi adicionado ao ácido cítrico. Também Hooper et al. (2007) estudando o efeito protetor de dentifrícios com HMP obteve relação positiva de sua utilização com a redução da erosão *in vitro e in situ*.

A análise de íons fosfato não pode ser utilizada para avaliar a proteção do HMP pois este apresenta fosfato em sua composição.

Quando a perda de cálcio foi somada, observou-se que os grupos que apresentaram-se estatisticamente diferentes do controle negativo foram ELM e HMP. Estes resultados sugerem que a camada protetora formada por ELM e HMP é mais resistente, ou oferece maior proteção, do que a formada por TiF_4.

6.4 Correlação entre as Variáveis

É interessante observar que os testes estatísticos empregados para correlacionar os métodos de análise demonstraram que houve correlação entre os testes de microdureza e nanodureza e entre os testes de análise de cálcio e análise de fosfato. Enquanto que não foi encontrada correlação entre os testes de dureza e análise de íons.

Estes resultados nos levam a pensar que para avaliar o efeito de aditivos ou substâncias na superfície dental, tanto quanto ao seu efeito protetor quanto remineralizador, é interessante lançar mão de diferentes testes como foi utilizado no presente estudo, empregando testes físico e químico. Isto pode ajudar a explicar os resultados tão conflitantes encontrados na literatura que estudam métodos alternativos para proteger a estrutura dental contra processos erosivos. O emprego de um único método de avaliação poderá conduzir a resultados incorretos

7 CONCLUSÕES

Dentro da metodologia estudada foi possível concluir:

- Quanto à dureza superficial

  Os enxaguatórios associados à caseína, hexametafosfato de sódio, tetrafluoreto de titânio, fluoreto estanhoso II e o Elmex não foram capazes de alterar a dureza positivamente. O tetrafluoreto de titânio promoveu diminuição da dureza, detectada pelo teste de nanodureza.

- Quanto à perda de íons cálcio

  Após 30 segundos de imersão seguida do ácido por 10 segundos, todos os enxaguatórios foram capazes de diminuir a perda de íons cálcio, exceto a caseína. Após a segunda imersão todos os enxaguatórios testados não foram capazes de diminuir a perda de íons cálcio. Os efeitos acumulativos das duas imersões demonstraram que o Elmex e o Hexametafosfato de Sódio são capazes de diminuir a perda de íons cálcio.

- Quanto à perda de íons fosfato

  Tanto na primeira quanto na segunda imersão somente o Elmex foi capaz de diminuir a perda de íons fosfato.

  Os efeitos acumulativos das duas imersões demonstraram que o Elmex e o TiF4 são capazes de diminuir a perda de íons fosfato.

- Quanto à correlação das variáveis

  Houve correlação entre os testes de microdureza e nanodureza e entre os testes de leitura de íons cálcio e íons fosfato, mas não houve correlação entre os testes de dureza e leitura de íons.

1

REFERÊNCIAS[1]

Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. J Nutr. 2004 Apr;134(4):989S-95S.

Amaech BT, Higham SM. In vitro remineralization of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001;29:371-6.

Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. Caries Res. 1998;32(5):344-50.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. J Dent Res. 1978;57(9-10):933-8.

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

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. J Oral Rehabil. 2005a; 32(1):16-21.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-aproved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. Eur J Oral Sci. 2005b;113(6):457-61.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. Eur J Oral Sci. 2008 Oct;116(5):473-8.

Bardolia P, Burnside G, Ashcroft A, Milosevic A, Goodfellow SA, Rolfe EA, et al. Prevalence and risk indicators of erosion in thirteen- to fourteen-year-olds on the Isle of Man. Caries Res. 2010;44:165–8.

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

Bartlett DW, Coward PY. Comparison of the erosive potential of gastric juice and a carbonated drink in vitro. J Oral Rehabil. 2001;28(11):1045-7.

Bartlett DW, Evans DF, Smith BG. The relationship between gastro-aesophageal reflux disease and dental erosion. J Oral Rehabil. 1996;23:289-97.

Bhatti SA, Walsh TF, Douglas CW. Ethanol and pH levels of proprietary mouthrinses. Community Dent Health. 1994;11(2):71-4.

[1] De acordo com o estilo Vancouver.

Birkhed D. Sugar content acidity and effect on plaque pH of fruit juices, fruit drinks, carbonated beverages and Sport drinks. Caries Res. 1984;18:120-7.

Bruvo M, Moe D, Kirkeby S, Vorum H, Bardow A. Individual variations in protective effects of experimentally formed salivary pellicles. Caries Res. 2009;43(3):163-70.

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

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

Demeester TR, Johnson LF, Joseph GJ, Toscano MS, Hall AW, Skinner DB. Patterns of gastroesophageal reflux in health and disease. Ann Surg. 1976 Oct;184(4):459-70.

Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. Dent Update. 1982; 9:373-4.

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.

Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the Chemistry of Dental Erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:66–76.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann 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, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. Monogr Oral Sci. 2006;20:32-43.

Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. Caries Res. 2011;45(6):581-9.

Gracia LH, Rees GD, Brown A, Fowler CE. An in vitro evaluation of a novel high fluoride daily mouthrinse using a combination of microindentation, 3D profilometry and DSIMS. J Dent. 2010 Nov;38 Suppl 3:S12-20.

Grenby TH. Lessening dental erosive potential by product modification. Eur J Oral Sci. 1996;104:221-8.

Grenby TH, Andrews AT, Mistry M, Williams RJ. Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations in vitro. J Dent. 2001 Feb;29(2):83-92.

Grippo JO, Simring M. Dental “Erosion” Revisited. J Am Dent Assoc. 1995;126(5):619-30. Review.

Grippo JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncarious cervical lesions: a 20-year perspective. J of Esthet Restor Dent. 2012;24(1):10-23.

Grippo JO, Simring M, Schneider S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited- a new perspective on tooth surface lesions. J Am Dent Assoc. 2004;135(8):1109-18.

Grøn P. Chemistry of topical fluorides. Caries Res. 1977;11 Suppl 1:172-204.

Gu Z, Li J, Söremark R. Influence of tooth surface conditions on enamel fluoride uptake after topical application of TiF4 in vitro. Acta Odontol Scand. 1996 Oct;54(5):279-81.

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

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. Arch Oral Biol. 2005 Jun;50(6):541-52.

Hanning M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries Res. 2001;35:142-8.

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

Hanning M, Hess NJ, Holth-Hanning W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. Clin Oral Invest. 2003;7:158–61.

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

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological Factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:88–99.

Harris RS, Nizel AE, Walsh NB. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. J Dent Res. 1967 Jan-Feb;46(1):290-4.

Hay KD, Thomson WM. A clinical trial of the anticaries efficacy of casein derivatives complexed with calcium phosphate in patients with salivary gland dysfunction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Mar;93(3):271-5.

Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME. Enamel erosion in dietary acids: inhibition by food proteins in vitro. Caries Res. 2010;44(6):525-30.

Hesaraki S, Zamanian A, Moztarzadeh F. Effect of adding sodium hexametaphosphate liquefier on basic properties of calcium phosphate cements. J Biom Mater Res Part A. 2009;88:314-21.

Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions--a comparison of calcium and profilometric analyses. Arch Oral Biol. 2010;55(3):229-34.

Hooper S, Hughes J, Parker D, Finke M, Newcombe RG, Addy M, et al. A clinical study in situ to assess the effect of a food approved polymer on the erosion potential of drinks. J Dent. 2007;35(6):541-6.

Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF4, SnF2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry. Caries Res. 2006;40(5):440-3.

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. 2007a;65:259-64.

Hove LH, Young A, Tveit AB. An in vitro study on the effect of TiF4 treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. Caries Res. 2007b;41(1):80-4.

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.

Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996;104(2): 151-5.

Jarvinen VK, Rytomaa I, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. J Dent Res. 1991;110(3):942-7.

Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A, et a. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. Clin Oral Investig. 2004 Jun;8(2):91-6.

Johansson AK, Norring C, Unell L. Eating disorders and oral health: a matched case-control study. Eur J Oral Sci. 2012;120:61-8.

Jones L, Lekkas D, Hunt D, McIntyre J, Rafir W. Studies on dental erosion: An in vivo-in vitro model of endogenous dental erosion--its application to testing protection by fluoride gel application. Aust Dent J. 2002 Dec;47(4):304-8.

Kanekanian AD, Williams RJH, Brownsell VL, Andrews AT. Caseinophosphopeptides and dental protection: Concentration and pH studies. Food Chem. 2008;107(3):1015-21.

Kawasaki K, Kambara M, Matsumura H, Norde W. Measurements of the wettability of protein-covered hydroxyapatite surfaces. Caries Res. 1999;33(6):473-8.

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.

Lagerweij MD, ten Cate JM. Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. Caries Res. 2002;36(4):270-4.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. Caries Res. 2002;36(1):75-80.

Lazarchik DA, Filler SJ. Effects of gastroesophageal reflux on the oral cavity. Am J Med. 1997;103:107S- 13S.

Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. Eur J Oral Sci 1996;104 (2):191-8.

Lussi A, Hellwig E. Erosive potential of oral care products. Caries Res. 2001;35(1):52-6.

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

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

Magalhães 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. 2008;42(4):269-74.

Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Buzalaf MA. The erosive potential of 1% citric acid supplemented by different minerals: na in vitro study. Oral Health Prev Dent. 2010;8(1):41-5.

Mahoney EK, Kilpatrick NM. Dental erosion: part 1. Aetiology and prevalence of dental erosion. NZ Dent J. 2003;99(2):33-41.

Manarelli MM, Vieira AE, Matheus AA, Sassaki KT, Delbem AC. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. Caries Res. 2011;45(6):506-9.

Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J Am Dent Assoc. 1989;119(2):298-304.

McDonald JL Jr, Stookey GK. Influence of inherent dietary calcium and phosphorus on the cariostatic properties of NaH 2 PO 4 in the rat. J Dent Res. 1973 Jan-Feb;52(1):79-82.

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

Meyer-Lueckel H, Tschoppe P. Effect of fluoride gels and mouthrinses in combination with saliva substitutes on demineralised bovine enamel in vitro. J Dent. 2010 Aug;38(8):641-7.

Moazzez R, Smith BGN, Bartlett DW. Oral pH and drinking habit during ingestion of a carbonated drink in a group of adolescents with dental erosion. J Dent. 2000;28(6):395-7.

Moss SJ. Dental Erosion. Int Dent J. 1998;48(6):529-39. Review.

Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. J Dent Res. 1972 Nov-Dec;51(6):1567-71.

Nunn JH, Gordon PH, Morris AJ, Pine CM, Walker A. Dental erosion -- changing prevalence? A review of British National childrens' surveys. Int J Paediatr Dent. 2003;13(2):98-105.

Pace F, Pallotta S, Tonini M, Vakil N, Bianchi Porro G. Systematic review: gastro-oesophagela reflux disease and dental lesions. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27 (12):1179-86.

Pearce EI, Bibby BG. Effects of time, surface area, pH and some ions on protein adsorption by bovine enamel. Arch Oral Biol. 1966a Aug;11(8):825-32.

Pearce EI, Bibby BG. Protein adsorption on bovine enamel. Arch Oral Biol. 1966b Mar;11(3):329-36.

Phillips RW, Hine MK. Effect of sodium hexametaphosphate on teeth. J Dent Res. 1946 Jun;25:184.

Reussner GH, Coccodrilli G Jr, Thiessen R Jr. Effects of phosphates in acid-containing beverages on tooth erosion. J Dent Res. 1975 Mar-Apr;54(2):365-70.

Reynolds EC. The prevention of sub-surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra-oral model. J Dent Res. 1987 Jun;66(6):1120-7.

Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. J Dent Res. 1997 Sep;76(9):1587-95.

Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. J Dent. 2011;39(12):841-8.

Scaramucci T, Sobral MA, Eckert GJ, Zero DT, Hara AT. In situ evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives. Caries Res. 2012;46(1):55-61.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion-intrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104:178-90.

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;41:141–5.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. Caries Res. 2011;45(1):13-23.

Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. Arch Oral Biol. 2010a;55(4):294-9.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. Eur J Oral Sci. 2009a;117(4):427-34.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel in vitro. Arch Oral Biol. 2009b;54(5):432-6.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. J Dent. 2009c Dec;37(12):944-8.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. Acta Odontol Scand. 2010b May;68(3):180-4.

Setarehnejad A, Kanekanian A, Tatham A, Abedi AH. The protective effect of caseinomacropeptide against dental erosion using hydroxyapatite as model system. Int. Dairy J. 2010;20:652-6.

Tantbirojn D, Pintado MR, Versluis A, Dunn C, Delong R. Quantitative analysis of tooth surface loss associated with gastroesophageal reflux disease: a longitudinal clinical study. J Am Dent Assoc. 2012;143(3):278-85.

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. Review.

ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Crit Rev Oral Biol Med. 1991;2(3):283-96.

ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):241-44.

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. Review.

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

Tveit AB, Klinge B, Tötdal B, Selvig KA. Long-term retention of TiF4 and SnF2 after topical application to dentin in dogs. Scand J Dent Res. 1988 Dec;96(6):536-40.

Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. Am J Gastroenterol. 2006;101(8):1900-20.

Venasakulchai A, Williams NA, Gracia LH, Rees GD. A comparative evaluation of fluoridated and non-fluoridated mouthrinses using a 5-day cycling enamel erosion model. J Dent. 2010; 38(3):S21-9.

Vieira AM, Ruben JL, Bronkhorst EM, Huysmans MC. In vitro reduction of dental erosion by low-concentration TiF4 solutions. Caries Res. 2011;45(2):142-7. Epub 2011 Mar 31.

Wang X, Megert B, Hellwing E, Neuhaus KW, Lussi A. Preventing erosion with novel agents. J. Dent. 2011 Feb;39(2):163-170.

Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Sener B, Attin T. Retention of KOH-soluble fluoride formed after application of a SnCl(2)/AmF/NaF containing mouth rinse under erosive conditions. Acta Odontol Scand. 2012 Jul;70(4):272-8.

Weiss ME, Bibby BG. Effects of milk on enamel solubility. Arch Oral Biol. 1966a Jan;11(1):49-57.

Weiss ME, Bibby BG. Some protein effects on enamel solubility. Arch Oral Biol. 1966b Jan;11(1):59-63.

White AJ, Gracia LH, Barbour ME. Inhibition of Dental Erosion by Casein and Casein-Derived Proteins. Caries Res. 2011;45:13–20.

White AJ, Yorath C, Hengel VT, Leary SD, Huysmans MCSNJM, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under “single-drink” conditions. Eur J Oral Sci. 2010;118:604-9.

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, Laabs KA, Gressmann G, Roos M, Magalhães AC, Attin T. Protection of short-time enamel erosion by different tetrafluoride compounds. Arch Oral Biol. 2008a Jun; 53(6):497-502.

Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, et al. Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. Caries Res. 2008b;42(4):247-54.

Willumsen T, Ogaard B, Hansen BF, Rølla G. Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid. Acta Odontol Scand. 2004;62(5):278-81.

World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech Rep Ser. 2003;916:i-viii, 1-149, backcover.

Young A, Tenuta LMA: Initial Erosion Models. Caries Res. 2011;45:33-42.

Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rölla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. Eur J Oral Sci. 2006;114(3):80-3.

Yu H, Wegehaupt FJ, Zaruba M, Becker K, Roos M, Attin T, et al. Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro. Arch Oral Biol. 2010 Sep;55(9):702-5.

Zero DT. Etiology of dental erosion-extrinsic factors. Eur J Oral Sci 1996;104:162-77.

Anexo A – Comitê de Ética em Pesquisa (FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 111/11
CAAE 0124.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental"**, de responsabilidade dos pesquisadores Tatiane Alexandre de Oliveira e Fernando Neves Nogueira, sob orientação da Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de dezembro de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 –Tel. (0XX11) 3091-7960

Anexo B - Parecer do Comitê de Ética em Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 166/2011 referente ao projeto intitulado: "*Comparação da ação de princípios ativos incorporados a um enxaguatório bucal na prevenção/controle da erosão dental*" sob a responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **Maria Angela Pita Sobral**, aluna **Tatiane Alexandre de Oliveira** e os pesquisadores **Thais Scaramucci**, **Fernando Neves Nogueira**, foi analisado pela CEUA/ICB em 29.10.11, e considerado isento de análise da CEUA por utilizar dentes bovinos já disponíveis no Laboratório do Departamento de Dentista da Faculdade de Odontologia da USP.

São Paulo, 30 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA-ICB/USP

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa: Comparação da Ação de Princípios Ativos Incorporados a um Enxaguatório Bucal na Prevenção/Controle da Erosão Dental. Sua participação é voluntária e seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento.

Este estudo tem como objetivo comparar (*in vitro*) o desempenho de um enxaguatório bucal acrescido de diferentes princípios ativos para prevenção e controle da erosão dental de origem intrínseca.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em mascar um filme de parafina sem sabor por 10 minutos para concomitante coleta de sua saliva através de seu depósito em tubos plásticos. Está saliva será congelada a -80°C e após a utilização no estudo, será descartada em local apropriado. Não há riscos relacionados à sua participação no estudo. Este estudo pode trazer como beneficio uma alternativa de prevenção de erosão dental para pacientes com distúrbios gástricos e alimentares.

A coleta será realizada no Laboratório de Pesquisas Aplicadas a Dentística Prof. Lincoln Steagall do Departamento de Dentística e Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

As informações obtidas nessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação, sendo os dados necessários divulgados de forma a não permitir a sua identificação.

Após ter sido informado (a) e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa.

Nome:_____RG:_____

Assinatura_____

São Paulo, _____ de _____ de 2011.

Pesquisadores

Professora Doutora Maria Angela Pita Sobral CRO: 23336

_____

Pós - graduanda: Tatiane Alexandre de Oliveira CRO: 98757

_____

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - Departamento de Dentística.

Aveninda Prof. Lineu Prestes, 2227. Cidade Universitária, Butantã. CEP: 05508-900. São Paulo – SP. Brasil. Telefone: (11) 3091-7843. E-mail: tatiane.oliveira@usp.br

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Prof. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo ou pelo e-mail cepfo@usp.br)