



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral



**EFEITO DA FITOESFINGOSINA SOBRE A RESISTÊNCIA AO
MANCHAMENTO E A MICRODUREZA DO ESMALTE DENTAL.**

Ayodele Alves Amorim

**Ribeirão Preto
2019**

Ayodele Alves Amorim

**EFEITO DA FITOESFINGOSINA SOBRE A RESISTÊNCIA AO
MANCHAMENTO E A MICRODUREZA DO ESMALTE DENTAL.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda de Carvalho
Panzeri Pires de Souza

**Ribeirão Preto
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Amorim, Ayodele Alves

Efeito da fitoesfingosina sobre a resistência ao manchamento e a microdureza do esmalte dental. Ribeirão Preto, 2019.

89p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador(a): Pires de Souza, Fernanda de Carvalho Panzeri

1. PHS.
2. Estabilidade de cor.
3. Fluorescência.
4. Microdureza

FOLHA DE APROVAÇÃO

Amorim, AA. **Efeito da fitoesfingosina sobre a resistência ao manchamento e a microdureza do esmalte dental.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração:
Reabilitação Oral.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora:

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico...

Primeiramente à **Deus**, pelo dom da vida, por sempre me mostrar o caminho que devo seguir e me amparar nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, **Marcos Antônio Machado Godoy** e **Izabel Cristina Leite Godoy** por sempre me darem suporte, apoio, confiança durante toda a minha jornada de formação educacional e profissional e principalmente pela pessoa que sou hoje;

Aos meus familiares e amigos que sempre acreditaram em mim e no meu potencial.

Agradecimientos

À Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, minha orientadora, muito obrigado pela grande oportunidade, pela liberdade de pensar e agir que sempre me proporcionou, foi uma honra ter a oportunidade de aprender durante esse período de mestrado como seu orientado, a superar as dificuldades que surgiram durante a jornada da pós-graduação.

Aos meus mestres de graduação Prof. Dr. Antônio Azoubel e Prof. Dr. Josué Alves, não existem palavras suficientes para expressar o quanto eu sou grato pelo apoio que me deram nessa empreitada rumo à pós-graduação na FORP-USP. O apoio e os conselhos de vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, espero um dia poder retribuir a gentileza e a atenção que me deram nesse período tão conturbado de tomada de decisões. Toda minha admiração e gratidão.

A minha tia Fátima Pacheco (*in memoriam*), pelo apoio, confiança, carinho e pela sua imensa ajuda, sem a qual não conseguiria prestar a seleção que me inseriu nesse novo mundo de descobertas e aprimoramento intelectual que tanto almejei, você faz parte desta conquista!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP – USP), minha segunda casa, que tenho muito orgulho de fazer parte;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Imagem do dente bovino utilizado na obtenção das amostras.....	32
Figura 2.	Porção coronal após a secção da raiz.....	32
Figura 3.	Porção coronal incluída em cera.....	32
Figura 4.	Secção da superfície vestibular do dente bovino.....	32
Figura 5.	Fragmentos obtidos na superfície vestibular.....	32
Figura 6.	Dispositivo confeccionado em resina acrílica para padronização da espessura das amostras.....	32
Figura 7.	Lixamento das amostras.....	32
Figura 8.	Dispositivo confeccionado em resina acrílica para padronização da rugosidade, utilizado na lixa 2000.....	32
Figura 9.	Aspecto final da amostra.....	32
Figura 10.	Marcação feita na parte posterior das amostras, a fim de padronizar a posição para realização das leituras de cor e microdureza.....	33
Figura 11.	Posicionamento das amostras para aplicação do verniz incolor.....	33
Figura 12.	Proteção da superfície das amostras com verniz incolor.....	33
Figuras 13 e 14.	Unidade transversal precursora de leitura do Rugosímetro Surfcoorder SE 1700 (Kosakalab, Toquio, Japão)	34
Figura 15.	Endentação losangular provocada nas amostras pelo teste de microdureza Knoop.....	35
Figura 16.	Sistema de coordenadas de cores CIE L* a* b*.....	36
Figura 17.	Câmara de luz (iluminante D65)	37
Figura 18.	Análise de cor utilizando o espectrofotômetro VITA Easy Shade.....	37
Figura 19.	Imagens das amostras a serem testadas (lado esquerdo), identificadas pelo número correspondente ao seu grupo, obtidas sob o iluminante UV, juntamente com a amostra padrão (lado direito) utilizada como parâmetro para análise do software Matlab.....	39
Figura 20.	Comparação das imagens utilizado o software Matlab (Matworks)	40
Figura 21.	Esquema utilizado para manchamento das amostras com café e chá preto.....	43
Figura 22.	Equipamento para aspiração de fumaça de cigarro, desenvolvido para utilização no estudo.....	44
Figura 23.	Amostra adaptada no dispositivo de suporte para exposição a fumaça de cigarro..	45

Figura 24.	Paralelômetro utilizado como suporte para as escovas.....	46
Figura 25.	Dispositivo fixado na mesa, utilizado para a realização dos movimentos da escova.....	46
Figura 26.	Amostras após as diferentes condições de manchamento a que foram submetidas, juntamente com a amostra utilizada como referência de cor.....	53
Figura 27.	Amostras, sob o iluminante UV, após as diferentes condições de manchamento a que foram submetidas, juntamente com a amostra utilizada como referência de cor.....	62

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições experimentais de manchamento propostas para cada grupo de amostras.....	42
Tabela 2.	Fragmentos dentais tratados com as respectivas soluções de tratamento e submetidos aos testes de manchamento (grupos do estudo).....	43
Tabela 3.	Médias iniciais dos valores de rugosidade de superfície (Ra).....	50
Tabela 4.	Médias e desvios padrão de alteração de cor (ΔE) dos grupos. Valores transformados ($Y=\log Y$). 2-way ANOVA, Tukey, $p<.05$	51
Tabela 5.	Alteração de cor dos grupos para a coordenada L* (preto-branco).....	54
Tabela 6.	Alteração de cor dos grupos para a coordenada a* (verde-vermelho).....	56
Tabela 7.	Alteração de cor dos grupos para a coordenada b* (azul-amarelo).....	58
Tabela 8.	Médias e desvios padrão dos valores de fluorescência.....	60
Tabela 9.	Médias e desvios padrão dos valores de microdureza relativa (%)......	63

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Alteração de cor dos grupos (ΔE) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.....	52
Gráfico 2.	Alteração de cor para a coordenada L^* (ΔL) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.....	55
Gráfico 3.	Alteração de cor para a coordenada a^* (Δa) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.....	57
Gráfico 4.	Alteração de cor para a coordenada b^* (Δb) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.....	59
Gráfico 5.	Letras diferentes, minúsculas comparando agentes manchadores e maiúsculas na coluna para as soluções de tratamento, comparando as leituras de fluorescência final. Símbolos indicam diferença entre manchamento inicial e final.....	61
Gráfico 6.	Alteração de microdureza e sua relação com os diferentes tipos de agente de manchamento em combinação com suas respectivas soluções de tratamento.....	64

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. PROPOSIÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1 Seleção e obtenção das amostras.....	31
3.2 Realização dos ensaios.....	33
3.2.1 Análise de Rugosidade.....	33
3.2.2 Análise de Microdureza.....	34
3.2.3 Análise de Cor.....	36
3.2.4 Análise de Fluorescência.....	38
3.3 Tratamento das amostras.....	42
3.4 Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	51
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

Resumo

Amorim, AA. **Efeito da fitoesfingosina sobre a resistência ao manchamento e a microdureza do esmalte dental.** Ribeirão Preto, 2019. 89p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência protetora de solução de fitoesfingosina (PHS) sobre o esmalte dental e sua relação com a película adquirida (PA) quanto ao manchamento, microdureza e fluorescência. Noventa e seis fragmentos de dentes bovinos (6mm x 6mm x 2mm) foram obtidos a partir da secção da superfície vestibular. Em seguida, foram realizadas as leituras iniciais de cor (espectrofotômetro Easyshade, VITA Zahnfabrik, Bad Sckingen, Alemanha), microdureza Knoop (microdurômetro Micro Hardness Tester HMV-2, Shimadzu®, Tóquio, Japão) e fluorescência através de software matemático e digital (Matlabs software, Matworks, Natick, MA, EUA). Os fragmentos foram separados aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o tratamento a que foram submetidos: água destilada (controle); saliva humana, para formação de película adquirida; solução de fitoesfingosina (PHS); PHS + saliva humana (PA). Em seguida, as amostras (n=6) foram submetidas a manchamento com os seguintes agentes: água destilada (imersão por 30 dias); café; chá preto e fumaça de cigarro (20 cigarros por amostra). O café e o chá preto foram aplicados por 15 minutos, duas vezes ao dia, por 15 dias. Após os testes, os fragmentos foram submetidos às leituras finais de cor, microdureza e fluorescência. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente segundo o teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde a microdureza apresentou distribuição não normal dos valores encontrados, que foram analisados segundo Kruskal-Wallis. Para as distribuições normais, a comparação das médias foi feita através do teste 2-way ANOVA, Tukey, $p < .05$. Verificou-se que o café foi o agente de manchamento que produziu a maior alteração de cor (ΔE), seguido pelo chá preto, independente da solução de tratamento associada. Conclui-se que o PHS em associação com a película adquirida não interfere ativamente na alteração de cor dos fragmentos dentais, visto que seus valores foram intermediários entre as demais soluções de tratamento.

Palavras-chave: PHS, Estabilidade de cor, Fluorescência, Microdureza

Abstract

Amorim, AA. **Effect of phytosphingosine on staining resistance and microhardness of tooth enamel.** Ribeirão Preto, 2019. 89p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the staining resistance, the microhardness and fluorescence of dental enamel when submitted to phytosphingosine (PHS) solutions associated or not to the salivary film. Initial color (EasyShade spectrophotometer, VITA Zahnfabrik), Knoop microhardness (Micro Hardness Tester HMV-2, Shimadzu) and fluorescence (Matlabs software, Matworks) readings of 96 fragments of bovine teeth (6mm x 6mm x 2mm) were taken. The fragments were randomly separated into four groups according to the treatment the teeth were submitted: distilled water (control); human saliva (HS) for the formation of the salivary film; phytosphingosine solution (PHS); PHS + HS. After that, the samples (n = 6) were submitted to staining solutions: distilled water (immersion for 30 days - control); coffee; black tea and cigarette smoke (20 cigarettes/sample). Coffee and black tea were applied for 15 minutes, twice a day, for 15 days. After the tests, the fragments were submitted to the final color, microhardness and fluorescence readings. The quantitative data were analyzed according to the Shapiro-Wilk normality test. Color and fluorescence were analyzed using 2-way ANOVA test, Tukey, $p < .05$; and microhardness was analyzed using the Kruskal-Wallis test. Coffee was the staining agent that produced the highest color change (ΔE), followed by black tea, regardless of the solution associated for the treatment. It was concluded that the PHS associated to the salivary film did not interfere with the color change of the dental enamel, considering the intermediate results found for this treatment solution.

Keywords: PHS, Color stability, Fluorescence, Microhardness

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A estética das restaurações odontológicas tem evoluído nos últimos anos devido ao desenvolvimento de materiais restauradores que possibilitam cada vez mais a preservação de estruturas dentárias não afetadas e com maior demanda protetiva para os tecidos saudáveis¹. Entretanto, o mais importante para se realizar uma odontologia de mínima intervenção, é enfatizar a promoção e prevenção em saúde bucal, que mostram-se cruciais na manutenção dos dentes, sem alterações ao longo do tempo².

As estruturas mineralizadas do elemento dental estão sujeitas durante todo o tempo a mudanças de pH da cavidade bucal. Diante disto, a saliva, que apresenta em sua composição íons de cálcio, fosfato e flúor, auxilia na proteção do esmalte através da formação da película adquirida, agindo diretamente sobre os ácidos presentes, neutralizando-os e fornecendo estes íons para remineralizar lesões cariosas^{3; 4}.

É sabido que os dentes tem sua cor alterada ao longo do tempo. A higienização bucal, dentro desse contexto, tem o objetivo de manter a estética dos dentes através do polimento e remoção de manchas extrínsecas causadas pela pigmentação da película adquirida⁵, que tem na sua formação, relação direta com: os hábitos alimentares, hábitos de higiene e idade do paciente. Todos esses fatores, isoladamente ou em conjunto, mostram-se responsáveis pela alteração da cor e superfície dos dentes⁶.

Os hábitos alimentares tem grande influência e relação direta na manutenção da cor dos dentes. Sabe-se que a ingestão de alimentos com grandes quantidades de corantes podem interferir na cor final dos dentes ao longo do tempo⁷. Diferentes estudos com manchadores relatam que a alteração na cor dos elementos dentais é resultado de interação física e química entre os tecidos dentais e o agente causador da pigmentação e pode ser causado por fatores extrínsecos ou intrínsecos^{7; 8; 9; 10}.

A alteração de cor dos dentes geralmente ocorre devido a três motivos: 1) pigmentações externas devido ao acúmulo de biofilme e manchas, 2) alterações na superfície ou sub-superfície, promovendo a degradação do substrato e

propiciando a penetração e reação de agentes corantes com a superfície dental (adsorção), 3) descolorações intrínsecas devido a fatores localizados ou genéticos^{8; 9; 10; 11}.

A pigmentação extrínseca é adquirida pelo contato com o meio após a erupção do dente, como resultado da deposição de pigmentos e corantes provenientes da dieta, por exemplo, sobre a película adquirida. Entre os principais produtos e alimentos causadores de pigmentação extrínseca, podem-se citar o café, o chá preto, o tabaco, além de bebidas com altas taxas de substâncias corantes, como as bebidas a base de cola⁷.

O vício de fumar também pode interferir na manutenção da cor dos dentes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), existem cerca de 1 bilhão de fumantes em todo o mundo, motivo de grande preocupação, já que o tabagismo está entre as principais causas, evitáveis, de enfermidade e morte¹². No caso dos pacientes fumantes, os elementos dentais estariam expostos à fumaça de cigarro que é composta por várias substâncias tóxicas como monóxido de carbono, amônia, níquel, arsênio, alcatrão e metais pesados como chumbo e cádmio¹³. Quando essa fumaça entra em contato com a superfície de dentes e restaurações, a estética fica muito comprometida já que dentes de indivíduos fumantes se tornam amarelados e até enegrecidos devido à impregnação de contaminantes provenientes da fumaça do cigarro^{13; 14}.

O esmalte dentário é um tecido duro, submetido constantemente aos processos de desmineralização e remineralização por estar constantemente em contato com os fluidos bucais. Seu principal constituinte, a hidroxiapatita de cálcio (HAp), é inerentemente suscetível à ação corrosiva e de dissolução dos ácidos, resultando na doença cárie, devido à perda de minerais no ambiente bucal, culminando em seu primeiro sinal clínico, a mancha branca ativa¹⁵.

O biofilme dental, dieta, saliva e a susceptibilidade do hospedeiro são alguns dos fatores que tem íntima relação com o desenvolvimento da cárie. O processo envolve a desmineralização do esmalte dental devido à altas concentrações de ácidos produzidos pelas bactérias presentes nos biofilmes, na presença de carboidratos^{16; 17}. Os dentes sofrem contínuos processos de desmineralização seguidos por remineralização e restabelecimento da

integridade do esmalte dentário devido ao controle do biofilme dentário, presença de saliva, entre outros fatores¹⁸.

A cárie dentária ocorre quando a desmineralização não consegue ser controlada pela fase de remineralização^{19; 20}. A capacidade do *Streptococcus mutans* e outras espécies envolvidas na etiologia da cárie, em produzir excessivas quantidades de ácido láctico na presença de açúcares fermentáveis, são consideradas uma das principais causas de perda e comprometimento da estrutura dentária. Esses ácidos podem reduzir o pH a valores abaixo do pH crítico (5,3~5,5) para desmineralização da superfície do dente, assim induzindo uma alteração no equilíbrio do processo natural desmineralização-remineralização (DES-RE) e ocasionando a perda de minerais^{21; 22; 23}.

A saliva, sendo parte desse constante processo natural de desmineralização-remineralização (DES-RE), atua como um fator protetor à superfície do esmalte, formando a película adquirida do esmalte, a qual reduz o efeito desmineralizador dos produtos ácidos por dificultar a difusão do ácido para superfície adamantina^{19; 20; 21; 24}.

Acredita-se que os peptídeos de ligação ao cálcio promovam a remineralização do esmalte mantendo um estado supersaturado de cálcio em relação a HAp na superfície do esmalte, aumentando assim a disponibilidade de íons de cálcio^{23; 25}.

Além disso, outro método pode ser utilizado para diminuir a ação do biofilme sobre o esmalte, como o fortalecimento do tecido com soluções como o flúor. Aplicações tópicas de fluoretos são as formas mais importantes de uso desse elemento na prevenção da formação de biofilme dental, mostrando sua eficácia na prevenção da cárie, inibindo a desmineralização, reforçando a remineralização, reduzindo a atividade metabólica de bactérias, assim como a permeabilidade do esmalte^{1; 26; 27}.

Recentemente, um estudo de Sauro et al. (2016)²⁵ demonstrou a eficiência protetora da fitoesfingosina (PHS) sobre discos de hidroxiapatita. O PHS é uma das bases constituintes dos esfingolípídeos, que são moléculas de lipídios amplamente encontradas em leveduras, plantas e animais, incluindo mamíferos²⁵. Estão presentes também em alimentos, fazendo parte da dieta

humana, que ingere aproximadamente 50 mg de PHS diariamente, através de frutas e vegetais. No corpo humano, pequenas quantidades de PHS são encontradas na epiderme, mas também na cavidade oral, na saliva e nas superfícies mucosas^{23; 25; 28; 29}.

A fitoesfingosina (PHS) e seus derivados são conhecidos por prevenir a perda de umidade da pele, regular as células da epiderme, crescimento, diferenciação e apoptose, além de possuírem forte atividade bactericida nos biofilmes salivares, e apresentar atividade anti-inflamatória²⁸. Além de apresentar benefício aos seres humanos, pois os lipídios encontrados na saliva contribuem em processos relacionados ao sistema imunológico, auxilia no transporte de antioxidantes lipossolúveis, nas propriedades anti-inflamatórias e atividade antimicrobiana sobre a mucosa^{30; 31; 32; 33}.

Quanto à ação antimicrobiana, a estrutura do PHS parece ideal para a inserção na membrana celular de micro-organismos; suas cadeias alifáticas estão alinhadas com as cadeias de ácidos graxos da bicamada fosfolipídica e, ao mesmo tempo, seus grupos de radicais positivamente carregadas interagem eletrostaticamente com os grupos de radicais fosfolipídicos carregados negativamente. Esta inserção leva à ruptura da membrana e à alteração do equilíbrio molecular intracelular²⁹.

Devido ao seu caráter anfipático, em solução, o PHS tem tendência a se agrupar em agregados ou micelas altamente carregados positivamente, com as caudas de ácidos graxos voltadas ao interior e os grupos de área positivamente carregadas expostos ao volume da solução²⁵.

A solução de PHS apresenta comprovada interação com a hidroxiapatita. Valentijn-Benz et al. (2015)²³ analisaram a concentração e dependência de tempo do PHS com a hidroxiapatita e verificaram que a adsorção máxima ocorreu em concentrações de 60 µg /mL e superior, de forma que a concentração de 100 µg /mL, utilizada pelos autores, mostrou melhores resultados em um menor tempo de aplicação (1-30 minutos). Essa concentração da solução de PHS também foi capaz de inibir em 90% a aderência de *Streptococcus mutans* em superfícies de hidroxiapatita e saliva, sob condições estáticas^{23; 29}. Bikker et al. (2018)³⁴ avaliaram as propriedades anti-adesivas e anti-biofilme do PHS em

biofilme in vitro de forma dinâmica e verificaram que, após 3 horas de sua maturação, ocorreu redução de 99% das células viáveis e após 6 horas a redução foi de 94%, mostrando que o PHS é um possível agente para a prevenção oral^{34; 35}.

Como a prevalência de desgaste erosivo está aumentando gradualmente na sociedade moderna, há necessidade urgente de agentes que protejam o esmalte contra a ação de substâncias desmineralizantes²³. Devido à carga positiva dos esfingolipídios, há afinidade por superfícies carregadas negativamente, como a HAp. Dessa forma, entende-se que esse tratamento poderia ser benéfico para diminuir a desmineralização dental^{29; 35}.

A inibição da dissolução de HAp por PHS e outras bases esfingóides ocorre devido à formação de camadas de PHS na superfície HAp, agindo como barreiras de difusão que impedem o acesso direto de íons H⁺, bem como retardando a difusão dos íons cálcio e fosfato da superfície HAp^{23; 25}. Um modo de ação semelhante foi proposto para a proteção mediada pela caseína na HAp contra a erosão²⁵.

Entretanto, a interação do PHS com soluções manchadoras pode resultar em efeito protetor superficial do esmalte, resultando em menor manchamento extrínseco e intrínseco do dente, e conseqüentemente menor alteração de cor da dentina. Entretanto, é sabido que cor é diferente de fluorescência. Dessa forma, mesmo que haja proteção superficial do esmalte e menor alteração de cor, ainda pode haver alteração de fluorescência, resultando em efeito estético indesejado em algumas situações clínicas³⁴.

Segundo Valentijn-Benz *et al.* (2015)²³ observações experimentais sugerem que o PHS exibe efeitos protetores em concentrações acima de 20 µg / ml, o que é na mesma ordem de grandeza que a concentração crítica de micelas relatada para PHS.

Dadas as propriedades antiaderentes, anti-biofilme e anti-erosivas do PHS, ela poderia ser considerada ingrediente promissor para uso em produtos de higiene oral destinados ao controle microbiano e tratamento de hipersensibilidade dentinária^{25; 34}.

Considerando-se o efeito protetor do PHS sobre a HAp e suas propriedades sobre a retenção de biofilme, diante do exposto, da inovação que o material representa e da ausência de evidências científicas sobre o uso desse lipídio em Odontologia, propõem-se estudar o efeito que o PHS tem na proteção ao manchamento e na alteração de cor, de fluorescência e de rugosidade de superfície do esmalte dental^{23; 25; 29; 34}.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi analisar a eficiência protetora de solução de fitoesfingosina (PHS) sobre o esmalte dental quanto ao manchamento, microdureza e fluorescência.

A hipótese nula testada foi que não haveria diferença na estabilidade de cor, rugosidade de superfície e fluorescência de esmalte dental entre os grupos tratados.

3. Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Seleção e obtenção das amostras

Para este estudo foram selecionados dentes bovinos hígidos, obtidos em frigoríficos na região de Ribeirão Preto, isentos de trincas e/ou fraturas. Estes dentes, após serem lavados em água corrente e passarem por raspagem, com a finalidade de remover qualquer resíduo periodontal e ósseo, tiveram suas raízes removidas, restando apenas as coroas, as quais foram cortadas em noventa e seis fragmentos (6mm x 6mm x 2mm), a partir da secção da superfície vestibular dos dentes bovinos usando disco de diamante de baixa velocidade sob resfriamento com água (Isomet 1000, Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

A planificação da superfície do esmalte foi realizada sob refrigeração, com lixas de granulação em ordem decrescente 600, 1200 e 2000, para amenizar as irregularidades em esmalte mais profundas e padronizar a espessura da superfície dentinária, mantendo relação ideal esmalte/dentina, possibilitando a avaliação da superfície desses fragmentos.

O acabamento da superfície do esmalte de cada fragmento bovino foi realizado em politriz mecânica metalográfica (Polipan-U, Panambra São Paulo, SP, Brasil). Os fragmentos foram submetidos a cada lixa durante 3 minutos, em baixa velocidade e com peso padrão de 50g, contando com o auxílio de dispositivos confeccionados em resina acrílica, a fim de manter a posição das amostras durante o lixamento, bem como padronizar a espessura das mesmas durante cada troca de lixa. Além disso, a espessura do esmalte foi controlada de forma que foram descartados os fragmentos com rugosidade maior que 0,3 μ m, promovendo assim uma homogeneidade da amostra.

Os fragmentos, tiveram uma marcação confeccionada na parte posterior (dentina), realizada com disco de lixa para micromotor em baixa velocidade, para padronizar e manter o posicionamento da amostra nas leituras iniciais e finais de cor, microdureza, fluorescência e rugosidade. Toda sequência de preparos realizados para obtenção das amostras, descritos anteriormente, estão presentes nas Figuras 1 a 12.



Figura 1 – Dente bovino utilizado na obtenção das amostras.



Figura 2 – Porção coronal após secção da raiz.

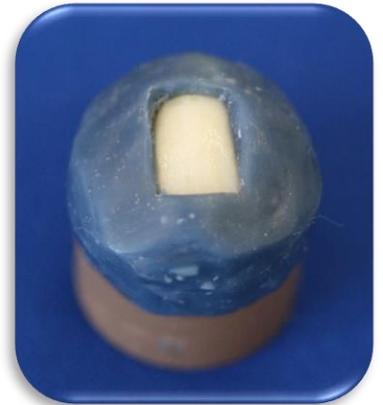


Figura 3 – Porção coronal incluída em cera.

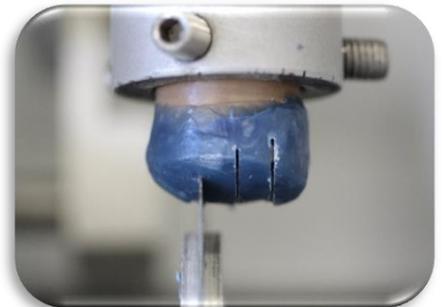


Figura 4 – Secção da superfície vestibular.

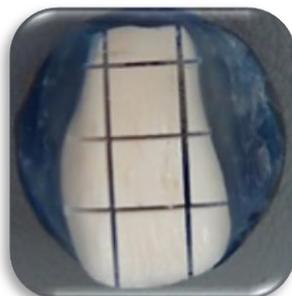


Figura 5 – Fragmentos obtidos na superfície vestibular.



Figura 6 – Dispositivo em resina acrílica para padronização da espessura das amostras.

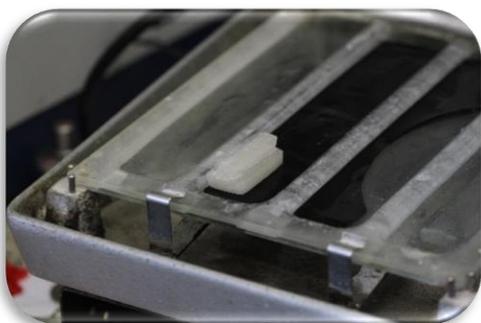


Figura 7 – Lixamento das amostras.

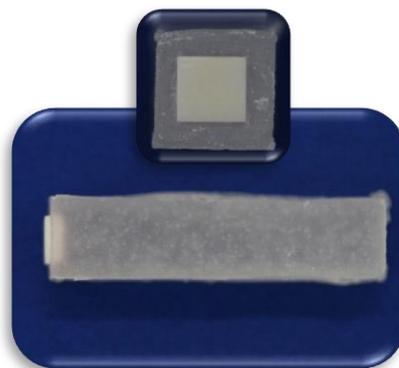


Figura 8 – Dispositivo em resina acrílica para padronização da rugosidade, utilizado na lixa 2000.



Figura 9 – Aspecto final da amostra.

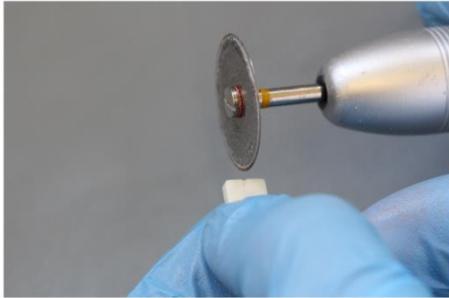


Figura 10 – Marcação feita na parte posterior das amostras.



Figura 11 – Posicionamento das amostras para aplicação do verniz incolor.

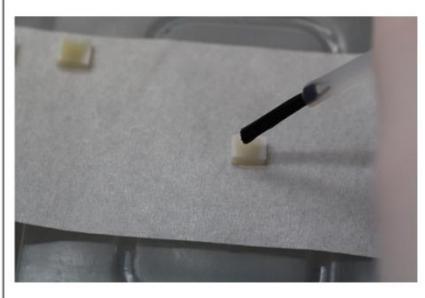


Figura 12 – Proteção da superfície dentinária das amostras com verniz incolor.

3.2 Realização dos ensaios

3.2.1 Análise de Rugosidade

Para padronização das amostras, a rugosidade de superfície do esmalte foi o parâmetro de verificação, a qual foi realizada utilizando o Rugosímetro Surfcoorder SE 1700 (Kosakalab, Toquio, Japão).

Esse equipamento permitiu a análise das condições rugosimétricas da superfície dos padrões, sendo composto por duas partes principais:

- Unidade Programadora de Controle e Registro da Leitura: onde ficam localizados os comandos para o acionamento do aparelho e o seletor do programa utilizado.
- Unidade Transversal Motorizada Precursora de Leitura: composta por um motor e uma agulha, que se movimenta, realizando a sondagem da superfície da restauração de acordo com o programa pré-estabelecido. A unidade motora é fixada a uma haste vertical que, por sua vez, prende-se a uma base sólida de granito, oferecendo estabilidade ao conjunto. A base de granito fica paralela à unidade motorizada, que é passível de regulagem nos sentidos vertical e horizontal.

Após ser acionado pelo display do controle, a agulha de leitura do rugosímetro percorre a distância de 3,2 mm com 3 *cut-off* de 0,8 mm, totalizando um comprimento de leitura de 2,4 mm, à velocidade de 0,25 mm/s. A agulha é movimentada em uma única direção e detecta as irregularidades da superfície que correspondem aos picos, vales e ondas. Este é definido como a média dos afastamentos do *pick-up* tanto para cima como para baixo, em relação a uma linha central.

Foram realizadas três leituras, em locais diferentes na superfície das regiões de interesse do estudo: uma central, uma 1 mm para direita e uma 1 mm para esquerda e a média desses valores foram utilizadas como medidas de rugosidade de superfície inicial (Figuras 13 e 14).



Figuras 13 e 14 – Unidade transversal precursora de leitura.

3.2.2 Análise de Microdureza

Para análise de microdureza Knoop foi utilizado um microdurômetro Micro Hardness Tester HMV-2 (Shimadzu®, Tóquio, Japão), que aciona uma ponta penetradora de diamante de forma piramidal e base losangular sob carga vertical estática de 50g aplicada por 5 segundos. Foram realizadas leituras com a objetiva de 40x para as amostras (Figura 15).

Quando acionada, a ponta penetradora realizou uma compressão na superfície do padrão, gerando uma figura geométrica em forma de pirâmide inversa. O losango possibilitou a determinação da microdureza superficial do material a partir da mensuração da sua maior diagonal, cujo valor é aplicado na fórmula:

$$KHN = 1,451 F/d^2$$

Onde:

KHN = Valor de dureza Knoop

F = 50 gramas

d = comprimento da maior diagonal na endentação

Foram realizadas 3 leituras iniciais distintas nos padrões: uma central, uma 1mm à direita e outra 1mm à esquerda, em relação à marcação central. A média das três leituras foi considerada como valor inicial de microdureza. Após os testes e exposição dos fragmentos as substâncias manchadoras, leituras finais de microdureza foram realizadas e a alteração de microdureza foi calculada pela fórmula:

$$\Delta KHN = KHN_f - KHN_i$$

onde KHN_i é referido como medição inicial de microdureza e KHN_f como medição final de microdureza.

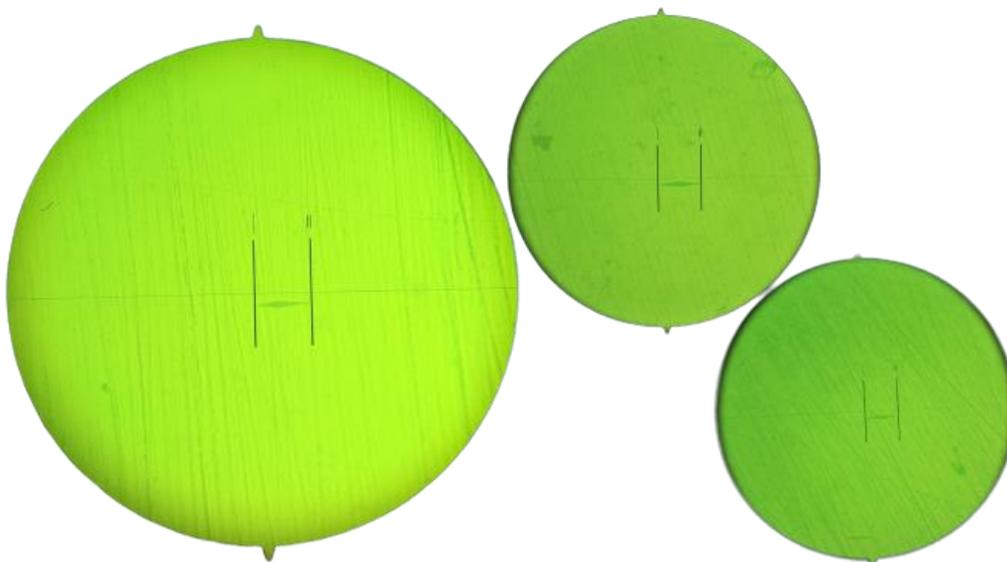


Figura 15 – Endentação losangular provocada nas amostras pelo teste de microdureza Knoop.

3.2.3 Análise de Cor

Após a obtenção dos fragmentos, foram realizadas leituras iniciais de cor utilizando o espectrofotômetro EasyShade (VITA Zahnfabrik, Bad Sckingen, Alemanha). Esse equipamento possui uma ponteira digital que, posicionada sobre a superfície da amostra, emite um feixe de luz, que é transmitida por meio de fibras ópticas capazes de captar a reflexão da luz segundo coordenadas.

O padrão de observação simulado pelo equipamento segue o sistema CIE $L^*a^*b^*$, recomendado pela CIE (Comission Internationale de l'Éclairage), e que é definido por uma combinação de coordenadas cartesianas onde um ponto está associado a uma cor única (Figura 16). O eixo L^* – coordenada de luminosidade (escala de cinza) – apresenta valores numéricos que variam de 0 (preto) a 100 (branco). Quanto mais próximo de zero, mais escura é a cor do objeto, sendo que objetos claros apresentam valores numéricos para L^* próximos de 100. Os eixos a^* e b^* são conhecidos como coordenadas de cromaticidade e variam de -80 a +80. A coordenada a^* designa o eixo verde-vermelho. Quando o valor para a^* for negativo (-), mostrará desvio no sentido da tonalidade verde; quando o valor for positivo (+), mostrará desvio no sentido do vermelho. Para a coordenada b^* , os valores negativos são fornecidos para os objetos de tonalidade azul, e positivos para a tonalidade amarela.

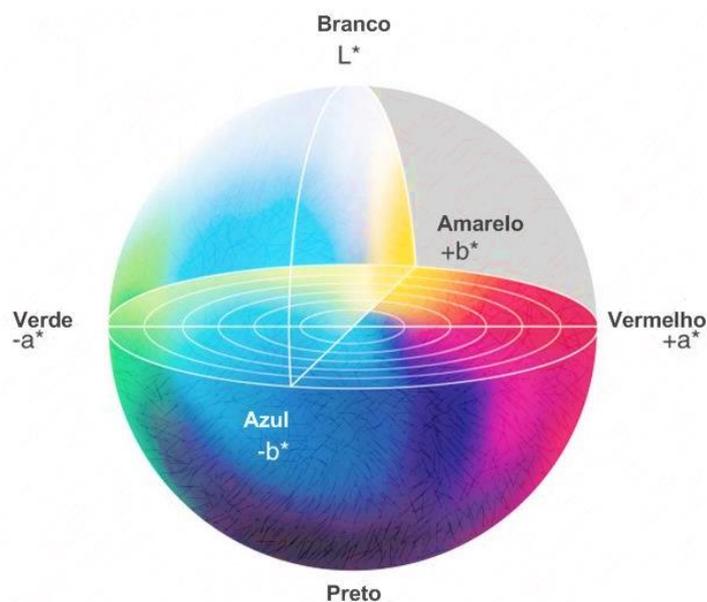


Figura 16 – Sistema de coordenadas de cores CIE $L^*a^*b^*$.
(Fonte: disenoypreimpresionmozadr.wordpress.com)

Para leitura de cor (Figuras 17 e 18), os fragmentos foram colocados sobre um bloco de fundo padrão branco (White Standard Sphere for 45°, 0° Reflectance and Color Gardner Laboratory Inc. Bethesda, Geretsried, Alemanha) em câmara de luz padronizada. O iluminante padrão primário utilizado foi o D65, que simula o espectro da luz do dia. Esse feixe é refletido também em 0° de volta para o aparelho e, assim, captura e registra os valores de L^* , a^* e b^* das amostras. Para padronização da análise de cor foram realizadas leituras, de forma que os valores de L^* a^* b^* com variação acima de 1,0 foram descartados. Da mesma maneira, realizou-se a análise de cor dos fragmentos após o manchamento e utilização do PHS, mantendo sempre a orientação da amostra sobre o bloco padrão branco através da marcação realizada na porção dentinária de cada fragmento.



Figura 17 – Câmara de luz (iluminante D65).



Figura 18 – Espectrofotômetro VITA Easy Shade.

3.2.4 Análise de Fluorescência

As leituras de fluorescência foram realizadas utilizando as ferramentas de um software matemático e digital (Matlabs software, Matworks, Natick, MA, EUA) que foram empregadas para quantificar o efeito de contraste fluorescente entre o fragmento dental no seu estado inicial, e após a realização do manchamento e aplicação do PHS no substrato dental.

Imagens digitais bidimensionais de cada fragmento foram capturadas dentro de uma mesa de luz padronizada (Macbeth Spectra Light, Nova York, EUA) utilizando sempre um mesmo fragmento como referência de cor (Figura 19), obtendo assim um parâmetro de comparação. Os iluminantes incluíram: 1) iluminação natural, faixa de comprimento de onda ~ 380 a 780 nm (Gretagmacbeth, 6500, F20T12 / 65, 20W, EUA), e 2) iluminação ultravioleta, faixa de comprimento de onda ~ 340 a 400 nm (UV-A Sylvania, Blacklight Azul, F30T8 / BLB, 30W, EUA).

A metodologia de análise de imagem exigiu a conversão de todas as imagens das amostras para níveis de escala de cinza, padronizando a comparação de imagens entre as amostras e a amostra utilizada como padrão de cor conhecido, para quantificação (Figura 20). Assim, a intensidade de fluorescência detectada para todos os grupos foi calculada pelo nível de escala de cinza usando o software Matlab (Matworks). Para obtenção das imagens, foi garantida uma posição padronizada perpendicular entre a amostra e a câmera (Cannon, Rebel T3i, JP). As imagens foram capturadas com a ISO 400 a uma distância padronizada de 15 cm entre a amostra e a câmera. A velocidade de abertura foi ajustada em 4 segundos sob o iluminante diurno e 0,8 s sob o iluminante UV. Durante os intervalos entre as capturas de imagens, os fragmentos foram armazenados em água destilada (37 °C). Foram obtidas imagens antes e após os tratamentos a que as amostras foram submetidas.

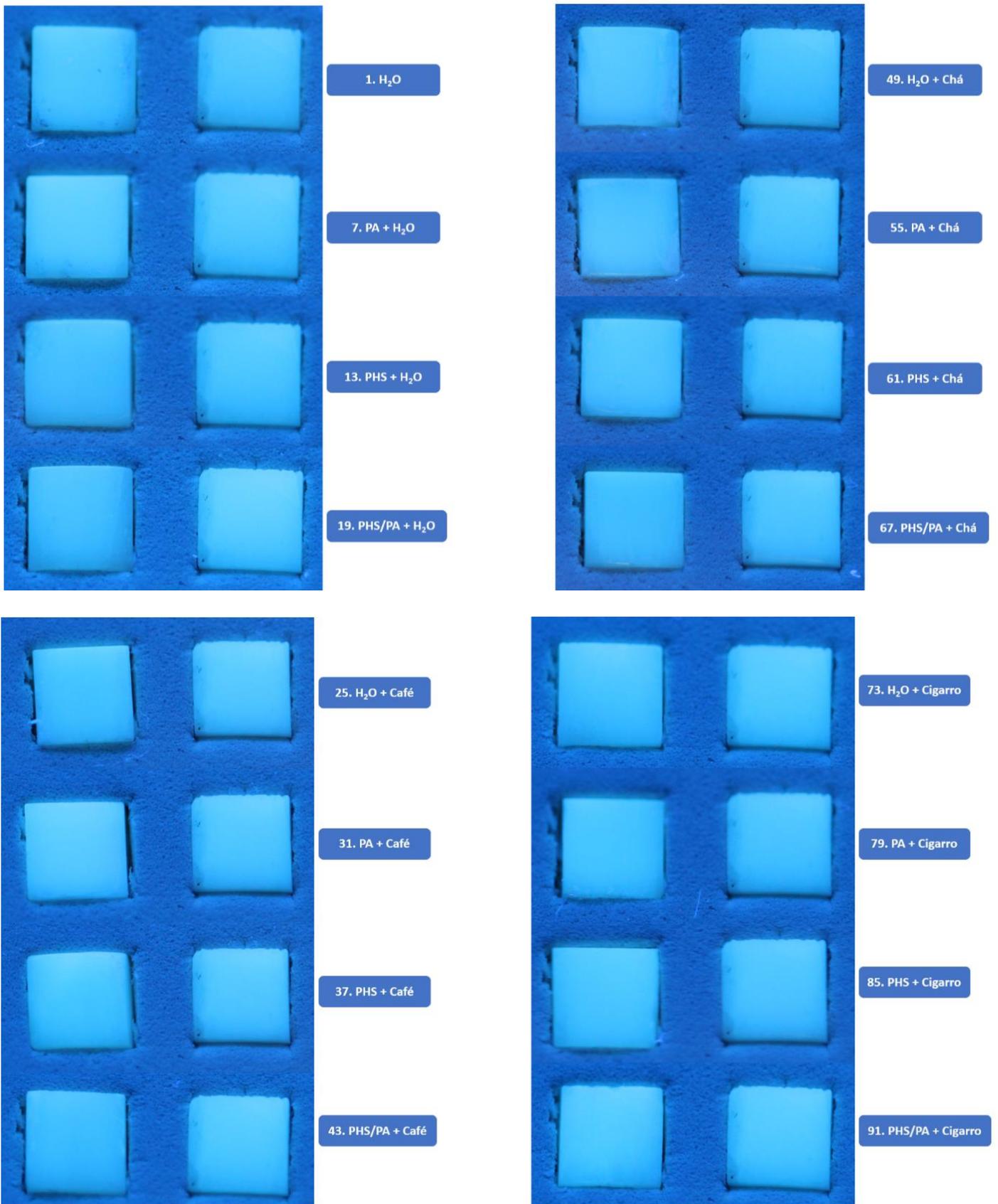
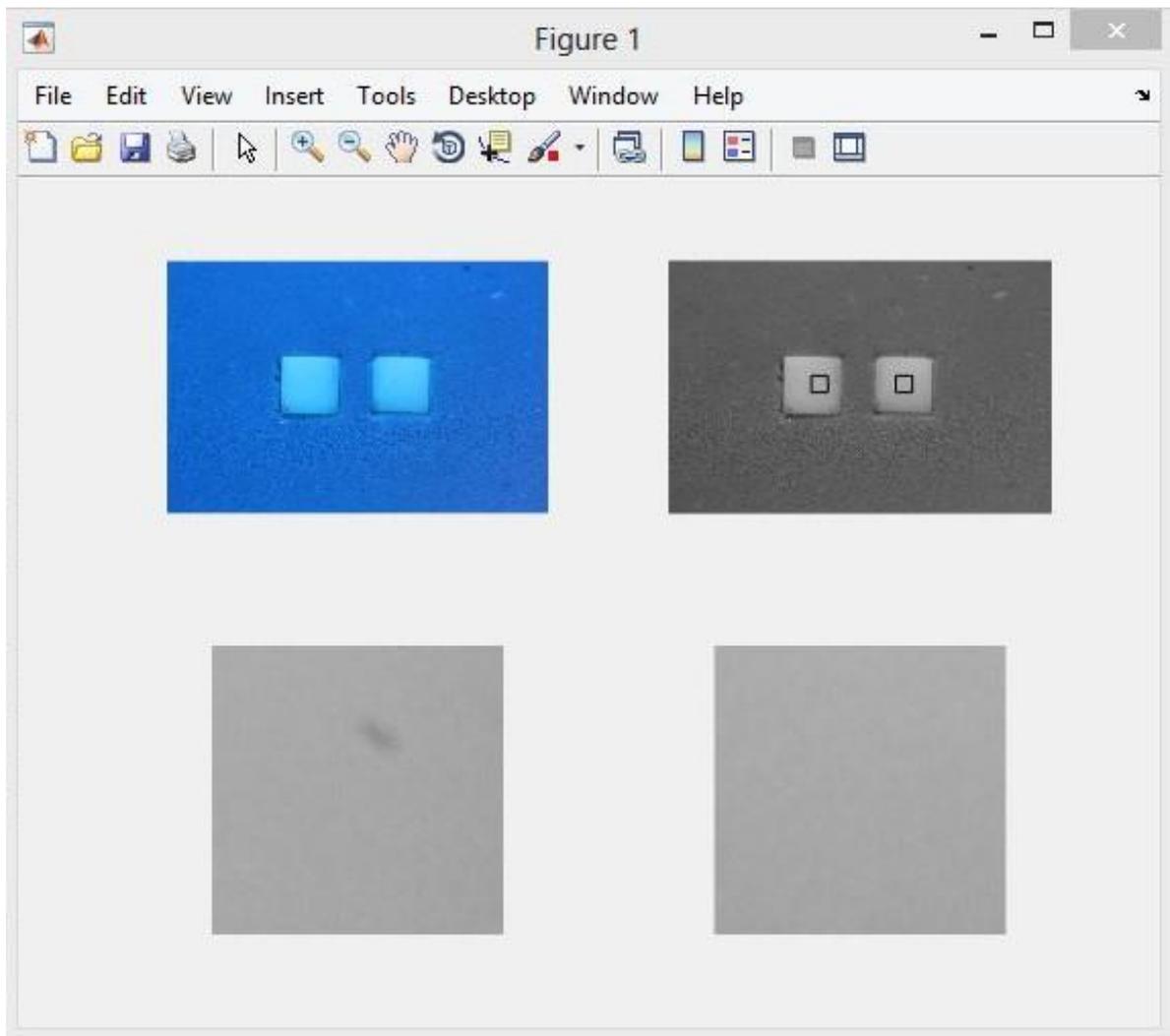


Figura 19 – Imagens das amostras a serem testadas (lado esquerdo), identificadas pelo número correspondente ao seu grupo, obtidas sob o iluminante UV, juntamente com a amostra padrão (lado direito) utilizada como parâmetro para análise do software Matlab.



Figuras 20 – Comparação das imagens utilizando o software Matlab (Matworks).

3.3 Tratamentos das amostras

Após as leituras iniciais, os 96 fragmentos tiveram as superfícies de dentina protegidas com verniz incolor (Colorama, L'Oréal Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente, foram aleatoriamente separados em 4 grupos de 24 espécimes, de acordo com o tratamento a que foram submetidos (Tabela 1): água destilada (controle), saliva humana, solução de fitoesfingosina (PHS) e PHS + saliva humana.

O grupo controle foi tratado pela imersão das amostras em água destilada por 30 dias e mantido a 37°C. O grupo tratado com saliva humana teve como objetivo a formação de película adquirida sobre o esmalte. Para isso, as amostras foram imersas em 0,5 ml de saliva humana (coletada diariamente de doador único, do sexo masculino) durante duas horas por dia, sob agitação constante em um agitador (280 rpm), como descrito por Karasawa *et al.* (2010)³⁷, repetindo esse processo por 15 dias, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP sob o número de CAAE: 10429219.8.0000.5419.

O tratamento com solução de (PHS) foi realizado como descrito por Valentijn Benz *et al* (2015)²³. As soluções de estoque de PHS foram preparadas em etanol a uma concentração de 5 mg / ml. A solução de reserva foi ainda diluída em Tris 20 mM suplementado com 0,1% de Tween 20 (pH 6,8) (Tris-Tween) a 100 ug / ml²³. O tratamento dos espécimes foi realizado colocando os fragmentos em recipientes Eppendorf, aos quais foram adicionados 1,5 ml das soluções PHS e incubados em um agitador (150 rpm) durante 30 min, por 15 dias.

O último grupo de fragmentos foi tratado com solução de PHS como descrito anteriormente, porém essas amostras foram previamente submetidas a formação de película adquirida, conforme metodologia descrita.

Amostras tratadas e não tratadas com PHS, em associação ou não com a formação de película adquirida, foram separadas aleatoriamente em 4 grupos (n = 6) de acordo com os agentes de manchamento a que foram submetidos, conforme descrito na Tabela 1. O tamanho da amostra foi definido a partir de resultados de estudo piloto, através da comparação de médias

(<https://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm>), com nível de confiança de 95% e poder de 80%.

A distribuição das amostras, relacionando os grupos de soluções de tratamento com os agentes de manchamento segue o esquema proposto na Tabela 2.

Tabela 1 – Os dentes tratados e não tratados com PHS foram submetidos a testes de manchamento de acordo com as condições experimentais propostas.

Grupos	Agente de Manchamento	Condições Experimentais
Grupo 1	Água destilada (Controle)	Imersão em 20mL de água destilada por 30 dias.
Grupo 2	Café	Imersão diária em café preparado por dissolução de 1.5g de café solúvel (Nescafe Tradição) em 50mL de água destilada em ebulição.
Grupo 3	Chá preto	Imersão diária em chá preto preparado por infusão de 1 bolsa de chá (Black Tea Lipton) em 100mL de água destilada em ebulição por 5 minutos.
Grupo 4	Fumaça de cigarro	20 cigarros (Marlboro Red, Phillip Morris) para cada fragmento preparado.

Tabela 2 – Grupos do estudo. Os dentes tratados com as respectivas soluções de tratamento e submetidos aos testes de mancha.

SOLUÇÕES DE TRATAMENTO DAS AMOSTRAS				
AGENTES DE MANCHAMENTO	Água destilada (Controle)	Película Adquirida (Controle)	PHS	PHS + Película Adquirida
Água destilada (Controle)	1-6	7-12	13-18	19-24
Café	25-30	31-36	37-42	43-48
Chá Preto	49-54	55-60	61-66	67-72
Fumaça de Cigarro	73-78	79-84	85-90	91-96

Os fragmentos imersos em café e chá preto, foram submetidos a mancha por 15 minutos, duas vezes por dia, durante 15 dias (Figura 21). Segundo Karadas & Seven (2014)⁹, o consumo diário médio de café pela população é de 15 minutos. Portanto, foi simulado 30 dias de consumo da bebida⁹. O valor de pH dessas bebidas também foi mensurado para fins de controle, sendo o pH=4,9 para o café e pH=5,4 para o chá preto.

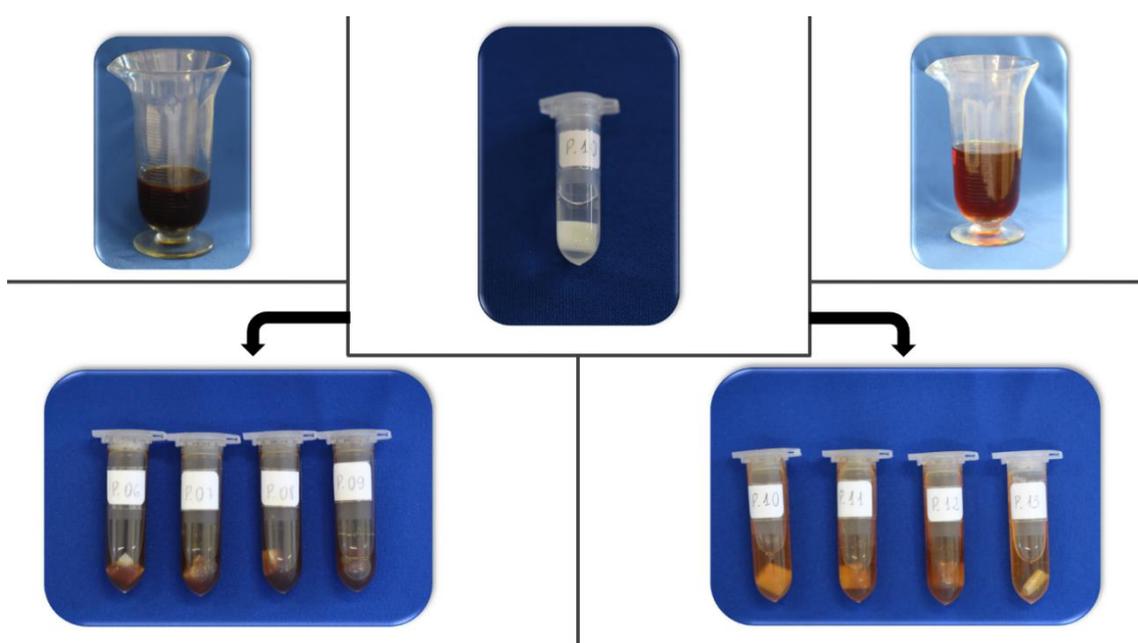


Figura 21 – Esquema utilizado para mancha com café e chá preto.

Para a impregnação por fumaça do cigarro, foi utilizado um dispositivo confeccionado com os mesmos princípios descritos em Alandia-Roman et al. (2013)¹⁰. O equipamento é destinado à aspiração da fumaça liberada por quatro cigarros, simultaneamente (Figura 22), propiciando desta forma, a impregnação de nicotina e outras substâncias nos fragmentos dentais, com finalidade de reproduzir *in vitro* as condições da cavidade bucal de uma pessoa fumante¹⁰. A utilização desse equipamento comportando quatro cigarros de uma só vez, teve por objetivo um maior controle do tempo de exposição dos fragmentos, controlando melhor os ciclos de manchamento e seus intervalos em imersão em PHS.

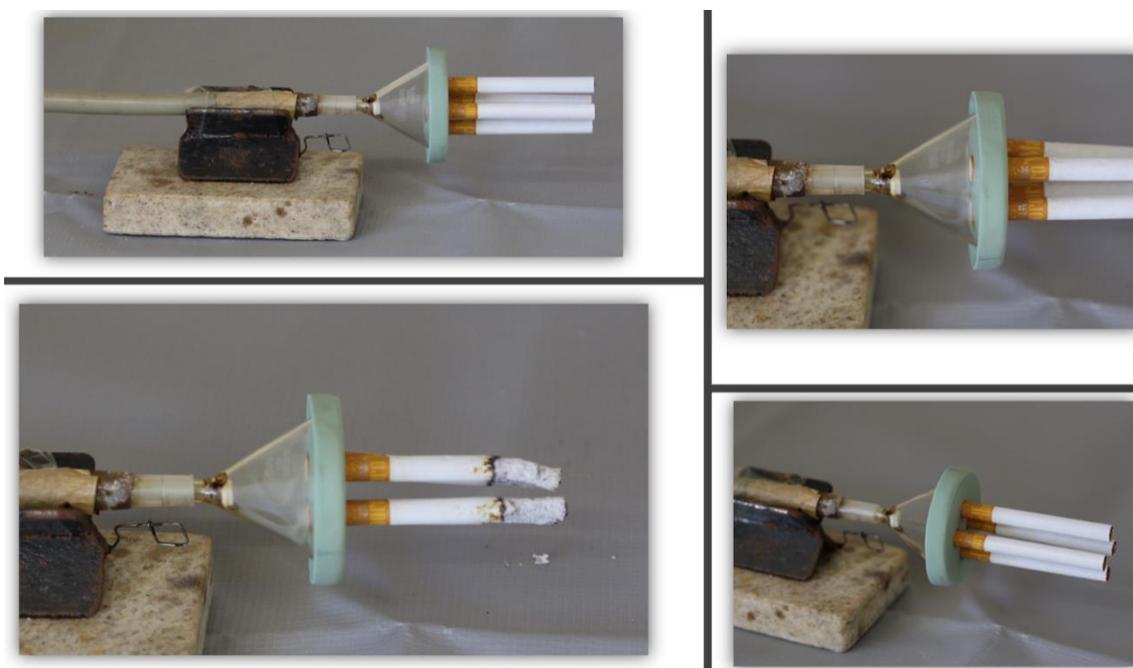


Figura 22 – Equipamento para aspiração de fumaça de cigarro, desenvolvido para utilização no estudo.

O equipamento foi confeccionado na oficina de precisão do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP e no Laboratório de Análise de Biomateriais (LaABio) da FORP-USP, conforme a Figura 23, utilizando um funil de vidro seccionado na sua porção de menor diâmetro, tendo em um extremo um suporte para o encaixe dos cigarros servindo também como vedação para o sistema e no outro extremo uma mangueira de ar acoplada a uma piteira

adaptada com um sistema que permite uma pressão negativa que pode ser regulada e padronizada¹⁰. A utilização desse equipamento para essa fase do estudo deu-se em uma capela com exaustão, para que houvesse o controle de qualquer contaminação do ambiente.

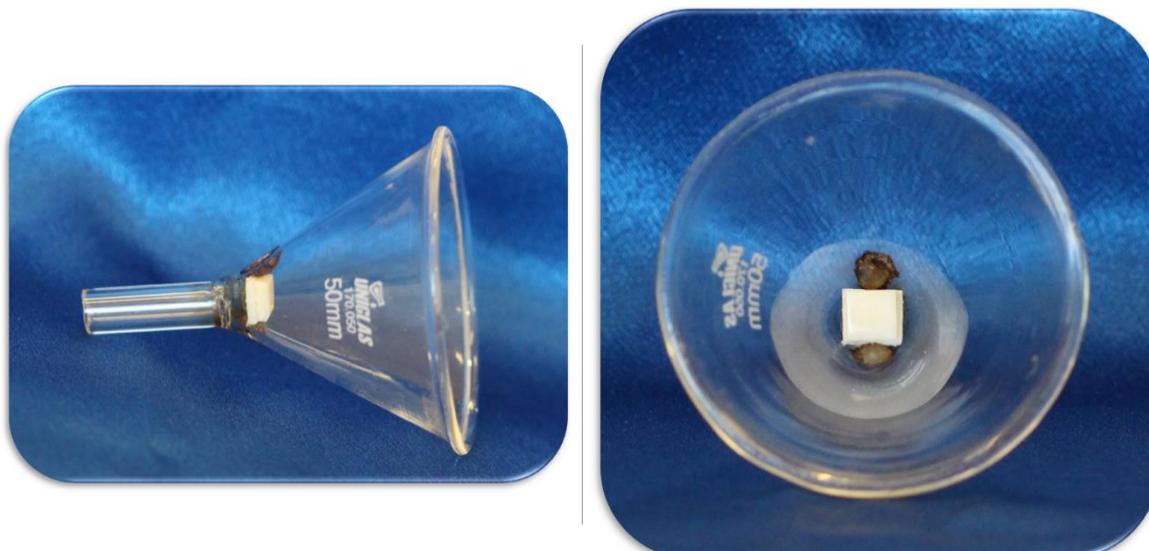


Figura 23 – Amostra adaptada no dispositivo de suporte para exposição a fumaça de cigarro.

O funcionamento do equipamento se deu pelo fechamento da tampa na extremidade de maior diâmetro do funil de vidro e acendimento dos cigarros acoplados aos orifícios designados para isso. A partir da colocação dos cigarros, a pressão do ar foi ajustada de forma que os cigarros fossem queimados durante 10 minutos. Periodicamente, esse ajuste era checado, a partir da queima de 4 cigarros, sem nenhum fragmento dental na câmara, para verificação da padronização de tempo e queima, que deveria ser simultânea nos 4 cigarros. Para cada fragmento, foram utilizados 20 cigarros (Marlboro Red, Phillip Morris Brazil Ind. e Com. Ltda., Santa Cruz do Sul, RS, Brasil), distribuídos em 5 ciclos de manchamento de 4 cigarros, no grupo que foi imerso em PHS, cada ciclo intercalado com a imersão em fitoesfingosina (PHS) por 15 minutos.

Após exposição aos cigarros, as amostras foram escovadas utilizando um dispositivo padronizado (Figuras 24 e 25) com o intuito de eliminar excessos de nicotina e outras substâncias aderidas na superfície dos fragmentos dentais.

O dispositivo apresenta uma base de acrílico com a superfície superior deslizante, com um espaço central (6mm x 6mm x 2mm) para fixação das amostras. Para padronização da posição da cabeça da escova e da força aplicada sobre a amostra no momento da escovação, o dispositivo foi adaptado a um paralelômetro de forma que sua base ficasse fixada na mesa de suporte.



Figura 24 – Paralelômetro.

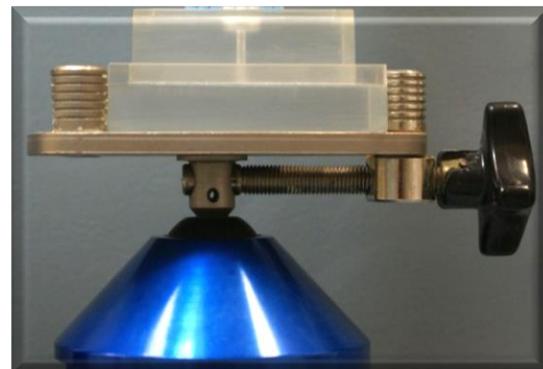


Figura 25 – Dispositivo fixado na mesa.

Foram utilizadas, para cada grupo de amostras, 01 cabeça de escova dental (Colgate Extra Clean, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brasil) com cerdas macias. As cabeças das escovas foram cortadas antes das hastes e estas foram acopladas e fixadas à haste vertical do paralelômetro através de uma matriz confeccionada em resina acrílica incolor. A haste do dispositivo foi fixada ao paralelômetro até o final da fase experimental, a fim de manter a posição e padronizar a escovação em todos os corpos de prova. Junto com a escova, foi utilizada água destilada.

Cada amostra foi escovada por 10 vezes após a aplicação da fumaça de cigarro, deslizando a parte superior do dispositivo em movimentos de vai e vem

permitindo, dessa forma, o contato das cerdas com a amostra. Em seguida, o corpo de prova foi lavado em água corrente e devolvido ao seu respectivo recipiente com água destilada até a próxima exposição à fumaça.

Todas as amostras foram submetidas ao manchamento duas vezes ao dia, incluindo as amostras que foram previamente submetidas ao PHS, seguidas de imersões de 15 min em soluções de manchamento ou exposição a tabaco, para mimetizar a rotina de higiene bucal. Todas as soluções de manchamento e tratamento foram renovadas diariamente.

Após o manchamento, leituras finais de cor, microdureza e as imagens para fluorescência foram tomadas. A estabilidade de cor dos materiais foi determinada pelo cálculo de ΔE , utilizando a seguinte fórmula:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Onde:

ΔE^* = alteração de cor

ΔL^* = diferença na luminosidade (L^*)

Δa^* = diferença no eixo a^*

Δb^* = diferença no eixo b^* .

A direção da diferença de cor é descrita pelas magnitudes e sinais algébricos das componentes ΔL^* , Δa^* e Δb^* :

$$\Delta L^* = L^*_F - L^*_i$$

$$\Delta a^* = a^*_F - a^*_i$$

$$\Delta b^* = b^*_F - b^*_i$$

onde L^*_i , a^*_i e b^*_i são referidos como medição inicial da cor e L^*_F , a^*_F e b^*_F como medição final da cor. Os valores de estabilidade de cor foram comparados aos limites clínicos de perceptibilidade (1.2) e aceitabilidade (2.7), segundo descrito por Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ et al. (2015)³⁸.

As mudanças na microdureza foram calculadas pela diferença entre as medidas final e inicial encontradas antes e após o tratamento das amostras, respectivamente, segundo a fórmula:

$$\Delta KHN = KHN_f - KHN_i$$

onde KHNi é referido como medição inicial de microdureza e KHNf como medição final de microdureza.

A quantificação da fluorescência foi realizada a partir da comparação das imagens considerando a intensidade da emissão de cinza em vez da análise de cores. Os níveis de escala de cinza foram transformados em números absolutos usando uma função Matlab ("rgb2gray").

3.4 Análise estatística

Os valores obtidos para cada propriedade estudada foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro-Wilk e para todos os ensaios as amostras foram consideradas dentro de uma distribuição normal, com exceção da microdureza. Para as distribuições normais, a comparação das médias foi feita através do teste 2-way ANOVA, Tukey, $p < .05$ e a microdureza foi analisada segundo o teste Kruskal-Wallis.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Rugosidade de superfície

Foram obtidos os valores médios de rugosidade de superfície inicial (Ra) para cada grupo testado, realizada com a finalidade de manter a homogeneidade da amostra e obter padronização para realização dos ensaios que se seguiram. Os valores médios encontrados para cada grupo encontram-se na Tabela 3, evidenciando a homogeneidade das amostras, obtidas através do protocolo de planificação do esmalte bovino adotado na metodologia desse estudo.

Tabela 3 – Médias iniciais dos valores de rugosidade de superfície (Ra).

	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	0,081 μm	0,125 μm	0,085 μm	0,093 μm
Café	0,077 μm	0,117 μm	0,094 μm	0,076 μm
Chá preto	0,102 μm	0,103 μm	0,085 μm	0,118 μm
Cigarro	0,162 μm	0,137 μm	0,102 μm	0,134 μm

4.2 Alteração de cor

A alteração de cor (ΔE) é o resultado dos efeitos causados pelas condições de manchamento a que as amostras foram submetidas, a qual percebemos através das mudanças observadas nos parâmetros L^* , a^* , b^* comparando seus valores iniciais e finais. Além da variável Delta E (ΔE), realizou-se também a análise estatística desses parâmetros separadamente afim de obter informações complementares que pudessem auxiliar na interpretação dos resultados e esclarecer o comportamento das soluções protetoras quando em contato com as soluções de manchamento.

4.2.1 Delta E (ΔE)

Sabendo que a distribuição do erro amostral foi normal, os valores foram transformados ($Y=\log Y$) e utilizado teste paramétrico, análise de variância – 2-way ANOVA, sendo os fatores de variação os agentes de manchamento e as soluções de tratamento a que as amostras foram submetidas, com nível de significância de 5%. As médias e respectivos desvios padrão dos valores de alteração de cor (ΔE) estão apresentados na Tabela 4. O Gráfico 1 mostra uma comparação entre os diferentes tipos de tratamento e sua relação com a alteração de cor.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão de alteração de cor (ΔE) dos grupos. Valores transformados ($Y=\log Y$). 2-way ANOVA, Tukey, $p<.05$

	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	1,90 ± 0,81 abB	1,34 ± 0,68 abB	1,46 ± 0,70 aB	2,06 ± 0,65 bB
Café	36,03 ± 7,95 aA	28,71 ± 5,94 aA	37,65 ± 6,68 aA	32,50 ± 2,62 aA
Chá preto	24,68 ± 5,85 aA	16,61 ± 2,66 bC	28,57 ± 7,13 aA	22,55 ± 6,37 abA
Cigarro	5,32 ± 0,61 bC	5,84 ± 0,99 bD	4,49 ± 0,44 bC	11,21 ± 1,28 aC

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p<.05$).

Todos os grupos apresentaram alteração de cor nas diferentes condições experimentais (Figura 26), sendo maiores os valores de manchamento para as amostras submetidas ao café e ao chá preto, independente da solução de tratamento testada, sem diferença ($p>.05$) entre elas, exceto quando tratadas com PA, sendo maior a alteração para o café. Água e Cigarro demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p>.05$) em relação aos outros dois manchadores e entre si, independente da solução de tratamento.

Água destilada e a fumaça de cigarro produziram alterações de cor semelhantes ($p>.05$) para os grupos tratados com água destilada, PA e PHS. O PHS+PA apresentou diferença ($p<.05$) das demais soluções de tratamento quando em combinação com a fumaça de cigarro e quando submetido ao manchamento com água destilada mostrou-se diferente ($p<.05$) apenas do PHS.

Gráfico 1 – Alteração de cor dos grupos (ΔE) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.

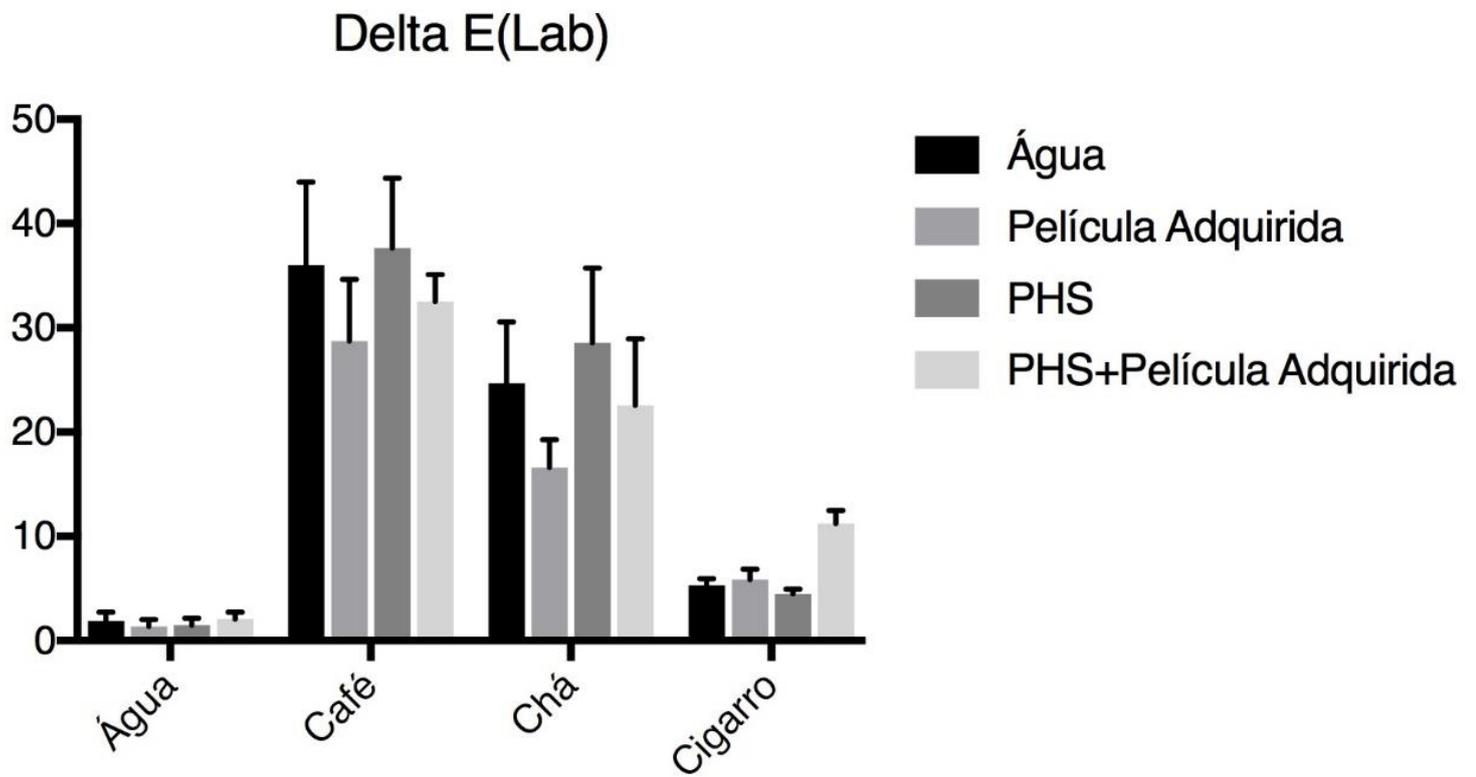




Figura 26 – Amostras após as diferentes condições de manchamento a que foram submetidas, juntamente com a amostra utilizada como referência de cor.

4.2.2 Delta L* (ΔL)

Os valores de média e desvio padrão da coordenada L*, podem ser vistos na Tabela 5. Podemos observar diminuição geral dos valores dessa coordenada, devido aos valores negativos para as médias, exceto para o grupo PHS + água destilada. O Gráfico 2 ilustra essa diminuição para os respectivos grupos.

Tabela 5 – Alteração de cor dos grupos para a coordenada L* (preto - branco).

	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	-1,27 ± 1,23 aA	-0,15 ± 1,17 aA	0,37 ± 1,35 aA	-0,85 ± 0,96 aA
Café	-33,51 ± 7,06 aB	-26,56 ± 6,35 bB	-35,67 ± 6,64 aB	-30,25 ± 2,79 abB
Chá preto	-22,58 ± 5,76 aC	-14,32 ± 2,27 bC	-25,74 ± 6,66 aC	-20,55 ± 6,10 abC
Cigarro	-2,53 ± 0,45 aA	-2,20 ± 1,54 aA	-1,51 ± 0,56 aA	-6,83 ± 0,77aA

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significante ($p < .05$).

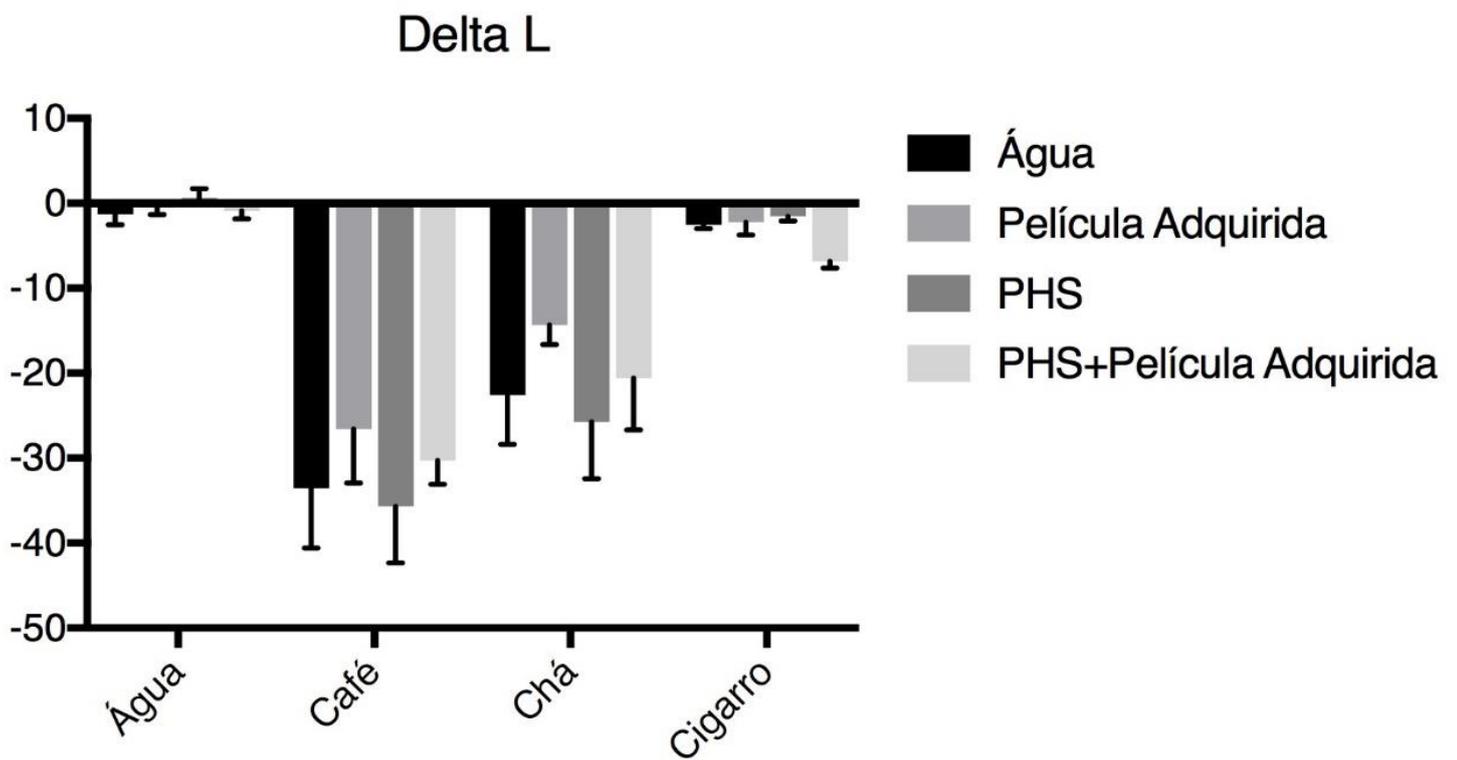
Em geral os grupos apresentaram diminuição para o parâmetro L* em todas as condições experimentais, exceto para condição de tratamento do PHS + água destilada. Os maiores valores médios para a alteração do L* foram dos agentes de manchamento café e chá preto independente das soluções de tratamento a que foram submetidas, com diferença estatisticamente significante ($p > .05$) entre elas e em relação aos demais grupos de agentes de manchamento. Água destilada e cigarro não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si ($p > .05$), para nenhuma solução de tratamento.

Quando os tratamentos foram comparados, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significante ($p > .05$) quando a água e o cigarro foram utilizados. Porém, quando as soluções de café e chá preto foram usadas para o manchamento, verificou-se que as amostras tratadas com película adquirida apresentaram diferença estatisticamente significante ($p < .05$) em relação aos grupos PHS e água, sem diferença ($p > .05$) do grupo PHS + película adquirida.

A água destilada e a película adquirida apresentaram diferença estatisticamente significante ($p < .05$) para ambos os agentes de manchamento, café e chá preto. Entretanto, estas duas soluções não apresentaram diferença

significante ($p > .05$) em relação à PHS+PA, que por sua vez, foram semelhantes ($p > .05$) de PA. PHS apresentou maior ($p > .05$) alteração de L^* que PA.

Gráfico 2 – Alteração de cor para a coordenada L^* (ΔL) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.



4.2.3 Delta a* (Δa)

Os valores da coordenada a*, para média e desvio padrão, encontram-se na Tabela 6. Nota-se que para essa coordenada houve valores positivos para a maioria dos grupos, indicando maior saturação do matiz vermelho, em relação às demais amostras. Porém, valores negativos foram encontrados para os grupos PHS submetido ao tratamento controle (água destilada) e água destilada, quando manchado por fumaça de cigarro. O Gráfico 3 mostra os valores do (Δa) para todas as condições experimentais.

Tabela 6 – Alteração de cor dos grupos para a coordenada a* (verde - vermelho).

	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	0,35 ± 0,30 aA	0,20 ± 0,15 aA	-0,03 ± 0,57 aA	0,68 ± 0,37 aA
Café	8,68 ± 3,12 abB	6,66 ± 1,81 bB	9,66 ± 2,02 aB	8,29 ± 0,95 abB
Chá preto	6,18 ± 1,99 aC	4,52 ± 0,92 bB	8,47 ± 2,62 aB	6,65 ± 2,41 abB
Cigarro	-0,06 ± 0,11 aA	0,96 ± 0,54 aA	0,00 ± 0,34 aA	0,72 ± 0,56 aA

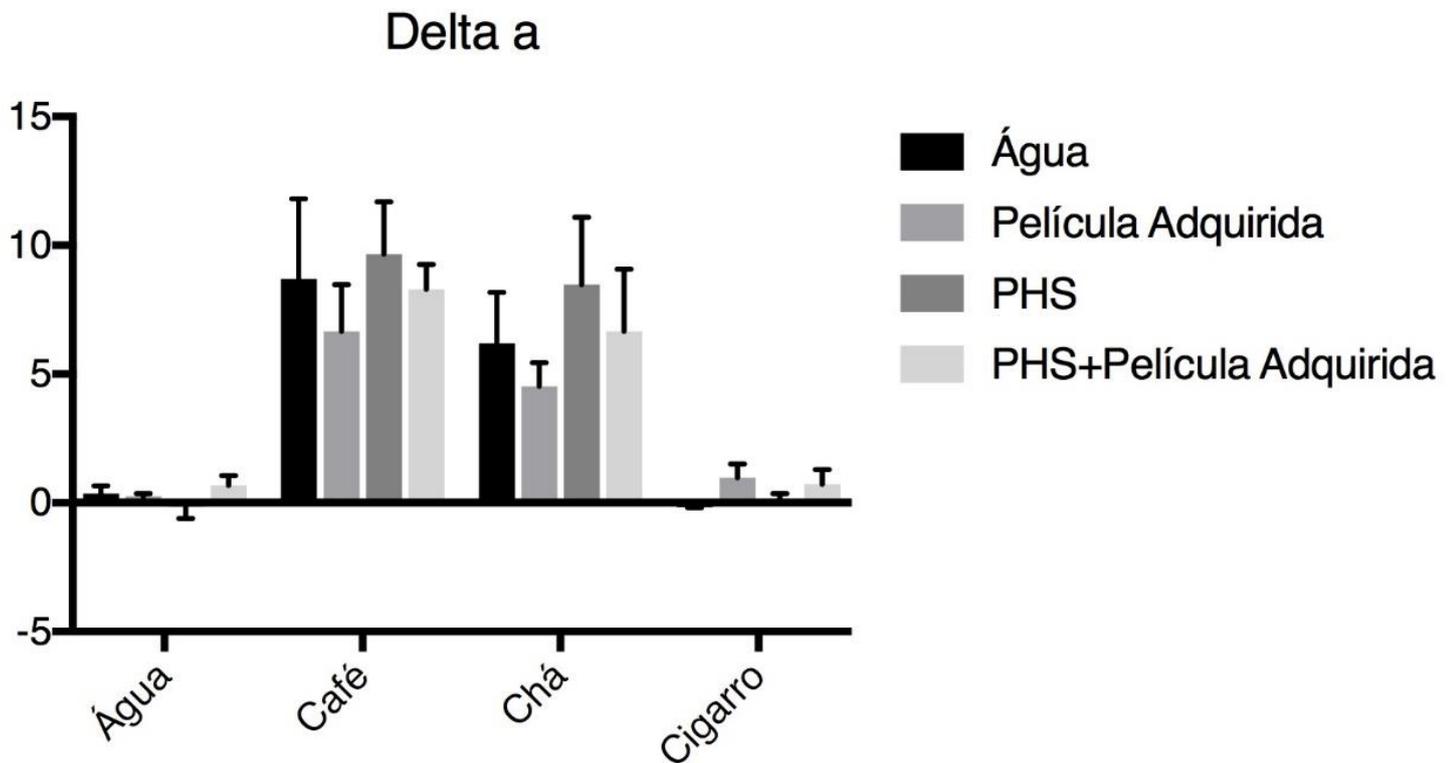
Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Não houve diferença ($p > .05$) entre os grupos tratados com água destilada e fumaça de cigarro, independente do tratamento a que as amostras foram submetidas. O manchamento com café e chá preto produziram os maiores valores de alteração desta coordenada, sendo que, para o café, o tratamento com película adquirida foi diferente de PHS ($p < .05$), que apresentou os maiores valores de alteração. Porém, estes grupos não apresentaram diferença ($p > .05$) em relação aos outros dois tipos de tratamento testados. As amostras manchadas com chá preto apresentaram níveis diferentes de alteração de cor, sendo que o grupo submetido a tratamento com película adquirida apresentou a menor alteração de cor, resultado diferente ($p < .05$) de PHS e água destilada, sendo semelhante ($p > .05$) ao grupo PHS + película adquirida.

No geral os grupos apresentaram aumento dos valores para o parâmetro a*, porém para os grupos, PHS + água destilada e água destilada + cigarro, houve uma sutil diminuição dos valores das médias. Percebe-se também que

não houve diferença ($p > .05$) entre os tratamentos testados quando as amostras foram armazenadas em água destilada (controle) ou submetidas à fumaça do cigarro.

Gráfico 3 – Alteração de cor para a coordenada a^* (Δa) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.



4.2.4 Delta b* (Δb)

Os valores da coordenada b* podem ser vistos na Tabela 7, onde encontram-se valores positivos para a maioria dos grupos, indicando aumento da saturação do matiz amarelo, com exceção dos grupos submetidos ao grupo controle de manchamento, quando tratados com película adquirida e PHS, que apresentaram valores negativos para a variação da coordenada, ambos muito pequenos.

Tabela 7 – Alteração de cor dos grupos para a coordenada b* (azul - amarelo).

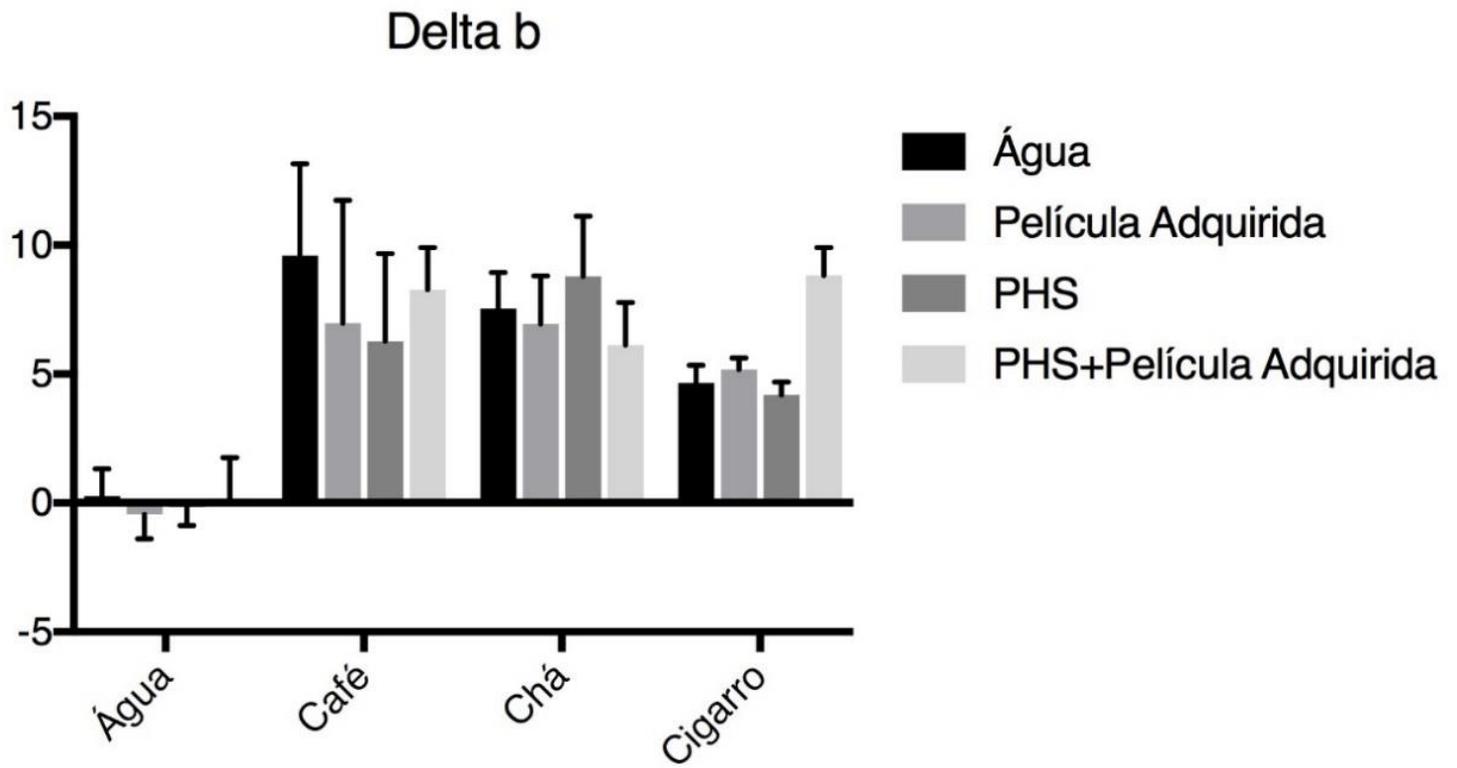
	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	0,21 ± 1,11 aA	-0,45 ± 0,94 aA	-0,03 ± 0,84 aA	0,02 ± 1,74 aA
Café	9,59 ± 3,56 aB	6,97 ± 4,76 abB	6,27 ± 3,41 bBC	8,26 ± 1,63 abB
Chá preto	7,53 ± 1,40 aBC	6,93 ± 1,88 aB	8,78 ± 2,32 aB	6,11 ± 1,65 aB
Cigarro	4,65 ± 0,68 aC	5,18 ± 0,44 aB	4,18 ± 0,49 aC	8,83 ± 1,08 bB

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Todos os agentes de manchamento produziram valores de (Δb) diferentes ($p > .05$) ao grupo de manchamento controle. Não houve diferença significativa ($p > .05$) entre os demais grupos manchados, com exceção do grupo submetido à fumaça do cigarro, que apresentou menor alteração ($p < .05$) de Δb que Café, quando tratado com água destilada e Chá, quando tratado com PHS.

Quando comparados os tratamentos, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > .05$) quando as amostras foram manchadas nos grupos controle (água destilada) e chá preto. Não houve diferença significativa ($p > .05$) da alteração de Δb em relação aos diferentes tratamentos, com exceção do grupo manchado com café tratado com PHS, que foi diferente do grupo de tratamento controle (água destilada); e do grupo manchado com a fumaça de cigarro, que apresentou diferença ($p < .05$) em relação aos demais grupos manchados. O Gráfico 4 mostra os valores do (Δb) para todas as condições experimentais.

Gráfico 4 – Alteração de cor para a coordenada b*(Δb) e sua relação com os diferentes tipos de tratamento.



4.3 Fluorescência

Os valores referentes à medida de fluorescência encontram-se na Tabela 8. Percebe-se que para essa medida houve valores de média negativos para todos os grupos, evidenciando a alteração de fluorescência presente em todas as amostras em diferentes graus, de acordo com o tipo de tratamento a que foram submetidos. O café foi o agente de manchamento que apresentou maiores valores de alteração da média, seguido pelo chá preto.

Tabela 8 – Médias e desvios padrão dos valores de fluorescência.

	Água	PA	PHS	PHS+PA
Água	-0,01 ± 0,01 aA	-0,01 ± 0,01 aA	-0,01 ± 0,03 aA	-0,04 ± 0,04 aA
Café	-0,53 ± 0,07 abB	-0,42 ± 0,06 aB	-0,54 ± 0,09 bB	-0,5 ± 0,05 abB
Chá preto	-0,42 ± 0,1 acB	-0,24 ± 0,03 bC	-0,47 ± 0,13 cB	-0,34 ± 0,14 abC
Cigarro	-0,04 ± 0,02 aA	-0,09 ± 0,02 aA	-0,03 ± 0,03 aA	-0,06 ± 0,03 aA

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significante ($p < .05$)

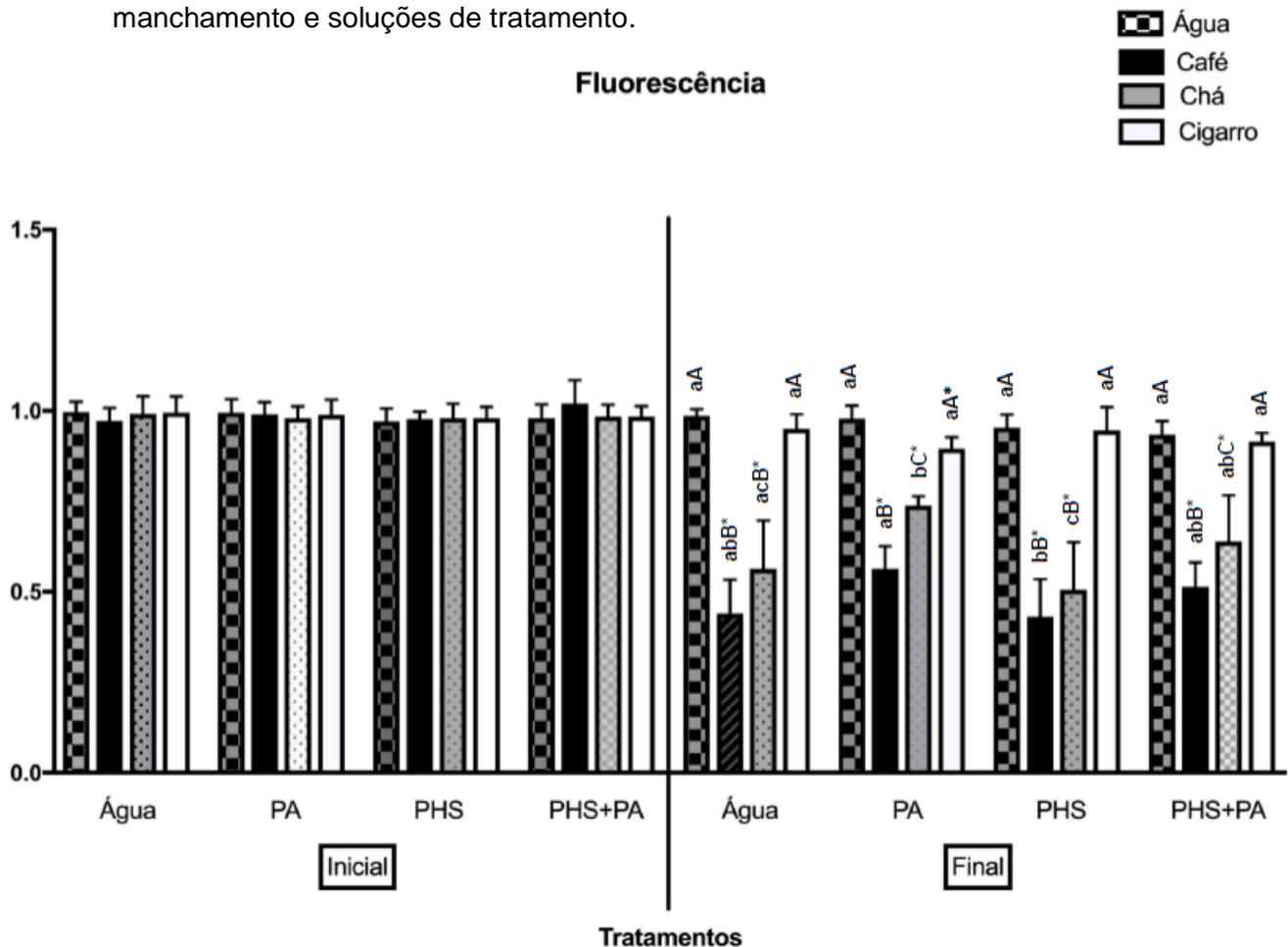
Os menores valores de fluorescência foram encontrados para os grupos tratados com água destilada, seguidos pelos grupos submetidos a fumaça de cigarro, os quais não apresentaram diferença significativa estatisticamente ($p > .05$) entre si. No grupo controle (água destilada), não houve diferença estatisticamente significativa ($p > .05$) entre os tratamentos (água destilada, película adquirida, PHS e PHS + película adquirida). O mesmo ocorreu com o grupo submetido a fumaça de cigarro. Os grupos submetidos a manchamento com café e chá preto apresentaram maior alteração de fluorescência ($p < .05$) quando tratados com PHS, em relação às amostras tratadas com PA, não havendo diferença estatística ($p > .05$) em relação aos demais tratamentos.

Quando comparados as soluções de manchamento, o café e o chá preto não apresentam diferença significativa estatisticamente ($p > .05$) entre si, quando associados às soluções de tratamento água destilada e PHS. Amostras submetidas a tratamentos com PA e PHS+PA apresentaram diferença

significante na fluorescência das amostras quando estas soluções foram comparadas.

A alteração da fluorescência e sua relação com os diferentes tipos de agente de manchamento e suas respectivas soluções de tratamento, estão apresentadas no Gráfico 5. A Figura 27 apresenta as diferentes nuances de fluorescência antes e após os tratamentos realizados.

Gráfico 5 – Alteração da fluorescência e sua relação com os diferentes agentes de manchamento e soluções de tratamento.



Letras diferentes, minúsculas comparando as soluções de tratamento e maiúsculas comparando os agentes manchadores. Símbolos indicam diferença entre manchamento inicial e final.

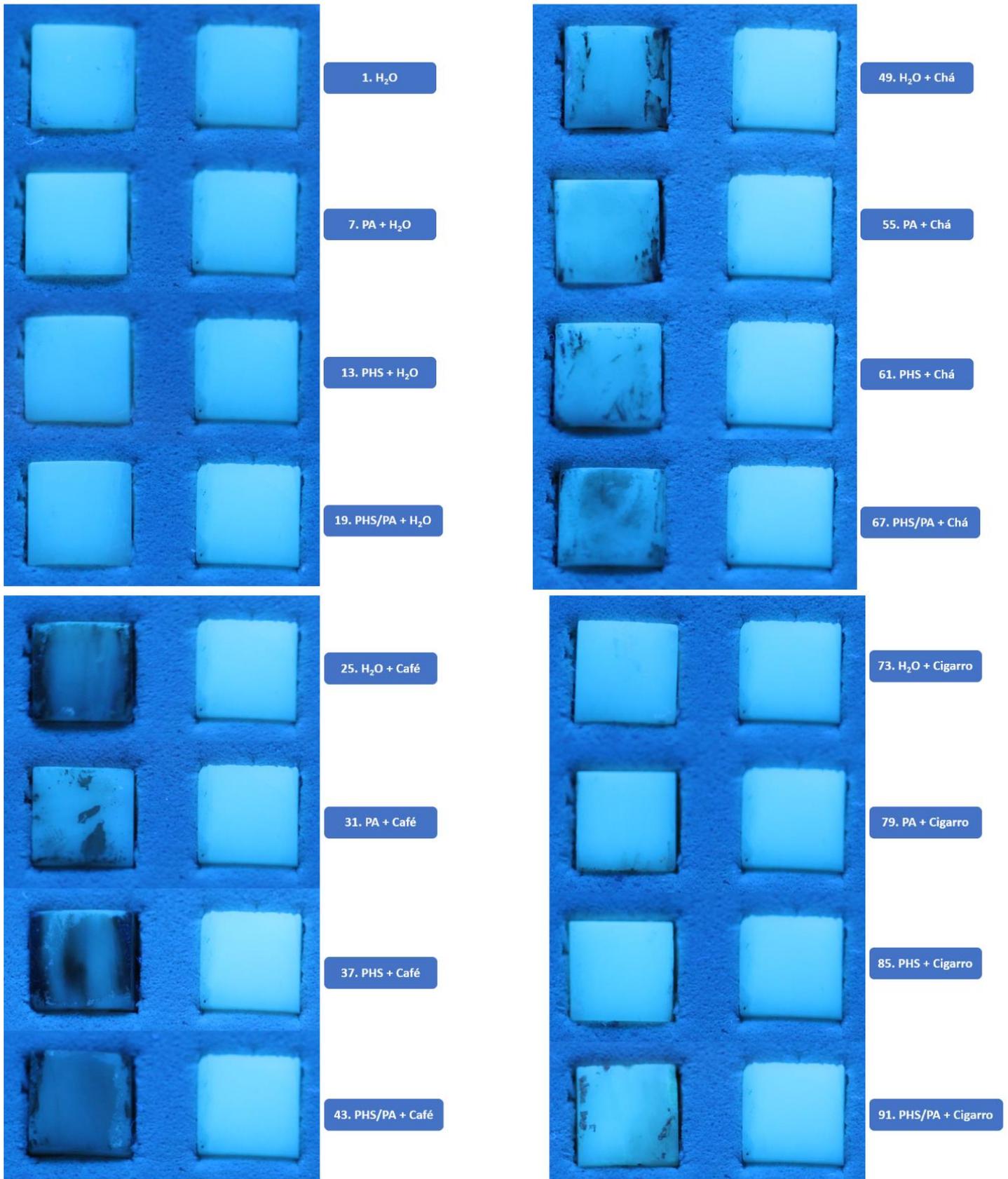


Figura 27 – Amostras, sob iluminante UV, após as diferentes condições de manchamento a que foram submetidas, juntamente com a amostra utilizada como referência de cor.

4.4 Microdureza

Após submeter os valores obtidos de microdureza relativa ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, constatou-se que esse parâmetro estava dentro de uma distribuição não-normal, sendo analisada segundo o teste Kruskal-Wallis, teste de Dunn. Os valores das médias e desvios padrão da microdureza relativa encontram-se na Tabela 9. A alteração de microdureza e sua relação com os diferentes tipos de agente de manchamento e suas respectivas soluções de tratamento, estão apresentadas no Gráfico 6.

Tabela 9 – Médias e desvios padrão dos valores de microdureza relativa (%).

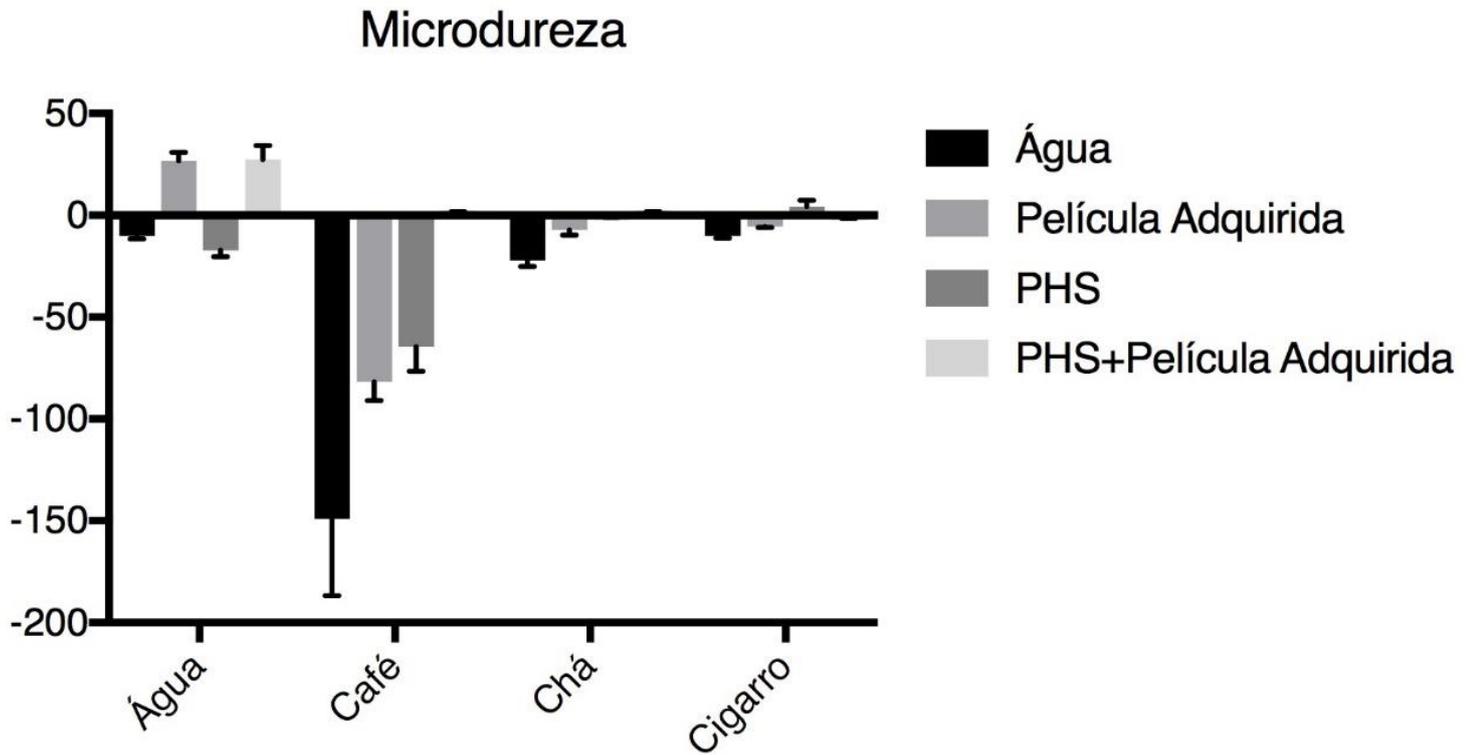
	Água	PA	PHS	PHS + PA
Água	97,19 ± 0,37 aA	107,6 ± 1,77 bA	95,37 ± 0,77 aA	107,8 ± 2,45 bA
Café	62,39 ± 6,74 aB	77,69 ± 3,32 bB	81,78 ± 2,95 cB	100,3 ± 0,18 dB
Chá preto	93,79 ± 0,63 aC	98,09 ± 0,64 bC	99,84 ± 0,08 bC	100,4 ± 0,1 bB
Cigarro	97,13 ± 0,42 aA	98,51 ± 0,06 acC	101,2 ± 0,82 bC	99,7 ± 0,12 bcB

Letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < .05$).

Os menores valores de microdureza relativa foram encontrados para os grupos manchados com café. Houve diferença significativa ($p < .05$) entre todos os grupos considerando-se os tratamentos realizados, de forma que $PHS+PA > PHS > PA > \text{Água}$. O grupo controle de manchamento (água destilada) apresentou maiores valores de microdureza relativa quando tratados com PA e PHS + PA, sem diferença ($p > .05$) entre si, porém, diferentes estatisticamente ($p < .05$) dos demais grupos. O grupo manchado com chá preto apresentou maiores valores de microdureza relativa para o grupo tratado com PHS + PA, diferente estatisticamente ($p < .05$) de todos os demais grupos. Quanto ao grupo manchado com fumaça de cigarro, houve diferença ($p < .05$) entre os grupos tratados com água e PHS, não havendo diferença ($p > .05$) entre os demais grupos.

Quanto aos agentes de manchamento, as amostras submetidas ao café, com menores valores de microdureza relativa para todos os grupos tratados, foram diferentes estatisticamente ($p < .05$) dos grupos manchados com água, chá preto e fumaça de cigarro para todas as soluções de tratamento utilizadas, com exceção das amostras tratadas com PHS + PA ($p > .05$), que não apresentaram diferença em relação às amostras submetidas a manchamento com café e cigarro.

Gráfico 6 – Alteração de microdureza e sua relação com os diferentes tipos de agente de manchamento em combinação com suas respectivas soluções de tratamento.



5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado o efeito protetor de solução de fitoesfingosina (PHS) sobre o esmalte dental bovino e sua relação com a película adquirida (PA) quanto ao manchamento provocado por diferentes agentes: café, chá preto e fumaça de cigarro, bem como a relação desses tipos de tratamento e sua repercussão na microdureza relativa e fluorescência.

Partiu-se da hipótese nula que não haveria diferença nas propriedades estudadas quando o esmalte fosse tratado com a fitoesfingosina (PHS). Considerando os resultados obtidos no estudo, a hipótese pode ser parcialmente aceita, uma vez que, quanto à estabilidade de cor e fluorescência, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com PHS em relação aos grupos controle e PA, com exceção das amostras manchadas com chá preto e tratadas com saliva, que apresentaram menor alteração de cor e de fluorescência. Amostras tratadas com PHS+PA apresentaram maior alteração de cor ($p < .05$) quando comparadas com amostras tratadas com PHS, quando submetidas a manchamento com água e fumaça de cigarro, não apresentando diferença em relação aos demais grupos. Quanto à microdureza, a hipótese não pode ser aceita pois houve aumento da microdureza quando as amostras foram tratadas com PHS ou PHS+PA.

A presença da película adquirida no tratamento das amostras e sua associação ou não com PHS e interação com os agentes de manchamento foram fatores significantes para as alterações ocorridas nas amostras.

A alteração de cor dentária pode ser causada por razões intrínsecas ou extrínsecas. As manchas intrínsecas são uma consequência da incorporação de materiais pigmentados nos tecidos dentários, como resultado de fatores localizados ou generalizados. Alteração de cor localizada pode ser causada por necrose pulpar e sangramento, infecção de dentes decíduos, tratamento endodôntico inadequado e manchamento por amálgama. As alterações intrínsecas generalizadas são o resultado de fatores ambientais ou genéticos, como fluorose dentária, tratamento com tetraciclina, doenças da infância e

distúrbios hereditários - como amelogênese e dentinogênese imperfeita - que afetam as estruturas dentárias³⁹.

Os fatores extrínsecos também podem ser a causa da alteração de cor dental, podendo estar relacionados com hábitos alimentares e sorção de corantes⁴⁰. Alguns fatores relacionados à dieta, como a ingestão de café (pH=4,99) e chá preto (pH=5,4), estão entre os principais fatores que podem levar à pigmentação extrínseca dos dentes. A alteração de cor das estruturas dentais depende de vários parâmetros, tais como o pH da solução. O baixo pH dessas bebidas desempenha um papel importante no grau de alteração de cor do esmalte^{41; 42}.

Muitos autores utilizam frequentemente dentes bovinos como uma alternativa aos dentes humanos em estudos laboratoriais de alteração de cor. Seu uso evita as questões éticas relacionadas ao uso de dentes humanos, e os dentes bovinos anatomicamente possuem áreas planas maiores que favorecem a acomodação da ponta do colorímetro propiciando uma leitura de cor facilitada e padronizada. Além disso, os dentes bovinos não diferem significativamente dos dentes humanos em termos de cor basal^{39; 43}.

Com relação a microdureza, segundo Arends, J; Schuthof, J; Jongebloed, W. G. (1979 e 1980)^{44; 45}, as diferenças entre o esmalte humano e bovino são pequenas, no entanto o esmalte humano mostra-se ligeiramente mais duro que o esmalte bovino. A utilização de dentes bovinos nesse estudo justifica-se pelo fato do esmalte bovino, quando abrasionado em sua superfície externa em torno de 100 a 200 μm , oferece uma superfície altamente reprodutível e, por esse motivo, pode ser seguramente utilizado em estudos envolvendo ensaios de microdureza e rugosidade, quando mensurações em serie são requeridas⁴³.

De acordo com alguns estudos, bebidas com baixo pH são responsáveis por um aumento na alteração de cor de dentes. Além disso, rugosidade, fissuras e porosidades inerentes às superfícies dentárias podem contribuir para o aumento do manchamento causado por certos tipos de substâncias^{46; 47}.

O baixo pH dos agentes manchadores pode ser neutralizado pela saliva formadora de película adquirida, uma vez que a saliva exerce um papel essencial

na proteção dos dentes contra os efeitos prejudiciais dos ácidos, devido à sua capacidade de enxágue e neutralização ácida. Além disso, a formação da película salivar, composta de mucinas e glicoproteínas ricas em prolina, tem protagonismo no revestimento das superfícies dentárias^{24; 25}. As primeiras proteínas de película, ricas em prolina e estatina, promovem a remineralização do esmalte atraindo íons cálcio. A desmineralização é retardada pelas proteínas da película, em conjunto com os íons cálcio e fosfato na saliva e no fluido da placa^{48; 49}.

A película adquirida é um biofilme condicionante que altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência da adesão. É constituída de uma mistura complexa de substâncias incluindo proteínas (albumina, lisozima e proteínas ácidas contendo muitos resíduos de prolina), glicoproteínas (lactoferrina, IgA, amilases), fosfoproteínas, lipídios, mucinas e ácido siálico, servindo, portanto, como receptores e fonte de nutrientes para os colonizadores primários. As bactérias aderem, de forma variável, a estas superfícies que compõem a película adquirida. Algumas possuem estruturas específicas de adesão, como fímbrias e polímeros extracelulares, que permitem uma rápida adesão por contato. Outras bactérias necessitam de uma exposição mais prolongada para unirem-se firmemente⁵⁰.

Uma outra função da película adquirida é atuar como uma barreira ou membrana semipermeável impedindo o contato direto dos fluidos orais e das substâncias ingeridas com a estrutura dental. Entretanto, a ação desta membrana é dependente da agressividade, do tipo de desafio ácido, da espessura da estrutura da película e do tempo de maturação da película formada na superfície do esmalte³⁷. Essa característica protetora pode justificar, em parte, os resultados encontrados para microdureza do esmalte quando as amostras foram tratadas com PA e/ou PHS+PA. As médias de microdureza das amostras submetidas ao tratamento com PA foram maiores que as médias encontradas para o grupo controle, bem como os resultados encontrados para PHS+PA foram mais elevados que os encontrados para amostras tratadas com PHS, indicando que a saliva tem importante papel na proteção do esmalte.

Várias glicoproteínas salivares impedem a aderência de microorganismos orais à película formada no esmalte e inibem seu crescimento. O arsenal salivar contém sistemas defensivos que protegem especificamente a dentição. Um desses sistemas é o tampão de carbonato/bicarbonato (neutralização rápida de ácidos) e proteínas específicas que formam uma camada protetora na superfície do esmalte, que serve como uma barreira para impedir a livre difusão ácida^{51; 52; 53}. Na metodologia utilizada, a película adquirida foi formada pela imersão dos fragmentos de dentes bovinos em saliva humana por 2 horas, coletada diariamente, conforme metodologia de Karasawa et al., (2010)³⁷.

Dentro desse contexto da proteção dos elementos dentais, os esfingolipídeos, representados pela fitoesfingosina (PHS) surgem como um potencial agente protetor contra o manchamento. Os esfingolipídeos podem ser considerados a segunda maior classe de lipídeos de membrana, se diferenciando por conter um aminoálcool de cadeia longa. Em animais, o aminoálcool é a esfingosina e em vegetais a fitoesfingosina^{54; 55}.

Os lipídeos são um grupo heterogêneo de compostos mais relacionados por suas propriedades físicas do que por suas propriedades químicas. Apresentam propriedades comuns, sendo relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes não polares^{56; 57}.

Os esfingolipídeos são constituintes da maioria dos alimentos, mas as quantidades são relativamente pequenas e não há evidência de que os esfingolípídes da dieta sejam necessários para o crescimento ou a sobrevivência. No entanto, tanto os esfingolípídios complexos como seus produtos de digestão (ceramidas e esfingosinas) são compostos altamente bioativos que têm efeitos profundos na regulação celular⁵⁶.

Os esfingolípídios sintéticos são eficazes na inibição da ligação de bactérias e vírus; portanto, é plausível que os esfingolípídios nos alimentos também entrem em competição por sítios de ligação celular⁵⁶.

No corpo humano, pequenas quantidades de PHS são encontradas na epiderme e na cavidade oral⁵⁸, na saliva e nas superfícies mucosas, sendo dessa

forma compatível com o corpo humano³³. Além disso, é benéfico aos seres humanos, já que lipídios encontrados na saliva contribuem em processos que estão relacionados ao sistema imunológico, no transporte de antioxidantes lipossolúveis, nas propriedades anti-inflamatórias e atividade antimicrobiana sobre as mucosas^{30; 31; 32; 33}. Diante disso, estudos recentes têm relacionado a capacidade da fitoesfingosina (PHS) em impedir a adesão e formação do biofilme sobre a hidroxiapatita^{23; 29; 34}.

Segundo Valentijn-Benz et al. (2015)²³, o PHS e outras bases esfingóides têm a capacidade de formar multicamadas protetoras sobre a HAp, atuando como barreiras de difusão contra os íons H⁺. Considerando isso, seria esperado que o PHS proporcionasse proteção superficial do esmalte em situações de manchamento e os resultados encontrados podem ser considerados promissores, uma vez que suas propriedades protetoras anti-erosivas se mostraram presentes e atuantes no esmalte dental bovino.

Devido ao seu caráter anfipático, em solução, o PHS tem a tendência de se reunir em agregados ou micelas carregadas positivamente, com as caudas de ácidos graxos voltadas ao interior e os grupos principais com carga positiva expostos à solução. A alta densidade de cargas positivas nesses agregados provavelmente produzirá uma alta avidéz para superfícies carregadas negativamente, como HAp e/ou esmalte dental²³. Uma vez ligada em sua porção positiva à HAp, fica disponível a porção negativa da molécula, com função protetora sobre o esmalte quanto à adesão microbiana. Entretanto, sendo o café e o chá soluções polares e levemente ácidas, essas soluções podem se ligar à camada de PHS, resultando em maior manchamento com essas soluções. Assim, o PHS teria menor efeito protetor quanto à essas soluções^{23; 29; 32; 34}.

A percepção das cores por análise visual é uma interpretação subjetiva e varia entre os diversos observadores. Tal variabilidade é resultado de vários fatores, incluindo o objeto visto, a iluminação, o metamerismo, a fadiga, a idade e estado emocional dos observadores⁵⁹. O espectrofotômetro Easy Shade foi utilizado para evitar erros subjetivos de visualização e assim obter dados mais precisos e confiáveis⁷. Os valores de estabilidade de cor (Delta E) foram comparados aos limites clínicos de perceptibilidade (1.2) e aceitabilidade (2.7),

segundo descrito por Paravina RD, Ghinea R, Herrera LJ et al (2015)³⁸. Verificou-se que as alterações de cor causadas por café e chá se encontram muito acima dos limites críticos. A alteração de cor após manchamento com cigarro também está acima dos limites críticos, porém em níveis mais moderados. Evidencia-se, porém, o potencial protetor do PHS em comparação à película adquirida.

A presença da PA demonstrou melhores resultados que o PHS quanto à proteção ao manchamento com chá e café e efeito intermediário quando ambos estavam associados. Justifica-se esse fato devido à adsorção da película adquirida sobre o esmalte dental, diminuindo a absorção dos cromóforos dos agentes manchadores. Quando associado ao PHS, pode ter ocorrido alguma competição pelo sítio de ligação da película adquirida ao esmalte, tendo sido ocupado em parte pelo PHS, justificando os resultados intermediários de alteração de cor, significando menor proteção ao manchamento que as soluções isoladas^{23; 25; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 37}.

A alteração de cor de um material (Delta E) destaca apenas a distância euclidiana entre dois pontos (antes e depois de um tratamento). Assim, para justificarmos as alterações encontradas pelo Delta E, devemos analisar as coordenadas que compõem a cor.

A coordenada L^* tem grande importância na análise dos resultados já que representa a luminosidade das amostras. O olho humano é capaz de perceber as variações no eixo L^* mais claramente que nos eixos a^* e b^* , pois a quantidade de células responsáveis pela visão em preto e branco (bastonetes) é mais abundante do que a de células responsáveis pela visão colorida (cones). Assim, qualquer perda de luminosidade é fundamental para a estabilidade de cor⁶⁰.

Na análise das coordenadas, todos os grupos apresentaram diminuição do parâmetro L^* , representada pelos valores negativos encontrados para o Delta L, mostrando que a exposição ao café, chá preto e fumaça de cigarro produziram uma diminuição da luminosidade e escurecimento das amostras, o que está de acordo com os estudos in vitro realizados por Watts, A. e Addy, M. (2001)⁴⁶.

Café e chá preto contêm corantes amarelos com diferentes polaridades, o que pode explicar a maior saturação do matiz vermelho (valores positivos para

coordenada a*) e amarelo (valores positivos para coordenada b*) observadas após imersão em chá preto ou café. Os resultados encontrados estão de acordo com o estudo de Karadas e Seven, (2014)⁹.

O café solúvel é fabricado a partir de cafés das variedades Arábica e Robusta/Conillon e é resultado da desidratção do extrato aquoso de café torrado, havendo em sua composição apenas café e água. No café torrado se encontram açúcares, celulose, cafeína, substâncias gordurosas, ácidos clorogênicos, polifenóis, outras substâncias nitrogenadas, constituintes voláteis, lipídeos, protéidos, melanoidinas, entre outros⁶¹.

O café tipo conillon é o mais utilizado no Brasil, mas seu sabor não é agradável, por isso é mais barato. No entanto, ele é muito empregado para dar corpo a misturas de cafés arábicas (blends) ou na preparação de café solúvel, que foi o tipo escolhido para realização desse estudo. A quantidade de sólidos insolúveis em água do café conillon é bem maior do que a quantidade de sólidos solúveis. A acidez do café está relacionada à formação de ácidos durante o processo de torração, pela degradação de glucídios e lipídios, degradação térmica de ésteres, autooxidação de aldeídos e cetonas⁶¹. Alimentos e bebidas como chá, café e vinho também podem promover a formação de manchas dentárias ao depositar diretamente cromógenos na superfície do dente^{61; 62}. Nesses processos de pigmentação é comum observar uma fina película amarelada na superfície do dente, livre de bactérias. As substâncias nestas bebidas, que são responsáveis por causar manchas dentárias, são conhecidas como taninos e são compostos de polifenóis, como catequinas e leucoantocianinas. Estes materiais geram cor devido à presença de ligações duplas conjugadas e interagem com a superfície do dente através de troca iônica^{62; 63}.

O tanino ou compostos tânicos são compostos fenólicos de alto peso molecular e, portanto, são altamente reativos quimicamente, tendo afinidade por cadeias de proteínas, sendo responsáveis pela sua precipitação. Tais compostos formam soluções coloidais, apresentando reação ácida e forte sabor adstringente quando em contato com a água^{64; 65}. A força de adesão dos cromóforos e o seu mecanismo químico é que determinam a resistência do

pigmento. Os alimentos como café e chá preto, devido a presença de tanino, apresentam alto grau de dificuldade de remoção de pigmento⁶³.

Os compostos tânicos também são comumente encontrados em algumas plantas utilizadas para fazer chás, sendo essa bebida a segunda mais consumida no mundo depois da água. O chá preto é originário das folhas da planta *Camellia sinensis*, que pode ser classificada em três tipos principais de acordo com o nível de fermentação: chá verde (não fermentado), chá oolong (parcialmente fermentado) e chá preto (totalmente fermentado)^{66; 67}.

As folhas do chá preto - *Camellia sinensis* contêm proteínas (15 a 20%), glicídios (5%), ácido ascórbico, vitaminas do complexo B e bases púricas, especialmente cafeína (2 a 4%), polifenóis (30%): monosídeos de flavonóis e flavonas, catequina, epicatequina e galato de epicatequina, além de taninos condensados e hidrolisáveis. A composição do chá varia com a estação do ano, o clima, a idade da folha e a variedade do chá⁶⁷.

Na obtenção do chá preto, as folhas são secas, reduzindo-se o seu conteúdo de umidade, até que o seu peso seja 55% do peso da folha original⁶⁸. Posteriormente, as folhas são trituradas, iniciando-se a oxidação e dimerização das catequinas, muito importantes para o desenvolvimento da coloração avermelhada e sabor característico da bebida, além de aumentar o seu tempo de conservação^{68; 69}.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboraram com os achados na literatura e reafirmaram a capacidade de manchamento do café e chá preto, quando em contato com as estruturas dentais. Ressalte-se que esse manchamento foi mais marcante nas bordas dos fragmentos. Isso pode ser justificado pela forma da amostra e, embora tenhamos utilizado procedimentos de polimento neste estudo para garantir a padronização dos espécimes e as amostras apresentarem valores médios de rugosidade de superfície próximos a 0,1µm, é de se esperar que as superfícies de esmalte possam ter mantido algumas irregularidades características da própria estrutura do dente bovino. Dessa forma, esses agentes de manchamento provavelmente se difundiram

através desses defeitos estruturais mais facilmente do que a fumaça de cigarro, por estarem na forma líquida³⁹.

O tabagismo também é responsável pela produção primária de escurecimento e alteração de cor dos dentes⁴¹. A conexão entre contaminação por manchamento do substrato dental e o fumo está bem consolidada na literatura. Os dentes de indivíduos fumantes tornam-se amarelados e até enegrecidos devido à impregnação de contaminantes provenientes da fumaça do cigarro^{10; 70}.

Não há na literatura uma grande variedade de estudos que padronizem a submissão de fragmentos dentais bovinos à fumaça do cigarro. O que há são estudos que relacionam a ação da fumaça às alterações de cor promovidas em dentes humanos e materiais restauradores, sem, entretanto, padronizar o tipo de equipamento utilizado, o número de cigarros, o fluxo da fumaça e o tempo de exposição do agente sobre o fragmento dental^{10; 41; 70; 71}.

Diferentemente destes estudos, a metodologia utilizada para essa pesquisa utilizou um equipamento de menores dimensões, com capacidade de receber 4 cigarros por vez, permitindo, dessa forma, que a fumaça dos cigarros entrassem em contato com a amostra em tempo e velocidade padronizados, prevenindo a dissipação da fumaça para áreas além do desejado, mantendo a fumaça em constante contato com o fragmento dental bovino e criando um fluxo de ar estável, juntamente com a fumaça liberada pela queima dos quatro cigarros simultaneamente. Tais características só foram possíveis de serem obtidas graças ao formato cônico do dispositivo.

De acordo com Alandia-Roman (2013)¹⁰, a distribuição e intensidade do manchamento é dependente do tipo, quantidade e duração da exposição ao agente pigmentante. Dessa forma, a metodologia proposta considera esses fatores, de forma que cada amostra foi exposta à fumaça de 20 cigarros, distribuídos em 5 ciclos de 4 cigarros por um período de 10 minutos cada, e isso foi determinado após estudo piloto realizado previamente, onde essa quantidade de cigarros foi suficiente para gerar alterações de cor nas amostras, embora

existam poucos dados na literatura que indiquem um protocolo de tempo e quantidade de exposição à fumaça.

Durante a realização do estudo piloto, notou-se que excessos de depósitos dos componentes da fumaça do cigarro estavam permanecendo aderidos à superfície das amostras, resultando em valores elevados de alteração de cor, não condizendo com a realidade clínica, onde a presença de saliva e a movimentação da língua produziriam de certa forma uma limpeza nos dentes¹⁰.

Considerando que em uma situação clínica, a escovação faz parte da rotina dos pacientes e pode ocorrer logo após a exposição a agentes pigmentantes, a influência de tal associação também é clinicamente relevante. Por isso, foi incluída a escovação na metodologia, optando-se por utilizar uma suave escovação nas amostras através de um dispositivo padronizado, de forma que para cada fragmento dental foi utilizada uma cabeça de escova para realização dos movimentos de forma delicada, de maneira que só o excesso dos sedimentos provocados pela fumaça do cigarro fossem removidos^{10,70}.

Segundo Wasilewski *et al.* (2010)⁷⁰, esses sedimentos são causados pela deposição de açúcares e cacau presentes na composição da fumaça. Observa-se, porém, que na composição do cigarro existem outros componentes capazes de ocasionar esse manchamento, como extrato de café e o alcatrão, que é um resíduo negro e viscoso que tem a capacidade de ficar impregnado na superfície da amostra.

A fumaça do cigarro é uma complexa mistura de componentes. A natureza físico-química dessa fumaça depende das características inerentes ao tipo de tabaco, a suas diferentes maneiras de processamento, aos tipos de aditivos, aos parâmetros físicos de cada cigarro, tais como o tipo de filtro, o papel, o comprimento e o diâmetro, e a sua maneira de confecção⁷².

De acordo com informações do fabricante, os ingredientes dos cigarros são o tabaco (1,1 mg de nicotina e 15 mg de alcatrão), água, açúcares (sacarose e / ou açúcar invertido e / ou xarope de milho rico em frutose), propilenoglicol, glicerol, extrato de alcaçuz, diamônio fosfato, hidróxido de amônio, produtos de cacau e cacau, feijão de alfarroba e sabores naturais e artificiais^{12; 73}.

A fumaça do cigarro é composta de ar, água, monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO₂) e alcatrão, que representam mais de 90% da quantidade total dos produtos de fumaça. As outras substâncias do fumo do cigarro são formadas durante a queima do tabaco ou simplesmente transferidas do tabaco para o fumo pelo aquecimento^{70; 73}.

Não obstante as possíveis variações supracitadas, a fumaça de cigarro é composta de aproximadamente 4.800 componentes e pode ser dividida em duas fases distintas: gasosa e particulada. A fase gasosa, responsável por 90-96% em peso da fumaça do cigarro, é distinguida como a porção que atravessa um filtro de fibra de vidro *Cambridge*, ao passo que a fase particulada, também conhecida como alcatrão, é a porção que fica retida. A fase particulada é formada por partículas entre 0,1 µm e 1,0 µm de diâmetro, e entre seus maiores componentes estão a nicotina e remanescentes alcalóides de *Nicotiana*^{72; 73; 74; 75; 76}.

Provavelmente, alguns desses componentes, como açúcares e cacau, podem ser responsáveis pela pigmentação devido à sua sombra escura e à capacidade de aderir à superfície dental. O alcatrão, que é subproduto da fase particulada da fumaça do cigarro sem nicotina e água⁷³, apresenta partículas de 100 nm a 700 nm de tamanho, que variam à medida que diminui o comprimento do cigarro, devido à queima. O próprio filtro também vai perdendo a capacidade de retenção das partículas maiores com o uso⁷⁷.

Todas essas características encontradas no cigarro e nos subprodutos advindos de sua queima, liberados na fumaça promoveram uma alteração mais pronunciada de cor para a coordenada b* que designa o eixo azul-amarelo, configurando um amarelamento das amostras.

Diante dos aspectos discutidos com relação a alteração de cor, a fluorescência tem papel fundamental no brilho e proporciona uma aparência de naturalidade. A fluorescência dos materiais dentários e das estruturas dentais depende da duração da exposição à luz UV que pode ocorrer sob luz natural ou luz artificial, como lâmpadas fluorescentes, flashes fotográficos ou “luz escura” de boates⁷⁸.

Fluorescência é a luz que um material emite após um iluminante brilhar sobre o material. Ocorre quando uma substância absorve e reemite a luz em um comprimento de onda maior. Ou seja, é resultado da interação do comprimento de onda iluminando o objeto e a molécula deste objeto⁷⁹. A energia é absorvida pela molécula com subsequente transição eletrônica para um estado de energia mais alta onde os elétrons permanecem por um curto período de tempo. A partir deste estado excitado, os elétrons podem cair para o estado fundamental e liberar a energia adquirida na forma de maior comprimento de onda, que está relacionada com a energia desprendida, e luz fluorescente pode ser emitida. A desmineralização resulta na perda da autofluorescência^{79; 80}.

Nos dentes naturais, a fluorescência é estimulada pela radiação ultravioleta (UV), que influencia o brilho do dente, produzindo uma aparência viva⁷⁹. No dente manchado, a absorção também depende do grau de concentração do cromógeno, como podemos perceber nos resultados, onde a alteração de fluorescência se mostrou presente em todas as amostras em diferentes graus, de acordo com o tipo de tratamento a que foram submetidos^{80; 81}.

A cor observada do dente é resultado da combinação de luz refletida da superfície do esmalte e luz difundida e refletida na interface do esmalte e dentina. O grau de absorção é determinado pelos comprimentos de percurso da luz incidente no dente e pelo coeficiente de absorção do dente⁸².

Esta propriedade óptica depende tanto da duração do tempo em que o dente foi exposto a um iluminante UV quanto, subsequentemente, da reemissão do comprimento de onda do dente. Portanto, quanto mais luz UV absorvida pelo dente, maior a reemissão de fluorescência^{79; 82}.

A fluorescência dos dentes naturais exibe uma cor branco-azulada e é mais bem descrita como um fenômeno de fotoluminescência imediata e concomitante⁸⁰. No entanto, como a fluorescência do dente depende do tempo de exposição à fonte de UV, a excitação diminui após a remoção da fonte de luz estimulante. Parte da luz incidente é absorvida pelas proteínas pigmentadas e outras manchas coloridas no dente. Como a luz é absorvida por esses tipos de

cromogênios no dente, a concentração de cromógeno na superfície dental é um fator importante na determinação do grau de absorção no dente⁸². Dessa maneira o café apresentou-se como o agente de manchamento com os maiores valores de alteração de fluorescência, seguido pelo chá preto, para as diferentes soluções de tratamento utilizadas.

Os tecidos do esmalte e da dentina, devido as suas características fisiológicas e anatômicas, produzem graus variados de fluorescência e interação com a luz^{39; 80}. Sendo, dessa forma, afetados de maneiras diferentes pelas substâncias com as quais eventualmente entrem em contato ou com estímulos internos ou externos ao organismo que possam produzir alguma alteração de cor dental³⁹. Tais alterações podem estar diretamente ligadas à composição química das substâncias que entram em contato com as estruturas dentárias e sua interação a nível molecular com os tecidos dentais, promovendo manchamento com os mais variados graus de intensidade e dificuldade de remoção.

Diante dessas interações moleculares dos tecidos dentais com substâncias potencialmente manchadoras presentes na dieta, o PHS surgiu como um componente promissor, com potencial para inclusão em produtos de higiene oral graças as suas propriedades antifílicas. Onde esperávamos uma alta avidéz na interação do PHS com o esmalte dental, que ocorreu, porém em menores proporções²³.

O caráter protetor do PHS mostrou-se presente e atuante quando em contato com a superfície do esmalte, porém, sua interação com a película adquirida não foi completamente elucidada nesse estudo, sendo necessários novos estudos para esclarecer essa relação e o comportamento dessas substâncias sobre o esmalte dental.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados no estudo, foi possível concluir que:

- 1) O PHS foi capaz de proteger o esmalte dental do manchamento ocorrido pela fumaça do cigarro, em relação aos outros agentes de tratamento.
- 2) Quando associado à Película adquirida, esta proteção do PHS em relação ao cigarro foi menor que a solução utilizada isoladamente.
- 3) O PHS não foi capaz de proteger o esmalte dental do manchamento por café e chá preto.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

- 1 CALDEIRA, Tania Coelho Rocha. Tratamento preventivo do esmalte desmineralizado: estudo in vitro. 2014. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- 2 MELO, Loyane Franio Batista de. Avaliação do efeito remineralizador da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo-cpp-acp nas lesões iniciais de cárie em dentes decíduos e permanentes; estudo "in vivo". 2012.
- 3 LEE, Sean S.; ZHANG, W. U.; LI, Yiming. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices: results of an in vitro diffusion method study. **The Journal of the American Dental Association**, v. 135, n. 8, p. 1133-1141, 2004.
- 4 DOS REIS, Patrícia Queiroz Rocha et al. Avaliação in vitro do efeito de um dentifício à base de nanohidroxiapatita na rugosidade de superfície do esmalte dental bovino. Efeito de um dentifício contendo nanohidroxiapatita na rugosidade do esmalte dental. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, n. 2, p. 133, 2017.
- 5 CAMARGO, I. M. C. et al. Abrasiveness evaluation of silica and calcium carbonate used in the production of dentifrices. **Journal of cosmetic science**, v. 52, n. 3, p. 163-168, 2001.
- 6 WATTS, Am; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: tooth discolouration and staining: a review of the literature. **British dental journal**, v. 190, n. 6, p. 309, 2001.
- 7 TÊO, Tatiana Baú et al. Avaliação, após clareamento, da alteração de cor de dentes bovinos imersos em soluções com elevado potencial de pigmentação. **RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 7, n. 4, p. 401-405, 2010.
- 8 FESTUCCIA, Marília Salomão Campos Cabrini et al. Color stability, surface roughness and microhardness of composites submitted to mouthrinsing action. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 2, p. 200-205, 2012.
- 9 KARADAS, Muhammet; SEVEN, Nilgun. The effect of different drinks on tooth color after home bleaching. **European journal of dentistry**, v. 8, n. 2, p. 249, 2014.

- 10 ALANDIA-ROMAN, C. C. et al. Effect of cigarette smoke on color stability and surface roughness of dental composites. **Journal of dentistry**, v. 41, p. e73-e79, 2013.
- 11 TAKEUCHI, Cristina Yoshie Garcia. Avaliação do efeito da fumaça do cigarro na translucidez da resina composta: influência do selante da superfície e da escovação. 2004.
- 12 http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/cardiovascular_harms_tobacco_use/en/
- 13 FURUSE, Adilson Y. et al. Colour-stability and gloss-retention of silorane and dimethacrylate composites with accelerated aging. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 11, p. 945-952, 2008.
- 14 ZIMMERLI, B. et al. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. **Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin= Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie= Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia**, v. 120, n. 11, p. 972-986, 2010.
- 15 KELLEHER, M.; BISHOP, K. Tooth surface loss: Tooth surface loss: an overview. **British Dental Journal**, v. 186, n. 2, p. 61, 1999.
- 16 NUNES, Maria Cristina Pereira et al. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais Contribution of dental biofilm study to the treatment of periodontal diseases. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 25, n. 1, p. 55-61, 2007.
- 17 PEREIRA, Andreia G.; NEVES, Ana M.; TRINDADE, António C. Imunologia da cárie dentária. **Acta Med Port**, v. 23, n. 4, p. 663-668, 2010.
- 18 ALMEIDA, Paulo Fernando de et al. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 33-41, 2002.
- 19 SILVA, ACB et al. Detecção de estreptococos orais em biofilme dental de crianças cárie-ativas e livres de cárie. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 648-651, 2008.
- 20 GARCÍA-GODOY, Franklin; HICKS, M. John. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and

- remineralization. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 25S-34S, 2008.
- 21 PEDRAZZI, Vinícius et al. Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. **Periodontia, Rio de Janeiro**, v. 19, n. 3, p. 26-33, 2009.
 - 22 NUNN, June Heather. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. **European journal of oral sciences**, v. 104, n. 2, p. 156-161, 1996.
 - 23 VALENTIJN-BENZ, Marianne et al. Sphingoid bases inhibit acid-induced demineralization of hydroxyapatite. **Caries research**, v. 49, n. 1, p. 9-17, 2015.
 - 24 MANGUEIRA, Dayane Franco Barros et al. Erosão dentária: etiologia, diagnóstico, prevalência e medidas preventivas. **Arquivos em Odontologia**, v. 45, n. 4, 2009.
 - 25 SAURO, Salvatore et al. Di-calcium phosphate and phytosphingosine as an innovative acid-resistant treatment to occlude dentine tubules. **Caries research**, v. 50, n. 3, p. 303-309, 2016.
 - 26 ALMEIDA, Gabrielle Jacintho Fogaça et al. Indicações de odontopediatras quanto ao uso de flúor tópico por crianças entre zero e seis anos de idade: dados para a elaboração de um protocolo de ações. **Rev. Salusvita (Impr.)**, v. 26, n. 3, p. 105-124, 2007.
 - 27 ARAÚJO, Diana Ferreira Gadêlha de. **Comparação de diferentes pré-tratamentos de superfície na remineralização de esmalte com flúor em tratamento de lesões com mancha branca e sua resistência após desafio ácido**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
 - 28 KIM, Byung-Hak et al. Phytosphingosine Derivatives Ameliorate Skin Inflammation by Inhibiting NF- κ B and JAK/STAT Signaling in Keratinocytes and Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 1023-1032, 2014.
 - 29 CUKKEMANE, Nivedita et al. Anti-adherence and bactericidal activity of sphingolipids against *S treptococcus mutans*. **European journal of oral sciences**, v. 123, n. 4, p. 221-227, 2015.

- 30 VEERMAN, Enno CI et al. Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 2, p. 447-452, 2004.
- 31 VEERMAN, Enno CI et al. Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 18831-18841, 2007.
- 32 VEERMAN, Enno CI et al. Phytosphingosine kills *Candida albicans* by disrupting its cell membrane. **Biological chemistry**, v. 391, n. 1, p. 65-71, 2010.
- 33 FISCHER, Carol L. et al. Oral mucosal lipids are antibacterial against *Porphyromonas gingivalis*, induce ultrastructural damage, and alter bacterial lipid and protein compositions. **International journal of oral science**, v. 5, n. 3, p. 130, 2013.
- 34 BIKKER, Floris J. et al. Phytosphingosine prevents the formation of young salivary biofilms in vitro. **Caries research**, v. 52, n. 1-2, p. 7-13, 2018.
- 35 YÖNEL, Nermin et al. Anti-erosive effects of fluoride and phytosphingosine: an in vitro study. **European journal of oral sciences**, v. 124, n. 4, p. 396-402, 2016.
- 36 HALL, Andrew; GIRKIN, J. M. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 1_suppl, p. 89-94, 2004.
- 37 KARASAWA, Lilian Harumi et al. Influência da formação de película adquirida e aplicação tópica de flúor na microdureza do esmalte tratado com peróxido de hidrogênio 35%. **Brazilian Dental Science**, v. 13, n. 1/2, p. 10-15, 2010.
- 38 PARAVINA, Rade D. et al. Color difference thresholds in dentistry. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 27, p. S1-S9, 2015.
- 39 BAZZI, Juliana Zavala et al. The effect of at-home bleaching and toothbrushing on removal of coffee and cigarette smoke stains and color stability of enamel. **The Journal of the American Dental Association**, v. 143, n. 5, p. e1-e7, 2012.
- 40 OMATA, Yo et al. Staining of hybrid composites with coffee, oolong tea, or red wine. **Dental materials journal**, v. 25, n. 1, p. 125-131, 2006.

- 41 CÔRTEZ, Gabriel et al. Influence of coffee and red wine on tooth color during and after bleaching. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 6, p. 1475-1480, 2013.
- 42 DE GEUS, J. L. et al. One-year follow-up of at-home bleaching in smokers before and after dental prophylaxis. **Journal of dentistry**, v. 43, n. 11, p. 1346-1351, 2015.
- 43 AZEVEDO, Juliana Felippi David et al. **Avaliação do desgaste e da rugosidade superficial do esmalte bovino submetido ao clareamento e escovação simulada**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- 44 ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W. G. Microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries research**, v. 13, n. 5, p. 290-297, 1979.
- 45 ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W. G. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries research**, v. 14, n. 4, p. 190-195, 1980.
- 46 WATTS, Am; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: tooth discolouration and staining: a review of the literature. **British dental journal**, v. 190, n. 6, p. 309, 2001.
- 47 ADDY, M.; MORAN, J. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine. II. Clinical staining produced by chlorhexidine, iron and tea. **British dental journal**, v. 159, n. 10, p. 331, 1985.
- 48 HANNIG, M. et al. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization—an in situ pilot study. **Clinical oral investigations**, v. 7, n. 3, p. 158-161, 2003.
- 49 HANNIG, Christian; HANNIG, Matthias; ATTIN, Thomas. Enzymes in the acquired enamel pellicle. **European journal of oral sciences**, v. 113, n. 1, p. 2-13, 2005.
- 50 ALMEIDA, Paulo Fernando de et al. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. 2002.
- 51 VAN NIEUW AMERONGEN, Arie; BOLSCHER, Jan GM; VEERMAN, Enno CI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 2004.
- 52 SCHENKELS, Léon CPM; VEERMAN, Enno CI; NIEUW AMERONGEN, Arie V. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical reviews in oral biology & medicine**, v. 6, n. 2, p. 161-175, 1995.

- 53 AMERONGEN, AV Nieuw; VEERMAN, E. C. I. Saliva—the defender of the oral cavity. **Oral diseases**, v. 8, n. 1, p. 12-22, 2002.
- 54 POUTON, Colin W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 278-287, 2006.
- 55 SANTANA, Márcia Cristina Araújo et al. Lipídeos: classificação e principais funções fisiológicas. **REDVET. Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 18, n. 8, p. 1-14, 2017.
- 56 VESPER, Hubert et al. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1239-1250, 1999.
- 57 SCHORSCH, Christoph; BOLES, Eckhard; SCHAFFER, Steffen. Biotechnological production of sphingoid bases and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4301-4308, 2013.
- 58 MOTTA, Stefania et al. Ceramide composition of the psoriatic scale. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1182, n. 2, p. 147-151, 1993.
- 59 ERTAS, Ertan et al. Color stability of resin composites after immersion in different drinks. **Dental materials journal**, v. 25, n. 2, p. 371-376, 2006.
- 60 SAMRA, Adriana Postiglione Bühner et al. Color stability evaluation of aesthetic restorative materials. **Brazilian oral research**, v. 22, n. 3, p. 205-210, 2008.
- 61 DO NASCIMENTO, Evandro Afonso et al. Composição química do café conillon em diferentes graus de torração. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 17-21, 2008.
- 62 NATHOO, Salim A. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. **The Journal of the American Dental Association**, v. 128, p. 6S-10S, 1997.
- 63 GASPAR, Jose Antonio. " AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CORANTES ESPECIAIS E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO IRRADIADOS POR LASER DE ARGÔNIO E LASER DE DIODO NO CLAREAMENTO DENTAL IN VITRO. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2003.

- 64 VERZA, Simone Gasparin et al. Evaluation of analytical variables of the Folin-Ciocalteu method for the quantitation of the total tannins content using a *Psidium guajava* L. leaves aqueous extract as a model. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.
- 65 DE ALMEIDA, T. D.; MAI, B. F.; PUGET, F. P. Extração de tanino da casca do café. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 15268-15274, 2015.
- 66 JOINER, Andrew et al. Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. **European journal of oral sciences**, v. 111, n. 5, p. 417-422, 2003.
- 67 PRIYA, B. Meena et al. Efficacy of chlorhexidine and green tea mouthwashes in the management of dental plaque-induced gingivitis: A comparative clinical study. **Contemporary clinical dentistry**, v. 6, n. 4, p. 505, 2015.
- 68 PEREIRA, Ailton Vicente et al. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto-*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 31, n. 2, p. 119-124, 2009.
- 69 NHACUTONE, Elídio Alfredo. **Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto-camellia sinensis (L)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Eduardo Mondlane.
- 70 WASILEWSKI, M. de S. et al. Effect of cigarette smoke and whiskey on the color stability of dental composites. **Am J Dent**, v. 23, n. 1, p. 4-8, 2010.
- 71 MATHIAS, Paula et al. Cigarette smoke combined with staining beverages decreases luminosity and increases pigmentation in composite resin restorations. **Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)**, v. 32, n. 2, p. 66-70, 2011.
- 72 HOFFMANN, Dietrich; HOFFMANN, Ilse; EL-BAYOUMY, Karam. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 7, p. 767-790, 2001.
- 73 DALRYMPLE, Annette et al. Assessment of enamel discoloration in vitro following exposure to cigarette smoke and emissions from novel vapor and tobacco heating products. **American journal of dentistry**, v. 31, n. 5, p. 227-233, 2018.

- 74 E SILVA, Júnio S. Almeida. **Influência da contaminação pela fumaça do cigarro na força de união entre dentina e compósito**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
- 75 ALVES, Venise Bouvier. A influência da densidade do filtro de cigarros nos teores da fumaça. 2016.
- 76 MARTINS, Susana Daniela da Silva et al. Caracterização de fumo inalável de cigarro quanto a alguns compostos orgânicos voláteis e muito voláteis. 2008.
- 77 ALMEIDA, Adriano Gondim et al. Influência da contaminação pela fumaça do cigarro na resistência de união entre dentina e resina composta utilizando-se dois sistemas adesivos: um estudo in situ. 2012.
- 78 REIS, RODRIGO SANT'ANNA AGUIAR DOS et al. Evaluation of fluorescence of dental composites using contrast ratios to adjacent tooth structure: a pilot study. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 19, n. 4, p. 199-206, 2007.
- 79 RECHMANN, Peter et al. Performance of laser fluorescence devices and visual examination for the detection of occlusal caries in permanent molars. **Journal of biomedical optics**, v. 17, n. 3, p. 036006, 2012.
- 80 CRISTINA BRAINER DE OLIVEIRA MOTA, Cláudia. **Aplicação clínica da tomografia por coerência óptica na avaliação da integridade de restaurações estéticas**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- 81 LEE, Yong-Keun. Fluorescence properties of human teeth and dental calculus for clinical applications. **Journal of biomedical optics**, v. 20, n. 4, p. 040901, 2015.
- 82 KWON, Y. H. et al. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 5, p. 473-477, 2002.