

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**DIFUSÃO DO ÁCIDO CÍTRICO E DO SEU EFEITO EROSIVO NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Isabella Cavalcante Medeiros

SAPIENTIA AEDIFICAT

2015

ISABELLA CAVALCANTE MEDEIROS

**DIFUSÃO DO ÁCIDO CÍTRICO E DO SEU EFEITO EROSIVO NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr^a. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

João Pessoa

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BIBLIOTECÁRIO:

M488d Medeiros, Isabella Cavalcante.

Difusão do ácido cítrico e do seu efeito erosivo na desmineralização do
esmalte dentário / Isabella Cavalcante Medeiros.- João Pessoa, 2015.

63f. : il.

Orientadora: Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo Coorientador:
Frederico Barbosa de Sousa Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Odontologia. 2. Erosão dentária. 3. Testes de dureza.
4. Absorção atômica. 5. Microscopia de polarização.
6. Espectrofotometria.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

ISABELLA CAVALCANTE MEDEIROS

**DIFUSÃO DO ÁCIDO CÍTRICO E DO SEU EFEITO EROSIVO NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

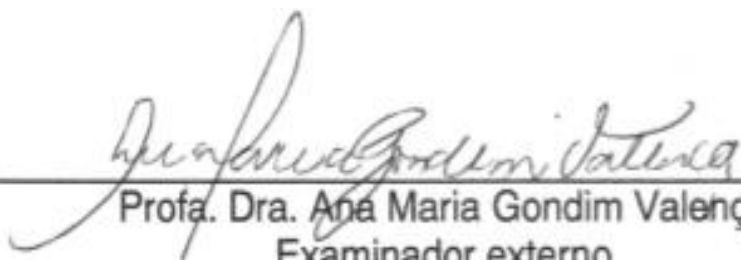
Banca Examinadora



Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo
Orientadora



Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos
Examinador - UFPB



Profa. Dra. Ana Maria Gondim Valença
Examinador externo

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Luis e Fátima, por tudo o que representam na minha vida! Vocês que são exemplos de amor, honestidade, alegria e perseverança.

Toda conquista em minha vida será sempre dedicada a vocês!

À minha querida irmã, Clarissa, a melhor amiga que eu poderia ter. Por meio do seu cuidado comigo, me faz sentir que nunca estarei sozinha nessa caminhada.

Não há uma conquista sequer que eu não queria compartilhar com você!

A todos os meus familiares, que sempre torceram para que meus sonhos pudessem se tornar realidade. Em especial a minha querida avó France, por todo o carinho, à vovó Zirene (*in memoriam*) e à titia Zenaide (*in memoriam*), que mesmo não estando entre nós, consigo vê-las, em minha mente, com os seus sorrisos cheios de orgulho e felicidade!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me protege e cuida da minha vida com tanto Amor, agradeço por essa conquista e peço que me conserve sempre atenta, para que eu possa utilizar tudo o que me é concedido para fazer o bem.

Aos meus amados pais, Luis e Fatima, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Todas as formas de agradecimentos são insuficientes para vocês!

À minha irmã, Clarissa, que sempre me apoia com tanto amor. Agradeço a Deus por você existir na minha vida.

Ao meu noivo, Leonardo, pelas palavras de incentivo e entusiasmo, paciência, companheirismo e, principalmente, Amor!

Aos meus amados avós, tios, primos e amigos, que apesar das distâncias, sempre compartilharam dos momentos mais importantes da minha vida.

A minha querida orientadora, profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo, por sua experiência e pelas orientações nas minhas primeiras atividades científicas. Por todo apoio, dedicação, conhecimento e atenção no desenvolvimento desse trabalho, bem como pelo bom humor e disponibilidade na hora de atender às minhas dúvidas, transmitindo sempre tranquilidade e pensamentos positivos, mas também pela seriedade, dedicação e empenho nos momentos necessários. Minha eterna admiração e amizade!

Ao prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa, estimado coorientador, pela disposição em ajudar e pelos conhecimentos disponibilizados para a conclusão dessa pesquisa.

Ao prof. Dr. Osmundo Pessoa Neto, por toda a contribuição no desenvolvimento desse trabalho materializado no auxílio quanto às análises laboratoriais.

A técnica do LABIO e MSc. Rebeca Tibau Aguiar, por todo o apoio durante o desenvolvimento da pesquisa e também por sua amizade.

A todos os mestres que passaram pela minha vida estudantil, a quem admiro pela reconhecida importância na minha formação intelectual, desde os tempos de infância, na Escola Virgem de Lourdes – Lourdinhas, bem como na fase da

adolescência, no Colégio Imaculada Conceição – Damas. Durante o meu curso de graduação na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, e por fim no Mestrado em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

A todos os amigos que a Odontologia me presenteou, especialmente Gêisa, Mirella e Izabelle, também a todos o meus colegas do Mestrado pela alegre convivência e pela disposição em sempre ajudar!

A todos os funcionários da Universidade Federal da Paraíba, em especial Dona Rita e Senhor Dedé por todo auxílio durante a execução da minha pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para que hoje eu pudesse realizar o meu tão estimado sonho, pois sem vocês essa jornada não teria sido tão prazerosa.

Muito obrigada!

EPIÍGRAFE

“Feliz o homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento, porque a sabedoria vale mais do que a prata, e dá mais lucro do que o ouro. Ela é mais valiosa do que as pérolas e não existe objeto mais preciso que se iguale a ela. Na mão direita ela tem vida longa, e na sua esquerda, riqueza e honra.”

Provérbios 3, 13-16.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar a difusão do ácido cítrico (0,1M - pH 2,27) na estrutura do esmalte e o seu potencial em desmineralizar o esmalte e a dentina por meio da análise de microdureza Vickers (VHN) e pela liberação imediata e tardia dos íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}). Trinta terceiros molares hígidos e não-erupcionados foram utilizados para a confecção das amostras. As amostras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos (n=10) para as seguintes análises: Microscopia de luz polarizada (MLP); Espectroscopia de absorção atômica e espectrofotometria para avaliar a liberação tardia e imediata de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} , respectivamente; e VHN superficial do esmalte e em profundidade do esmalte e dentina. Para análise em MLP, as amostras foram preparadas até a espessura de 100 μm , o agente erosivo foi aplicado, a partir da superfície de esmalte e registros fotográficos para acompanhar, durante 5 h, a difusão do ácido cítrico no esmalte foram realizados por meio do *single Polscope* em MPL. Para a análise em VHN, blocos de esmalte (4 x 4 mm) foram preparados e divididos (2 x 4 mm) em grupo experimental e controle (sem desafio). A área do grupo controle foi isolada com esmalte de unha. As amostras foram submetidas ao desafio erosivo durante 10 min. As medidas de VHN de superfície do esmalte foi realizada antes e após o desafio. Em seguida, as amostras foram seccionadas na interface controle e experimental para a análise de VHN em profundidade no esmalte e dentina em ambos os grupos (controle e experimental). As medidas de VHN ao longo do esmalte foram realizadas de 40 μm a 1000 μm . Para a dentina as medidas foram realizadas nas profundidades de 0 μm a 360 μm da junção amelodentinária (JAD). Para a quantificação dos íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} na solução erosiva, tanto na análise imediata como tardia, foi realizada a leitura em 5 mL da solução para cada íon. Para a análise da liberação tardia dos íons, após o desafio erosivo, as amostras foram imersas em 10 mL de água deionizada (pH 6,5), durante 48 h, para posterior análise de liberação de íons. Os dados foram analisados pelo teste T e Wilcoxon, $\alpha=0,05$. Os valores de VHN do esmalte de superfície e em todas as profundidades analisadas reduziram após o desafio erosivo. Para a dentina também houve redução nos valores de VHN até a profundidade de 120 μm da JAD. Houve maior liberação de íons Ca^{+2} imediatamente após o desafio erosivo quando comparado ao grupo controle, porém não houve diferença para a análise de liberação tardia. Contrariamente, houve maior liberação de íons PO_4^{-3} na análise tardia e não houve diferença com o controle na análise de liberação imediata. A análise de MLP mostrou diferença no retardo de fase do esmalte dentário após desafio erosivo, ocorrendo a difusão do agente erosivo em toda a profundidade do esmalte. Concluiu-se que o ácido cítrico possuiu contínua difusão a partir da superfície do esmalte chegando na JAD, e causou desmineralização até 120 μm na dentina.

Palavras-chave: Erosão dentária, testes de dureza, absorção atômica, microscopia de polarização, espectrofotometria.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the diffusion of citric acid (0.1 M - pH 2.27) in enamel structure and its potential to demineralize enamel and dentin by Vickers Microhardness (VHN) and immediate and later release of calcium ions (Ca^{+2}) and phosphate (PO_4^{-3}). Thirty third sound and non-erupted molars were used. The samples were divided randomly into 3 groups ($n = 10$) for the following analysis: Polarized light microscopy (MLP); Atomic absorption spectroscopy and spectrophotometry to assess the immediate and later release of Ca^{+2} and PO_4^{-3} ions, respectively; and VHN of surface and deep into the enamel and dentin. For MLP analysis, the samples were prepared to a thickness of 100 μm , the erosive agent was applied from the enamel surface and photographic records were performed for 5 h during the diffusion of citric acid in the enamel by MPL using the *single PolScope*. For VHN, enamel blocks ($4 \times 4 \text{ mm}$) were prepared and divided ($2 \times 4 \text{ mm}$) into experimental and control groups. The area of control group was isolate with nail varnish. The samples were subjected to erosive challenge for 10 min. The superficial VHN was made before and after the erosive challenge. Then, the samples were sectioned at the interface between control and experimental groups for deep VHN analysis. VHN analysis through enamel were measured to 40 μm until 1000 μm of depth. For dentin the measurements were carried out between 00 μm to 360 μm of dentinoenamel junction (DEJ). For the quantification of Ca^{+2} and PO_4^{-3} ions in the erosive solution (for immediate and later analysis), 5 mL of the solution was used for each ion analysis. For the later release analysis, the samples were immersed in 10 mL of deionized water (pH 6.5) during 48 h for analysis. Data were analyzed by t test and Wilcoxon, $\alpha = 0.05$. The VHN of surface and deep analysis of enamel showed reduction of VHN values after the erosive challenge. For dentin, there also was reduction of VHN values until 120 μm of DEJ. There was higher release of Ca^{+2} ions immediately after the erosive challenge when compared to the control group, but there was no difference for later release analysis. In contrast, there was increased release of PO_4^{-3} ions in the later analysis, and no difference with the control in the analysis of immediate release. The MLP analysis revealed a difference in the phase delay of dental enamel after erosive challenge, thus, the erosive diffusion occurred throughout the depth of enamel. It was concluded that the citric acid had continuous diffusion through enamel structure until DEJ and caused demineralization in dentin until 120 μm .

Keywords: Dental erosion, hardness tests, atomic absorption, polarization microscopy, spectrophotometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VHN	Microdureza Vickers
MLP	Microscopia de Luz Polarizada
JAD	Junção amelodentinária
pK_a	Constante de dissociação
Ca⁺²	Íons Cálcio
PO₄⁻³	Íons Fosfato
H⁺	Íons Hidrogênio
OH⁻	Hidroxila

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Revisão da Literatura	4
2.1 Etiologia da erosão dentária	4
2.2 Ácido cítrico e erosão dentária	6
2.3 Esmalte dentário e difusão dos líquidos em seu interior	7
2.4 Teste de microdureza e erosão dentária	10
2.5 Espectrometria utilizada para análise do Cálcio e Fosfato	11
3 Proposição	14
3.1 Objetivos específicos	14
4 Materiais e métodos	15
4.1 Questões éticas	15
4.2 Local de realização do estudo	15
4.3 Desenho estudo	15
4.4 Cálculo amostral	15
4.5 Amostra	17
4.6 Desafio erosivo e microdureza Vickers do esmalte e dentina	17
4.7 Microscopia de luz polarizada	21
4.8 Liberação imediata e tardia de íons Cálcio e Fosfato da estrutura dentária na solução erosiva	25
4.9 Análise dos dados	29
5 Resultados	30
6 Discussão	35
7 Conclusão	41
Referências	42
Anexo 1. Certidão de aprovação pelo CEP	48
Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido	49
Apêndice B. Termo de doação de dentes	51

1. INTRODUÇÃO

A erosão dentária é uma lesão que se desenvolve a partir de um processo químico de dissolução ácida, sem envolvimento bacteriano, resultando na desmineralização da estrutura dentária (LUSSI, 2006). Os fatores etiológicos da erosão dental são intrínsecos (ácido do estômago que chega a cavidade bucal por problemas gastroesofágicos) e/ou extrínsecos (exposição ácida pela dieta), sendo estes os fatores mais prevalentes (LUSSI, 2006; LUSSI, JAEGGI, 2006). Os alimentos, principalmente as bebidas ácidas, são os agentes que mais possuem relação com a ocorrência da erosão dentária atualmente, em decorrência do contato frequente destes com as estruturas dentárias pelos hábitos alimentares modernos da população (SCHLUETER, TVEIT, 2014).

Dentre os ácidos de origem extrínseca, o ácido cítrico é muito utilizado em pesquisas *in vitro* de erosão dentária por estar presente na composição de muitas bebidas, como sucos e refrigerantes (CARVALHO, LUSSI, 2015; AZADISCHOSSIG, BECKER, ATTIN, 2015). O potencial erosivo do ácido cítrico é relacionado à sua capacidade de liberar íons hidrogênio (H^+) e a sua ação quelante. O ácido cítrico libera até três íons H^+ , a partir de cada molécula, pela sua dissociação em água. Os íons H^+ são capazes de atacar diretamente os íons carbonato e/ou fosfato (PO_4^{-3}) da estrutura dentária, causando desmineralização. Conforme o pH aumenta e o meio torna-se básico, o citrato se liga ao íon cálcio (Ca^{+2}) enfraquecendo o conteúdo mineral da estrutura dentária, o que é chamado de ação quelante (LUSSI et al, 2006; FEATHERSTONE, LUSSI, 2006).

No estágio inicial da erosão dentária, os ácidos possuem a capacidade de se difundir para o interior da estrutura dentária e eliminar os íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} , o que resulta em um “amolecimento” da camada subsuperficial. Esta camada varia de acordo com o tempo de imersão e tipo de ácido, com espessura entre 0,2 e 3 μm (LUSSI et al., 2011). Caso a lesão de erosão não seja interrompida, a dissolução dos cristais do esmalte pode ocorrer camada por camada acarretando em uma perda permanente de volume com uma camada amolecida na superfície, podendo até expor a dentina (WANG, LUSSI, 2010; LUSSI et al., 2011).

Todavia, o mecanismo da difusão de ácidos erosivos para o interior do esmalte e a extensão desta difusão na dissolução do mesmo tem sido pouco investigado. De acordo com Gray (1962), os ácidos na forma não dissociada

possuem a capacidade de se difundir de modo mais rápido por meio dos poros do esmalte contribuindo para a dissolução dos tecidos mineralizados. Atkinson (1947) relatou um processo osmótico no esmalte dentário, com deslocamento de água da superfície para o interior do dente, o que foi eliminado após remoção da matéria orgânica. Além disso, o volume mineral diminui da superfície do esmalte para a junção amelodentinária (JAD), enquanto que os volumes orgânicos e de água aumentam, apontando para a existência de um contínuo deslocamento de água da superfície do esmalte para a dentina (SETALLY et al., 2014). O teor de água na estrutura do esmalte permite também que ocorra a difusão de substâncias ácidas e outros componentes minerais, como Ca^{+2} e PO_4^{-3} , para fora do dente durante o desenvolvimento das lesões de erosão dentária (FEATHERSTONE et al., 1983).

Considerando que as moléculas que desmineralizam o esmalte no processo de erosão são pequenas o suficiente para serem transportadas por esse processo osmótico, existe a possibilidade dos agentes erosivos se deslocarem para o interior da estrutura dentária e causarem uma desmineralização em pontos distantes da superfície do esmalte. A difusão dos agentes pode ocorrer nas bainhas dos prismas (SETALLY et al., 2014), assim o transporte ácido dos agentes erosivos ocorre através do esmalte interno, e possivelmente chega até a dentina externa. Entretanto, este mecanismo de difusão de agentes erosivos no esmalte, bem como a extensão desta difusão na dissolução e desmineralização do esmalte e/ou da dentina ainda não foram investigados.

Concomitantemente à difusão do agente erosivo na estrutura dentária, ocorre a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e desmineralização dos tecidos dentários (BARBOUR et al, 2013; SHELLIS, FEATHERSTONE, LUSSI, 2014).

A avaliação da quantidade de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} dissolvidos dos cristais de hidroxiapatita pode ser realizada por eletrodos de íon específico, métodos colorimétricos e espectroscopia de absorção atômica (ATTIN, WEGEHAUPT, 2014). A espectroscopia de absorção atômica é um método eficaz e tem sido bastante utilizada em estudos de erosão para quantificar, principalmente, os íons Ca^{+2} dissolvidos. A quantidade de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} liberados da estrutura dentária foi principalmente avaliada em estudos de prevenção e tratamento da erosão com componentes fluoretados (HJORTSJÖ et al, 2010; ATTIN, WEGEHAUPT, 2014). Porém, a literatura é escassa com relação a quantificação

destes íons dissolvidos da estrutura dentária que podem ser liberados posteriormente ao desafio erosivo. Este fato auxiliaria no entendimento da extensão do processo de difusão de ácidos no interior do esmalte para a dentina.

A desmineralização do esmalte e dentina por agentes erosivos é bastante investigada na literatura pelos métodos de microdureza, microradiografia, perfilometria de superfície (ATTIN, WEGEHAUPT, 2014). Os estudos de desmineralização por agentes erosivos mostraram que ocorre redução de dureza na superfície do esmalte após o desafio erosivo (SCARAMUCCI et al., 2011; CARVALHO, LUSSI, 2015). Assim, a avaliação da dureza em profundidade na extensão do esmalte em direção a JAD também se torna um dado importante para entender a difusão de agentes erosivos na estrutura dentária.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a difusão do ácido cítrico na estrutura dentária, a liberação imediata e tardia de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} após sua aplicação e o seu efeito na desmineralização do esmalte dentário e da dentina externa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia da Erosão Dentária

A erosão dentária é uma lesão caracterizada por causar a perda de substância mineralizada do dente, por meio de um processo químico, na ausência de bactérias. A lesão resulta de um processo crônico e assintomático proveniente da ação de ácidos, que podem ser de origem intrínseca ou extrínseca (LUSSI et al., 2006).

Os ácidos de origem intrínseca são produzidos pelo próprio organismo do indivíduo e entram em contato com o elemento dentário por meio de episódios de regurgitação e vômitos, frequentes em pacientes acometidos por alterações gastroesofágicas (LUSSI, 2014). O ácido clorídrico, oriundo do estômago e produzido por células parietais desse órgão, é responsável por causar este tipo de lesão de erosão dentária. Esse ácido se desloca através do esôfago e alcança a cavidade oral, promovendo a desmineralização da superfície dos dentes de forma mais grave do que outros ácidos devido ao seu pH muito baixo. Algumas alterações ou condições de saúde são responsáveis por promover o deslocamento do ácido clorídrico para o interior da cavidade oral incluindo a ruminação, o alcoolismo crônico e vômitos resultantes da gravidez ou por distúrbios alimentares, como a bulimia e anorexia (MOAZZEZ, BARTLETT, 2014). Segundo Dent et al. (2005), essas condições estão associadas a uma doença muito comum que acomete entre 10 – 20% da população, sendo conhecida como doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE) e responsável por provocar o movimento retrógrado do conteúdo estomacal passando pelo esfíncter esofágico inferior (MOAZZEZ, BARTLETT, 2014).

Por sua vez, os ácidos de origem extrínseca contatam a superfície dental devido aos hábitos que o indivíduo possui, isto é, o tipo de dieta, o uso de determinados medicamentos, o ambiente de trabalho (indústrias com produtos que liberem vapores, águas de piscinas) (CORRÊA et al, 2011). Assim, a etiologia da erosão dentária sofre influência de fatores biológicos, químicos e individuais (LUSSI et al., 2006) possuindo etiologia multifatorial (LUSSI et al., 2011; FUNG, BREARLEY, 2013) diretamente relacionado com o desenvolvimento de lesões de erosão dentária é o ácido cítrico. Esse ácido é encontrado em refrigerantes,

frutas, sucos naturais e industrializados, sendo bastante utilizado nas pesquisas que avaliam a erosão dentária (SCARAMUCCI et al, 2011).

A liberação de íons H^+ , oriundos de substâncias ácidas ou da ação de ânions que se ligam ao Ca^{+2} presente nos tecidos mineralizados, atuando como uma substância quelante são capazes de promover o amolecimento da superfície do esmalte dentário (LUSSI et al., 2006; WIEGAND, KÖWING, ATTIN, 2007; CHENG et al., 2009) influenciado principalmente pelo tempo de exposição (JAGER et al., 2012) e o valor do pH do ácido (BARBOUR, LUSI, SHELLIS, 2011).

Com a progressão da erosão dentária, as camadas de cristais de esmalte sofrem dissolução contínua e progressiva, podendo ocasionar uma perda irreversível da substância mineralizada do elemento dentário e, na ausência de qualquer intervenção, compromete a estrutura da dentina subjacente (LUSSI et al., 2011).

Diferentemente das lesões cariosas que possuem “pH crítico” de 5,5 para promover a dissolução do conteúdo mineral dos dentes, as soluções ácidas envolvidas com o desenvolvimento das lesões de erosão dentária não possuem um “pH crítico”, já que as composições químicas dessas soluções são bastante variáveis (BARBOUR, LUSI, 2014).

Várias propriedades químicas das bebidas foram investigadas, de acordo com a literatura, e podem estar relacionadas com o potencial erosivo e a dissolução do esmalte dentário, como: pH, titularidade e capacidade tampão (LUSSI et al., 2012; SHELLIS et al., 2013). Além desses fatores, o tempo de exposição ao ácido (AYKUT-YETKINER et al., 2014) e a concentração dos íons cálcio, fosfato e flúor também podem influenciar no potencial erosivo das bebidas (LUSSI et al., 2011).

Segundo Larsen e Nyvad (1999), o pH é inversamente proporcional ao potencial erosivo de uma bebida, portanto quanto menor o pH maior será o potencial erosivo.

Quanto à capacidade tampão, torna-se de grande importância a sua influência sobre a duração do desafio erosivo bem como na taxa de neutralização da saliva, devido ao seu papel determinante na capacidade da solução ácida em desmineralizar os tecidos mineralizados da estrutura dentária (SHELLIS et al.,

2013). Além disso, acredita-se que um ácido fraco não dissociado pode contribuir no tamponamento no caso de uma dissolução sub-superficial (GRAY, 1962).

2.2. Ácido Cítrico e a Erosão dentária

Dentre os ácidos utilizados em trabalhos sobre erosão dentária causada por fatores extrínsecos, o ácido cítrico é um dos mais empregados em estudos *in vitro* (SCARAMUCCI et al., 2011; CARVALHO, LUSSI, 2015). Os principais fatores relacionados ao seu uso como agente erosivo devem-se ao fato de estar presente na composição de diversos refrigerantes, frutas e sucos cítricos (VORONETS, LUSSI, 2010), além da sua dupla capacidade erosiva (AZADI-SCHOSSIG, BECKER, ATTIN, 2015). A dupla capacidade erosiva é relacionada ao ácido cítrico por promover a desmineralização tanto pela dissociação de íons H^+ quanto por sua capacidade de formar complexos com íons Ca^{+2} dissolvidos a partir dos cristais de hidroxiapatita (AZADI-SCHOSSIG, BECKER, ATTIN, 2015). Esta última forma de desmineralização é chamada de ação quelante do ácido cítrico.

Segundo Shellis, Featherstone e Lussi (2014), a ação quelante do ácido cítrico está relacionada com a formação de diferentes tipos de constantes de dissociação (pK_a), isso significa que quanto menor é o valor de pK_a mais forte a ligação do ácido com os íons Ca^{+2} . Assim, as três etapas para a dissociação por ação quelante são descritas como:



As equações acima demonstram que, na ausência de dois ou até mesmo todos os íons H^+ , o ácido cítrico consegue formar uma ligação eletrostática com os íons Ca^{+2} a partir de cada grupo COO^- . Além disso, o valor de pK_a , constante de dissociação, é proporcional à concentração de íons liberados. Portanto, quanto menor o valor de pK_a mais ionizado é o ácido e, consequentemente, maior é a sua força de ligação. Assim, de acordo com as equações o $H_3Cittrato^0$ é mais forte do que o $H_2Cittrato^-$ e o $HCitrato^{2-}$, já que o seu valor de pK_a é menor do que os demais, implicando numa maior ionização da solução e, consequentemente, maior poder de desmineralização (HELLWIG, LUSSI, 2014).

Esta formação de complexos de Ca^{+2} com moléculas de citrato é considerada um fator relevante para a perda de estrutura dentária e avanço da erosão para a dentina (AZADI-SCHOSSIG, BECKER, ATTIN, 2015).

Diversas pesquisas envolvendo erosão dentária utilizaram o ácido cítrico em diferentes concentrações e com métodos variados para analisar seu potencial erosivo em desmineralizar a estrutura dentária (HJORTSJÖ et al., 2010; HEURICH et al., 2010; SCARAMUCCI et al., 2011; HJORTSJÖ et al., 2014; TENUTA et al., 2015).

Hjortsjö et al. (2010) avaliaram o efeito protetor de soluções contendo fluoreto diante de desafios erosivos utilizando ácido cítrico em tempos de 10 e 1 minuto e concentrações de 0,1M e 0,01M, respectivamente, na superfície do esmalte. Por meio da análise de absorção atômica, foi observado que o ácido cítrico desmineralizou as amostras, mas a ação protetora das soluções reduziu a desmineralização. Hjortsjö et al. (2014) avaliaram a ação de soluções ácidas de fluoreto e ácido cítrico, durante 10 minutos, no esmalte dentário. Utilizando a espectroscopia de absorção atômica a solução de ácido cítrico apresentou os maiores valores de íons Ca^{+2} após o desafio erosivo. Scaramucci et al. (2011) criaram um suco sintético e compararam o seu potencial erosivo com o do ácido cítrico e de bebidas comerciais. 40 amostras de esmalte divididas em 4 grupos (suco sintético, ácido cítrico, Minute Maid Original® e Florida Natural Original®) foram submetidas a ciclagem erosiva, durante 5 dias e 6 repetições diárias. Após análise em microdureza Knoop verificou-se que amostras embebidas em ácido cítrico apresentaram os menores valores de dureza, indicando que foi a solução com o maior potencial erosivo quando comparada as demais soluções.

Nos estudos as concentrações mais utilizadas do ácido cítrico variam entre 0,1 a 1% e o pH das soluções entre 2,4 a 3,8 na tentativa de reproduzir o pH encontrado nas bebidas ácidas (HUGHES et al., 2000).

2.3 Esmalte Dentário e difusão de líquidos em seu interior

O esmalte é a estrutura mais mineralizada do corpo humano, sua constituição é, aproximadamente, 96% de matéria inorgânica, 3% de água e 1% de matéria orgânica, além de ser considerado anisotrópico (JIA, XUAN, 2012). Os principais constituintes da matéria inorgânica do esmalte são os íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} , representados por cristais de hidroxiapatita na forma não estequiométrica

(LUSSI et al., 2011), e grupos carbonatos, capazes de substituir os grupos PO_4^{-3} e a hidroxila (OH^-). Segundo Elliot (1997), os cristais de hidroxiapatita possuem outras substâncias inorgânicas em seu conteúdo mineral, como descrito na fórmula estequiométrica



Quanto à organização microestrutural, estes cristais estão dispostos como hastes de, aproximadamente, 50 - 70 nm de largura, 20 - 25 nm de espessura e comprimento variável (NIKIFORUK, 1985), e são responsáveis por constituir a unidade estrutural do esmalte (denominada prismas de esmalte), que são separados por esmalte interprismático (HE et al., 2013). Quando localizados próximo à superfície oclusal, os prismas de esmalte encontram-se distribuídos de forma ordenada e perpendicular à superfície, por sua vez, quando se localizam próximos à JAD, os prismas possuem orientação pouco regular com trajetória sinuosa (FOX, 1980; BRALY et al., 2007). Em um corte transversal, os prismas se apresentam com o aspecto de “buraco de fechadura” e três regiões podem ser diferenciadas: a cabeça, a cauda⁴⁵ e a junção dos prismas (HE et al., 2013).

Segundo Habelitz et al. (2001), as regiões da cabeça e da cauda podem ser diferenciadas de acordo com a orientação dos cristais do prisma de esmalte, isto é, a região correspondente à cabeça possui cristais paralelos ao longo eixo dos prismas. Enquanto, os cristais da cauda são ligeiramente divergentes do eixo longitudinal dos prismas. A região da junção dos prismas, também denominada de colo, representa a interface entre a cabeça e a cauda dos prismas de esmalte.

A disposição dos cristais de esmalte ao longo dos prismas origina duas categorias de poros com diâmetros distintos. Os cristais localizados na região da cabeça do prisma suscitam na região intraprismática e formam poros de menor diâmetro, que medem entre 2 a 3 nm. Existe a região interprismática, rica em água e matriz orgânica, onde os cristais de hidroxiapatita apresentam orientações diferentes, por isso essa região é menos mineralizada. E a região que circunda os prismas de esmalte é denominada de bainha e nela encontram-se os poros de maior diâmetro, 4 a 6 nm (MORENO, ZAHRADNIK, 1973). Os microporos de maior diâmetro contidos na bainha são preenchidos por matriz orgânica e água, principalmente na região superficial do esmalte (MJÖR, FEJERSKOV, 1986; GE et al., 2004) e constituem uma via de grande relevância para o transporte de substâncias por difusão como ácidos, peróxido de hidrogênio e íons cálcio e

hidrogênio (KIDD, JOUYSTON-BECHAL, 1997; FEATHERSTONE, 1999; WEST, JOINER, 2014).

Embora se imagine que os cristais de esmalte estejam firmemente unidos uns aos outros, na realidade eles são separados por matéria orgânica e água. A matéria orgânica é representada principalmente por proteínas não colágenas, como amelogenina e enamulina, e lipídeos (TEN CATE, 2001; SIMMER, HU, 2001; FRIED et al., 2008). A água presente na região interprismática é responsável por permitir a permeabilidade do esmalte e trocas iônicas, podendo estar livre ou adsorvida na estrutura dos cristais de esmalte. Por isso, o esmalte é considerado uma membrana semipermeável constituída por poros interligados e a água pode ser transportada para o interior do tecido, a partir de gradiente osmótico, e também na direção contrária (SHELLIS, DIBDIN, 2000).

A água adsorvida pode ser categorizada de acordo com simplicidade para sua remoção em firmemente ou fracamente aderida (ELLIOT, 1997). O conteúdo de água firmemente aderida está relacionado com o conteúdo mineral presente nos poros interprismáticos, estando em maior quantidade (volume). Por sua vez, a água fracamente aderida se refere ao conteúdo orgânico, localizada no interior do poro e responsável pela permeabilidade e condutividade iônica do esmalte (SOUSA, VIANA, SANTOS-MAGALHÃES, 2009).

Atkinson (1947) relatou um processo osmótico no esmalte dentário, com deslocamento de água da superfície para o interior do dente, o que foi eliminado após remoção da matéria orgânica. Consistente com este relato, recentemente foi mostrado que a camada interna do esmalte (cerca de 0,4 mm) apresenta uma riqueza de matéria orgânica (DUSEVICH et al., 2012).

O transporte de materiais através dos poros do esmalte permite a movimentação de íons, moléculas e substâncias ácidas pelo tecido. Ainda, a difusão é o principal sistema de transporte pelo esmalte e está relacionada com as pequenas dimensões dos poros e com a pressão osmótica, direcionada para a proporção de matéria orgânica. Por isso, a difusão da água é maior ao longo das bainhas do que nos poros intraprismáticos (BERKOVITIS, HOLLAND, MOXHAM, 2002).

Entretanto, a presença de matéria orgânica no interior dos poros pode diminuir a taxa de difusão (ARWILL, MYRBERG, SOREMARK, 1969; SHELLIS, DIBDIN, 2000), já que a hidratação das proteínas pode reduzir a mobilidade da

água no interior dos poros e a carga iônica das proteínas pode interagir com os solutos. Os lipídios ainda podem contribuir com a redução da taxa de difusão por causa da sua hidrofobicidade (SHELLIS, DIBDIN, 2000).

Macena et al. (2014) avaliaram a presença dos componentes minerais e orgânicos do esmalte dentário, desde a superfície até a JAD. Para a análise do conteúdo mineral foi utilizado radiomicrografia, enquanto a análise do conteúdo orgânico foi analisado a partir da birrefringência do esmalte em água e em ar em microscópio de luz polarizada. Os autores relataram que o volume mineral diminuiu da superfície do esmalte em direção à JAD, enquanto que os volumes orgânicos e de água aumentaram nessa mesma direção.

Souza, Soares e Vianna (2013) analisaram o volume mineral e orgânico do esmalte dentário sadio e acometido por lesão cariosa e confirmaram sua hipótese de que a presença da matéria orgânica está relacionada com a taxa de difusão por meio desse tecido e com suas propriedades ópticas. Já que as amostras acometidas por lesões cariosas apresentaram o volume mineral mais baixo e maior volume orgânico e de água do que as amostras de esmalte sadio.

Por isso, é importante compreender a permeabilidade do esmalte e o mecanismo de difusão através desse tecido, uma vez que eles podem influenciar nos processos de des/remineralização dentária (ROBINSON et al., 2000).

2.4 Teste de microdureza e erosão dentária

Para avaliar a redução ou a incorporação de minerais à estrutura dental os testes de microdureza são utilizados por apresentar uma relação direta com a perda mineral (JOHANSSON et al., 2001). Esse método mecânico consegue medir o comprimento das indentações na superfície do esmalte, obtidas a partir de uma ponta de diamante com carga e tempo específicos. Entretanto, esse método não permite avaliar os desgastes dentários, a localização e a distribuição dos minerais na superfície (ZERO, 1995).

Inúmeros trabalhos utilizaram o teste de microdureza para avaliar o efeito erosivo de substâncias na superfície do esmalte dentário, encontrado redução da dureza de superfície. Magalhães et al. (2008) avaliaram o efeito desmineralizante e remineralizante de vernizes fluoretados após imersão das amostras em solução ácida desmineralizante e constataram redução nos valores de microdureza após o contato com a solução. Mistry et al. (2015) avaliaram os efeitos da erosão em

dentes diferentes (molares e pré-molares) e superfícies diferentes (lingual e vestibular), por meio da microdureza. Para o desafio erosivo foi realizada uma ciclagem com ácido cítrico 0, 3% (pH 3,2) durante 10 minutos e 5 repetições. Os autores constataram redução da dureza após o desafio erosivo para as amostras e diferenças nesses valores entre os grupos, onde os molares apresentaram valores mais baixos do que os pré-molares.

Entretanto, poucos artigos investigaram o efeito do ácido cítrico na dureza de superfície e em profundidade. Carvalho e Lussi (2015) avaliaram o efeito do ácido cítrico 1% e pH 3,6 na superfície e profundidade do esmalte utilizando dentes molares e pré-molares. Para a superfície as amostras foram submetidas a 3 desafios erosivos consecutivos (30 mL durante 1 minuto). Após cada desafio, os valores de microdureza e liberação de Ca^{+2} foram medidos. Consecutivamente, para o ensaio em profundidade as amostras foram desgastadas até a 200, 400 e 600 μm e submetidos a 3 desafios erosivos em cada profundidade. Quanto à microdureza em superfície os autores não relataram diferenças após o desafio erosivo, exceto quando os dentes eram de grupos diferentes (molares ou pré-molares). E em profundidade, para quantificar a erosão dentária foi analisada a liberação de íons Ca^{+2} e constatou-se que em camadas mais profundas o esmalte tende a liberar quantidades mais baixas de cálcio.

2.5 Espectrometria utilizada para análise do cálcio e fosfato

A espectrofotometria é uma técnica de medida utilizada para avaliar as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e/ou emitir energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético.

A determinação da concentração de uma substância por espectrofotometria é baseada na transformação química dessa substância num complexo colorido (CARMOUZE, 1994). O espectrofotômetro mede a transmitância de um feixe de luz num determinado comprimento de onda após atravessar a solução numa cubeta de quartzo ou vidro. Com a relação da transmitância e concentração da solução, por intermédio de uma série de diluições obtidas a partir de solução padrão, pode-se determinar de maneira satisfatória uma curva relacionando a concentração com a absorbância.

A espectroscopia de absorção atômica é uma técnica empregada para avaliar a perda mineral das estruturas dentárias. Consiste na análise quantitativa

e qualitativa de elementos químicos em soluções, através da absorção ou transmissão de radiação eletromagnética na forma de luz por átomos das amostras experimental (NAVARRO, 2008).

Técnicas químicas podem ser empregadas para mensurar a presença de cálcio e fosfato no esmalte erodido, através de um ácido ou desgaste mecânico, pela avaliação dos componentes de soluções em que as amostras foram imersas (AZEVEDO, 2014).

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foi introduzida em 1955 por Walsh na Austrália e por Alkemade e Milatz na Holanda. É uma técnica espectroanalítica muito utilizada em laboratórios de análises de rotina por apresentar algumas características como: simplicidade, eficácia e custo relativamente baixo. Em estudos envolvendo erosão dentária, este método é utilizado para quantificar a liberação de íons da estrutura dentária (Ca^{+2} e PO_4^{-3} , principalmente) (ATTIN, WEGEHAUPT, 2014), por causa da sua capacidade em promover o doseamento de elementos químicos existentes em soluções químicas e está embasado no fato de que os átomos dos diferentes elementos conseguem absorver energia, em comprimentos de onda característicos, e a sua absorbância, A , é proporcional à concentração atômica (Lei de Beer):

$$A = \alpha lc$$

Onde, α corresponde a absorbtividade molar, c corresponde à concentração da espécie absorvente e l a distância que a luz atravessa a amostra.

Para que ocorra o processo de atomização se faz necessário que a amostra seja convertida em um aerossol constituído de partículas finamente divididas. Assim, os processos de dessolvatação e formação da nuvem atômica que ocorrem na chama tornam-se eficientes. Dessa forma, a amostra líquida é aspirada por um nebulizador pneumático pelo fluxo rápido do oxidante, geralmente ar, próximo da extremidade do capilar por efeito Venturi. O líquido se dispersa como uma fina névoa que é direcionada em alta velocidade contra uma pérola de vidro ou anteparos, nos quais as gotículas se dispersam em partículas ainda menores. O aerossol formado, o oxidante e o combustível passam por defletores que bloqueiam as gotículas maiores do líquido. As gotículas que são introduzidas na chama evaporam e, então, o sólido resultante vaporiza e se decompõe em átomos. A FAAS é fortemente limitada, pois o processo de

nebulização é ineficiente e apenas cerca de 5 – 10 % da amostra aspirada é introduzida na chama (HARRIS, 2001). O vapor formado é constituído por uma mistura de compostos que se decompõem em átomos. Esses átomos são submetidos a uma fonte de radiação específica e podem ser quantificados.

Carvalho e Lussi (2015) avaliaram a presença de íons Ca^{+2} em solução de ácido cítrico 1% e pH 3,6 após o desafio erosivo na superfície do esmalte e também em diferentes profundidades. Esses autores observaram que a presença dos íons Ca^{+2} aumentou conforme os desafios erosivos eram realizados em distâncias maiores da superfície de esmalte, enquanto na superfície do esmalte a presença desse íon foi pouco detectada. Rirattanapong, Vongsavan, Surarit (2014) realizaram a análise química dos íons liberados em soluções, por meio da técnica de espectroscopia de absorção atômica, após submeterem dentes bovinos ao desafio erosivo com diversos refrigerantes e em água deionizada (grupo controle). Foi constatado a presença de íons Ca^{+2} em quantidades maiores nas soluções erosivas do que na solução de água deionizada, indicando que a exposição prolongada do esmalte em soluções ácidas provoca a perda de conteúdo mineral. Entretanto, a literatura é ainda escassa quanto a avaliação de íons liberados tardiamente do esmalte após desafio erosivo.

Baseado nesta revisão de literatura torna-se evidente a importância de investigar a difusão do ácido cítrico no esmalte, e seu efeito na perda mineral pela liberação imediata e tardia de íons cálcio e fosfato associada à análise de microdureza da superfície e em profundidade do esmalte dentário.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a difusão do ácido cítrico 1,8% (0,1M), pH 2,27 na estrutura dentária e seu efeito na liberação imediata e tardia de íons cálcio e fosfato do esmalte, bem como na desmineralização de superfície e em profundidade do esmalte e dentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a difusão do ácido cítrico 1,8% (0,1M), pH 2,27 na estrutura do esmalte por Microscopia de Luz Polarizada utilizando o *single Polscope*
2. Avaliar o efeito do desafio erosivo com ácido cítrico na liberação tardia e imediata de íons cálcio e fosfato.
3. Avaliar o efeito do desafio erosivo com ácido cítrico na desmineralização da superfície do esmalte e em sua profundidade em direção a JAD, e na dentina externa por meio de microdureza Vickers.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Questões Éticas

Por respeitar as diretrizes e normas responsáveis por regulamentar as pesquisas envolvendo seres humanos, direta ou indiretamente, estabelecidas pela resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde. A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CAAE: 39013014.2.0000.5188) e os doadores de dentes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.2 Local de Realização do Estudo

O preparo das amostras foi realizado no LABIO – Laboratório de Biomateriais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB (PPGO-UFPB). As análises em microscopia de luz polarizada foram desenvolvidas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB) – UFPB, enquanto as análises de dureza foram desenvolvidas no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e as análises de espectroscopia de absorção atômica realizadas no Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA), no Departamento de Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB.

4.3 Desenho do Estudo

Este projeto foi caracterizado como um estudo *in vitro* laboratorial e experimental, o qual utilizou a técnica de observação direta e intensiva (MARCONI, LAKATOS, 2003).

4.4 Cálculo amostral

O cálculo amostral para o teste de dureza Vickers (VHS) foi realizado com correção aplicada a partir da multiplicação da magnitude do efeito por 1,414 para proporcionar a menor variância do teste pareado. Este cálculo foi empregado com

a intenção de detectar uma diferença em qualquer local, tanto no esmalte quanto na dentina. A partir desses cálculos foi possível constatar a relevância de $n = 10$.

Os parâmetros utilizados para a superfície da amostra (esmalte superficial) foram:

- Erro tipo II (alfa) de 1% unicaudal (deve calcular IC 99%);
- + poder estatístico de 90%;
- + magnitude de efeito g de Hedge de 1,4;
- = $n = 8$;
- + 20% de perda;
- $n = 10$

Os parâmetros utilizados para as regiões internas (esmalte e dentina) foram:

- Erro tipo II (alfa) de 1 % unicaudal (deve calcular IC 99%);
- + poder estatístico de 80%;
- + magnitude de efeito g de Hedge de 1,1;
- $n = 10$

Para a análise de liberação de íons cálcio foi realizado o cálculo amostral utilizando os seguintes parâmetros:

- erro tipo II (alfa) de 1 % unicaudal (deve calcular IC 99%)
- poder estatístico de 99%
- magnitude de efeito g de Hedge de 2
- $n = 7$
- + 30% de perda
- $n = 10$

Para a análise da liberação de íons fosfato os seguintes parâmetros foram utilizados:

- erro tipo II (alfa) de 5 % bicaudal (deve calcular IC 95%)
- poder estatístico de 80%
- magnitude de efeito g de Hedge de 1,3
- $n = 6$

4.5 Amostra

Para este estudo foram utilizados 30 terceiros molares, não irrompidos. Estes elementos dentários foram obtidos por meio de doação de pacientes, os quais foram extraídos por razões odontológicas de acordo com a assinatura do TCLE. Após coleta, os dentes foram submetidos a uma limpeza mecânica para remoção de debris com cureta periodontal e armazenados em solução de timol a 0,1% (em peso) e congelados a 4°C até o momento de sua utilização.

4.6 Desafio erosivo e Microdureza Vickers do esmalte e dentina

Em todos os experimentos deste estudo foi utilizada como agente erosivo a solução de ácido cítrico 1,8% (0,1 M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) em água deionizada e ajustada em pH 2,27 com NaOH (HJORTSJÖ et al, 2010; HJORTSJÖ et al., 2014). Dez terceiros molares foram selecionados para esta análise. No esmalte da superfície proximal mais plana de cada dente foi realizada uma janela de 4 mm x 4 mm tendo como limite de profundidade a região da câmara pulpar. Blocos de esmalte desta superfície com 16 mm² de área foram obtidos utilizando disco dupla face diamantado (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) na peça de mão do micromotor, sob refrigeração (Figura 1).

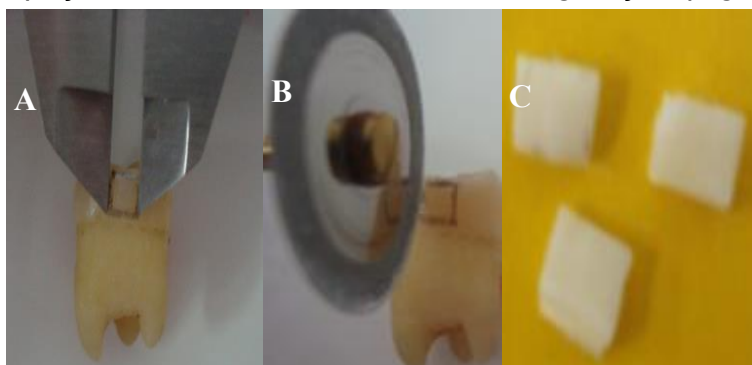


Figura 1. Obtenção das amostras. (A). Delimitação da amostra na superfície proximal do esmalte. (B) e (C) Obtenção da amostra e amostra final.

As amostras foram embutidas em resina acrílica (VIPI-Flash, Pirassununga, SP, Brasil), inseridas em tubos de PVC e a superfície de esmalte de cada bloco foi polida serialmente com discos de lixa de carvão de silício de granulação 400, 600 e 1200, sob irrigação constante com água deionizada para padronização e

planificação da superfície. Em seguida, as amostras foram inseridas em ultrassom (Ultrasonic Cleaner, model USC1400, Unique Ind. e Com. Ltda, Indaiatuba, SP, Brasil) com água deionizada por 10 minutos para remoção de impurezas, e inspecionadas em microscópio óptico (Nikon 88286, Tokyo, Japan) com aumento de 40x para avaliação de trincas e fraturas. Existindo trincas e/ou fraturas na superfície da amostra, a mesma foi descartada.

A microdureza vickers (VHN) de superfície no esmalte foi avaliada em microdurômetro (HVM-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) com carga de 300 g aplicada durante 15 s na superfície do esmalte (KHAMVERDI et al., 2010) (Figura 2). Foram realizadas 5 indentações por amostra e apenas as amostras com valores variando 300 a 380 VHN foram selecionadas (MURAKAMI et al., 2009).

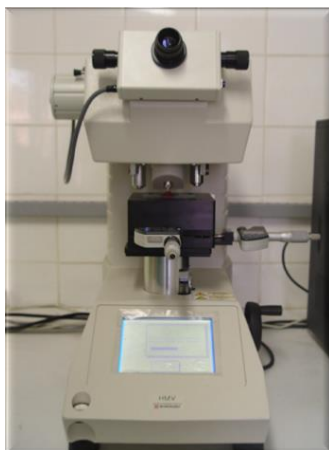


Figura 2. Microdurômetro utilizado no experimento (HVM-2, Shimadzu, Kyoto, Japão).

Cada amostra foi dividida ao meio (2 x 4 mm), sendo que uma metade foi submetida ao desafio erosivo (n=10) e a outra metade da amostra foi o grupo controle (sem desafio erosivo) (n=10). A metade controle foi isolada com duas camadas de esmalte para unhas (Colorama, L'óreal Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 3).



Figura 3. Preparo da amostra para análise de microdureza. A metade isolada com esmalte para unhas corresponde ao grupo controle e a outra metade da amostra corresponde ao grupo experimental.

As amostras foram submetidas ao desafio erosivo com solução de ácido cítrico 1,8% (0,1M) com pH 2,27 (HJORTSJÖ et al., 2014), inseridas individualmente em um recipiente de plástico hermeticamente fechado. Em cada recipiente foi inserido 10 mL da solução de ácido e as amostras permaneceram em contato por 10 minutos (HJORTSJÖ et al., 2014). Em seguida, as amostras foram removidas e lavadas com água deionizada durante 5 segundos. Na metade da amostra não isolada (experimental) o teste de VHN foi realizado, como já descrito, na superfície de esmalte antes e após a exposição ácida para comparação dos valores de dureza entre os dois períodos experimentais.

A seguir, com um disco diamantado dupla face diamantado (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) acoplado ao micromotor, sob refrigeração, um corte foi realizado na amostra, dividindo a mesma em duas áreas de 2 mm por 4 mm (Figuras 4 A, B e C). Em seguida, as amostras de esmalte e de dentina foram removidas do embutimento de resina acrílica com um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) para realização do teste de dureza das medidas de VHN em profundidade do esmalte e da dentina (Figura 5 A e B). Para a análise no equipamento, as amostras foram reimbutidas e planificadas inferiormente para conferir melhor estabilidade para amostra e precisão da análise.

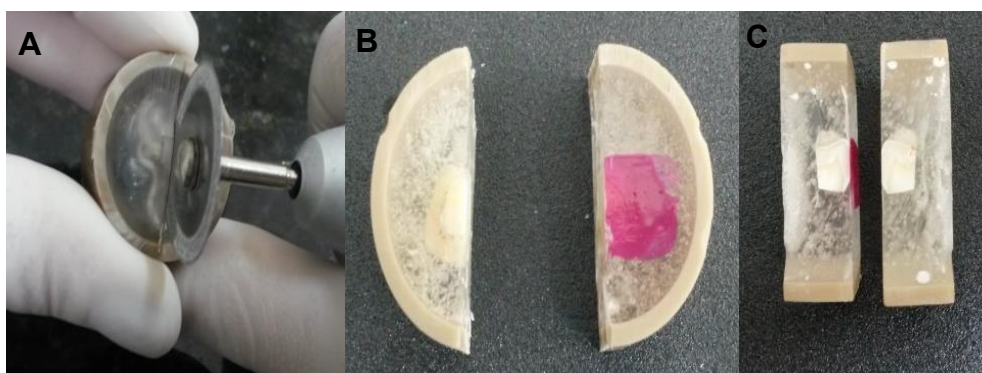


Figura 4. Preparo da amostra para análise da microdureza do esmalte e dentina em profundidade A. Divisão da amostra em duas partes (2 x 4 mm) com auxílio do disco diamantado; B. Amostras divididas controle (isolada com esmalte de unha) e experimental; C. Visualização dos blocos de esmalte para realização da microdureza em profundidade.

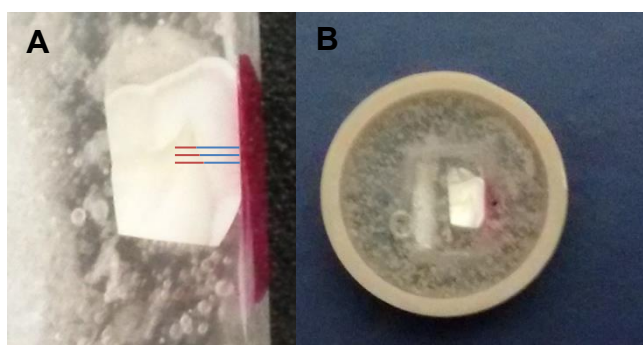


Figura 5. Obtenção da amostra para análise em profundidade do esmalte e dentina. A. Amostra seccionada. B. Amostra embutida para análise em profundidade de esmalte e dentina. —: linhas representativas das 3 fileiras paralelas onde foram realizadas as indentações em esmalte da análise em profundidade. —: linhas representativas das 3 fileiras paralelas onde foram realizadas as indentações em dentina da análise em profundidade.

A análise de microdureza Vickers em profundidade do esmalte foi realizada nas amostras controle (isolada com esmalte de unha) e experimental (submetida a erosão) em toda a extensão de profundidade do esmalte. As indentações foram realizadas em três fileiras paralelas distante 100 μ m uma das outras em distâncias a partir da superfície externa do esmalte em direção a junção

amelodentinária (JAD). As distâncias em profundidade no esmalte foram: 40 µm, 80 µm, 160 µm, 200 µm, 300 µm, 400 µm, 500 µm, 600 µm, 700 µm, 800 µm, 900 µm e 1000 µm da superfície. A mesma carga e tempo empregados na análise de dureza de superfície foi utilizada. Uma média do valor de VHN foi obtida para cada distância.

As medidas de dureza VHN em profundidade na dentina foram realizadas nas amostras controle (isolada com esmalte de unha) e experimental (submetida a erosão) em três fileiras paralelas distante 100 µm uma das outras em distâncias a partir da JAD para a polpa: 00 µm, 40 µm, 80 µm, 160 µm, 260 µm e 360 µm. Uma média do valor de VHN foi obtida para cada distância. A carga de 50 g durante 15 segundos foi utilizada para análise no microdurômetro (Cruz-Filho et al., 2011).

4.7 Microscopia de Luz Polarizada

Para as análises no sistema “*single Polscope*”, foram confeccionadas 10 amostras, a partir de 10 dentes. Os elementos dentários foram seccionados, com o auxílio de um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP) acoplado em uma peça de mão de micromotor, sob refrigeração constante, na região central da face oclusal, no sentido vestibulo-lingual obtendo-se uma fatia da coroa dentária em torno de 0,5 mm. As raízes também foram removidas cerca de 5 mm abaixo da junção esmalte-cimento. Após a obtenção das amostras, as mesmas foram polidas, por desgaste, utilizando um jig de lapidação com lixas d’água de granulações distintas até espessuras entre 90 – 100 µm.

As amostras foram analisadas durante 5 horas nos seguintes intervalos de tempo: antes da erosão (*baseline*), durante a erosão (10 minutos) e após a erosão até o final das 5h de análise. A lente objetiva de 2x foi utilizada para permitir que o campo de visão alcançasse toda a área correspondente ao esmalte e dentina.

O sistema “*single Polscope*” utiliza a microscopia de luz polarizada para avaliar, por meio do retardo de fase, o conteúdo mineral existente nas amostras. Por isso, foram realizados registros fotográficos sequenciais das modificações que ocorreram no retardo de fase das amostras. A técnica consistiu no uso da microscopia de luz polarizada que independe da orientação da amostra e faz uso apenas de um cristal líquido. Esse sistema é composto por um filtro monocromático verde, dois polarizadores, um cristal líquido e dois filtros de

retardo de fase de $\frac{1}{4}$ de λ . Desde a saída da luz da base do microscópio até a ocular, a sequência de itens é: (1) filtro verde de birrefringência de 546 nm (largura d banda de 10 nm; Edmund Optics, Barrington, EUA), (2) primeiro polarizador, (3) cristal líquido coberto por filtro de $\frac{1}{4}$ de λ acromático para 545 nm (liquid crystal polarization rotator, Frederick, EUA), (4) amostra, (5) segundo polarizador e (6) o segundo filtro de retardo de $\frac{1}{4}$ de λ acromático para 545 nm (Meadowlark, Frederick, EUA). Todos os itens foram montados em um microscópio vertical composto de luz transmitida (modelo BA320, Motic, Richmond, Canadá). Um gerador de função (modelo AFG 2021-BR, Tektronix, Beaverton, EUA) foi acoplado ao cristal líquido através de um cabo elétrico para aplicar tensão e permitir rotação do eixo de polarização da luz. A câmera digital (Nikon D7000, Tóquio, Japão), no modo monocromático foi acoplada para completar o sistema. Todas as imagens foram obtidas utilizando a lente objetiva 2x plana, de tubo infinito, fluorita e de luz polarizada (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Na organização inicial padrão os dois polarizadores e o eixo lento do cristal líquido permaneceram paralelos entre si e os dois filtros de $\frac{1}{4}$ de λ ficaram paralelos entre si e a 45° dos polarizadores. O ângulo entre o primeiro polarizador e o eixo lento do primeiro filtro de $\frac{1}{4}$ de λ foi denominado de ângulo beta (SHRIBAK, 2011), que correspondeu a 87° , e determinou o retardo de fase máximo mensurável pelo sistema.

O retardo de fase máximo mensurável foi dado pela razão entre o comprimento de onda de luz utilizado e o ângulo máximo (180°) entre o eixo lento do cristal líquido e um dos polarizadores. O ângulo máximo entre o eixo lento do cristal líquido e um dos polarizadores permite a obtenção da medida do retardo de fase que é nesse sistema 90° , de modo que o retardo de fase máximo mensurável pelo sistema “*single Polscope*” é de metade do comprimento de onda (273 nm). O retardo de fase dividido pela espessura da amostra (em nm) e multiplicado pelo sinal da birrefringência resulta na birrefringência observada.

Utilizando o sistema “*single Polscope*”, a amostra permaneceu numa posição específica e o retardo de fase de toda a área histológica incluída no campo de visão foi medida simultaneamente em que quatro estados de polarização da luz foram transmitidas para amostra. Esses quatro estados de polarização da luz foram criados pelo gerador de estados de polarização (composto pelo primeiro polarizador e o cristal líquido coberto por filtro de $\frac{1}{4}$ de

onda acromático) acionado por quatro tensões elétricas aplicadas. A aplicação dos estados de polarização durou cerca de 30 segundos, sendo esse parâmetro de resolução temporal. As tensões elétricas foram aplicadas ao cristal líquido através de um cabo elétrico conectado a um gerador de funções que operou nas seguintes configurações:

- Onda quadrada;
- Frequência de 2,0 Khertz;
- Unidade de voltagem de raiz quadrada da média dos quadrados ("root mean square; Vrms);
- Modo contínuo;
- 0 Vrms de corrente direta;
- Voltagens sequenciais de 1, 48; 1,79; 2,10; 2,51 Vrms, que corresponderam aos ângulos 0°, 45°, 90°, 135°, respectivamente, da luz polarizada que ilumina a amostra, e estão relacionadas ao algoritmo de quatro enquadramentos descritos por Shribak (2011).

A relação entre as voltagens e os ângulos de rotação da luz polarizada foi fornecida pelo fabricante do cristal líquido. As voltagens aplicadas foram necessárias para obter os estados de polarização requeridos para o algoritmo de quatro enquadramentos descritos por Shribak (2011). As variações na intensidade da luz na amostra foram processadas por um algoritmo de quatro enquadramentos que resultou no retardo de fase e no azimuth (ângulo de orientação) das estruturas birrefringentes. O resultado foi apresentado numa imagem digital. A aplicação do algoritmo de quatro enquadramentos para obter a imagem final com os retardos de fase foi desenvolvido com o auxílio de um aplicativo Java (SHRIBAK, 2011). Os valores dos retardos de fase em cada ponto histológico de interesse foram coletados com o auxílio de um *software* livre de análise de imagem (Image J, NIH, EUA).

No presente estudo foram realizadas medidas sequenciais de retardos de fase durante longos períodos de tempo, para tanto foi utilizado um sistema desenvolvido especialmente para esta finalidade, capaz de controlar o sistema além de permitir o funcionamento sincronizado do gerador de funções e da câmera digital sem a presença do operador pelo tempo programado.

Desta forma, foi delimitada à região correspondente a superfície externa do esmalte e o restante da amostra foi isolada utilizando esmalte de unha transparente. Em seguida, cada amostra foi posicionada e fixa sobre a lâmina de vidro com o auxílio de cola instantânea e, após a sua fixação, uma lamínula foi colocada sobre a amostra (Figura 6).



Figura 6. Amostra sendo fixada sobre a lâmina de vidro para análise no Microscópio de Luz Polarizada no sistema *single Polscope*.

Para o desafio erosivo foi utilizada solução de ácido cítrico 0,1 M e pH 2,27. Entretanto, a essa solução foi adicionado Iodeto de Potássio com o intuito de modificar o índice de refração do ácido cítrico, permitindo a melhor visualização da trajetória realizada pelo ácido na estrutura do esmalte. O índice de refração foi verificado utilizando o refratômetro de Abbe (Figura 7).

Inicialmente, foi verificado o índice de refração (IR) da água e obteve-se o valor de 1,33. Em seguida, para a modificação do índice de refração do ácido cítrico foi adicionado 20 g de iodeto de potássio em uma solução de 50mL e obteve-se o valor de 1,38. Em estudo piloto o valor do pH das soluções com e sem a adição do iodeto de potássio foi medido em eletrodo específico e não foi alterado.

Assim, com a modificação do IR do ácido cítrico, 30 μ L da solução foi colocada na região da superfície da amostra, com o auxílio de uma pipeta, para padronizar a quantidade aplicada sobre a superfície de esmalte (Figura 8).

O desafio erosivo foi realizado por 10 minutos. Para a remoção do ácido presente na amostra foi utilizado papel absorvente, o qual foi posicionado entre a lâmina e a lamínula. Em seguida, com o auxílio de uma seringa de insulina a amostra foi lavada com água deionizada, apenas na região delimitada, para remover quaisquer vestígios da solução ácida.



Figura 7. Refratômetro de Abbe utilizado para medir o índice de refração das amostras.

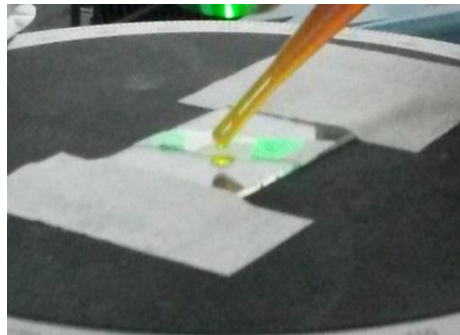


Figura 8. Adição da solução de ácido cítrico com iodeto de potássio na amostra posicionada no Microscópio de Luz Polarizada para análise no *single Polscope*.

Novamente, foi utilizado papel absorvente entre a lâmina e lamínula para remover a água deionizada. Imagens foram capturadas durante as 5 h de análise, sendo registrada a primeira imagem antes da erosão, durante a erosão (2 fotos/minuto por 10 min), após a erosão (2 fotos/minuto durante 30 minutos; 1 foto após 10 minutos, após 4 horas e após 20 minutos). Em seguida, as imagens foram analisadas no software Image J (para observação do *stack* (junção de todas as imagens) e a difusão do agente erosivo foi observada em função do tempo.

4.8 Liberação imediata e tardia de íons cálcio e fosfato da estrutura dentária na solução erosiva

A análise de íons cálcio e fosfato liberados do esmalte na solução erosiva foi realizada imediatamente após o desafio ácido (liberação imediata) e tardiamente ao desafio (liberação tardia). As soluções das amostras utilizadas durante o desafio erosivo para o teste de microdureza foram armazenadas, em potes hermeticamente fechados, para análise de liberação imediata de cálcio e fosfato por espectroscopia. Da quantidade de 10 mL da solução de ácido cítrico utilizada no desafio ácido, 5 mL de cada amostra foram destinadas a análise do cálcio e 5 mL para a análise do fosfato. A solução controle para ambas as análises de íons foi a solução de ácido cítrico 0,1M utilizada para o desafio.

As análises de liberação de cálcio foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo 908 AA - GBC/Germany, Analítica, São Paulo, Brasil) (Figura 9 A) e as análises do fosfato em espectrofotômetro (Modelo 8453 - Hewlett-Packard, Califórnia, EUA) (Figura 9B).

Para análise do cálcio foram preparados sete padrões de cálcio a partir de uma solução estoque nas seguintes concentrações: 0,5 ppm de Ca^{+2} ; 1 ppm de Ca^{+2} ; 2 ppm de Ca^{+2} ; 3 ppm de Ca^{+2} ; 4 ppm de Ca^{+2} ; 5 ppm de Ca^{+2} ; 7 ppm de Ca^{+2} , em balões de 25 mL. A partir das leituras de absorbância de cada um dos padrões, uma curva analítica foi construída utilizando uma equação linear simples ($y = a + bx$).

Em seguida, os valores de absorbância foram substituídos na equação e foram obtidas as concentrações de cálcio presente nas soluções de ácido cítrico.

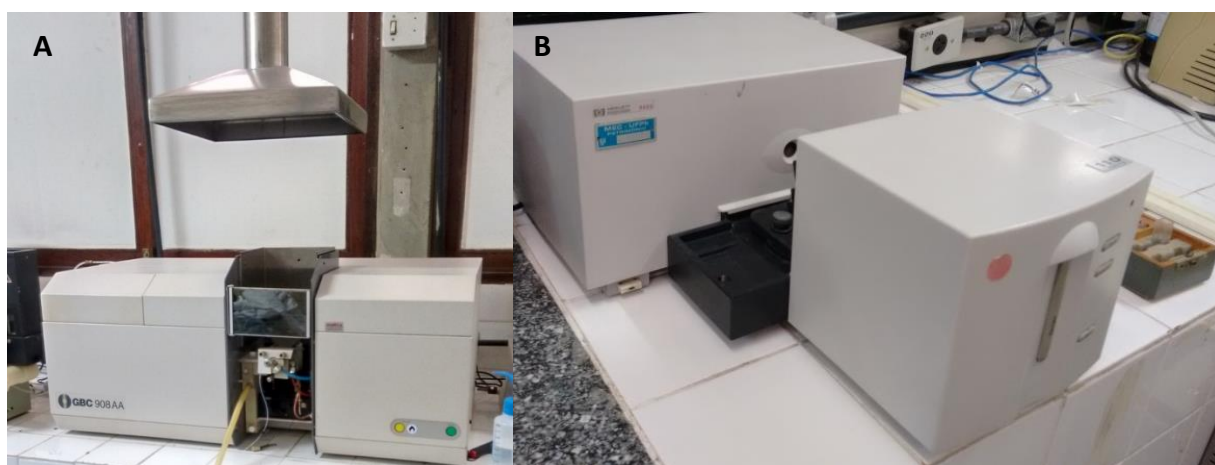


Figura 9. A. Espectrofotômetro de absorção atômica por chama para análise do cálcio (Modelo 908 AA - GBC/Germany); B. Espectrofotômetro para análise do fosfato (Modelo 8453 - Hewlett-Packard, Califórnia, EUA).

Para análise de PO_4^{3-} foram utilizadas soluções padrões nas concentrações de 0,025 ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm; 0,2ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 2,0 ppm em balões de 25 mL. Para relacionar as concentrações a serem obtidas no espectrofotômetro a partir da solução padrão e suas respectivas absorbâncias, foi utilizada a equação linear simples ($y = a + bx$).

O preparo dos padrões de fosfato e das amostras para análise no espectrofotômetro foi realizado pela adição de 5 mL da solução erosiva de cada amostra em 10 mL de solução ácida de molibdato de amônio (0,6 g de subcarbonato de bismuto, 45 mL de ácido sulfúrico concentrado e 6 g de molibdato de amônio em 1L de água deionizada) com 30 mg de ácido ascórbico em pó. A mistura foi agitada suavemente e aguardou-se a presença da coloração azulada durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da intensidade da cor no comprimento de onda de 660 nm no aparelho.

Para as análises da liberação tardia de cálcio e fosfato, 10 blocos de esmalte (4 x 4 mm) foram obtidos de 10 terceiros molares inclusos e foram preparados de acordo como relatado no item 4.5. As amostras foram embutidas e a superfície do esmalte polida com a lixa de granulação 400, 600 e 1200 sob irrigação constante com água deionizada para padronização e planificação da superfície. A superfície da amostra foi dividida em controle e experimental (2 x 4 mm) e a superfície controle foi isolada. O desafio erosivo em solução de 10 mL de ácido cítrico por 10 min foi realizado para cada amostra conforme descrito no item 4.5. Em seguida, a parte controle e a experimental de cada amostra foram separadas com disco diamantado, sob refrigeração, com auxílio da peça de mão do micromotor, obtendo-se de cada amostra um bloco controle (sem desafio $n=10$) e outro experimental (com desafio $n=10$). Da mesma forma, a dentina subjacente ao esmalte foi removida do bloco com o disco diamantado, deixando somente o esmalte com espessura de 1,5 mm utilizando um paquímetro digital (Lee Tools, Mauá, SP, Brasil) (Figura 10).

Em seguida, cada amostra de esmalte controle e experimental foram individualmente imersas, em recipiente hermeticamente fechado, contendo 10 mL de água deionizada com pH ajustado em 6,5 durante 48 h. Em seguida, cada amostra de esmalte controle e experimental foram individualmente imersas, em recipiente hermeticamente fechado, contendo 10 mL de água deionizada com pH ajustado em 6,5 durante 48 h.



Figura 10 – Amostra de esmalte após a remoção do esmalte superficial e da dentina subjacente.

Ao término das 48 horas, as amostras foram removidas dos recipientes e as soluções de água deionizada foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica por chama e espectrofotômetro para leitura da liberação tardia de cálcio e fosfato, respectivamente, conforme descrito previamente. Para este experimento, o grupo controle foi a solução de água deionizada das amostras de esmalte que não foram submetidas ao desafio ácido.

4.9 Análise dos dados

Para testar a hipótese de que o agente erosivo causa dissolução dos íons e desmineralização na superfície do esmalte e na dentina subjacente, amostras pareadas (do mesmo dente) foram divididas em grupo controle (não exposta a agente erosivo; $n = 10$) e experimental (exposta a agente erosivo; $n = 10$). Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk.

Os dados da difusão do agente erosivo através do esmalte dentário foram analisados qualitativamente com os vídeos criados a partir das imagens capturadas durante a difusão do agente erosivo (*stacks*).

Os dados de dureza de esmalte e dentina foram analisados separadamente quanto a normalidade. O teste de Wilcoxon foi aplicado nos dados de dureza de esmalte de superfície e de profundidade para testar se os grupos diferiram por acaso ou não, considerando um valor de erro tipo I de 5%. A magnitude de efeito para dados não paramétricos e o intervalo de confiança de 95% foram calculados. Para os dados de dentina em profundidade foi aplicado o teste t de Student bicaudal para comparação entre o grupo controle e experimental em cada profundidade.

Os dados de liberação imediata dos íons cálcio e fosfato foram analisadas pelo teste T de Student unicaudal, já os dados de liberação tardia dos íons foram analisados pelo teste de Wilcoxon. Ambos os testes foram aplicados para avaliar as diferenças entre o grupo controle e experimental.

5 RESULTADOS

Através de uma avaliação qualitativa, por meio do *single Polscope*, foi possível acompanhar a difusão do agente ácido através dos poros do esmalte, devido a captura das imagens durante a aplicação do agente erosivo sobre a amostra. A figura 11 representa a amostra antes do desafio erosivo (*baseline*) (Fig. 11 A), durante a aplicação do agente erosivo na superfície do esmalte (10 minutos) (Figs. 11. B até F) e após o desafio erosivo (Figs. 11. G até I). Devido às alterações no retardo de fase, foi possível observar a penetração da solução ácida pela estrutura do esmalte dentário. Durante a aplicação do agente erosivo (Figs 11 C até F) pode ser visualizado, acompanhando a direção dos prismas, o aparecimento da “cor branca” (visualizando o retardo de fase que indica a difusão do ácido) da superfície do esmalte em direção a JAD. Nas figuras 11.G ao 11.I, o ácido cítrico já tinha sido completamente removido da amostra, no entanto a difusão do ácido na estrutura do esmalte se aproximando da dentina na JAD ainda pode ser visualizado.

Os dados de microdureza foram testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e apenas os de microdureza de dentina possuíram distribuição normal. Para a magnitude de efeito, foi calculada a magnitude de efeito g de Hedge, que, nos casos de não normalidade, foi calculada substituindo médias por medianas e desvios-padrão por 75% da distância interquartil (IQ), conforme preconizado por Grissom, Kim (1990) e Laird, Mosteller (2012). As análises seguiram procedimentos descritos em Cohen (1988), Grisson e Kim (2012).

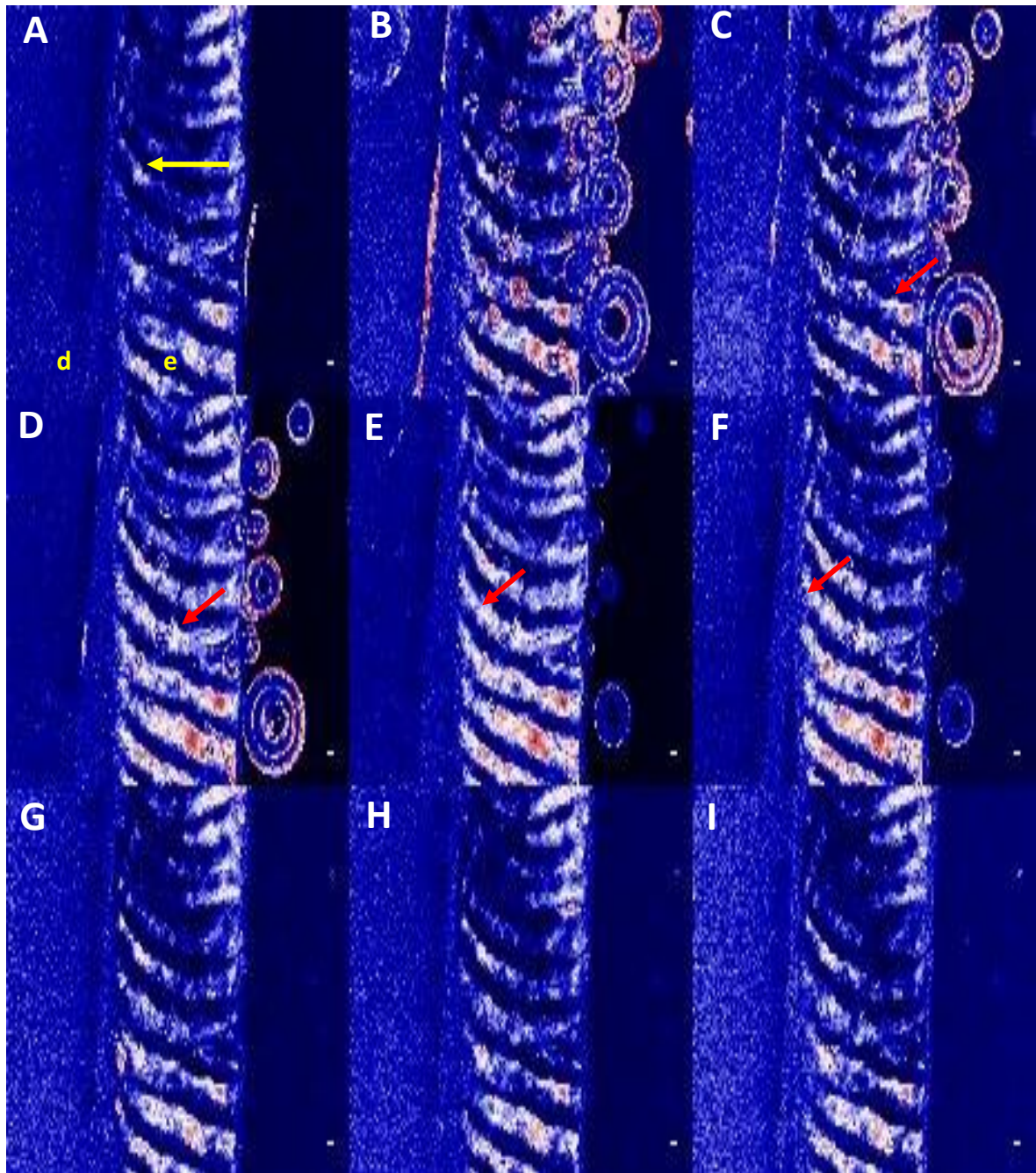


Figura 11. Amostra submetida ao desafio erosivo, gerada pelo sistema *single Polscope* para acompanhar a difusão do ácido cítrico 1% através do esmalte dentário. (A) Amostra antes do desafio erosivo; (B) Logo após a aplicação do ácido cítrico na superfície do esmalte; (C) – (F) Difusão do agente erosivo pela estrutura do esmalte; (G) – (H) Após remoção do agente erosivo.

Barra de escala = 10 μ m; e: Esmalte; d: Dentina; → (amarela): Direção de difusão da solução erosiva no esmalte; → (vermelha): mudança no retardo de fase indicando a difusão do agente erosivo pelo esmalte em direção a JAD.

A Tabela 1 demonstra os valores de mediana $\pm$ 75% IQ das medidas de dureza do esmalte dentário da superfície do esmalte antes e depois do desafio com ácido cítrico 0,1 M e em profundidade do esmalte, obtidas a partir das distâncias da superfície em direção a JAD (de 40 μ m até 1000 μ m) nos grupos controle (sem erosão) e após erosão. Foi possível constatar redução significativa nos valores de VHN antes e após o desafio erosivo com ácido cítrico na superfície do esmalte ($p=0,005$). A análise de VHN em profundidade do esmalte dentário também mostrou que houve redução significativa de dureza em todas as distâncias da superfície (de 40 até 1000 μ m) quando comparado o grupo controle (sem erosão) com o grupo erosão ($p<0,005$).

Tabela 1. Valores de mediana $\pm$ 75% IQ da microdureza Vickers (VHN) da superfície do esmalte antes e depois do desafio com ácido cítrico 0,1 M e da profundidade do esmalte, de acordo com a distância da superfície, nos grupos controle (sem erosão) e após erosão, pelo teste de Wilcoxon.

Valores de Microdureza VHN (Mediana $\pm$ 75% IQ)				
Superfície do esmalte	Antes erosão	Pós-erosão	Valor de p	
	345,7 $\pm$ 16,3	267,1 $\pm$ 7,4	0,005	
Profundidade da superfície do esmalte (μ m)	Controle	Erosão	Perda Mineral (%)	Valor de p
40	337,0 $\pm$ 11,1	273,0 $\pm$ 30,6	19,0%	0,005
80	338,5 $\pm$ 18,4	269,0 $\pm$ 25,6	20,5%	0,005
160	334,5 $\pm$ 19,4	276,3 $\pm$ 16,6	17,5%	0,005
200	326,8 $\pm$ 17,2	276,5 $\pm$ 15,2	15,3%	0,005
300	334,0 $\pm$ 10,4	273,0 $\pm$ 15,3	18,3%	0,005
400	327,3 $\pm$ 8,6	278,0 $\pm$ 18,2	15,0%	0,005
500	331,7 $\pm$ 11,5	282,0 $\pm$ 16,4	14,8%	0,005
800	320,0 $\pm$ 2,7	280,0 $\pm$ 6,5	12,5%	< 0,001
900	320,8 $\pm$ 5,6	275,2 $\pm$ 10,1	14,0%	0,001
1000	326,0 $\pm$ 7,2	258,2 $\pm$ 18,7	20,1%	0,001

Os resultados dos valores de VHN na dentina em profundidade, a partir de distâncias da JAD (de 0 a 360 μm) nos grupos controle (sem erosão) e após erosão com ácido cítrico 0,1 M são descritas na Tabela 2. Houve diferença estatística significativa nos valores de VHN entre grupo controle e erosão até 120 μm ($p=0,00001$). Nas distâncias de 160, 260 e 360 μm da JAD não houve diferença significativa entre os grupos controle e erosão ($p>0,05$).

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão (dp) dos valores de microdureza Vickers (VHN) da dentina em profundidade, a partir de distâncias da junção amelo-dentinária (JAD), nos grupos controle (sem erosão) e após erosão com ácido cítrico 0,1 M, pelo teste T bicaudal.

Valores de Microdureza VHN da Dentina (média $\pm$ dp)				
Distância da JAD (μm)	Controle	Erosão	Perda Mineral (%)	Valor de p
00	62,9 $\pm$ 2,0	52,0 $\pm$ 2,5	17,3%	< 0,001
40	61,8 $\pm$ 1,6	51,4 $\pm$ 1,9	17,5%	< 0,001
80	62,2 $\pm$ 1,6	53,0 $\pm$ 1,6	14,5%	< 0,001
120	62,5 $\pm$ 1,8	58,3 $\pm$ 1,3	7,2%	< 0,001
160	62,3 $\pm$ 0,7	62,0 $\pm$ 1,7	0,5%	0,64
260	63,3 $\pm$ 2,4	63,3 $\pm$ 2,6	0%	0,53
360	63,6 $\pm$ 2,5	63,8 $\pm$ 2,9	0%	0,41

Os resultados de liberação imediata dos íons cálcio e fosfato são apresentados na Tabela 3. Para relacionar as concentrações obtidas no espectrofotômetro de absorção atômica (análise do Ca^{+2}) e no espectrofotômetro (análise do PO_4^{-3}) a partir das leituras de cada uma das soluções-padrão e suas respectivas absorbâncias, a equação da reta obtida para a análise do cálcio foi $y = 0,0135x + 0,0275$ e do fosfato foi $y = 0,188x + 0,0012$, e os valores da R^2 foram superiores a 0,99. Houve diferença estatisticamente significativa na liberação imediata de íons cálcio com aumento significativo dos íons após a erosão ($15,6 \pm 2,5 \text{ mg/kg}$) comparada ao controle (solução de ácido cítrico) ($0,5 \pm 0,02 \text{ mg/kg}$) ($p=0,0001$). Entretanto, não houve diferença na liberação de íons fosfato entre controle e erosão. Foi rejeitada a hipótese nula de que a concentração de Ca^{+2} na

solução ácida após seu contato com a superfície do esmalte é semelhante à concentração de Ca^{+2} na solução ácida antes de seu contato com a superfície do esmalte.

Para a análise da liberação tardia dos íons cálcio e fosfato foi verificado que apenas houve diferença estatística na liberação tardia de PO_4^{-3} após erosão ($0,20 \pm 0,04$ mg/kg) comparado ao grupo controle ($0,11 \pm 0,01$ mg/kg), com maior liberação deste íon após a erosão. Não houve diferença significativa na liberação tardia de Ca^{+2} (Tabela 4). Foi rejeitada a hipótese nula de que a concentração de PO_4^{-3} na solução neutra após seu contato com o esmalte do grupo experimental é semelhante à concentração de PO_4^{-3} na solução neutra após seu contato com o esmalte do grupo controle. Por outro lado, a hipótese nula de que a concentração de Ca^{+2} na solução neutra após seu contato com o esmalte submetido à erosão é semelhante à concentração de cálcio na solução neutra após seu contato o esmalte não submetido à erosão.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão (dp) da liberação imediata dos íons cálcio e fosfato (em mg/Kg) do esmalte dentário nos grupos controle (solução de ácido cítrico 0,1M) e erosão com ácido cítrico 0,1M, pelo teste T de Student unicaudal.

Liberação imediata	Controle (média $\pm$ dp)	Erosão (média $\pm$ dp)	Valor de p
Cálcio	0,5 $\pm$ 0,02	15,6 $\pm$ 2,5	< 0,001
Fosfato	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 3,82	0,06

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão (dp) da liberação tardia dos íons cálcio e fosfato (em mg/Kg) do esmalte dentário nos grupos controle (sem erosão) e erosão com ácido cítrico 0,1M, pelo teste T de Student unicaudal.

Liberação tardia	Controle (média $\pm$ dp)	Erosão (média $\pm$ dp)	Valor de p
Cálcio	0,54 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,08	0,19
Fosfato	0,11 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,04	0,001

DISCUSSÃO

Devido à sua organização estrutural, a camada de esmalte é a primeira a ser atingida por soluções ácidas durante o desafio erosivo. Já é definido na literatura que a bainha dos prismas é a principal trajetória para difusão dos ácidos cariogênicos e íons minerais no esmalte (SHELLIS, DIBDIN, 2000), de modo que soluções, íons e moléculas conseguem se difundir no esmalte cariado (SOUSA, SOARES, VIANA, 2013; MACENA et al., 2014). Entretanto, ainda não foi investigada a difusão do ácido erosivo e a sua extensão nos tecidos dentários. Assim, o presente estudo forneceu dados inovadores sobre a difusão do ácido cítrico 0,1 M na estrutura do esmalte, bem como quanto a extensão desta difusão em esmalte e dentina pela avaliação química de liberação de íons e microdureza.

O ácido cítrico 0,1 M foi utilizado neste estudo, pois é um ácido frequentemente encontrado em bebidas ácidas e refrigerantes e utilizado nos estudos *in vitro* de erosão (BARBOUR et al., 2003; HJORTSJÖ et al., 2010). O período de 10 min de desafio erosivo e o pH 2,27 foram utilizados pois este tempo e pH demonstraram ser suficientes para detectar perdas de íons, principalmente Ca^{+2} , e de estrutura mineral quando tratamentos com fluoreto foram investigados (HJORTSJÖ et al., 2010; HJORTSJÖ et al., 2014). Além disso, terceiros molares hígidos e não-erupcionados foram utilizados para que não existisse variação do conteúdo mineral no esmalte entre as amostras, em decorrência da maturação pós-eruptiva.

O conteúdo de água presente no interior dos poros do esmalte pode ser dividido em água fracamente e firmemente aderida, sendo que esta última é mais facilmente removida e encontra-se na região da bainha, onde os poros e a taxa de difusão são maiores (DIBDIN, 1993; SHELLIES, DIBDIN, 2000). A difusão é o mecanismo envolvido no transporte de substâncias por meio da estrutura do esmalte (ATKINSON, 1947). Esse transporte pode ocorrer através dos poros do esmalte, diante da presença de matéria orgânica e água em seu interior (ATKINSON, 1947).

Segundo Elliot (1997) as variações no volume mineral podem ser influenciadas pela movimentação de íons dissolvidos nos poros do esmalte. Entretanto o volume do poro, responsável por limitar os volumes orgânicos e de água e, conseqüentemente, a taxa de difusão, é influenciado pelo volume mineral

(SOUSA, SOARES, VIANA, 2013). Por esse motivo, a velocidade de difusão a partir dos poros presentes na bainha, que possui maiores diâmetros, é maior quando comparada aos poros de diâmetros menores. Como o volume mineral diminui da superfície do esmalte para a JAD, enquanto que os volumes orgânicos e de água aumentam, provavelmente um contínuo deslocamento de água ocorre da superfície do esmalte para a dentina (MACENA et al., 2014). Embora tenha sido avaliado em esmalte com lesões naturais de cárie, Meira et al. (2015) verificaram que uma solução ácida consegue infiltrar mais rapidamente no esmalte primeiro pela água fracamente aderida; depois pela água fortemente aderida, atravessando o conteúdo orgânico no interior dos poros; e finalmente chegando aos cristais de hidroxiapatita, promovendo a sua desmineralização.

No presente estudo, por meio de uma única aplicação de ácido cítrico 0,1 M por 10 min na superfície do esmalte através de avaliação do sistema *single Polscope*, foi observado que esta solução erosiva conseguiu se difundir pelos poros do esmalte. Como o retardo de fase do sistema *single Polscope* foi alterado após a aplicação do agente erosivo (Figura 11), provavelmente os íons do agente erosivo interagiram com os cristais de hidroxiapatita do esmalte, alcançado distâncias próximas à JAD.

Baseado nas explicações de difusão de soluções em lesões naturais de cárie em esmalte (SOUSA, SOARES, VIANA, 2013; MACENA et al., 2014; MEIRA et al., 2015) pode ser sugerido que neste estudo a difusão do ácido cítrico na estrutura do esmalte, como mostrado na Figura 11, ocorreu pela penetração das pequenas moléculas do ácido cítrico nos poros do esmalte através da água fracamente aderida. Dentro dos poros do esmalte, pelo transporte aleatório de difusão, as moléculas do ácido podem ter se difundido ao longo da água fracamente aderida em direção às paredes minerais, deslocando e atravessando a matéria orgânica e água firmemente aderida (MEIRA et al., 2015). Como visualizado na Figura 11F pelo retardo de fase, provavelmente a difusão da solução estendeu-se para a camada mais interna do esmalte próximo a JAD. Fato este possível, já que o gradiente osmótico do esmalte atrai a difusão para as camadas mais internas (MACENA et al., 2014). Em cada ponto mais interno do esmalte, as moléculas do ácido também podem ter se difundido em direção às paredes minerais, causando desmineralização ao longo de todo seu trajeto até a JAD.

Neste estudo também foi demonstrado que houve redução nos valores de dureza de superfície do esmalte após a erosão com ácido cítrico (Tabela 1). Outros resultados também mostraram a redução de dureza na superfície do esmalte erodido com o mesmo ácido (BARBOUR et al., 2003; CARVALHO, LUSI, 2015; MISTRY et al, 2015). Este fato se deve principalmente ao baixo pH do ácido, e a ação quelante que pode “sequestrar” os íons cálcios da superfície dentária (LUSI, JAEGLI, 2006).

Também houve diferença significativa nos valores de dureza em profundidade no esmalte quando comparado com o grupo controle (sem erosão), a partir de 40 até 1000 μm (Tabela 1). Este fato mostra que o esmalte, em contato por 10 min com o ácido cítrico 0,1 M, foi desmineralizado em toda a sua extensão, ultrapassando a JAD e atingindo até 120 μm da dentina, pois até esta profundidade foi observada a redução significativa de dureza da dentina após a erosão (Tabela 2). Estes dados confirmam a difusão do ácido em toda extensão do esmalte até JAD encontrado nas imagens do sistema *single Polscope*, em microscópio de luz polarizada, embora não tenha sido visualizada a difusão até a dentina externa (Fig. 11).

O conteúdo mineral e a concentração de Ca^{+2} do esmalte diminuem em direção a JAD, mas as concentrações de carbonato e magnésio aumentam, o que reduz a cristalinidade dos prismas de esmalte (LEGEROS , TUNG, 1983). Estes gradientes são utilizados para explicar a diminuição da dureza e densidade do tecido e o aumento da solubilidade mineral que ocorre no esmalte da superfície para a JAD (CARVALHO, LUSI, 2015; LUSI et al., 2011), como ocorreu também em nosso estudo.

Carvalho e Lusi (2015) investigaram o efeito do ácido cítrico 1% por 3 min na microdureza do esmalte em profundidades de 100, 200, 400 e 600 μm da superfície em diferentes tipos e regiões do dente, com polimento ou não. Embora tenham observado que as camadas mais profundas não tenham sido afetadas pela exposição do ácido a 100 μm , o tempo de contato foi menor que o do presente estudo. Tempos maiores de erosão com ácido cítrico poderiam detectar maiores perdas minerais e a atuação de fluoretos no tecido, como explicado previamente (HJORTSJÖ et al., 2010).

Como a dentina não entrou em contato direto com o ácido cítrico 0,1 M durante o desafio erosivo, a redução de dureza até 120 μm (Tabela 2) é de

grande relevância, uma vez que implica em fortes indícios de que o ácido conseguiu penetrar pelos poros do esmalte e alcançou o tecido subjacente. Essa difusão para o interior do esmalte e dentina é justificada principalmente pelo aumento no conteúdo orgânico e de água conforme ocorre a aproximação com a JAD (DIBDIN, 1993; SHELLIS, DIBDIN, 2000). Além disso, o maior conteúdo orgânico e de água presente na dentina também poderiam favorecer esta difusão para o seu interior.

O teste de microdureza é o mais utilizado para análise de desmineralização por erosão, porém a análise química de liberação de cálcio também é um método preciso para avaliar a desmineralização causada por erosão (CARVALHO, LUSSI, 2015). A mudança na microdureza de superfície detecta a perda de resistência à penetração do indentador, devido às perdas minerais, e reflete as propriedades de superfície na região do esmalte submetido à aplicação da carga. A liberação de cálcio, por sua vez, mede a perda mineral do esmalte pela desmineralização em toda a extensão da amostra exposta (CARVALHO, LUSSI, 2015).

Embora a microdureza e a análise química do cálcio possuam diferença na metodologia, ambas mostraram que ocorreu a desmineralização na superfície, devido à redução de dureza de superfície e o aumento na concentração de íons Ca^{+2} na solução de ácido cítrico, após o desafio erosivo (Tabelas 1 e 3). Porém, na análise de liberação tardia de cálcio não houve diferença entre grupo controle (sem erosão) e erosão (Tabela 4). Carvalho e Lussi (2015) avaliaram a liberação de íons Ca^{+2} em diferentes profundidades no esmalte, após desafio erosivo com ácido cítrico, e constataram que a liberação desse íon diminui com o aumento da profundidade e a proximidade com a JAD. No presente estudo, na liberação imediata e tardia de Ca^{+2} somente a superfície do esmalte foi exposta ao desafio, porém na liberação tardia o esmalte em toda a sua extensão e profundidade foi armazenado em água deionizada, por 48h. Provavelmente todos os íons Ca^{+2} tenham sido liberados da superfície do esmalte na solução de ácido cítrico durante o desafio, resultado obtido na liberação imediata do íon (Tabela 3). Porém, como a liberação do íon diminui em direção a JAD (CARVALHO, LUSSI, 2015) não foi possível detectar a liberação de íons Ca^{+2} tardiamente, já que a erosão foi realizada somente na superfície.

O ácido cítrico, utilizado para promover o ataque ácido na superfície das amostras, por sua composição química, consegue desmineralizar a estrutura da

hidroxiapatita a partir da dissociação em água dos íons H^+ que se ligam de forma reversível ao íon citrato (COO^-). O citrato pode existir em três formas distintas e quando dois ou até os três íons H^+ presentes na molécula do ácido cítrico são removidos, pode ocorrer a formação de um complexo com o íon Ca^{+2} por meio da interação eletrostática entre os íons, resultando na ação quelante (LUSSI, JAEGGI, 2006). Esta interação, diferente do momento da liberação dos íons H^+ , ocorre diante de pH básico. Isto significa que o ácido cítrico diante de pH ácido libera íons H^+ capazes de atacar diretamente a superfície do mineral, e em pH básico o íon COO^- se liga ao cálcio removendo-o da estrutura cristalina e promovendo a desmineralização do tecido (SHELLIS, FEATHERSTONE, LUSSI, 2014).

Contrariamente a liberação de Ca^{+2} , os íons fosfato (PO_4^{-3}) foram detectados apenas tardiamente nas soluções, esse fenômeno pode ter ocorrido por causa da preferência que o íon citrato possui em remover, inicialmente, os íons Ca^{+2} pela interação eletrostática que ocorre entre eles (SHELLIS, FEATHERSTONE, LUSSI, 2014). Isso implica que embora os íons PO_4^{-3} não tenham sido liberados imediatamente após o desafio erosivo, eles podem permanecer na água firmemente aderida, e após os íons Ca^{+2} terem sido removidos, os íons PO_4^{-3} se difundem da água firmemente aderida para a fracamente aderida e podem ser liberados da estrutura dentária, mesmo em pH neutro da solução.

Clinicamente, durante o processo de erosão por agentes ácidos e/ou quelantes, estes agentes interagem com a superfície dos cristais do esmalte, mas somente após terem sido difundidos pelo biofilme (se o mesmo estiver presente), atravessarem, em seguida, a película adquirida, e por fim se difundirem pela camada lipídica e proteica formada em cada cristal (SHELLIS, FEATHERSTONE, LUSSI, 2014). Mesmo que o presente estudo tenha investigado o efeito erosivo *in vitro* do ácido cítrico 0,1 M, com tempo e pH determinados, sem possuir as características clínicas citadas acima, as evidências apontaram para a existência de um contínuo deslocamento do agente erosivo a partir da superfície do esmalte chegando na JAD, e causando desmineralização em até 120 μm na dentina. Foi também sugerido um possível mecanismo de difusão do agente erosivo no esmalte. Além disso, as análises químicas demonstraram que durante o processo de erosão os íons fosfatos são

liberados após a liberação dos íons cálcio, sendo que a liberação deste último ocorre durante o desafio erosivo. Assim, estes resultados podem elucidar futuros estudos sobre o processo de erosão no esmalte dentário causado por fatores extrínsecos.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo pode-se concluir que:

- O ácido cítrico 1,8% (0,1 M) conseguiu se difundir na estrutura do esmalte através dos seus poros;
- Houve a liberação imediata de íons Ca^{+2} após o desafio erosivo e os íons PO_4^{-3} foram detectados na análise de liberação tardia, sugerindo que a desmineralização é iniciada pela remoção dos íons Ca^{+2} ;
- O desafio erosivo com ácido cítrico causou desmineralização da estrutura dentária tanto na superfície quanto em profundidade no esmalte (até 1000 μm), ultrapassando a JAD e atingindo até a dentina, devido a redução dos valores de VHN.

REFERÊNCIAS*

1. Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:1-8.
2. Lussi A, Jaeggi T. Dental erosion in children. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:140-51.
3. Schlueter N, Tveit AB. Prevalence of erosive tooth wear in risk groups. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:74-98.
4. Carvalho TS, Lussi A. Susceptibility of enamel to initial erosion in relation to tooth type, tooth surface and enamel depth. *Caries Res.* 2015;49(2):109-15.
5. Azadi-Schossig P, Becker K, Attin T. Chelating effect of citric acid is negligible for development of enamel erosions. *Clin Oral Investig.* 2015 Nov 7.
6. Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent.* 2006 Dec;19(6):319-25.
7. Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76.
8. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12.
9. Wang X, Lussi A. Assessment and management of dental erosion. *Dent Clin North Am.* 2010 Jul;54(3):565-78.
10. Gray JA. Kinetics of the dissolution of human dental enamel in acid. *J Dent Res.* 1962 May-Jun;41:633-45.
11. Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. *Br Dent J.* 1947 Nov 21;83(10):205-14.
12. Setally Azevedo Macena M, de Alencar e Silva Leite ML, de Lima Gouveia C, de Lima TA, Athayde PA, de Sousa FB. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. *Arch Oral Biol.* 2014 Jun;59(6):568-77.
13. Featherstone JDB, Mayer I, Driessens FCM, Verbeeck RMH, Heijligers HJM. Synthetic apatites containing Na, Mg, and CO₃ and their comparison with tooth enamel mineral. *Calcif Tissue Int.* 1983; 35:169-171.
14. Barbour ME, Maddocks SE, Wood NJ, Collins AM. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3507-19
15. Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163-79.
16. Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:123-42.

17. Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions--a comparison of calcium and profilometric analyses. *Arch Oral Biol.* 2010 Mar;55(3):229-34.
18. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Braz Dent J.* 2011;22(6):473-8.
19. Lussi A. Introduction. Stabilized stannous fluoride and dental erosion. *Int Dent J.* 2014 Mar;64 Suppl 1:2-3.
20. Moazzez R, Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:180-96.
21. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005 May;54(5):710-7.
22. Corrêa MSNP, Corrêa FNP, Corrêa JPNP, Murakami C, Mendes FM. Prevalence and associated factors of dental erosion in children and adolescents of a private dental practice. *Int J Paediatr Dent.* 2011 Nov;21(6):451-8
23. Fung A, Brearley Messer L. Tooth wear and associated risk factors in a sample of Australian primary school children. *Aust Dent J.* 2013 Jun;58(2):235-45.
24. Wiegand A, Köwing L, Attin T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. *Arch Oral Biol.* 2007 Nov;52(11):1043-7.
25. Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge J, Yan JX. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomed Mater.* 2009 Feb;4(1):015020.
26. Jager DH, Vieira AM, Ruben JL, Huysmans MC. Estimated erosive potential depends on exposure time. *J Dent.* 2012 Dec;40(12):1103-8.
27. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:24-32.
28. Barbour ME, Lussi A. Erosion in relation to nutrition and the environment. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:143-54.
29. Lussi A, Megert B, Shellis RP, Wang X. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *Br J Nutr.* 2012 Jan;107(2):252-62
30. Shellis RP, Barbour ME, Jesani A, Lussi A. Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. *Caries Res.* 2013;47(6):601-11.
31. Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Ronay V, Attin R, Becker K, Attin T. In vitro evaluation of the erosive potential of viscosity-modified soft acidic drinks on enamel. *Clin Oral Investig.* 2014 Apr;18(3):769-73.
32. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.

33. Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2010 Jun;14(3):251-6.
34. Hellwig E, Lussi A. Oral hygiene products, medications and drugs – hidden aetiological factors for dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:155-162
35. Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion--a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent Mater.* 2010 Apr;26(4):326-36.
36. Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Etching effect of acidic fluorides on human tooth enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2014. 59(12):1328-1333.
37. Tenuta LMA, Fernández CE, Brandão ACS, Cury JA. Titratable acidity of beverages influences salivary pH recovery. *Braz. oral res.* 2015 Feb;29(1).
38. Hughes JA, West NX, Parker DM, Van Den Braak MH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent* 2000;28:147-152.
39. Jia YF, Xuan FZ. Anisotropic fatigue behavior of human enamel characterized by multi-cycling nanoindentation. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 16:163-168, 2012.
40. Elliott JC. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *Ciba Found Symp.* 1997;205:54-72.
41. Nikiforuk G. *Understanding Dental Caries.* Basel, Karger, 1985.
42. He LH, Yin ZH, Vuuren L J, Carter EA, Liang XW. A natural functionally graded biocomposite coating – Human enamel. *Acta Biomaterialia.* 2013;9(5): 6330-6337.
43. Fox PG. The toughness of tooth enamel, a natural fibrous composite. *J Mat Sci.* 1980;15(12):3113–3121.
44. Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaforde MF, Weihs TP. The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Arc Oral Biol.* 2007; 52(9):856-860.
45. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall Jr GW, Balooch, M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arc Oral Biol.* 2001;46(2):173-183.
46. Moreno EC, Zahradnik RT. The pore structure of human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1973;18(8):1063-1068
47. Mjör IA, Fejerskov O. *Human Oral Embryology and Histology.* 1. ed. Copenhagen: Munksgaard, 1986.
48. Ge J, Cui FZ, Wang XM, Feng HL. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomater.* 2004;26(2005): 3333-3339.
49. Kidd EAM, Jouyston-Bechal S. *Essentials of Dental Caries.* 2. ed. Londres: Oxford University Press, 1997.

50. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Com Dent Oral Epid*. 1999;27(1):31-40.
51. West NX, Joiner A. Enamel mineral loss. *J Dent*. 2014;42(1):2-11.
52. Ten Cate AR. *Histologia bucal – Desenvolvimento, estrutura e função*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001.
53. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Edu*. 2001;65(9):896-905.
54. Fried D, Featherstone JD, Le CQ, Fan K. Dissolution studies of bovine dental enamel surfaces modified by high-speed scanning ablation with a $\lambda=9.3$ -microm TEA CO(2) laser. *Lasers Surg. Med*. 2006; 38(9):837-845.
55. Shellis RP, Dibdin GH. Enamel microporosity and its functional implications. In: Teafor MF, Smith MM, Ferguson MWJ. *Development, function and evolution of teeth*. New York: Cambridge University Press. 2000:242-251.
56. Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. Dental enamel birefringence for a wide mineral content range and for different immersion media's refractive indexes: an improved mathematical interpretation. *J Mic*. 2009; 223(1):69-75.
57. Dusevich V, Xu C, Wang Y, Walker MP, Gorski JP. Identification of a protein-containing enamel matrix layer which bridges the dentine-enamel junction of adult human teeth. *Arch Oral Biol*. 2012;57(12):1585-1594.
58. Berkovitis BKB, Holland GR, Moxham BJ. Esmalte. In: *Anatomia, embriologia e histologia bucal*. 3ªed. São Paulo: Artmed. 202: 1001-118.
59. Arwill T, Myrberg N, Soremark R. Penetration of radioactive isotopes through aenamel and dentin II. Transfer of ^{22}Na in fresh and chemically treated dental tissues. *Odontologisk Revy*. 1969; 20:47-54.
60. Macena MAS, Leite MLAS, Gouveia CL, Lima TAS, Athayde PAA, Sousa FB. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(6): 568-577.
61. Sousa FB, Soares JD, Vianna SS. Natural enamel caries: a compartive histological study on biochemical volumes. *Caries Res*. 2013;47:183-192.
62. Robinson C, Shore RC, Brookes SW, Strafford S, Wood ER, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit. Ver. Oral Biol. Med*. 2000; 11:481-495.
63. Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth – an in vivo and in vitro study. *J Dent*. 2001;29(5):333-340.
64. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995;9(3):214-230.
65. Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The effect of an experimental 4% Tif4 varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF4 solution on dental erosion in vitro. *Caries Res*. 2008;42(4):269-74
66. Mistry M, Zhu S, Moazzez R, Donaldson N, Bartlett DW. Effect of Model Variables on in vitro Erosion. *Caries Res*. 2015 Nov;49(5):508-14.

67. Carmouze JP. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgar Blucher: FAPESP, 1994. 253 p.
68. Navarro RS. Avaliação da perda mineral do esmalte adjacente a cavidades preparadas com laser de ER, Cr:YSGG e restauradas com diferentes materiais após desafio ácido [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.
69. Azevedo DT. Associação do laser diodo com CPP-ACP/verniz fluoretado na resistência a desmineralização do esmalte dental [tese]. Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP; 2014.
70. Harris DC. Análise Química Quantitativa. 5a ed. Trad. C. A. S. RIEHL & A. W. S GUARIANO. Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, 2001 p.862.
71. Rirattanapong P, Vongsavan K, Surarit R. Effect of soft drinks on the release of calcium from enamel surfaces. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013 Sep;44(5):927-30.
72. Marconi Ma, Lakatos M. Fundamentos da Metodologia Científica. 5. ed. São Paulo: Atlas 2003.
73. Khamverdi Z, Kasraie Sh, Rezaei-Soufi L, Jebeli S. Comparison of the effects of two whitening toothpastes on microhardness of the enamel and a microhybride composite resin: an in vitro study. J Dent (Tehran). 2010 Summer;7(3):139-45.
74. Murakami C, Bönecker M, Corrêa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. Arch Oral Biol 2009; 54(11):997-1001.
75. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pécora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. J Endod. 2011 Mar;37(3):358-62
76. Shribak M. Complete polarization state generator with one variable retarder and its application for fast and sensitive measuring of two-dimensional birefringence distribution. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis. 2011 Mar 1;28(3):410-9.
77. Grissom RJ, Kim JJ: Effect sizes for research.2.ed. New York, Routledge, 2012.
78. Laird NM, Mosteller F: Some statistical methods for combining experimental results. Int J Technol Assess Health Care 1990, 6: 5-30.
79. Cohen J: Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, Lawrence Erlbaum Associates, 1988.
80. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. Eur J Oral Sci. 2003 Oct;111(5):428-33.

81. Dibdin G.H. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res.* 1993;27(2):81-86.
82. Meira KR, de Mattos Brito CS, de Sousa FB. Predicting infiltration of the surface layer of natural enamel caries. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun;60(6):883-93.
83. LeGeros RZ, Tung MS. Chemical stability of carbonate- and fluoride-containing apatites. *Caries Res.* 1983;17(5):419-29.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO 1. Certidão de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

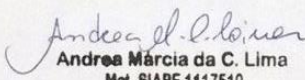


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 1ª Reunião realizada no dia 19/02/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“APLICAÇÃO IN VITRO DE ÁCIDO CÍTRICO NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTÁRIO: ESTUDO DOS EFEITOS DESMINERALIZANTES NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE E DA DENTINA SUBJACENTE”** da pesquisadora Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo. Protocolo 049/15. CAAE: 39013014.2.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prezado voluntário, esta pesquisa tem como título “APLICAÇÃO *IN VITRO* DE ÁCIDO CÍTRICO NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTÁRIO: ESTUDO DOS EFEITOS DESMINERALIZANTES NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE E DA DENTINA SUBJACENTE” e será desenvolvida pela cirurgiã-dentista ISABELLA CAVALCANTE MEDEIROS, mestranda em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação de FÁBIO GALBIATTI DE CARVALHO CARLO professora doutora do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Considerando que, cada vez mais, tem aumentado a ingestão de bebidas energéticas, refrigerantes, sucos e frutas cítricas. O objetivo desse estudo laboratorial é testar a hipótese de que a aplicação *in vitro* do ácido cítrico 1,8% (0,1M) ajustado a pH de 2,27 com NaOH na superfície do esmalte dentário humano proporciona desmineralização no esmalte e na dentina.

A sua colaboração na pesquisa consistirá em doar um dente extraído por razões de saúde identificadas pelo cirurgião-dentista que lhe prestou assistência odontológica. Todas as partes moles (que contêm células, sangue e material genético) dos dentes serão descartadas e não serão usadas. O dente doado ficará guardado com o pesquisador até 3 anos a contar da data de assinatura deste documento. Solicitamos sua autorização para usar, durante o período de 3 (três) anos, o material doado em outros estudos que sejam importantes para desenvolver o tratamento mencionado acima. Após este período de 3 anos, o dente será aquecido a 900° C por duas horas, em seguida triturado até formar um pó e desprezado no sistema de esgotamento sanitário da cidade. Os procedimentos para a realização desta pesquisa respeitarão as diretrizes e normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Sua participação é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição (quando for o caso). Nesta pesquisa, o(a) senhor(a) não poderá se certificar pessoalmente de todas as análises a serem feitas nos laboratórios com o material doado.

Solicito sua permissão para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. O(s) pesquisador(es) estará(ão) à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa, inclusive para informar as conclusões finais.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da
Pesquisa ou Responsável Legal

Assinatura do(a)
Pesquisador(a) Responsável

Assinatura do(a) Pesquisador(a)
Participante

Assinatura da Testemunha (em
caso de analfabetos)

Espaço da
impressão
dactiloscópica

Endereço (Setor de Trabalho) do Pesquisador Responsável: Isabella Cavalcante Medeiros (matrícula UFPB/2014105090), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

Endereço (Setor de Trabalho) do Pesquisador Participante: Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo (matrícula UFPB/Siape 1827375), Departamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba. Telefone para contato: (0xx83) 3216-7251 (Departamento de Clínica e Odontologia Social/CCS/UFPB).

Qualquer dúvida, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB, telefone: (0xx83) 3216-7791. E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

Apêndice B – TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Eu, _____, declaro que estou doando o(s) elemento(s) dentário(s) _____, que foi/foram extraído(s) por indicação terapêutica avaliado pelo cirurgião-dentista que me prestou assistência odontológica, para a pesquisa intitulada “APLICAÇÃO *IN VITRO* DE ÁCIDO CÍTRICO NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTARIO: ESTUDO DOS EFEITOS DESMINERALIZANTES NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE E DA DENTINA SUBJACENTE” que será desenvolvida pela cirurgiã-dentista ISABELLA CAVALCANTE MEDEIROS, mestranda em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação de FABÍOLA GALBIATTI DE CARVALHO CARLO, professora doutora do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Estou ciente de que este(s) dente(s) será(ão) utilizado(s) pelos alunos e pesquisadores da instituição para treinamento acadêmico laboratorial e realização de pesquisas.

_____, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do Doador