

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA PREVENTIVA E INFANTIL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO FOSFOPEPTÍDEO DE CASEÍNA-FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO
(CPP-ACP) NO CONTROLE DA EROÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Autora: Luciana Vilar de Oliveira Diniz
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Franklin Delano Soares

João Pessoa
2011

LUCIANA VILAR DE OLIVEIRA DINIZ

**EFEITO DO FOSFOPEPTÍDEO DE CASEÍNA-FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO
(CPP-ACP) NO CONTROLE DA EROÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, como exigência para a obtenção do título de mestre em Odontologia Preventiva e Infantil.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Franklin Delano Soares Forte

**João Pessoa
2011**

LUCIANA VILAR DE OLIVEIRA DINIZ

**EFEITO DO FOSFOPEPTÍDEO DE CASEÍNA-FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO
(CPP-ACP) NO CONTROLE DA EROSÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPB, como exigência legal para a obtenção do título de mestre em Odontologia Preventiva e Infantil.

Dissertação aprovada em:

Prof. Dr. Franklin Delano Soares Forte (Orientador – UFPB)

Prof. Dr. Fábio Correa Sampaio (Examinador Interno - UFPB)

Prof. Dra. Cintia Regina Tornisiello Katz (Examinador Externo – UPE)

Dedico este trabalho a **Deus**
A quem devo tudo.

Ao meu esposo Marcelo,
Pelo seu amor, pela sua amizade, pela sua compreensão,
pelo seu carinho, pelo seu incentivo que tantas vezes
precisei para não desaminar.
Você é um Presente de Deus na minha vida.
A você todo o meu amor e toda a minha gratidão.

Aos meus pais queridos Judenir e Vera Lúcia,
se contornei obstáculos, se consegui vitórias e se aqui estou,
com certeza, foi porque tenho pais maravilhosos,
que me dão todo apoio e demonstram o melhor exemplo de honestidade,
trabalho, esforço e um amor imensurável por mim.
Minha eterna gratidão.
Amo vocês.

Ao meu irmão Felipe
Pela amizade, companheirismo, carinho, paciência
Quero levar sempre comigo
sua determinação na busca pelos objetivos.
Sou muito feliz por você ser meu irmãozinho.

Aos meus novos irmãos Raoni, Millena, Thiago, Tayza
e meus sobrinhos Maria Mariana, Maria Eduarda, Rafael e Davi,

Aos meus sogros Zenilton e Graça
Por ter me acolhido como filha e
pela nova família que recebi quando vocês entraram na minha vida.

Aos meus avós Amélia e João,
Ao lado de vocês o tempo parece não passar.
Sempre me sentirei aquela criança que espera pela visita aos avós.
Obrigada por todo amor e pelos momentos felizes que tivemos juntos.

A toda a minha família pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

A **Maria** Mãe de Deus e minha Mãe,
por ir sempre à frente me conduzindo a fazer a vontade de Deus.

Prof^a. Dr^a. Andressa Feitosa,
Por ter se disponibilizado em ser minha orientadora,
pelos ensinamentos transmitidos e oportunidades dadas.
O carinho, a atenção e sobretudo a confiança que sempre demonstrou,
deram-me segurança para vencer as dificuldades nas diferentes fases do trabalho.
Você sempre foi a palavra certa na hora certa.

Prof. Dr. Franklin Delano,
Pela preciosa ajuda na co-orientação deste trabalho.
Serei sempre grata pela sua generosidade e disposição para contribuir não só para
a conclusão desta etapa tão importante para mim, mas com ensinamentos que
ficarão para toda a vida.
Muito obrigada!

Aos meus amigos fiéis Vilson e Thayse, por todo amor e cuidado.
Vocês são verdadeiramente anjos em minha vida.

Aos meus colegas de turma
por todos os momentos vividos juntos.

A Camila Helena,
sua amizade foi um presente de Deus para mim neste mestrado.

Aos meus voluntários Marcelo, Andressa, Vilson, Thayse, Priscilla, Jaiza e Julyana
Pela amizade, compreensão, paciência e sobretudo pelo empenho de fazer este
trabalho acontecer junto comigo. A vocês muito obrigada mesmo.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal das Paraíba,
e a todos que a fazem, professores e funcionários,
por terem feito parte do meu processo de amadurecimento.

Ao professor Fábio Sampaio
por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Bucal. A seriedade e motivação
com que trabalha são contagiantes.
Sua presença constitui um imenso benefício à Faculdade de Odontologia da UFPB.

A professora Rosângela Marques,
mais do que agradecer pelo uso do Laboratório de Matérias Dentárias para
realização das análises de rugosidade, agradeço pelo carinho, atenção e
disponibilidade.

Ao professor Severino Jackson
por ter cedido o Laboratório de Solidificação Rápida do
Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba para realização das
medições de microdureza e MEV.

Ao professor Tibério,
por ter se mostrado tão receptivo em me acolher no
Laboratório de Solidificação Rápida e me ajudar com as análises.

Ao professor Joab,
sua contribuição nesta etapa final foi significativa.
Aos funcionários Nemiuzia, Aulus, Marcelino, Mayara, Sérgio, Fábio dos laboratórios
pelos quais passei.

A todos que contribuíram direta e indiretamente
para a conquista de mais esta vitória em minha vida!

**“Bem-aventurada és tu, Maria, entre as mulheres...
Feliz daquela que acreditou que teriam cumprimento
as coisas que lhe foram ditas da parte do Senhor”.**

Lc 1, 42-45

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do CPP-ACP no controle da erosão dentária. Para isso foram realizados dois estudos 1 e 2. (1) O objetivo do estudo 1 foi avaliar *in vitro* o efeito de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária associada ou não à abrasão. Oitenta blocos de esmalte foram distribuídos em 10 grupos (n=8) de acordo com o tipo do produto utilizado: Mi Paste®(G1/G6), Mi Paste Plus®(G2/G7), Sensodyne Pro-Esmalte®(G3/G8), Crest®(G4/G9) e saliva artificial (G5/G10) e do procedimento realizado: erosão seguida de gotejamento com solução do produto (G1-G5) e erosão seguida de abrasão com gotejamento da solução do produto (G6-G10). Os espécimes foram submetidos à simulação da erosão, utilizando um refrigerante à base de cola como agente erosivo. Foram realizados três ciclos erosivos de cinco minutos, sob constante agitação, durante dez dias. A rugosidade superficial (R_a) foi avaliada para quantificar as alterações superficiais do esmalte erodido. Para a avaliação qualitativa do esmalte foi usado o MEV. Houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos G1-G4 em relação ao grupo controle G5 após o desafio erosivo. O mesmo ocorreu entre os grupos G6-G9 e o controle G10 quando a erosão foi seguida da abrasão. Porém, os produtos não diferiram quando foram comparados entre si nas duas condições de erosão. Nas avaliações do MEV observou-se nítida alteração na lisura de superfície de todos os grupos experimentais em relação à superfície hígida em cada espécime. Pode-se concluir que o CPP-ACP e o CPP-ACPF, apresentaram capacidade de reduzir os efeitos deletérios da erosão semelhante aos dentifrícios fluoretados. (2) O objetivo do estudo 2 foi avaliar *in situ* o efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo associado ou não à abrasão. Este estudo apresentou um desenho cruzado e cego em que oito voluntários utilizaram aparelhos intrabucais palatinos contendo seis espécimes. Cada voluntário foi submetido a três períodos experimentais, de sete dias cada, com *wash out* de sete dias entre eles. Em cada período foram observadas três condições de erosão: erosão somente, erosão associada à escovação imediata e erosão associada à escovação após uma hora. A rugosidade superficial (R_a , R_z e R_t) foi avaliada para análise das alterações superficiais. Em todos os espécimes houve incremento de rugosidade no esmalte após os desafios erosivos. Diferença estatística significativa foi encontrada entre os períodos experimentais “sem goma” e “goma com CPP-ACP” quando a erosão foi seguida da escovação imediata: R_z ($p=0,0148$) e R_t ($p=0,036$) e escovação após uma hora: R_a ($p=0,0312$), R_z ($p=0,0264$) e R_t ($p=0,498$). Entre as três condições de erosão em cada período, os valores de rugosidade seguiram sempre o mesmo padrão de apresentação: erosão < erosão seguida de abrasão após uma hora < erosão seguida de abrasão imediata, porém não houve diferença estatística significativa. Os dados sugerem que o uso da goma de mascar com CPP-ACP após a ingestão de bebidas erosivas, contribui para redução da erosão dentária no esmalte, sobretudo quando o desafio erosivo é seguido da abrasão. Assim, conclui-se que o CPP-ACP incorporado em pastas ou em gomas de mascar foi capaz de reduzir os efeitos deletérios da erosão dentária.

Palavras-chave: Erosão; Abrasão; CPP-ACP; Flúor; Dentifrício; Goma de mascar.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of CPP-ACP in dental erosion control. For this purpose two studies. (1) The objective the first study was to evaluate in vitro the effect of pastes containing CPP-ACP and fluoride dentifrice in controlling dental erosion with or without abrasion. Eighty enamel blocks were divided into 10 groups (n = 8) according to the type of product used: MI Paste® (G1/G6), MI Paste Plus® (G2/G7), Sensodyne Pro-Enamel® (G3 / G8), Crest® (G4/G9) and artificial saliva (G5/G10) and the experimental procedure: erosion with dripping with solution of the product (G1-G5) and erosion abrasion with dripping of the solution of the product (G6- G10). The specimens were subjected to simulated erosion using a soft drink as an agent of erosion, for three cycles of erosion of five minutes under constant agitation, for ten days. The surface roughness (Ra) was used to quantify the changes of the enamel surface eroded. For qualitative assessment of enamel was used SEM. There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between groups G1-G4 in the control group G5 after the erosive challenge. The same occurred between groups G6-G9 and G10 when the erosion control was followed by abrasion. However, the products did not differ when they were compared in two conditions of erosion. In the evaluations of the SEM observed change in the surface of all experimental groups compared to healthy surface in each specimen surface. It can be concluded that the CPP-ACP and CPP-ACPF, showed ability to reduce the deleterious effects of erosion similar to fluoride toothpastes. (2) The objective of the second study was to evaluate in situ the effect of CPP-ACP incorporated into a chewing gum in reducing the increase of surface roughness of enamel after being subjected to erosive challenge with or without abrasion. This study presented a blind crossover design in which eight volunteers used intraoral palatal appliances containing six specimens. Each volunteer was subjected to three experimental periods of seven days each, with seven-day wash out between them. In each period were observed three conditions of erosion: erosion only, immediate erosion associated with brushing and erosion associated with brushing after an hour. The surface roughness (Ra, Rz and Rt) was used to analyze the surface changes. In all specimens there was an increase in roughness of enamel after the erosive challenges. Statistically significant difference was found between the experimental periods "no gum" and "gum with CPP-ACP" when erosion was followed by immediate brushing: Rz ($p = 0.0148$) and Rt ($p = 0.036$) and one hour after brushing Ra ($p = 0.0312$), Rz ($p = 0.0264$) and RT ($p = 0.498$). Among the three conditions of erosion in each period, the roughness values always followed the same pattern of presentation: erosion < erosion with abrasion after an hour < erosion with abrasion immediately, but there was no statistically significant difference. The data suggest that the use of chewing gum with CPP-ACP after ingestion of erosive beverages, contributes to reduction of dental enamel erosion, especially when the challenge is followed by the erosive abrasion. Thus, it is concluded that the CPP-ACP incorporated into folders or chewing gum was able to reduce the deleterious effects of dental erosion.

Keywords: Erosion; Abrasion; CPP-ACP; Fluoride; Dentifrice; Chewing gum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Suporte para execução dos cortes.	23
Figura 2: Aparelho de corte de precisão.	23
Figura 3: Disco diamantado dupla face.	23
Figura 4: Verificação da largura do espécime.	23
Figura 5: Politriz Metalográfica.	24
Figura 6: Planificação e polimento dos espécimes.	24
Figura 7: “Stop” metálico para padronização da espessura do bloco de esmalte.	24
Figura 8: Verificação da espessura do espécime.	24
Figura 9: Espécime planificado e polido.	24
Figura 10: Microdurômetro acoplado a um microcomputador.	25
Figura 11: Ponta penetradora tipo Knoop.	25
Figura 12: Soluções de dentifrícios.	26
Figura 13: Ensaio erosivo na mesa agitadora Orbital.	27
Figura 14: Amostras na saliva artificial.	27
Figura 15: Leitura da absorbância de cálcio no Espectrofotômetro.	34
Figura 16: Aparelho intrabucal palatino.	35
Figura 17: Kit contendo os materiais utilizados nas etapas experimentais.	36
Figura 18: Fluxograma ilustrando os períodos experimentais.	36
Figura 19: Imersão dos espécimes no agente erosivo.	38
Figura 20: Abrasão dos espécimes.	39

ARTIGO 1

Figura 1: Médias (erro padrão) de rugosidade ($\pm Ra$, μm) inicial e final dos espécimes de esmalte dentário humano para os diferentes grupos. Resultados do teste t pareado em cada grupo.	49
Figura 2: Imagens do microscópio eletrônico de varredura mostrando o esmalte hígido (controle em cada espécime) e os grupos experimentais submetidos à erosão seguida de gotejamento com os diferentes agentes remineralizantes. (G1) Mi Paste. (G2) Mi Paste Plus. (G3) Pro-Esmalte. (G4) Crest. (G5) Saliva. Fotomicrografias em aumento de X 5000.	50

Figura 3: Imagens do microscópio eletrônico de varredura mostrando o esmalte hígido (controle em cada espécime) e os grupos experimentais submetidos à erosão seguida de abrasão com os diferentes agentes remineralizantes. **(G6)** Mi Paste. **(G7)** Mi Paste Plus. **(G8)** Pro-Esmalte. **(G9)** Crest. **(G10)** Saliva. Fotomicrografias em aumento de X 5000.____51

ARTIGO 2

Figura 1: Médias da concentração de cálcio ($\mu\text{g/mL}$) nos diferentes períodos de medição._____69

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: Distribuição dos grupos. _____ 47

Tabela 2: Valores médios de rugosidade ($\pm$ Ra, μ m) para os espécimes de esmalte dentário humano submetidos à erosão *in vitro* e ao tratamento com diferentes agentes remineralizantes nas diferentes condições. _____ 50

ARTIGO 2

Tabela 1: Médias ($\pm$ dP) das diferenças de rugosidade inicial e final dos três parâmetros estudados (Ra, Rz e Rt) nas diferentes condições de erosão e períodos experimentais. _____ 68

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca ou Ca^{2+} = íons cálcio

CaCl_2 = cloreto de cálcio

CaF_2 = fluoreto de cálcio

CPP-ACP = fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo

$^{\circ}\text{C}$ = Grau Celsius

dP = desvio padrão

g = grama

KCl = cloreto de potássio

KHN = número de dureza Knoop

KH_2PO_4 = hidrogeno fosfato de potássio

KNO_3 = Nitrato de Potássio

MEV = microscópio eletrônico de varredura

min = minuto

mL = mililitro

mM = milimol

mm = milímetro

mm/s = milímetros por segundo

N = newtons

NaCl = cloreto de sódio

NaF = fluoreto de sódio

NaSCN = tiocianato de sódio

Na_2HPO_4 = monoidrogenofosfato de sódio

NH_4Cl = cloreto de amônio

nm = nanômetro

pH = potencial hidrogeniônico

ppm = parte por milhão

Ra = Rugosidade média

R_t = distância entre o pico mais alto e o vale mais profundo medido em um perfil de rugosidade.

R_z = média entre os cinco picos mais altos e os cinco vales mais profundos no percurso de medição.

s = segundos

μL = microlitro

μm = micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Estudo 1: Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária	22
3.1.1 Obtenção dos dentes humanos	22
3.1.2 Obtenção dos espécimes de esmalte humano	22
3.1.3 Avaliação da microdureza superficial e seleção dos espécimes	25
3.1.4 Protocolo <i>in vitro</i>	25
3.1.5 Avaliação da rugosidade	28
3.1.6 Análise da Morfologia pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
3.1.7 Análise dos dados	29
3.2 Estudo 2: Efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar no controle da erosão sobre o esmalte dentário	30
3.2.1 Delineamento experimental	30
3.2.2 Obtenção dos dentes humanos e dos espécimes	30
3.2.3 Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos espécimes	31
3.2.4 Seleção dos voluntários	31
3.2.5 Avaliação do fluxo salivar	32
3.2.6 Determinação da concentração de cálcio	33
3.2.7 Preparo dos dispositivos intrabuciais	34
3.2.8 Protocolo <i>in situ</i>	36
3.2.9 Avaliação da Rugosidade	40
3.2.10 Análise dos dados	40
3.3 Aspectos Éticos	41

ARTIGO 1 - Avaliação in vitro do efeito de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária	42
ARTIGO 2 - Avaliação in situ do efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar no controle da erosão sobre o esmalte dentário	59
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	77
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	85
APÊNDICES	86

1 INTRODUÇÃO

A melhoria nas condições de saúde bucal da população em decorrência do aumento das ações preventivas tem acarretado uma mudança nos hábitos de higiene bucal e, conseqüentemente, um declínio na prevalência da cárie no Brasil (ANTUNES; NARVAI, 2010). Por outro lado, tem sido relatado um aumento na prevalência de outra alteração bucal, a erosão dentária (MANGUEIRA; SAMPAIO; OLIVEIRA, 2009; MURAKAMI et al., 2011).

A erosão dentária é definida como uma patologia crônica caracterizada pela dissolução localizada dos tecidos dentários, decorrente de uma exposição prolongada a ácidos sem o envolvimento de bactérias (IMFELD, 1996). Esse processo resulta da atuação de ácidos cujos valores de pH são inferiores a 4,5, valores abaixo das zonas de pH crítico tanto para a hidroxiapatita (em torno de 5,5) quanto para a apatita fluoretada (em torno de 4,5), causando a dissolução destes minerais presentes no esmalte, originando uma lesão superficial (FEATHERSTONE; LUSSI, 2006).

Os ácidos que desencadeiam a erosão podem ter origem intrínseca e extrínseca (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004). Os fatores intrínsecos resultam de situações em que o suco gástrico está presente com freqüência na boca, abrangendo pacientes portadores de anorexia nervosa, bulimia e refluxos recorrentes (HOLBROOK et al., 2009). A diminuição do fluxo salivar também pode ter influência no aparecimento da lesão, visto que a liberação de saliva tem importante papel no tamponamento dos ácidos (AMAECHI; HIGHAM, 2001; LUSSI et al., 2006; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

Os fatores extrínsecos estão relacionados aos hábitos dietéticos através da ingestão de alimentos e bebidas ácidas, medicamentos e produtos advindos do ambiente de trabalho, como cloro das piscinas, gases expelidos em indústrias de baterias e fertilizantes que diminuem o pH bucal, facilitando o desenvolvimento do processo (ZERO, 1996; LUSSI et al., 2006).

Além da redução do pH, outros fatores podem estar envolvidos nesse processo de desgaste, tornando complexa a redução ou remoção dos seus agentes desencadeantes. Esses fatores são químicos, como o tipo do ácido (valores de pKa), a adesão do produto à superfície dentária, propriedades quelantes e

conteúdos de cálcio, fosfato e flúor; fatores comportamentais como hábitos alimentares, estilo de vida, consumo excessivo de ácidos e por fim, fatores biológicos que são taxa de fluxo, capacidade tampão, composição da saliva, formação da película adquirida, composição dos dentes e anatomia dental e dos tecidos moles (LARSEN; NYVAD, 1999; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

O aumento no consumo de bebidas prontas, que apresentam constituintes ácidos em sua composição, tem sido relatado principalmente entre crianças e adolescentes (MANGUEIRA; SAMPAIO; OLIVEIRA, 2009). O marketing das indústrias destas bebidas geralmente é direcionado para a camada mais jovem da população, sendo os refrigerantes associados à aceitação social, à beleza e ao sucesso (HUNTER et al., 2000). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), houve um aumento de 490% no consumo de refrigerantes no período de 1995 a 2003 no Brasil (IBGE, 2004). Dentre os mais consumidos estão os refrigerantes à base de cola (WONGKHANTEE et al., 2006; RIOS et al., 2006).

Sabe-se ainda que fatores comportamentais como a frequência e o tempo de ingestão de alimentos e bebidas ácidas potencializam os riscos ao desenvolvimento de lesões de erosão (DUGMORE; ROCK, 2004). Clinicamente, o tempo de contato dos dentes com os ácidos é mais importante que a quantidade de bebidas ingeridas (ZERO, 1996). As bebidas carbonatadas, por exemplo, são usualmente mantidas na boca até que as bolhas se dissipem, fazendo com que os refrigerantes tenham um contato com os dentes bem maior do que as bebidas não carbonatadas (WONGKHANTEE et al., 2006).

Alguns estudos demonstraram ainda que os elementos dentários expostos a ação de bebidas ácidas torna o esmalte mais susceptível à perda de estrutura por distúrbios mecânicos, como a atrição e, principalmente, a abrasão (ATTIN; BUCHALLA; PUTZ, 2001; JAEGGI; LUSSI, 1999; RANJITKAR et al., 2009). A atrição é um desgaste da estrutura dentária resultante de contatos dentários. Esse fenômeno tem importante papel no desgaste dentário quando associado à erosão, porém sua ocorrência pelos contatos oclusais normais é menos preocupante, pois pode naturalmente ser compensada pelo processo de erupção juntamente ao crescimento do osso alveolar e a deposição apical de cemento. Já a abrasão é caracterizada pela perda de estrutura dentária por ação da escova ou outro objeto, localizada principalmente na face vestibular, mais especificamente na região cervical (ADDY; SHELLIS, 2006).

A combinação entre erosão e abrasão tem despertado a atenção dos pesquisadores, pois as pessoas escovam seus dentes após as refeições que incluem o consumo de comidas e bebidas erosivas. Esse comportamento desencadeia um aumento do desgaste do esmalte previamente atacado por agentes erosivos (ATTIN; BUCHALLA; PUTZ, 2001; GANSS et al., 2007; RANJITKAR et al., 2009; RIOS et al., 2006). Por outro lado, se houver ação remineralizante da saliva por um determinado tempo, o esmalte desmineralizado pela bebida ácida torna-se mais resistente a escovação (RIOS et al., 2006). Por essa razão, alguns autores sugerem que a escovação seja realizada após um período de no mínimo 60 minutos, para permitir a remineralização pela ação da saliva (ATTIN et al., 2001; JAEGGI; LUSSI, 1999; LUSSI et al., 2006; RIOS et al., 2006).

O processo erosivo pode ser dividido em duas fases. Na fase inicial, ocorre uma desmineralização parcial da superfície resultando em um amolecimento do esmalte. Nesta fase o processo de remineralização é teoricamente possível, já que o tecido remanescente pode atuar como um andaime. Na segunda fase, uma perda mais avançada de mineral é observada e a camada superficial de esmalte totalmente perdida não sendo possível a remineralização (LUSSI; JAEGGI; ZERO 2004).

Deste modo, têm-se verificado na literatura, a preocupação em se tentar encontrar medidas preventivas que possam minimizar os efeitos deletérios da erosão sobre a estrutura dentária, como a estimulação do fluxo salivar (HUGUES et al., 2000; RIOS et al., 2006). Vários estudos têm confirmado a importância da saliva na compensação e neutralização dos ácidos sobre as superfícies dos dentes (AMAECHI; HIGHAM, 2001; HUGUES et al., 2000; RIOS et al., 2006; WETTON et al., 2007). O fluxo salivar, a capacidade tampão, a supersaturação de íons cálcio e fosfato, a película adquirida e a propriedade de lubrificação constituem mecanismos de defesa salivar contra os ataques ácidos, diminuindo a desmineralização e favorecendo a remineralização (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; O'SULLIVAN; CURZON, 2000). Contudo, o poder de atuação da saliva torna-se reduzido quando as bebidas erosivas são ingeridas com alta frequência, não diluídas conforme as instruções do fabricante, acondicionadas em mamadeiras e ingeridas durante o sono (HALL et al., 1999).

A estimulação salivar por meio de gomas de mascar sem açúcar após o consumo de bebidas ácidas também tem apresentado um papel protetor em relação

à erosão dentária (AMAECHI; HIGHAM, 2001). Rios et al. (2006), demonstraram a partir de um estudo *in situ* que o uso de chicletes foi capaz de minimizar o desenvolvimento da erosão seguido de abrasão em esmalte.

O flúor também tem sido apontado por vários estudos realizados com esmalte dentário como sendo um elemento capaz de reduzir a perda mineral causada por agentes erosivos (FAN, SUN, MORADIAN-OLDAK, 2009; GANSS et al., 2004; HARA et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008; POGGIO et al., 2009; REYNOLDS et al., 2008; WEGEHAUPT, ATTIN, 2010).

O mecanismo de ação do flúor frente a desafios erosivos não está totalmente elucidado. A camada de fluoreto de cálcio, que é depositada na superfície dentária após a aplicação tópica de flúor, fornece minerais adicionais para serem dissolvidos durante o ataque ácido, criando um efeito protetor e inibidor da erosão (GANSS et al., 2004). Além disso, quanto maior a concentração de flúor nos produtos e mais frequente as aplicações destes sobre as superfícies dentárias, maior a resistência ao desenvolvimento de lesões de erosão e abrasão (MAGALHÃES et al., 2008).

Entre os produtos que servem como meios para aplicação tópica de flúor estão os géis, soluções e dentifrícios. Os dentifrícios são considerados veículos acessíveis de flúor que, apesar de apresentarem baixa concentração deste, têm seu principal benefício na frequência de aplicação através da escovação (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Entretanto, devido às controvérsias novos estudos são necessários para investigar se a aplicação tópica de flúor é uma medida eficaz na prevenção e controle das lesões de erosão.

Em busca de outros meios para prevenção da erosão, outros agentes, como cálcio e fosfato, vêm sendo estudados na tentativa de aumentar a supersaturação destes compostos ao redor do dente. Estes íons estão presentes na estrutura do esmalte dentário e a supersaturação destes na saliva e no biofilme potencializam o processo de remineralização (REYNOLDS et al., 2003; REYNOLDS et al., 2008). O cálcio e o fosfato podem ser encontrados em altas concentrações no leite e no queijo, alimentos conhecidos como protetores contra a desmineralização dentária (GRENBY et al., 2001).

Estudos recentes têm mostrado que a caseína, uma proteína derivada do leite bovino, apresentou efeito remineralizador do esmalte dentário após desafios ácidos (CAI et al., 2007; CAI et al., 2009; POGGIO et al., 2009; RANJITKAR et al., 2009; REYNOLDS et al., 2008; TANTBIROJN et al., 2008). Esse efeito ocorre quando

enzimas presentes na cavidade bucal produzem peptídeos a partir da proteína do leite, formando os fosfopeptídeos de caseína (CPP) que estabilizam o cálcio e o fosfato mantendo-os numa forma amorfa, ou seja, biologicamente ativa, conhecida como ACP. Dessa forma, o CPP localiza e estabiliza o cálcio e o fosfato amorfos na superfície do dente, no biofilme e na saliva, mantendo altos gradientes de concentrações desses íons no esmalte dentário, facilitando a remineralização. Esse mecanismo confere ao nanocomplexo fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), propriedade anti-cariogênica observada em estudos *in vitro* e *in situ* (CAI et al., 2009; KUMAR; ITTAHGARUN; KING, 2008; REYNOLDS et al., 2003; REYNOLDS et al., 2008) além de promover a redução da erosão dentária (POGGIO et al., 2009; RANJITKAR et al. 2009 e TANTBIROJN et al. 2008). O CPP também estabiliza o fosfato de cálcio amorfo e flúor (ACPF), que tem apresentado um maior efeito remineralizante em lesões de cárie quando comparados com o CPP-ACP sozinho (REYNOLDS et al., 2003; LENONN et al., 2006; COCHRANE et al., 2008).

Os efeitos da remineralização pelo leite bovino e pela saliva após a erosão do esmalte humano por refrigerantes à base de cola foram evidentes e a saliva apresentou menor grau de remineralização do que o leite (GEDALIA et al., 1991) e do que o queijo (LEWINSTEIN; OFEK; GEDALIA, 1993). Entretanto, além da caseína não possuir um paladar agradável aos humanos, a ingestão desses alimentos após o consumo de bebidas ácidas não é comum, o que torna seu valor prático limitado (TAHMASSEMBI et al., 2006).

O CPP-ACP tem sido incorporado com sucesso em produtos de saúde bucal como pastas, mousse, bochechos, gomas de mascar sem açúcar e em alimentos. Alguns estudos na literatura relatam a ação desses compostos frente a desafios erosivos (POGGIO et al., 2009; RANJITKAR et al., 2009; TANTBIROJN et al., 2008), porém nenhum estudo foi realizado com a aplicação tópica do fosfopeptídeo de caseína com cálcio e fosfato amorfos incorporado em gomas de mascar no controle da erosão dentária.

O presente estudo se propõe a verificar ação do CPP-ACP na prevenção e controle da erosão dentária associada ou não à abrasão. Com isso, os profissionais poderão dispor de mais um dado clínico para conscientização e prevenção da população quanto aos maus hábitos alimentares e suas conseqüências, sobretudo para a população que mais consome bebidas carbonatadas tipo cola, ou seja, crianças e adolescentes.

Essa dissertação está apresentada no formato de artigos científicos de autoria da aluna, modelo regulamentado pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba. Os artigos intitulados a seguir estão compilados dentro da formatação exigida pelo periódico *Caries Research* para o qual serão enviados para publicação.

Artigo 1: Avaliação *in vitro* do efeito de pastas contendo cpp-acp e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária.

Artigo 2: Efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar no controle da erosão sobre o esmalte dentário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) no controle da erosão dentária.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito de duas pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACP com adição de flúor na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo associado ou não à abrasão pela escovação.
- Avaliar a morfologia da superfície do esmalte dentário exposto aos diferentes produtos após desafio erosivo seguido ou não da abrasão, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar *in situ* o efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar, na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo, associado ou não à abrasão pela escovação.
- Determinar a concentração do íon cálcio na saliva após o uso de uma goma de mascar contendo CPP-ACP nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo 1: Avaliação *in vitro* do efeito de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária

3.1.1 Obtenção dos dentes humanos

Neste estudo foram utilizados 40 dentes humanos terceiros molares não-irrompidos, extraídos por razões ortodônticas ou por impactação. A seleção da amostra da presente pesquisa deu-se em função desse grupo de dentes não ter sido exposto a desafios ácidos na cavidade bucal. Os dentes foram obtidos na Clínica de Cirurgia II do Curso de Odontologia da UFPB após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos doadores (APÊNDICE – A).

Após a extração, os dentes coletados foram limpos através de raspagem com curetas (Duflex 55G/SS, White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) para remoção dos restos dos tecidos periodontais aderidos na superfície dentária, e armazenados em solução tamponada de formol a 10%, em temperatura ambiente, por um período de 15 dias (SRINIVASAN; KAVITHA; LOGANATHAN, 2010). Posteriormente os dentes foram examinados com auxílio de uma lupa de 5x de aumento para averiguação de possíveis trincas, rachaduras, cáries e alterações do esmalte, situações nas quais foram excluídos da amostra.

3.1.2 Obtenção dos espécimes de esmalte humano

Para obtenção dos espécimes de esmalte humano, os terceiros molares tiveram suas faces proximais analisadas para o planejamento dos futuros cortes. Com o auxílio de um paquímetro digital foi delimitada a área de corte situada logo acima da junção amelocementária. A escolha desta região se justifica por ser uma área plana e sem sulcos. Em seguida, as raízes dos elementos dentários foram fixadas em resina acrílica (JET Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e acopladas a um suporte de metal (Figura 1) que foi encaixado em um aparelho de corte de precisão Labcut 1010 Low Speed Diamond Saw (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA) (Figura 2).

Figura 1: Suporte para execução dos cortes.



Figura 2: Aparelho de corte de precisão.



Os cortes foram executados com um disco diamantado dupla face XL 12205 (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA) (Figura 3) originando 120 blocos de esmalte de 4 mm x 4 mm (Figura 4). De cada dente foram obtidos em média três espécimes, sendo assim necessária a aquisição de 40 dentes.

Figura 3: Disco diamantado dupla face.



Figura 4: Verificação da largura do espécime.



Em seguida, foi realizada a planificação do esmalte e da dentina. Os espécimes foram fixados em discos de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura) e o conjunto (disco + dente) adaptado em uma Politriz Metalográfica PSK-2V (Skill-tec Comércio e Manutenção Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com um sistema múltiplo para polimento automático de seis espécimes, objetivando o paralelismo entre as superfícies polidas e o disco de acrílico (Figuras 5 e 6). A politriz foi acionada em baixa velocidade, com dois pesos padrão de 86g. Durante o processo de planificação da dentina, a superfície do esmalte foi voltada para baixo e fixada no disco de acrílico com cera pegajosa (Kota, Ind. e Com. Ltda, São Paulo,

SP, Brasil), com cuidado para que a cera ficasse apenas ao redor do espécime. A planificação foi realizada utilizando-se uma lixa de granulação 600 (3M, São Paulo, SP, Brasil), sob constante refrigeração. Para padronização da espessura do bloco de esmalte em 2 mm foram utilizados “stops” de metal sobre o disco de acrílico (Figuras 7 e 8).

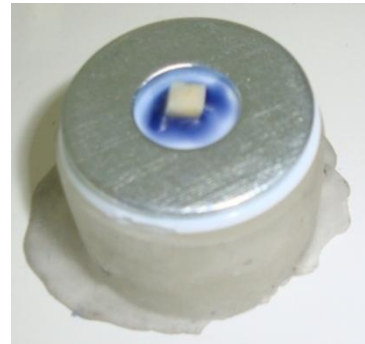
Figura 5: Politriz Metalográfica.



Figura 6: Planificação e polimento dos espécimes.



Figura 7: “Stop” metálico para padronização da espessura do bloco de esmalte.



Posteriormente, os blocos foram novamente fixados ao disco de acrílico, agora com a superfície do esmalte exposta para sua planificação. Para tanto, foram utilizadas lixas de granulação decrescente 600, 1000, 1200, 2000 e 2500 (3M, São Paulo, SP, Brasil) sob constante refrigeração. Para o polimento, foram utilizados feltros umedecidos com uma suspensão diamantada de 1 μ m (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA). Este procedimento teve por objetivo remover ranhuras do esmalte, permitindo uma padronização dos espécimes. Por fim, os espécimes foram fixados com cera pegajosa em suportes de acrílico (2mm), numerados e encaminhados para realização das medições de microdureza (Figura 9).

Figura 8: Verificação da espessura do espécime.



Figura 9: Espécime planificado e polido.



3.1.3 Avaliação da microdureza superficial e seleção dos espécimes

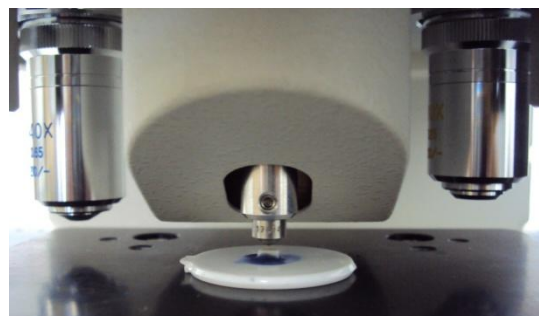
A avaliação dos valores de microdureza inicial foi utilizada para seleção dos blocos de esmalte. A aferição da microdureza foi realizada com um microdurômetro (HMV-2000/ Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) acoplado a um microcomputador com software específico para análise das amostras (Figura 10). Para tanto, foi utilizado um penetrador diamantado piramidal do tipo KNOOP, com carga estática de 25g, aplicada por dez segundos (KATO et al., 2010) (Figura 11). Em cada espécime foram realizadas cinco indentações, sendo excluídos do estudo todos os espécimes que estivessem com um valor médio de microdureza 10% acima ou abaixo da média de todos os blocos (RIOS et al., 2008). A média de microdureza de todos os espécimes foi de $360 \pm 4,9$ KHN.

Após a medição, os blocos de esmalte selecionados tiveram metade das superfícies polidas protegidas por esmalte cosmético (Colorama - ultra duração, Cosbra Cosméticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) para realização dos testes de rugosidade.

Figura 10: Microdurômetro acoplado a um microcomputador.



Figura 11: Ponta penetradora tipo Knoop.



3.1.4 Protocolo *in vitro*

Foram utilizados 80 blocos de esmalte dentário humano (4mm x 4mm x 2mm), com valor médio de microdureza de $360 \pm 4,9$ KHN. Os espécimes foram distribuídos em 10 grupos (n=8) de acordo com o tipo do produto utilizado: pasta ou dentifrício e o tipo de procedimento realizado: erosão seguida de gotejamento com solução do produto ou erosão seguida de abrasão com gotejamento da solução do

produto. Os produtos testados foram as pastas de uso profissional: MI Paste (Fosfopeptídeo de Caseína - Fosfato de Cálcio Amorfo, pH 6,94, lote 100720I, GC Corporation, Tokyo, Japan) e MI Paste Plus (Fosfopeptídeo de Caseína – Fosfato de Cálcio Amorfo e Flúor, 900ppm NaF, pH 7,19, lote 100723I, GC Corporation, Tokyo, Japan); e os dentifrícios de uso diário Sensodyne Pro-Esmalte (1425ppm NaF e Nitrato de Potássio, pH 7,12, lote pro142v, GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brasil); e Crest (1100ppm NaF, pH 7,5, lote 8354GR, Procter & Gamble, Cincinnati, USA). A solução de cada produto foi preparada na proporção de 1 parte do produto/ 3 partes de água deionizada em peso (ten Cate et al., 2006) (Figura 12). O grupo controle foi imerso apenas em saliva artificial durante o presente estudo.

Os dez grupos foram então distribuídos da seguinte forma:

Procedimento I: erosão seguida de gotejamento com solução do produto (G1 - G5)

- G1 - erosão com solução de MI Paste®;
- G2 - erosão com solução de MI Paste Plus®;
- G3 - erosão com solução de Sensodyne Pro-Esmalte®;
- G4 - erosão com solução de Crest® (controle positivo);
- G5 - erosão e armazenamento em saliva artificial (controle negativo);

Procedimento II: erosão seguida de abrasão com solução do produto (G6 - G10)

- G6 - erosão seguida de abrasão com solução de MI Paste®;
- G7 - erosão seguida de abrasão com solução de MI Paste Plus®;
- G8 - erosão seguida de abrasão com solução de Sensodyne ProEsmalte®;
- G9 - erosão seguida de abrasão com solução de Crest®;
- G10 - erosão seguida de abrasão sem solução e armazenamento em saliva artificial (controle negativo).

Figura 12: Soluções de dentifrícios.



Os espécimes foram submetidos à simulação de erosão, utilizando o refrigerante à base de cola (Coca-Cola®, pH 2,6, Coca-Cola Company, Spal, Porto Real, RJ, Brasil) como agente erosivo. A escolha da Coca-Cola® deu-se em função de um estudo de prevalência realizado no município de João Pessoa - PB, que verificou o uso da Coca-Cola® com bastante frequência entre as crianças de 6 e 12 anos de idade (MANGUEIRA, SAMPAIO, OLIVEIRA, 2009).

Os blocos de esmalte foram submetidos a três ciclos erosivos de cinco minutos no refrigerante, sob agitação (Orbital Shaker), em horários predeterminados (8:00; 12:00; 16:00 horas), durante 10 dias (Figura 14). No restante do tempo, os dentes foram armazenados em recipientes contendo saliva artificial (Figura 15) e acondicionados em estufa a 37°C, a fim de aproximar ao máximo as condições reais da cavidade bucal. A fórmula da saliva artificial utilizada foi 58 g de NaCl; 0,17g de CaCl_2 ; 0,16g de NH_4Cl ; 1,27g de KCl; 0,16 g de NaSCN; 0,33g KH_2PO_4 ; 0,34 g de Na_2HPO_4 e pH ajustado para 7,0 (LENNON et al., 2006). A saliva foi trocada diariamente e o refrigerante a cada imersão. O pH foi verificado após cada troca, com auxílio do pHmetro (420 A; Orion Research, Boston, USA).

Figura 13: Ensaio erosivo na mesa agitadora Orbital.

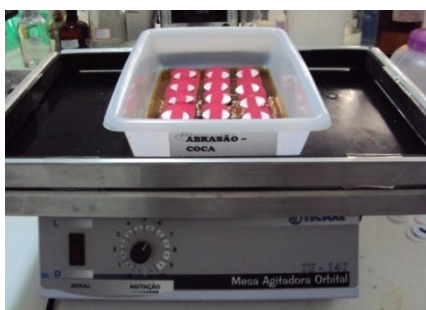


Figura 14: Amostras na saliva artificial.



Após cada desafio erosivo, os blocos foram lavados em água destilada por 20 segundos e os grupos G1 a G4 foram gotejados com a solução de creme dental correspondente a cada grupo. Nestes grupos, a solução de creme dental foi gotejada sobre os espécimes com auxílio de uma pipeta graduada automática (LABEMATE HTL LAB, Warsaw, Poland), sendo dispensadas 0,5mL de solução a cada 30 segundos. O grupo G-5 foi submetido aos desafios erosivos, lavados com água destilada por 20 segundos e recolocados na saliva artificial sem receber o gotejamento de solução.

Já os grupos G6 – G10, após cada desafio erosivo, foram lavados com água destilada por 20 segundos, gotejados com a solução do creme dental correspondente de cada grupo e em seguida escovados por 30 segundos (GANSS et al., 2007). A solução de creme dental foi gotejada sobre os espécimes com auxílio de uma pipeta graduada automática, sendo dispensadas 0,5mL de solução a cada 10 segundos durante a escovação.

Após a realização dos dois procedimentos (gotejamento e escovação com solução de creme dental) foi realizada uma nova lavagem com água destilada por 20 segundos para que os blocos pudessem voltar à saliva artificial até o próximo desafio erosivo.

Para a realização dos testes de escovação foi utilizado um suporte para acoplar as escovas elétricas (Oral B Cross Action™ Power®, Procter & Gamble, Loma Florida, México) ajustadas para a aplicação de carga de 200g em cada espécime, gerando em torno de 1,96 N (WIEGAND et al., 2007).

3.1.5 Avaliação da rugosidade

Para avaliação da rugosidade dos espécimes foram realizadas seis medições com um rugosímetro (Mitutoyo ver. 3.00, SurfTest-301, Japão) sendo três na superfície do esmalte hígido (rugosidade inicial) e em três no esmalte tratado (rugosidade final). Antes do início das mensurações do experimento, o rugosímetro foi calibrado com um dispositivo padrão. A avaliação da rugosidade foi realizada no Laboratório de Materiais Dentários do Núcleo de Biomateriais do Centro de Ciências da Saúde da UFPB.

O rugosímetro foi regulado para uma superfície de amostragem de 1,25mm, com valores de corte de 0,25mm (cut-off- λ_c) em uma velocidade de 0,1mm/s (ISO 97) para obtenção dos valores de rugosidade média (Ra). O parâmetro Ra corresponde ao valor da média aritmética de todas as distâncias absolutas do perfil de rugosidade traçado em relação a sua linha média (FIELD; WATERHOUSE; GERMAN, 2010).

3.1.6 Análise da Morfologia pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observação da morfologia do esmalte, após os testes da microdureza e rugosidade da superfície, dois corpos de prova representativos de cada grupo foram selecionados e armazenados em ambiente seco para serem preparados para visualização no MEV. Inicialmente, os espécimes foram fixados em portas-amostra de alumínio e recobertos com uma camada de ouro na sua superfície e em seguida analisados. Esta análise foi realizada no Núcleo de Pesquisas em Materiais do Centro de Tecnologia da UFPB. Fotomicrografias digitais do MEV foram obtidas em uma resolução de 5000X. A análise dos dados foi descritiva, levando-se em consideração as alterações qualitativas na morfologia do esmalte submetido aos diferentes tratamentos, comparando-os com a estrutura hígida do esmalte presente em cada espécime avaliado.

3.1.7 Análise dos dados

Os resultados foram avaliados verificando-se primeiramente a normalidade dos dados estatísticos através do teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias entre os grupos examinados com o teste de Levene. Uma vez que esses critérios foram satisfeitos, foi aplicada a Análise de Variância para comparação da rugosidade entre os diferentes produtos em cada procedimento, seguida do teste de comparação de médias de Tukey para as comparações individuais. O teste t foi usado para avaliar se houve diferença entre os procedimentos, gotejamento e escovação, após o desafio erosivo em cada produto. O teste t pareado foi utilizado para comparar os valores de rugosidade final e inicial em cada grupo. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

A análise dos dados pela microscopia eletrônica de varredura foi descritiva, verificando-se as alterações qualitativas na morfologia da estrutura do esmalte em função dos diferentes desafios erosivos e/ou abrasivos, considerando a estrutura hígida do esmalte protegida em cada espécime.

3.2 Estudo 2: Efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar no controle da erosão sobre o esmalte dentário

3.2.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi dividido em duas etapas. A primeira foi laboratorial, na qual foram obtidos os blocos de esmalte a partir de dentes humanos extraídos, que foram fixados em um aparelho intrabucal palatino, para que, posteriormente, fossem utilizados pelos voluntários.

A segunda etapa corresponde ao desenvolvimento do estudo *in situ*, cruzado e cego, em que 8 voluntários foram submetidos a três períodos experimentais de sete dias cada, com período de descanso (*wash out*) de sete dias entre eles. Nos períodos experimentais foram testados: o uso de uma goma de mascar contendo CPP-ACP, o uso de uma goma de mascar sem o CPP-ACP e, por fim, a não utilização de goma de mascar. Em cada um desses períodos foram observadas as condições de erosão, erosão associada à abrasão imediata e erosão associada à abrasão após uma hora. No início do estudo, todos os voluntários foram distribuídos entre os períodos experimentais através de sorteios e após o *wash out*, cada voluntário foi submetido ao outro período experimental, de forma que ao final todos foram submetidos aos três períodos propostos. Por fim, foi realizada a análise das alterações da superfície do esmalte dentário através do estudo da rugosidade superficial. A concentração de cálcio após o uso da goma de mascar contendo CPP-ACP em cada voluntário nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos foi determinada por espectrofotometria.

3.2.2 Obtenção dos dentes humanos e dos espécimes

Neste estudo foram utilizados 70 dentes humanos terceiros molares não-irrompidos. A obtenção dos dentes e dos espécimes de esmalte, bem como a seleção da amostra, foi realizada com os mesmos critérios já descritos no artigo 1.

3.2.3 Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos espécimes

A avaliação da microdureza inicial foi utilizada como critério de seleção dos espécimes seguindo os mesmos critérios do estudo 1. Foram utilizados 144 blocos de esmalte dentário humano (4mm x 4mm x 2mm), com valor médio de microdureza de $368 \pm 5,98$ KHN.

3.2.4 Seleção dos voluntários

O estudo foi realizado com oito voluntários adultos e saudáveis, alunos da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, com idades variando entre 22 e 40 anos, que aceitaram participar deste estudo após explicação de todo o experimento através da Carta de Esclarecimento ao Voluntário (APÊNDICE – B) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE – C).

Todos os voluntários residem em João Pessoa, onde o sistema de abastecimento de água não é fluoretado (SAMPAIO et al., 2010). Um exame intrabucal confirmou que cada voluntário tinha pelo menos 22 dentes naturais e saudáveis, ou seja, dentes sem atividade de cárie e sem doença periodontal. Os critérios de exclusão considerados na definição dos voluntários aptos foram ainda: fumar, apresentar desgaste acentuado nos dentes, ter aplicado flúor recentemente em consultórios odontológicos, ter usado nos últimos dois meses medicamentos que afetem o fluxo salivar, apresentar doenças sistêmicas auto-imunes, xerostomia, menopausa, diabetes tipo I, má-nutrição, problemas gastro-esofágicos, ser usuário de próteses ou aparelhos ortodônticos (SHELLIS et al., 2011).

3.2.5 Avaliação do fluxo salivar

A coleta de saliva foi realizada sempre no período da manhã. Os voluntários foram orientados a ficar de jejum duas horas antes da realização desse procedimento (JAEGLI; LUSI, 1999). Foram avaliados fluxo salivar não estimulado, estimulado, pH de ambas as salivas e capacidade-tampão da saliva estimulada (SHELLIS et al., 2011).

3.2.5.1 Avaliação do fluxo salivar não estimulado

Na medição do fluxo salivar não estimulado, o voluntário foi confortavelmente acomodado em uma cadeira sem estímulos olfativos ou visuais onde permaneceu em repouso com a cabeça levemente inclinada para baixo. Durante dez minutos, a saliva foi dispensada passivamente em um recipiente plástico calibrado que foi pesado antes e depois da coleta. Considerando a densidade da saliva como um, a determinação do fluxo salivar não estimulado foi calculado dividindo a diferença entre o peso inicial e final dos recipientes pelo tempo de dez minutos, que resultou no volume e na velocidade de liberação da saliva em mL/min. Foram considerados aptos os voluntários com fluxo maior que 0,2 mL/min (MANDEL, 1989).

3.2.5.2 Avaliação do fluxo salivar estimulado

Para estimulação do fluxo salivar, os voluntários mascaram constantemente um tubo de látex de aproximadamente 2 cm preso a um pedaço de fio dental de 30 cm. A saliva produzida no primeiro minuto foi deglutida, sendo coletada em recipientes plásticos previamente pesados, toda a saliva produzida nos 5 minutos seguintes. Após a coleta, os recipientes foram novamente pesados e a taxa do fluxo salivar foi estimada dividindo-se o volume da saliva (1g correspondendo a 1 mL) pelo tempo de coleta. O fluxo salivar foi calculado então em mL/min. Foram

considerados aptos os voluntários com fluxo salivar acima de 1,0 mL/min (MANDEL, 1989).

3.2.5.3 Análise de pH

A medição do pH das salivas não estimulada e estimulada foi realizada em uma amostra de 1 mL, imediatamente após a coleta, com auxílio de um pHmetro (420 A; Orion Research, Boston, USA) previamente calibrado. Para calibração, foram utilizadas soluções tampão padrão com pH 7 e 4.

3.2.5.4 Avaliação da capacidade tampão da saliva estimulada

A capacidade tampão foi determinada adicionando-se 1,0 mL de saliva com 3,0 mL de solução de ácido clorídrico 5 mM, em triplicata, em tubos de ensaio com tampa. Em seguida, a tampa dos tubos foi removida para eliminação do gás carbônico e após dez minutos o pH final foi verificado.

3.2.6 Determinação da concentração de cálcio

Para análise da concentração de cálcio, a saliva de todos os voluntários foi coletada em diferentes tempos após o uso do chiclete contendo CPP-ACP. Essa goma de mascar foi utilizada por 20 minutos, em seguida foi descartada e nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos seguintes, a saliva dos participantes foi coletada durante 3 minutos.

Posteriormente, 1 mL de saliva foi transferida para tubos Eppendorf e levados para uma microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 g. O sobrenadante da saliva de cada voluntário utilizado para determinação da concentração de cálcio. A saliva estimulada com tubos de látex foi utilizada como *baseline*.

Neste estudo, a determinação da concentração do cálcio baseou-se na reação dos íons cálcio (Ca^{2+}) com o reagente Arsenazo III (2,2' - [1,8-Diidroxi-3,6-isulphonaphthylene-2,7-bisazo] acid-bisbenzenearsonic) para formar um complexo de cor púrpura intenso. A absorção do complexo Ca-Arsenazo III foi medida em 640 nm por um espectrofotômetro de absorção de luz visível (FLUOstar OPTIMA - BMG Labtech, Alemanha) (Figura 15).

Figura 15: Leitura da absorbância de cálcio no Espectrofotômetro



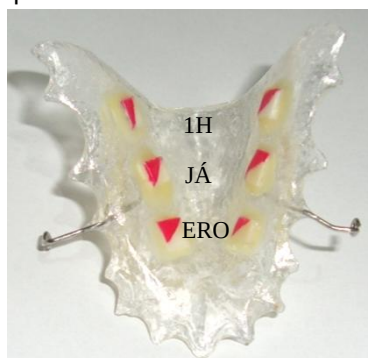
Para a curva de calibração foram utilizados cinco padrões de cálcio em duplicata, com concentrações pré-determinadas de 5, 10, 25, 50 e 100ppm. As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 1000 ppm de Ca (Orion ionplus®, Beverly, USA) e difundidas em duplicata da mesma forma que as amostras de saliva a serem analisadas. A quantidade de soluções pipetadas em cada poço da microplaca foi: 80 μL de água deionizada, 20 μL de padrão ou de amostra e 100 μL de Arsenazo III. As leituras foram realizadas imediatamente após a pipetagem. Foram utilizadas pipetas automáticas com uma ponteira descartável para cada amostra para que não ocorresse contaminação entre as amostras a serem avaliadas.

3.2.7 Preparo dos dispositivos intrabucais

Para a construção dos dispositivos intrabucais, os voluntários tiveram os seus arcos dentários superiores moldados com alginato para confecção do modelo de gesso e do aparelho intrabucal palatino em resina acrílica. Nesse dispositivo

intrabucal, foram realizados seis nichos (4mm x 4mm x 2mm), três de cada lado (esquerdo e direito) para a fixação de seis blocos de esmalte. Os blocos foram distribuídos através de sorteios entre os voluntários para cada período experimental, no decorrer do estudo (Figura 17).

Figura 16: Aparelho intrabucal palatino.



Durante a entrega do aparelho, cada voluntário recebeu um Kit contendo: uma lista de instruções (APÊNDICE – D), um diário de pesquisa (APÊNDICE – E), sete garrafas de 500 mL de Coca-Cola® (pH 2,6, Coca-Cola Company, Spal, Porto Real, RJ, Brasil); duas embalagens com oito unidades de chiclete de menta sem CPP-ACP (Trident®, Cadbury Adams, Bauru, SP, Brasil) ou duas embalagens com oito unidades de chiclete com CPP-ACP sabor menta (Trident Total®, Cadbury Adams, Bauru, SP, Brasil); um copo de vidro de 125mL; um estojo plástico para guardar o dispositivo intrabucal; uma escova dental elétrica (Oral B® Cross Action™ Power, Procter & Gamble, Loma Florida, México); uma bisnaga de dentifrício não fluoretado (Malvatrickids®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); um frasco com solução de clorexidina a 0,12% (Periogard, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., S. B. do Campo, SP, Brasil, pH ajustado para 6,8); uma bisnaga de dentifrício fluoretado (Crest®, 1100ppm, Procter & Gamble, Cincinnati, USA) e porções de gaze (Figura 18). Ao final de cada etapa os kits foram recolhidos e reorganizados para a etapa seguinte. O creme dental e a clorexidina foram repostos conforme demanda.

Figura 17: Kit contendo os materiais utilizados nas etapas experimentais.



3.2.8 Protocolo *in situ*

Oito voluntários previamente selecionados foram sorteados e distribuídos entre os três períodos experimentais cruzados: (1) sem goma de mascar; (2) goma de mascar sem CPP-ACP; (3) goma de mascar com CPP-ACP, de modo que ao final do estudo todos os voluntários foram submetidos aos três períodos experimentais (Figura 20). O sorteio se deu a partir de números sequenciais mantidos em envelopes opacos, não translúcidos e fechados (randomização). Cada período experimental foi realizado em um intervalo de sete dias, com um tempo de descanso (*wash out*) entre eles de sete dias. Este período de descanso foi necessário para eliminar o efeito residual do período experimental correspondente a goma de mascar com CPP-ACP (CAI et al., 2007; CAI et al., 2009).

Figura 18: Fluxograma ilustrando os períodos experimentais.



O dispositivo intrabucal foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene, para permitir a formação da película adquirida (HANING et al., 2007).

Em cada período experimental foram estudadas três condições de erosão: erosão somente, erosão associada à abrasão imediata e erosão associada à abrasão após uma hora. Desta forma, nos três períodos experimentais foram testados nove grupos, distribuídos da seguinte forma:

1º Período: sem goma de mascar

- G1 – erosão provocada por bebida ácida;
- G2 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação imediata;
- G3 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação realizada após uma hora.

2º Período: goma de mascar sem CPP-ACP

- G4 – erosão provocada por bebida ácida;
- G5 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação imediata;
- G6 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação realizada após uma hora.

3º Período: goma de mascar com CPP-ACP

- G7 – erosão provocada por bebida ácida;
- G8 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação imediata;
- G9 – erosão provocada por bebida ácida associada à abrasão pela escovação realizada após uma hora.

Para uma melhor identificação dos procedimentos que foram realizados em cada grupo, os dispositivos intrabucais foram sinalizados. As fileiras correspondentes aos grupos 1, 4 e 7 que foram expostas apenas à ação do agente erosivo foram identificadas com o símbolo “1º”. As fileiras dos grupos 2, 5 e 8 que foram escovadas imediatamente após o desafio erosivo apresentaram o símbolo

“2º”. Por fim, as fileiras correspondentes aos grupos 3, 6, 9 que foram escovadas uma hora após o desafio erosivo foram indicadas com “3º”.

Quatro vezes ao dia, em horários previamente estabelecidos (8:00; 12:00; 16:00 e 20:00 horas), os voluntários retiraram o aparelho e o imergiram em um copo contendo 125 mL do refrigerante (Figura 21), utilizado como agente erosivo durante 5 minutos (MAGALHÃES et al., 2008; RIOS et al., 2006; RIOS et al., 2008). A cada dia foi utilizada uma nova garrafa de 500mL, mantida a temperatura ambiente.

Figura 19: Imersão dos espécimes no agente erosivo.



Após cada imersão dos espécimes na bebida ácida, o dispositivo intrabucal foi removido para realização da escovação imediata nos grupos 2, 5 e 8, correspondentes a cada fase (Figura 22). Para essa etapa utilizou-se um dentifrício sem flúor e escova dental elétrica (Oral B CrossAction™ Power®) por trinta segundos, equivalente a 166 oscilações por segundo (GANSS et al., 2007). Em seguida o aparelho foi lavado em água corrente até que os restos visíveis de creme dental fossem removidos e retornou à boca onde permaneceu por uma hora. Ao final deste tempo, o aparelho foi retirado da boca para realização da escovação dos grupos 3, 6 e 9 (RIOS et al., 2006). Para padronização da escovação, antes de iniciar o experimento os voluntários receberam instruções quanto à força (2N) e quantidade de dentifrício (0,3g) a ser colocada na escova (GANSS et al., 2007). Os voluntários foram orientados a realizar a própria higiene bucal com o dentifrício Crest (1100ppm) e só recolocar o aparelho na boca dez minutos após este procedimento.

Figura 20: Abrasão dos espécimes.



No segundo período experimental, além da realização dos procedimentos descritos acima, os voluntários utilizaram uma goma de mascar. Após a realização da escovação imediata, o aparelho voltou à boca e o voluntário mascou, por vinte minutos, um tablete de chiclete sabor menta sem sacarose (Trident[®]). Os voluntários foram orientados a executar a mastigação de forma constante e uniforme para os dentes dos hemiarcos direito e esquerdo. Quarenta minutos depois do término da utilização da goma de mascar, ou seja, uma hora após a imersão, os voluntários retiraram o aparelho para realizar a escovação após uma hora.

Para o terceiro período experimental foi seguido o mesmo protocolo do segundo período experimental, diferindo apenas no tipo da goma de mascar. Foi utilizada uma goma de mascar sabor menta sem sacarose, contendo CPP-ACP (Trident Total[®]).

Os voluntários foram orientados a não remover o dispositivo intrabucal durante o dia, a não ser nos horários das refeições ou quando estivessem realizando os procedimentos de higiene bucal. Durante estes períodos, os aparelhos foram mantidos no estojo plástico, envolto por gaze umedecida em água deionizada. Além disso, foram orientados a não ingerir outros tipos de bebidas, exceto água quando estivessem utilizando o dispositivo.

Uma vez por dia, antes de dormir, o dispositivo foi imerso em solução de clorexidina a 0,12% por dois minutos para evitar acúmulo de biofilme dentário. Nos períodos de wash-out, os aparelhos foram higienizados e desinfetados com clorexidina a 0,12%, pH 6,8 por 30 minutos (RIOS et al., 2008). O esmalte de unha, responsável pela proteção de metade da área dos espécimes, foi então removido para as análises finais e um novo bloco de esmalte foi colocado no dispositivo para a próxima etapa.

3.2.9 Avaliação da Rugosidade

Para avaliação da rugosidade dos espécimes foram realizadas seis medições com um rugosímetro (Mitutoyo ver. 3.00, SurfTest-301, Japão) sendo três na superfície do esmalte hígido (rugosidade inicial) e em três no esmalte tratado (rugosidade final). Antes do início das mensurações do experimento, o rugosímetro foi calibrado com um dispositivo padrão.

O rugosímetro foi regulado para uma superfície de amostragem de 1,25mm, com valores de corte de 0,25mm (cut-off- λ_c) em uma velocidade de 0,1mm/s (ISO 97). Assim, foram obtidos os valores de rugosidades nos parâmetros Ra, Rz e Rt. O parâmetro Ra corresponde aos valores de rugosidade média que pode ser definida como o desvio médio de um perfil de sua linha média, sobre o comprimento medido. O parâmetro Rz é a distância média entre os cinco picos (elevações) mais altos e os cinco vales (depressões) mais profundos no percurso de medição. Já o parâmetro Rt é definido como sendo a distância entre o pico mais alto e o vale mais profundo medido em um perfil de rugosidade (NOVASKI, 1994; FIELD; WATERHOUSE; GERMAN, 2010).

3.2.10 Análise dos dados

Os resultados foram avaliados verificando-se primeiramente a normalidade dos dados estatísticos através do teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias entre os grupos examinados com o teste de Levene. Uma vez que esses critérios foram satisfeitos, foi aplicada a análise de Variância Univariada (ANOVA one-way) para a avaliação da rugosidade, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey para as comparações individuais. O teste t pareado foi utilizado para comparar os valores de rugosidade final e inicial em cada grupo. A correlação entre os parâmetros Ra, Rz e Rt foi avaliada pelo teste de Correlação de Pearson. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 14.0.

3.3 Aspectos Éticos

O presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderlei e obteve parecer favorável, sob o protocolo 463/10 (ANEXO). Todos os voluntários participantes da pesquisa preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE – C), elaborado de acordo com os preceitos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde, através do qual foram informados dos objetivos do estudo, dos benefícios que este pôde trazer à população e também da possibilidade de abandono da pesquisa pelos mesmos em qualquer momento, sem que houvesse nenhum ônus ao voluntário.

ARTIGO 1**AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DE PASTAS CONTENDO CPP-ACP E DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS NO CONTROLE DA EROSÃO DENTÁRIA****RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro o efeito de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios fluoretados no controle da erosão dentária associada ou não à abrasão. Oitenta blocos de esmalte foram distribuídos em 10 grupos (n=8) de acordo com o tipo do produto utilizado: Mi Paste®(G1/G6), Mi Paste Plus®(G2/G7), Sensodyne Pro-Esmalte®(G3/G8), Crest®(G4/G9) e saliva artificial (G5/G10) e do procedimento realizado: erosão seguida de gotejamento com solução do produto (G1-G5) e erosão seguida de abrasão com gotejamento da solução do produto (G6-G10). Os espécimes foram submetidos à simulação da erosão utilizando um refrigerante à base de cola como agente erosivo. Foram realizados três ciclos erosivos de cinco minutos no refrigerante, sob constante agitação, durante dez dias. A rugosidade superficial (Ra) foi usada para quantificar as alterações superficiais do esmalte erodido. Para a avaliação qualitativa do esmalte foi usado o MEV. Houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos G1-G4 em relação ao grupo controle G5 após o desafio erosivo. O mesmo ocorreu entre os grupos G6-G9 e o controle G10 quando a erosão foi seguida da abrasão. Porém, os produtos não diferiram quando foram comparados entre si nas duas condições de erosão ($p>0,05$). Nas avaliações do MEV, observou-se nítida alteração na lisura de superfície de todos os grupos experimentais em relação à superfície hígida em cada espécime. Pode-se concluir que o CPP-ACP e o CPP-ACP associado ao flúor apresentaram capacidade de reduzir os efeitos deletérios da erosão semelhante aos dentifrícios fluoretados de uso diário.

Palavras-chave: Erosão. Abrasão. CPP-ACP. Flúor. Dentifrício.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in vitro the effect of pastes containing CPP-ACP and fluoride dentifrice in controlling dental erosion with or without abrasion. Eighty enamel blocks were divided into 10 groups ($n = 8$) according to the type of product used: MI Paste® (G1/G6), Mi Paste Plus® (G2/G7), Sensodyne Pro-Enamel® (G3 / G8), Crest® (G4/G9) and artificial saliva (G5/G10) and the experimental procedure: erosion with dripping with solution of the product (G1-G5) and erosion abrasion with dripping of the solution of the product (G6-G10). The specimens were subjected to simulated erosion using a soft drink as an agent of erosion for three cycles of five minutes, with constant agitation, for ten days. The surface roughness (R_a) was used to quantify the changes of the enamel surface eroded. For the qualitative assessment of enamel was used SEM. There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between groups G1-G4 in the control group G5 after the erosive challenge. The same occurred between groups G6-G9 and G10 when the erosion control was followed by abrasion. However, the products did not differ when they were compared in two conditions of erosion ($p > 0.05$). In the evaluations of the SEM, we observed change in the enamel surface of all experimental groups compared to healthy surface in each specimen. It can be concluded that the CPP-ACP and CPP-ACP associated with fluoride showed ability to reduce the deleterious effects of erosion similar to the daily use of fluoride toothpastes.

Keywords: Erosion. Abrasion. CPP-ACP. Fluoride. Dentifrice.

INTRODUÇÃO

A melhoria nas condições de saúde bucal da população em decorrência do aumento das ações preventivas tem acarretado uma mudança nos hábitos de higiene oral e, conseqüentemente, um declínio na prevalência da cárie no Brasil [Antunes e Narvai 2010]. Por outro lado, tem sido relatado um aumento na prevalência de outra alteração bucal, a erosão dentária [Mangueira et al., 2009; Murakami et al., 2011].

A erosão dentária é definida como uma patologia crônica caracterizada pela dissolução localizada dos tecidos dentários, decorrente de uma exposição prolongada a ácidos sem o envolvimento de bactérias [Imfeld, 1996]. Os ácidos que desencadeiam a erosão podem ter origem intrínseca e extrínseca [Zero, 1996; Lussi et al., 2004; Amaechi e Higham, 2005]. Dentre os fatores extrínsecos estão os hábitos dietéticos através da ingestão de alimentos e bebidas ácidas que diminuem o pH bucal, facilitando o desenvolvimento desse processo [Larsen e Nyvad, 1999; Lussi et al., 2006; Wongkhantee, et al., 2006].

Além da redução do pH, outros fatores podem estar envolvidos nesse processo de desgaste, tornando complexa a remoção e redução dos seus fatores desencadeantes. Dentre eles estão a capacidade tampão, o fluxo salivar, o conteúdo de cálcio e fósforo, o teor de flúor, o tipo do ácido [Larsen e Nyvad, 1999; Hughes et al., 2000; Lussi et al., 2004; Hooper et al., 2007] e, por fim, a duração e frequência do agente ácido em contato com a superfície do dente [Dugmore e Rock, 2004].

Após a ingestão de alimentos, normalmente os indivíduos exercem uma força mecânica por meio da escovação para prevenir o desenvolvimento da cárie dentária. Entretanto, se houver componentes ácidos na dieta, esta pode desencadear o processo da erosão e o desgaste será potencializado pela escovação [Attin et al., 2001; Eisenburger et al., 2003]. Como medida preventiva, alguns autores preconizam o adiamento da escovação para permitir que a saliva exerça ação remineralizadora sobre o esmalte erodido, resultando em maior resistência a abrasão [Attin et al., 2001; Rios et al., 2006; Ranjitkar et al., 2009].

O fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) tem apresentado bons resultados na remineralização de lesões de cárie e erosão [Reynolds et al., 2003; Reynolds et al., 2008; Tantbirojn et al., 2008; Poggio et al., 2009; Ranjitkar et al., 2009]. Este nanocomplexo consiste em fosfopeptídeos de

caseína (CPP) que localizam e estabilizam o cálcio e o fosfato na superfície do dente, no biofilme e na saliva, mantendo-os numa forma amorfa, ou seja, biodisponível, conhecida como ACP. Dessa forma, são mantidos altos gradientes de concentrações desses íons no esmalte dentário, facilitando a remineralização [Reynolds et al., 2003; Kumar et al., 2008; Cai et al., 2009]. O CPP também estabiliza o fosfato de cálcio amorfo e flúor (ACPF), que tem apresentado um maior efeito remineralizante em lesões de cárie quando comparados com o CPP-ACP sozinho [Reynolds et al., 2008; Srinivasan et al., 2010].

O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro o efeito de duas pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACP com adição de flúor em relação a dois dentifrícios fluoretados em diferentes concentrações, na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo associado ou não à abrasão pela escovação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderlei da Universidade Federal da Paraíba e obteve parecer favorável, sob o protocolo 463/10. Os dentes foram obtidos na Clínica de Cirurgia II do Curso de Odontologia da UFPB após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos doadores.

Preparação dos espécimes

Neste estudo foram utilizados 30 dentes humanos terceiros molares não-irrompidos, extraídos por razões ortodônticas ou por impactação. Após a extração, os dentes coletados foram limpos através de raspagem com curetas para remoção dos restos dos tecidos periodontais aderidos na superfície dentária e armazenados em solução tamponada de formol a 10%, em temperatura ambiente, por um período de 15 dias [Srinivasan et al., 2010]. Posteriormente, cada dente foi examinado com auxílio de uma lupa de 5x de aumento para averiguação de possíveis trincas, rachaduras, cáries e alterações do esmalte, situações nas quais foram excluídos da amostra.

Os terceiros molares tiveram suas faces proximais cortadas com um disco diamantado dupla face XL 12205 (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA), originando blocos de esmalte de 4 mm x 4 mm x 2 mm. A planificação do esmalte dos espécimes foi realizada em uma Politriz Metalográfica PSK-2V (Skill-tec Comércio e Manutenção Ltda, São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se lixas de granulação decrescente 600, 1000, 1200 e 2000 (3M, São Paulo, SP, Brasil) sob constante refrigeração. Para o polimento, foram utilizados feltros umedecidos com uma suspensão de diamante de 1 μ m (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA).

A seleção dos espécimes foi realizada pelos valores de microdureza superficial KNOOP (HMV-2000/ Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Para tanto, foram realizadas cinco medições em cada corpo de prova (25g, 10s), obtendo-se um valor médio de $360 \pm 4,9$ KHN [Kato et al., 2010]. Após a medição, os blocos selecionados tiveram metade das suas superfícies polidas protegidas por esmalte cosmético para que assim cada espécime tivesse seu próprio controle. Em seguida, os espécimes foram imersos por 24 horas em saliva artificial a 37°C. A fórmula da saliva artificial utilizada foi 58 g de NaCl; 0,17g de CaCl₂; 0,16g de NH₄Cl; 1,27g de KCl; 0,16 g de NaSCN; 0,33g KH₂PO₄; 0,34 g de Na₂HPO₄ e pH ajustado para 7,0 (LENNON et al., 2006).

Delineamento do estudo

Oitenta blocos de esmalte dentário humano foram distribuídos em 10 grupos (n=8) de acordo com o tipo do produto utilizado: pasta/dentifrício e do procedimento realizado: erosão seguida de gotejamento com solução do produto/erosão seguida de abrasão com gotejamento da solução do produto (Tabela 1). Os produtos testados foram as pastas de uso profissional: Mi Paste® (Fosfopeptídeo de Caseína – Fosfato de Cálcio Amorfo, pH 6,94, lote 100720I, GC Corporation, Tokyo, Japan) e MI Paste Plus® (Fosfopeptídeo de Caseína – Fosfato de Cálcio Amorfo e Flúor, 900ppm NaF, pH 7,19, lote 100723I, GC Corporation, Tokyo, Japan); e os dentifrícios de uso diário Sensodyne Pro-Esmalte® (1425ppm NaF e KNO₃Nitrato de Potássio, pH 7,12, lote pro142v, GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brasil); e Crest® (1100ppm NaF, pH 7,5, lote 8354GR, Procter & Gamble, Cincinnati, USA). Cada um destes produtos foi diluído na proporção de 1 parte do produto/ 3 partes de água

deionizada em peso [ten Cate et al., 2006]. A saliva artificial foi utilizada como grupo controle nos dois tipos de procedimento.

Tabela 1: Distribuição dos grupos.

Erosão + Produto	Erosão + Produto + Abrasão
G1- erosão + MI Paste [®]	G6- erosão + MI Paste [®] + abrasão
G2- erosão + MI Paste Plus [®]	G7- erosão + MI Paste Plus [®] + abrasão
G3- erosão + Sensodyne ProEsmalte [®]	G8- erosão + Sensodyne ProEsmalte [®] + abrasão
G4- erosão + Crest [®] (controle positivo)	G9 - erosão + Crest [®] (controle positivo) + abrasão
G5- erosão + saliva (controle negativo)	G10- erosão + saliva (controle negativo) + abrasão

Os espécimes foram submetidos à simulação da erosão, utilizando o refrigerante à base de cola (Coca-Cola[®], pH 2.6, Coca-Cola Company, Spal, Porto Real, RJ, Brasil) como agente erosivo. Foram realizados três ciclos erosivos de cinco minutos no refrigerante, sob constante agitação (no agitador Orbital Shaker), em horários predeterminados (8:00, 12:00 e 16: 00h), durante 10 dias. No restante do tempo, os blocos de esmalte foram armazenados em recipientes contendo saliva artificial e acondicionados em estufa a 37°C, a fim de aproximar ao máximo as condições reais da cavidade bucal. A saliva foi trocada diariamente e o refrigerante a cada imersão. A medição de pH foi realizada após cada troca (pHmetro 420 A, Orion Research, Boston, USA).

Após cada desafio erosivo, os blocos foram lavados em água destilada por 20s e os grupos G1 – G4 foram gotejados com solução de creme dental por 3 min, com o produto correspondente a cada grupo. Nestes grupos, a solução de creme dental foi gotejada sobre os espécimes com auxílio de uma pipeta graduada automática (LABEMATE HTL LAB, Warsaw, Poland), sendo dispensadas 0,5mL de solução a cada 30 s. O grupo G-5 foi submetido aos desafios erosivos, lavados com água destilada por 20 s e recolocados na saliva artificial sem receber o gotejamento de solução. Já os grupos G6 – G10, após cada desafio erosivo, foram lavados com água destilada por 20 s, gotejados com a solução do creme dental correspondente de cada grupo e, em seguida, escovados por 30 s. A solução de creme dental foi gotejada sobre os espécimes, sendo dispensadas 0,5mL de solução a cada 10 s durante a escovação.

Após a realização dos procedimentos foi realizada uma nova lavagem com água destilada por 20 s para que os blocos pudessem voltar à saliva artificial até o próximo desafio erosivo.

Para a realização dos testes de escovação foram utilizadas escovas elétricas (Oral B CrossAction™ Power®, Procter & Gamble, Loma Florida, México) ajustadas para a aplicação de carga de 200g em cada espécime, gerando em torno de 1,96 N [Wiegand et al., 2007].

Avaliação da rugosidade

Para aferição das medidas de rugosidade superficial foram realizadas três leituras na superfície do esmalte hígido (rugosidade inicial) e três leituras no esmalte tratado (rugosidade final). O rugosímetro (Mitutoyo ver. 3.00, SurfTest-301, Japão) foi regulado para uma superfície de amostragem de 1,25mm, com valores de corte de 0,25mm (cut-off- λ_c) em uma velocidade de 0,1mm/s (ISO 97) para obtenção dos valores de rugosidade média (Ra).

Análise da Morfologia pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observação da morfologia da superfície do esmalte, após os testes da microdureza e rugosidade da superfície, dois corpos de prova representativos de cada grupo foram selecionados e armazenados em ambiente seco para visualização no MEV. Inicialmente, as amostras foram fixadas em portas-amostra de alumínio e recobertas com uma camada de ouro na sua superfície e em seguida analisados. Fotomicrografias digitais foram obtidas em uma resolução de 5000X.

Análise estatística

Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogênea (teste de Levene). O teste t pareado foi utilizado para comparar os valores de rugosidade inicial e final de cada grupo. Os testes ANOVA one-way seguido do Tukey foram usados para as comparações entre os produtos em cada procedimento. Por fim, o teste t foi usado para comparar os procedimentos em cada produto. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

A análise dos dados pela microscopia eletrônica de varredura foi descritiva, verificando-se as alterações qualitativas na morfologia da estrutura do esmalte em função dos diferentes desafios erosivos e/ou abrasivos, considerando a estrutura hígida do esmalte protegida em cada espécime.

RESULTADOS

As médias e o desvio padrão das leituras de rugosidade superficial (Ra) inicial e final de cada grupo estão apresentados na figura 1. O teste t pareado mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na comparação dessas medições em todos os grupos, mostrando que houve incremento de rugosidade no esmalte após os desafios erosivos, sobretudo quando estes foram seguidos da abrasão.

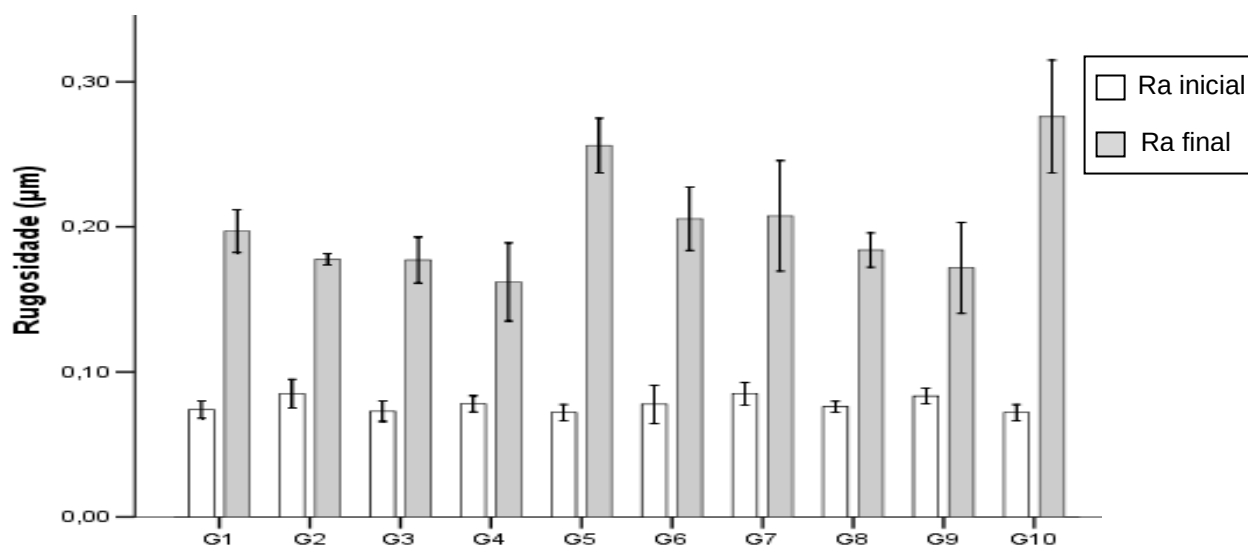


Figura 1: Médias (erro padrão) de rugosidade ($\pm$ Ra, μm) inicial e final dos espécimes de esmalte dentário humano para os diferentes grupos.

A tabela 2 mostra o incremento de rugosidade (Ra, μm) obtido dos espécimes de esmalte submetidos ao desafio erosivo nos diferentes tratamentos. A Análise de Variância (ANOVA) revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$) testou cada grupo individualmente mostrando que houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com os diferentes cremes dentais (G1-G4) em relação ao grupo controle (G5) após o desafio erosivo seguido de gotejamento. O mesmo ocorreu entre os cremes dentais (G6-G9) e o controle (G10) quando a erosão foi seguida da abrasão. Porém, nenhum dos cremes dentais testados apresentou diferença

estatística significativa quando comparados entre si nas duas condições de erosão. Não foi observada diferença estatística significativa quando se comparou o efeito entre os tratamentos com gotejamento e escovação em cada creme dental.

Tabela 2: Valores médios de rugosidade ($\pm Ra$, μm) para os espécimes de esmalte dentário humano submetidos à erosão *in vitro* e ao tratamento com diferentes agentes remineralizantes nas diferentes condições.

Agente	Rugosidade Superficial (μm)	
	Erosão + Gotejamento	Erosão + Abrasão
Mi Paste [®]	$0,12 \pm 0,02^{Aa}$	$0,13 \pm 0,03^{Aa}$
Mi Paste Plus [®]	$0,10 \pm 0,01^{Aa}$	$0,12 \pm 0,04^{Aa}$
Pro-Esmalte [®]	$0,11 \pm 0,01^{Aa}$	$0,11 \pm 0,02^{Aa}$
Crest [®]	$0,09 \pm 0,02^{Aa}$	$0,09 \pm 0,02^{Aa}$
Saliva	$0,18 \pm 0,02^{Bb}$	$0,19 \pm 0,03^{Bb}$

Letras maiúsculas indicam comparação entre colunas e letras minúsculas entre linhas. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Nas avaliações do MEV (figuras 2 e 3), observou-se uma nítida diferença na lisura de superfície de todos os grupos experimentais em relação à superfície dos espécimes que haviam sido protegidas com esmalte cosmético (esmalte hígido). Os espécimes dos diferentes grupos apresentaram alterações superficiais em diferentes intensidades. Nos grupos submetidos à erosão seguida de abrasão foi possível observar uma maior exposição dos primas de esmalte.

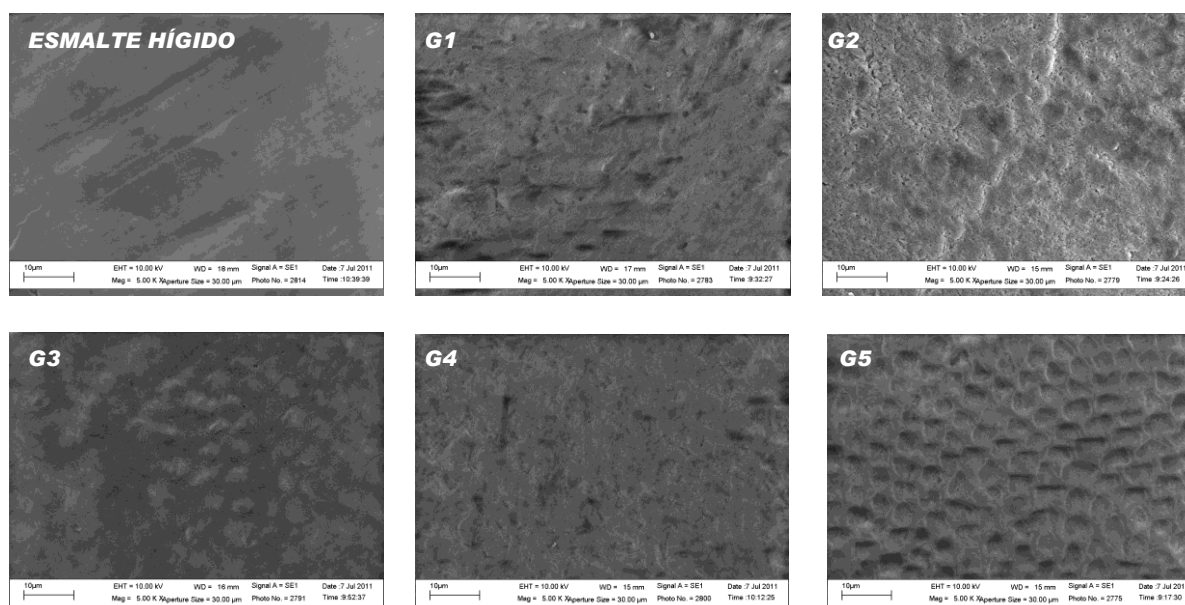


Figura 2: Imagens do microscópio eletrônico de varredura mostrando o esmalte hígido (controle em cada espécime) e os grupos experimentais submetidos à erosão seguida de gotejamento com os diferentes agentes remineralizantes. **(G1)** Mi Paste. **(G2)** Mi Paste Plus. **(G3)** Pro-Esmalte. **(G4)** Crest. **(G5)** Saliva. Fotomicrografias em aumento de X 5000.

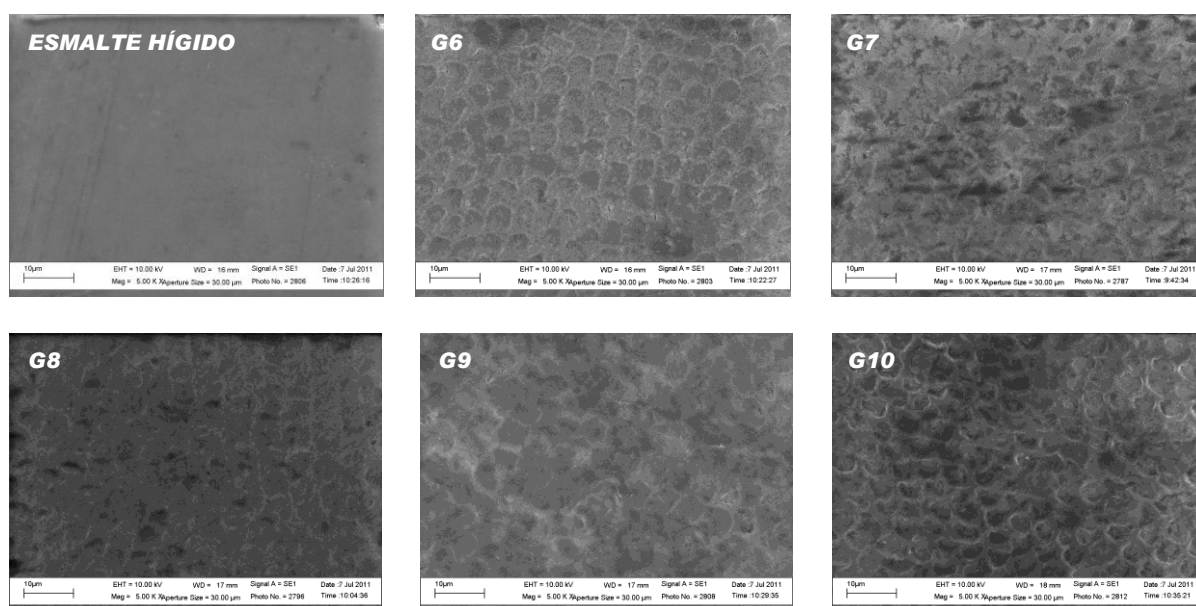


Figura 3: Imagens do microscópio eletrônico de varredura mostrando o esmalte hígido (controle em cada espécime) e os grupos experimentais submetidos à erosão seguida de abrasão com os diferentes agentes remineralizantes. **(G6)** Mi Paste. **(G7)** Mi Paste Plus. **(G8)** Pro-Esmalte. **(G9)** Crest. **(G10)** Saliva. Fotomicrografias em aumento de X 5000.

DISCUSSÃO

O aumento na prevalência das lesões de erosão, principalmente em crianças e adolescentes, tem sido associado ao consumo de alimentos e bebidas ácidas [Mangueira et al., 2009; Murakami et al., 2011]. Neste sentido, este estudo se propôs a avaliar estratégias práticas que possam ser utilizadas para o controle e prevenção do desenvolvimento dessas lesões. Os cremes dentais são considerados veículos acessíveis de agentes remineralizantes que têm como seu principal benefício a frequência de aplicação através da escovação [Lennon et al., 2006]. No presente estudo, nenhum produto testado foi capaz de impedir completamente a erosão, porém quando os grupos expostos aos cremes dentais foram comparados aos grupos imersos apenas em saliva artificial seu efeito protetor pôde ser constatado.

Apesar da existência de uma variedade de testes que podem ser utilizados para quantificar alterações das superfícies dentárias em estudos in vitro, a rugosidade média (Ra, média aritmética) ainda é um dos parâmetros mais utilizados. Uma limitação do uso do Ra é que o seu valor não contempla as características de textura da superfície em estudo, apresentando apenas informações sobre altura (picos) e profundidade (vales) da superfície em intervalos regulares [Field et al.,

2010]. No presente estudo, a análise qualitativa foi realizada no microscópio eletrônico de varredura, a qual mostrou as alterações das superfícies do esmalte hígido e tratado de cada grupo.

O mecanismo de remineralização do CPP-ACP está relacionado à supersaturação dos íons cálcio e fosfato em sua forma amorfa (biodisponível) na superfície do dente, o que confere a estes produtos um potencial anticariogênico [Shen et al., 2001; Reynolds et al., 2003; Kumar et al., 2008; Reynolds et al. 2008] e anti-erosivo [Tantbirojn et al., 2007; Poggio et al., 2009; Ranjitkar et al., 2009; Srinivasan et al., 2010; Wegehaupt e Attin, 2010; White et al., 2011]. Porém, a forma pela qual este agente reduz o desgaste erosivo nos dentes ainda não está totalmente esclarecida [Ranjitkar et al., 2009]. Sabe-se que, ao contrário do que ocorre no processo de remineralização das lesões de cárie, onde há um crescimento dos cristais de hidroxiapatita no interior das lesões [Reynolds et al., 2003], a superfície erodida pode ser reparada por deposição de mineral na zona porosa [Eisenburger et al., 2001].

Neste estudo, os grupos (G1 e G6) tratados com o creme dental Mi Paste® contendo o CPP-ACP foram capazes de reduzir o incremento de rugosidade quando comparados com os grupos que foram tratados apenas com saliva. Entretanto, quando o CPP-ACP foi associado com 900 ppm de flúor, os valores de rugosidade encontrados foram inferiores aos do CPP-ACP sozinho. Estudos recentes *in vitro* e *in situ* têm demonstrado o efeito sinérgico do CPP-ACP associado ao flúor na remineralização de lesões de cárie [Reynolds et al., 2003; Lenonn et al., 2006; Cochrane et al., 2008].

A adição de flúor aos cremes dentais também tem sido relatada como uma medida benéfica na prevenção da erosão [Ganss et al., 2004; ten Cate, 2006; Magalhães et al., 2007; Lussi et al., 2008; Hara et al., 2009; Kato et al., 2010]. Por esta razão, as pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACPF foram comparadas com dois dentífrícios fluoretados convencionais: Crest (1100ppm, controle positivo) e Sensodyne Pro-Enamel (1450ppm). Embora não tenham diferido estatisticamente, os cremes dentais fluoretados, sobretudo o Crest®, apresentaram os menores valores de rugosidade superficial. Esses achados têm sido atribuído à ação remineralizadora do flúor [Ganss et al. 2004; Lussi et al., 2008; Kato et al., 2010]. Este mineral se liga aos cristais de hidroxiapatita formando uma apatita fluoretada e conferindo à superfície do esmalte uma estrutura mais resistente a futuros ataques

de desmineralização. Além disso, depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) podem ser formados na superfície do esmalte dissociando-se durante uma queda de pH liberando o flúor [Petzold, 2000].

Em contrapartida, alguns autores afirmam que devido a composição e pH de alguns alimentos e bebidas serem inferior a 4,5, ou seja, subsaturados em relação a hidroxiapatita e a apatita fluoretada, o efeito protetor do flúor torna-se pouco eficaz contra a erosão dentária. Nessas situações críticas de pH, tanto o fluoreto de cálcio disponibilizado, quanto o remanescente de flúor de tratamentos anteriores são dissolvidos, a menos que a quantidade de fluoreto seja utilizada em concentrações prejudiciais [Larsen e Richards, 2002; Attin et al., 2003].

A inibição da erosão não ocorreu completamente no presente estudo, sugerindo que o flúor tem uma ação limitada na remineralização das lesões de erosão. O tratamento ideal da erosão com fluoretos deve consistir no máximo de inibição dessas lesões, sem pôr em risco a saúde dos pacientes. Além disso, o método de aplicação de flúor é crucial no fornecimento e manutenção desse agente remineralizador disponível no local e no momento do ataque erosivo [Lagerweij et al., 2006].

Quando o flúor foi combinado com o nitrato de potássio (KNO_3) no creme dental Sensodyne Pro-Esmalte[®], também foi possível observar uma redução das alterações superficiais do esmalte. A presença do agente dessensibilizante neste creme dental não interferiu em sua ação remineralizante [Hara et al., 2009; Lussi et al., 2008], diferindo de outro estudo, no qual os autores associaram os resultados desfavoráveis obtidos para este produto a uma possível interação entre o NaF e KNO_3 , o que poderia reduzir a biodisponibilidade de flúor [Kato et al., 2010].

Neste estudo os grupos experimentais foram divididos ainda quanto à presença ou não da variável abrasão após o desafio erosivo. Embora os valores de rugosidade tenham sido menores para os grupos tratados apenas com os cremes dentais, a erosão quando combinada com a abrasão também foi inibida pelos agentes remineralizadores contidos nas pastas. Alguns autores relataram que a escovação após um ataque erosivo deve ser adiada para permitir que a saliva possa exercer sua ação remineralizante sobre o esmalte erodido, resultando no aumento da resistência à abrasão [Lussi et al., 2004; Rios et al., 2006; Ranjitkar et al., 2009]. No presente estudo, os valores de rugosidade com e sem abrasão não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Visando aproximar as condições do estudo *in vitro* ao que acontece na cavidade bucal, a saliva artificial foi usada como controle negativo. Vários estudos relataram o potencial remineralizador da saliva, sobretudo da saliva estimulada em lesões de erosão [Amaechi e Higham, 2001; Rios et al., 2006; Wetton et al., 2006; Jager et al., 2011] Logo, os valores de proteção e ou inibição da erosão neste estudo poderiam ser maiores se os grupos tratados com os cremes dentais tivessem sido comparados com água deionizada, por exemplo. Mesmo assim, como o potencial de remineralização dessas lesões pela saliva parece ser limitado (Rios et al., 2006), é recomendado que um agente remineralizante deva ser aplicado logo após um desafio erosivo, principalmente para se evitar uma maior perda de estrutura dentária através de forças mecânicas como a abrasão.

Algumas limitações devem ser consideradas ao extrapolar esses resultados para a prática clínica. Por se tratar de um estudo *in vitro*, não foram incluídos no estudo as variáveis de proteção biológica conferida pela saliva, como estimulação salivar [Rios et al., 2008] e formação da película adquirida [Eisenburger et al., 2001]. Destaca-se ainda, o número pequeno da amostra e o curto período de tempo de realização do estudo, com desafios erosivos intensos. Estes modelos de estudo, portanto, podem ser considerados tendenciosos para desmineralização, em vez da remineralização.

Deste modo, têm-se verificado na literatura a preocupação em se tentar encontrar medidas preventivas que possam minimizar os efeitos deletérios da erosão sobre a estrutura dentária. Pode-se concluir que as pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACP com adição de flúor apresentaram capacidade de reduzir o incremento de rugosidade decorrente da erosão associada ou não a abrasão semelhante aos produtos fluoretados de baixa concentração de uso diário.

Financiamento: Bolsa de estudos da pesquisadora (CAPES).

Conflito de interesses: Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

Antunes JLF, Narvai PC: Políticas de saúde bucal no Brasil e seu impacto sobre as desigualdades em saúde. *Rev Saúde Pública* 2010; 44:360-5.

Amaechi BT, Higham SM: In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent* 2001; 29:371–76.

Amaechi BT, Higham SM: Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent* 2005; 33: 243–52.

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

Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM: Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 753–759.

Cai F, Shen P, Walker GD, Reynolds C, Yuan YI, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *J Dent* 2009; 37: 763-68.

Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC: Enamel subsurface lesion remineralization with casein phosphopeptide stabilized solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008; 42:88–97.

Dugmore CR, Rock WP: A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. *Braz Dent J* 2004; 196: 283-6.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35:211–5.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M: Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 2003; 37:450–55.

Field J, Waterhouse P, German M: Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent* 2010; 38: 182–190.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A: Effects of Two Fluoridation Measures on Erosion Progression in Human Enamel and Dentine in situ. *Caries Res* 2004; 38:561–66.

Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT: Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res* 2009; 43: 57–63.

Hopper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'ath J, Parker DM, Roeding-Penman A, Anddy MA: clinical study in situ to assess the effect of a food approved polymer on the erosion potential of drinks. *J Dent* 2007; 35: 541-46,.

Hughes JA, West NX, Parker DM, van der Braak, Addy M: Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent* 2000; 28: 147-52.

Imfeld T: Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:151-5.

Jager DHJ, Vieira, AM, Ligtenberg AJM, Bronkhorst E, Huysmans MCDNJM, Vissink A: Effect of Salivary Factors on the Susceptibility of Hydroxyapatite to Early Erosion. *Caries Res* 2011; 45: 532–37.

Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR: Preventive Effect of Commercial Desensitizing Toothpastes on Bovine Enamel Erosion in vitro, *Caries Res* 2010; 44: 85–89.

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

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon ÀM, Attin T: Prevention of Erosion and Abrasion by a High Fluoride Concentration Gel Applied at High Frequencies.Fluoride. *Caries Res* 2006; 40:148–153.

Larsen MJ, Nyvad B: Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999; 33: 81–7.

Larsen MJ, Richards A: Fluoride Is Unable to Reduce Dental Erosion from Soft Drinks. *Caries Res* 2002; 36: 75-80.

Lennon ÀM, Pfeffer M, Buchalla W, Becker K,Lennon S, Attin T: Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2006; 40:154–157.

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

Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *American Journal of Dentistry* 2006;19:319–25.

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T: Impact of Different Toothpastes on the Prevention of Erosion. *Caries Res* 2008; 42:62–67.

Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA: Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2007; 41: 77–79.

Mangueira DFB, Sampaio FC, Oliveira AFB, Association between socioeconomic factors and dental erosion in Brazilian schoolchildren: J Public Health Dent 2009; 69: 254-259.

Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Corrêa MSNP, Haddad AE, Bönecker M: Risk Indicators for Erosive Tooth Wear in Brazilian Preschool Children. Caries Res 2011; 45:121–129.

Petzold M. The Influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. Caries Res 2000; 35:45–51.

Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S: Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. J Dent 2009; 37:949-54.

Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW: The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. J Dent 2009; 37:250–254.

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD: Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. J Dent Res 2003; 82:206–11.

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate. J Dent Res 2008; 87:344–8.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, Buzalaf MAR: Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. Caries Res 2006; 40:218-223.

Shen R, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC: Remineralization of Enamel Subsurface Lesions by Sugar-free Chewing Gum Containing Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. J Dent Res 2001; 80:2066-70.

Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC: Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. Arch Oral Biol 2010 Jul; 55:541-4.

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

Ten Cate JM, Exterkate RA, Buijs MJ: The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. Caries Res 2006; 40: 136–141.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M: Exposure Time of Enamel and Dentine to Saliva for Protection against Erosion: A Study in vitro. Caries Res 2006; 40:213–217.

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

Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T: Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent* 2007; 35: 21–27.

White AJ, Gracia LH, Barbour ME: Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. *Caries Res* 2011; 45:13-20.

Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D: Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *J Dent* 2006; 34: 214-20.

Zero DT: Etiology of dental erosion: extrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:162-177.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO IN SITU DO EFEITO DO CPP-ACP INCORPORADO EM UMA GOMA DE MASCAR NO CONTROLE DA EROSÃO SOBRE O ESMALTE DENTÁRIO**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar in situ o efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo, associado ou não à abrasão. Este estudo apresentou um desenho cruzado e cego, em que oito voluntários utilizaram aparelhos intrabuciais palatinos contendo seis espécimes. Cada voluntário foi submetido a três períodos experimentais de sete dias cada, com *wash out* de sete dias entre eles. Em cada período foram observadas três condições de erosão: erosão somente, erosão associada à escovação imediata e erosão associada à escovação após uma hora. A rugosidade superficial (R_a , R_z e R_t) foi utilizada para análise das alterações superficiais do esmalte dentário. Em todos os espécimes houve incremento de rugosidade no esmalte após os desafios erosivos. Diferença estatística significativa foi encontrada entre os períodos experimentais “sem chiclete” e “chiclete com CPP-ACP” quando a erosão foi seguida da escovação imediata: R_z ($p=0,0148$) e R_t ($p=0,036$) e escovação após uma hora: R_a ($p=0,0312$), R_z ($p=0,0264$) e R_t ($p=0,498$). Entre as três condições de erosão em cada período, os valores de rugosidade seguiram sempre o mesmo padrão de apresentação em todos os parâmetros: erosão < erosão seguida de abrasão após uma hora < erosão seguida de abrasão imediata, porém não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$). Os dados sugerem que o uso da goma de mascar com CPP-ACP após a ingestão de bebidas erosivas contribui para redução da erosão dentária no esmalte, sobretudo quando o desafio erosivo é seguido da abrasão.

Palavras-chave: Erosão. Abrasão. CPP-ACP. Goma de mascar.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in situ the effect of CPP-ACP incorporated into a chewing gum in reducing of surface roughness of enamel after being subjected to erosive challenge, with or without abrasion. This study presented a blind crossover design in which eight volunteers used intraoral palatal appliances containing six specimens. Each volunteer was subjected to three experimental periods of seven days each, with seven-day wash out between them. In each period were observed three conditions of erosion: erosion only, immediate erosion associated with brushing and erosion associated with brushing after an hour. The surface roughness (Ra, Rz and Rt) was used for analysis of surface changes of dental enamel. In all specimens there was an increase in roughness of enamel after the erosive challenges. Statistically significant difference was found between the experimental periods "no gum" and "gum with CPP-ACP" when erosion was followed by immediate brushing: Rz ($p = 0.0148$) and Rt ($p = 0.036$) and one hour after brushing Ra ($p = 0.0312$), Rz ($p = 0.0264$) and RT ($p = 0.498$). Among the three conditions of erosion in each period, the roughness values always followed the same pattern of performance in all parameters: erosion < erosion with abrasion after an hour < abrasion erosion followed by immediate, but there was no statistically significant difference ($p > 0.05$). The data suggest that the use of chewing gum with CPP-ACP after ingestion of erosive beverages contributes to reduction of dental enamel erosion, especially when the challenge is followed by the erosive abrasion.

Keywords: Erosion. Abrasion. CPP-ACP. Chewing gum.

INTRODUÇÃO

A erosão dentária é definida como uma patologia crônica caracterizada pela dissolução localizada dos tecidos dentários, decorrente de uma exposição prolongada a ácidos sem o envolvimento de bactérias [Imfeld, 1996]. Estudos epidemiológicos têm mostrado um aumento na prevalência desta lesão, principalmente em crianças e adolescentes [Mangueira et al., 2009; Murakami et al., 2011]. Este aumento tem sido extensamente relacionado com o maior consumo de bebidas prontas, que apresentam constituintes ácidos em sua composição [Lussi et al., 2004].

Os fosfopeptídeos de caseína - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) que contém a sequência -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- são nanocomplexos derivados da proteína do leite bovino, que localizam e estabilizam os íons cálcio e fosfato na superfície do dente [Cross et al., 2005]. Esse processo impede a precipitação destes íons em sua forma insolúvel, tornando-os biodisponíveis para atuar no processo de remineralização de lesões de cárie [Shen et al., 2001; Reynolds et al., 2003; Ijima et al., 2004] e de erosão dentária em seu estágio inicial [Tantbirojn et al., 2008; Poggio et al., 2009; Ranjitkar et al., 2009]. Esses achados têm contribuído para a incorporação do CPP-ACP em produtos normalmente utilizados para promoção de saúde bucal e considerados de fácil acesso à população, como bochechos, cremes dentais e gomas de mascar sem açúcar.

Após a ingestão de alimentos, normalmente os indivíduos exercem uma força mecânica por meio da escovação para prevenir o desenvolvimento da cárie dentária. Entretanto, se houver componentes ácidos na dieta, esta pode desencadear o processo da erosão e o desgaste será potencializado pela abrasão [Eisenburger et al., 2003]. Por outro lado, se houver ação remineralizante da saliva por um determinado período de tempo o esmalte desmineralizado pela bebida ácida torna-se mais resistente à escovação. Por essa razão, alguns autores sugerem que a escovação seja realizada após um período de no mínimo 60 minutos para permitir a remineralização pela ação da saliva [Attin et al., 2001; Lussi et al., 2006; Rios et al., 2006].

Para os indivíduos propensos à cárie, o adiamento da escovação dos dentes após o consumo de alimentos e bebidas que contém açúcar pode se tornar um fator de risco para a progressão de lesões de cárie [Addy e Hunter, 2003]. Portanto,

torna-se importante a busca por medidas preventivas que sejam benéficas para erosão e cárie. A utilização de gomas de mascar como uma medida preventiva em relação à erosão foi relatada [Rios et al., 2006], no entanto não há trabalhos que avaliem o efeito protetor do CPP-ACP incorporado em chicletes frente a desafios erosivos associados ou não à abrasão por escovação dentária.

O objetivo deste estudo foi avaliar in situ o efeito do CPP-ACP incorporado em uma goma de mascar na redução do incremento de rugosidade superficial do esmalte dentário após ser submetido a desafio erosivo, associado ou não à abrasão pela escovação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Este estudo in situ apresentou um desenho cruzado e cego, em que oito voluntários utilizaram aparelhos intrabucais palatinos contendo seis espécimes. Cada voluntário foi submetido a três períodos experimentais, de sete dias cada, com *wash out* de sete dias entre eles. Nos períodos experimentais foram testados: o uso de uma goma de mascar contendo CPP-ACP, o uso de uma goma de mascar sem o CPP-ACP e, por fim, a não utilização da goma de mascar. Em cada um desses períodos foram observadas três condições de erosão: erosão somente, erosão associada à abrasão imediata e erosão associada à abrasão uma hora após o desafio erosivo. Para tanto, foram testados nove grupos, distribuídos da seguinte forma: Período I - sem goma de mascar (G1, G2 e G3), Período II - goma de mascar sem CPP-ACP (G4, G5 e G6) e Período III - goma de mascar com CPP-ACP (G7, G8, G9); sendo que G1, G4 e G7 corresponderam aos grupos expostos apenas a erosão; G3, G5, G8 aos grupos expostos a erosão seguida por abrasão imediata e G3, G6 e G9 aos grupos expostos a erosão à abrasão após uma hora. A rugosidade superficial foi utilizada para análise das alterações da superfície do esmalte dentário.

Aspectos éticos e seleção dos indivíduos

Foram selecionados oito voluntários, adultos e saudáveis, alunos da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, com idades variando entre 22 e 32 anos. O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderlei (protocolo 463/10) e todos os voluntários participantes preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os voluntários residiram em João Pessoa durante o período da pesquisa, onde o sistema de abastecimento de água não é fluoretado [Sampaio et al., 2010]. Foram incluídos no estudo indivíduos não fumantes, com pelo menos 22 dentes naturais sem atividade de cárie, doença periodontal ou outra patologia bucal. Os voluntários não poderiam ainda apresentar doenças sistêmicas ou ter feito uso recente de medicamentos que afetassem o fluxo salivar.

Os parâmetros salivares também foram usados como critérios de seleção da amostra. A coleta de saliva foi realizada sempre no período da manhã e os voluntários foram orientados a ficar de jejum duas horas antes da realização desse procedimento [JAEGGI; LUSSI, 1999]. Foram considerados aptos os voluntários com fluxo salivar maior que 0,2mL/min para saliva não estimulada e fluxo maior que 1,0 mL/min para saliva estimulada.

Preparação dos espécimes

Neste estudo foram utilizados 70 dentes humanos terceiros molares não-irrompidos, extraídos por razões ortodônticas ou por impactação. Após a extração, os dentes coletados foram limpos através de raspagem com curetas para remoção dos restos dos tecidos periodontais aderidos na superfície dentária e armazenados em solução tamponada de formol a 10%, em temperatura ambiente, por um período de 15 dias [Srinivasan et al., 2010]. Posteriormente, cada dente foi examinado com auxílio de uma lupa de 5x de aumento para averiguação de possíveis trincas, rachaduras, cáries e alterações do esmalte, situações nas quais foram excluídos da amostra [Rios et al., 2008].

Os terceiros molares tiveram suas faces proximais cortadas com um disco diamantado dupla face XL 12205 (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA), originando blocos de esmalte de 4 mm x 4 mm x 2mm. A planificação do esmalte dos

espécimes foi realizada em uma Politriz Metalográfica PSK-2V (Skill-tec Comércio e Manutenção Ltda, São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se lixas de silicone carbide de granulação decrescente (600, 1000, 1200, 2000 e 2500), sob constante refrigeração. Para o polimento, foram utilizados feltros umedecidos com uma suspensão de diamante de 1 μ m (Extec Corporation, Enfield, CT, EUA).

Para seleção dos espécimes foi utilizado um microdurômetro (HNV-2000/ Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) com um penetrador diamantado piramidal do tipo KNOOP, com carga estática de 25g, aplicada por dez segundos [Kato et al., 2010]. Foram realizadas cinco medições em cada corpo de prova, sendo excluídos do estudo todos os espécimes que estivessem com um valor médio de microdureza 10% acima ou abaixo da média de todos os blocos [Rios et al., 2008]. Cento e quarenta e quatro blocos de esmalte com média de microdureza de KHN 368,5 $\pm$ 5,98 foram selecionados. Após a medição, os blocos selecionados tiveram metade das suas superfícies polidas protegidas por esmalte cosmético para que assim cada espécime tivesse seu próprio controle.

Preparo dos dispositivos intrabucais

No dispositivo intrabucal foram realizados seis nichos (4mm x 4mm x 2mm), três de cada lado (esquerdo e direito) para a fixação de seis blocos de esmalte. Os blocos foram randomizados e distribuídos entre os voluntários para cada período experimental, no decorrer do estudo. O dispositivo intrabucal foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene, para permitir a formação da película adquirida [Haning et al., 2007].

Protocolo in situ

Quatro vezes ao dia, em horários previamente estabelecidos (8:00; 12:00; 16:00 e 18:00 horas), os voluntários imergiram o aparelho em um copo contendo 125 mL de refrigerante à base de cola (Coca-Cola[®] pH 2.6, Coca-Cola Company, Spal, Porto Real, RJ, Brasil), utilizado como agente erosivo durante 5 minutos [Magalhães et al., 2008; Rios et al., 2006]. A cada dia foi utilizada uma nova garrafa de 500mL, mantida a temperatura ambiente.

Após cada imersão dos espécimes na bebida ácida, o dispositivo intrabucal foi removido para realização da escovação imediata nos grupos 2, 5 e 8, correspondentes a cada período. Para essa etapa, foi utilizado um dentifrício sem flúor (Malvatikids[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova dental elétrica (Oral B Cross Action[™] Power[®], Procter & Gamble, Loma Florida, México) por trinta segundos, equivalente a 166 oscilações por segundo [Ganss et al., 2007]. Em seguida o aparelho foi lavado em água corrente até que os restos visíveis de creme dental fossem removidos e retornou à boca onde permaneceu por uma hora. Ao final deste tempo, o aparelho foi retirado da boca para realização da escovação dos grupos 3, 6 e 9. Para padronização da escovação, antes de iniciar o experimento os voluntários receberam instruções quanto à força (2N) e quantidade de dentifrício (0,3g) a ser colocada na escova [Ganss et al., 2007]. Os voluntários foram orientados a realizar a própria higiene bucal com o dentifrício Crest (1100ppm), e só recolocar o aparelho na boca dez minutos após este procedimento.

No segundo período experimental, além da realização dos procedimentos descritos acima, os voluntários utilizaram uma goma de mascar após a realização da escovação imediata. O aparelho voltou à boca e o voluntário mascava, por vinte minutos, um tablete de chiclete sabor menta sem sacarose (Trident[®], Cadbury Adams, Bauru, Brasil). Os voluntários foram orientados a executar a mastigação de forma constante e, igualmente, para os dentes dos hemiarcos direito e esquerdo. Quarenta minutos após o término da utilização da goma de mascar, ou seja, uma hora após a imersão, os voluntários retiraram o aparelho para realizar a escovação.

Para o terceiro período experimental foi seguido o mesmo protocolo do segundo período, diferindo apenas no tipo da goma de mascar. Foi utilizada uma goma de mascar sabor menta sem sacarose, contendo CPP-ACP (Trident Total[®], Cadbury Adams, Bauru, Brasil). Os voluntários foram orientados a não remover o dispositivo bucal durante o dia, a não ser nos horários das refeições ou quando estivessem realizando os procedimentos de higiene oral. Durante estes períodos, os aparelhos foram mantidos no estojo plástico, envolto por gaze umedecida em água deionizada. Além disso, foram orientados a não ingerir outros tipos de bebidas, exceto água quando estivessem utilizando o dispositivo [Shellis et al., 2011].

Uma vez por dia, antes de dormir, o dispositivo foi imerso em solução de clorexidina a 0,12% por dois minutos para evitar acúmulo de biofilme dentário. Nos períodos de wash-out, os aparelhos foram higienizados e desinfetados com

clorexidina a 0,12%, pH 6,8 por 30 minutos [Rios et al., 2008]. O esmalte de unha, responsável pela proteção de metade da área dos espécimes, foi então removido para as análises finais e um novo bloco de esmalte foi colocado no dispositivo para a etapa seguinte.

Avaliação da Rugosidade

Para avaliação da rugosidade dos espécimes foram realizadas seis medições com um rugosímetro (Mitutoyo ver. 3.00, SurfTest-301, Japan), sendo três na superfície do esmalte hígido (rugosidade inicial) e em três no esmalte tratado (rugosidade final). Antes do início das mensurações do experimento, o rugosímetro foi calibrado com um dispositivo padrão.

O rugosímetro foi regulado para uma superfície de amostragem de 1,25mm, com valores de corte de 0,25mm (cut-off- λ_c) em uma velocidade de 0,1mm/s (ISO 97). Assim, foram obtidos os valores de rugosidades nos parâmetros Ra (desvio médio de um perfil de sua linha média, sobre o comprimento medido), Rz (média entre os cinco picos mais altos e os cinco vales mais profundos no percurso de medição) e Rt (distância entre o pico mais alto e o vale mais profundo medido em um perfil de rugosidade) [Field et al., 2010].

Determinação da concentração de cálcio

A determinação da concentração de cálcio de todos os voluntários foi realizada. Para tanto, a saliva de todos os voluntários foi coletada em diferentes tempos após o uso da goma de mascar contendo CPP-ACP. Essa goma foi utilizada por 20 minutos, em seguida foi descartada e nos tempos: 0 (imediatamente após seu uso), 30, 60 e 120 minutos seguintes, a saliva dos participantes foi coletada (durante 3 minutos). A saliva estimulada com tubos de látex foi utilizada como *baseline*.

Posteriormente, 1 mL de saliva foi transferida para tubos Eppendorf e levados para uma microcentrifuga por 5 minutos a 10.000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante da saliva de cada voluntário foi utilizada para determinação da concentração de cálcio. A absorção do complexo Ca-Arsenazo III foi medido em 640 nm por um espectrofotômetro de absorção de luz visível (FLUOstar OPTIMA - BMG

Labtech, Alemanha). O aumento resultante na absorbância da reação da mistura foi diretamente proporcional à concentração de cálcio na amostra.

Análise dos dados

Os resultados foram avaliados verificando-se primeiramente a normalidade dos dados estatísticos através do teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias entre os grupos examinados com o teste de Levene. Uma vez que esses critérios foram satisfeitos, foi aplicada a análise de Variância Univariada (ANOVA one-way) para a avaliação da rugosidade, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey para as comparações individuais. O teste t pareado foi utilizado para comparar os valores de rugosidade final e inicial em cada grupo. A correlação entre os parâmetros R_a , R_z e R_t foi avaliada pelo teste de Correlação de Pearson. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 14.0.

RESULTADOS

Em todos os espécimes houve incremento de rugosidade no esmalte após os desafios erosivos, sobretudo quando estes foram seguidos da abrasão imediata. O teste t pareado mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,001$) na comparação dos valores de rugosidade iniciais e finais encontrados nos três parâmetros de rugosidade (R_a , R_z e R_t), para cada grupo.

As médias ($\pm dp$) das diferenças entre rugosidade inicial e final dos três parâmetros estudados estão descritas na tabela 1. O grupo com a goma de mascar com adição do CPP-ACP apresentou os menores valores de rugosidade em todas as condições de erosão testadas. No entanto, o teste ANOVA não revelou diferença estatística significativa ao testar o efeito da presença ou não das gomas de mascar quando os espécimes foram expostos apenas a erosão para R_a ($p = 0,0575$), R_z ($p = 0,0652$) e R_t ($p = 0,1209$).

Quando a erosão foi seguida da escovação imediata houve diferença estatística significativa entre os períodos experimentais para os parâmetros R_z ($p = 0,0148$) e R_t ($p = 0,036$). O teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença entre os períodos experimentais “sem goma de mascar” e “goma de

mascar com CPP-ACP”. Os grupos que usaram a goma com CPP-ACP também apresentaram uma redução significativa dos valores de rugosidade quando comparados aos grupos sem goma de mascar após exposição à erosão seguida de abrasão após uma hora para Ra ($p=0,0312$), Rz ($p=0,0264$) e Rt ($p=0,498$). A análise de Correlação de Pearson mostrou forte relação entre os três parâmetros de rugosidade estudados ($p<0,001$).

Tabela 1: Médias ($\pm$ dP) das diferenças de rugosidade inicial e final dos três parâmetros estudados (Ra, Rz e Rt) nas diferentes condições de erosão e períodos experimentais.

Condições de Erosão	Período Experimental	Ra (μ m)	Rz(μ m)	Rt(μ m)
		Média $\pm$ dp	Média $\pm$ dp	Média $\pm$ dp
Erosão	Sem goma de mascar	0,215 $\pm$ 0,100 ^A	1,167 $\pm$ 0,574 ^A	1,578 $\pm$ 0,952 ^A
	Goma de mascar normal	0,204 $\pm$ 0,074 ^A	1,177 $\pm$ 0,496 ^A	1,666 $\pm$ 0,882 ^A
	Goma de mascar CPP-ACP	0,145 $\pm$ 0,080 ^A	0,805 $\pm$ 0,394 ^A	1,099 $\pm$ 0,555 ^A
Erosão + Escovação Imediata	Sem goma de mascar	0,260 $\pm$ 0,066 ^A	1,485 $\pm$ 0,367 ^A	2,017 $\pm$ 0,578 ^A
	Goma de mascar normal	0,218 $\pm$ 0,106 ^A	1,146 $\pm$ 0,455 ^{A,B}	1,603 $\pm$ 0,864 ^{A,B}
	Goma de mascar CPP-ACP	0,187 $\pm$ 0,120 ^A	1,023 $\pm$ 0,501 ^B	1,338 $\pm$ 0,702 ^B
Erosão + Escovação 1h	Sem goma de mascar	0,241 $\pm$ 0,132 ^A	1,323 $\pm$ 0,641 ^A	1,926 $\pm$ 1,131 ^A
	Goma de mascar normal	0,205 $\pm$ 0,082 ^{A,B}	1,180 $\pm$ 0,482 ^{A,B}	1,699 $\pm$ 0,992 ^{A,B}
	Goma de mascar CPP-ACP	0,147 $\pm$ 0,066 ^B	0,845 $\pm$ 0,300 ^B	1,144 $\pm$ 0,441 ^B

ANOVA comparou os diferentes períodos experimentais em cada condição de erosão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

A comparação entre as três condições de erosão em cada período experimental também foi realizada. Os valores de rugosidade encontrados seguiram sempre o mesmo padrão de apresentação em todos os parâmetros: erosão < erosão seguida de abrasão após uma hora < erosão seguida de abrasão imediata, porém a ANOVA não revelou diferença estatística entre eles ($p>0,05$).

Em relação à determinação da concentração do íon cálcio, a análise de Variância de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa entre os valores médios de absorvância obtidos nos diferentes períodos de coleta após o uso da goma de mascar com adição de CPP-ACP ($p>0,05$). Porém observou-se um aumento da concentração do cálcio na medição realizada no tempo “0 minuto”, ou seja, logo após os voluntários terem mascado a goma (Figura 1).

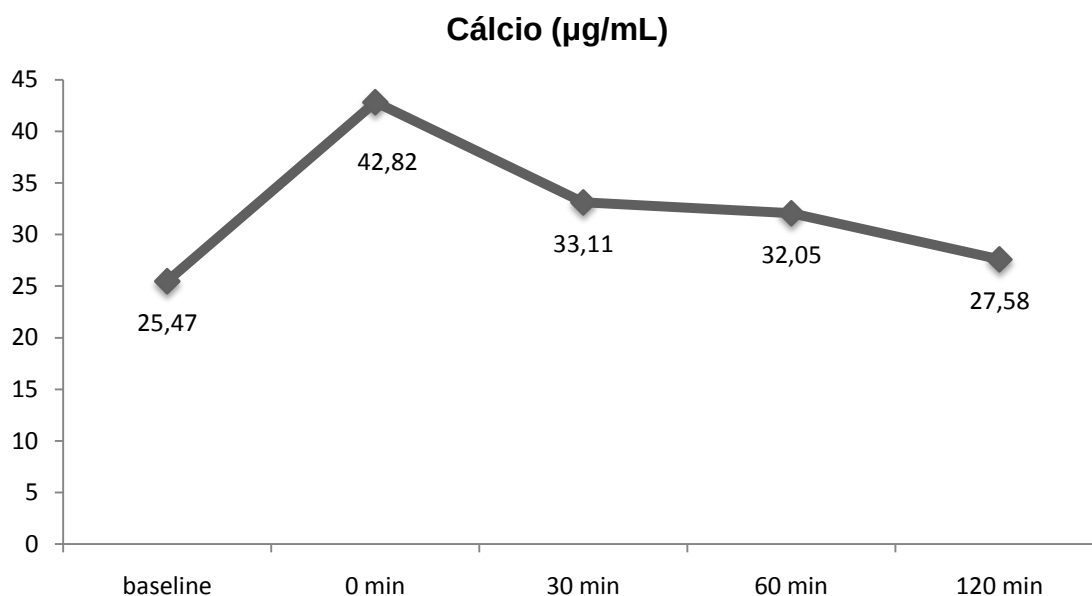


Figura 1: Médias da concentração de cálcio (µg/mL) nos diferentes períodos de medição.

DISCUSSÃO

A adição do fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo em gomas de mascar sem sacarose como um produto com capacidade de remineralizar lesões subsuperficiais do esmalte dentário tem sido relatada [Shen et al., 2001; Reynolds et al., 2003; Ijima et al., 2004; Cai et al., 2007; Cai et al., 2009]. Esta atividade anticariogênica está relacionada à localização e estabilização dos íons cálcio e fosfato em sua forma biologicamente ativa na superfície do dente, no biofilme e na saliva [Reynolds et al., 2003; Cross et al., 2005]. Dessa forma, é possível manter um gradiente de concentração supersaturado destes íons na superfície dentária, favorecendo o processo de remineralização através do crescimento dos cristais de hidroxiapatita no interior das lesões [Reynolds et al., 2003; Cochrane et al., 2008].

Estudos recentes tem mostrado uma ação anti-erosiva de produtos de higiene bucal contendo o CPP-ACP [Tantbirojn et al., 2008; Poggio et al., 2009; Ranjitkar et al., 2009; Srinivasan et al., 2010], porém pouco se conhece sobre a incorporação do CPP-ACP em gomas de mascar no controle da erosão dentária. O mecanismo de ação do CPP-ACP na redução do desgaste erosivo dos dentes ainda não está totalmente esclarecido [Ranjitkar et al., 2009]. Sabe-se que diferente do que ocorre no processo de remineralização da cárie, as lesões de erosão podem ser reparadas por deposição de mineral na zona porosa [Eisenburger et al., 2001]. Este processo

só é possível quando a desmineralização causada por desafios erosivos encontra-se em estágio inicial. Nessa fase, ocorre uma perda parcial dos cristais de hidroxiapatita e o processo de remineralização é teoricamente possível, já que o tecido remanescente pode atuar como um andaime. Quando ocorre uma desmineralização mais avançada, a camada superficial do esmalte é totalmente perdida e o processo erosivo não pode ser revertido [Lussi et al., 2004].

Apesar da existência de uma variedade de testes que podem ser utilizados para quantificar alterações das superfícies dentárias, a rugosidade média (Ra) ainda é um dos parâmetros mais utilizados [Field et al., 2010; Schlueter et al., 2011]. Essas medições de rugosidade parecem ser úteis principalmente em estágios iniciais de erosão [Schlueter et al., 2011]. Porém este parâmetro sozinho pode não caracterizar a variabilidade dos diferentes valores encontrados sobre o perfil analisado [Field et al., 2010]. Na perspectiva de um maior conhecimento das características dos perfis dos espécimes, além do Ra optou-se pela escolha dos parâmetros Rz e Rt para análise das superfícies.

No presente estudo foi testado o efeito de uma goma de mascar com adição de CPP-ACP em diferentes condições de erosão. Este modelo de estudo permitiu a comparação com outros resultados encontrados em várias configurações experimentais apresentadas na literatura [Shellis et al., 2011; West et al., 2011; Wiegand e Attin, 2011; Young e Tenuta, 2011].

Os grupos tratados com a goma de mascar com CPP-ACP apresentaram sempre os menores valores de rugosidade. Ao analisar os parâmetros Rz e Rt, observou-se que houve menor incremento de rugosidade nos grupos que usaram a goma de mascar com CPP-ACP em relação aos grupos que não usaram goma de mascar após os desafios erosivos seguidos de escovação imediata e escovação após uma hora. Estes achados sugerem que essa goma de mascar propiciou uma maior proteção ao esmalte dentário quando foi realizada a escovação. Proteção semelhante foi verificada nos grupos que usaram a goma de mascar com CPP-ACP e foram expostos apenas ao refrigerante, porém sem diferença estatística significativa. Isto pode ser atribuído ao fato dos espécimes destes grupos estarem localizados na parte anterior do dispositivo intrabucal palatino, região que pode apresentar maior desgaste pela ação língua [Hara et al., 2009].

Após a ingestão de alimentos, normalmente os indivíduos são orientados a higienizarem os dentes por meio da escovação. Entretanto, se houver componentes

ácidos na dieta, esta pode desencadear o processo da erosão e o desgaste será potencializado pela escovação [Hooper et al., 2003; Lussi et al., 2004]. Como medida preventiva, alguns autores preconizam o adiamento da escovação para permitir que a saliva exerça ação remineralizadora sobre o esmalte erodido, resultando em maior resistência a abrasão [Jaeggi and Lussi, 1999; Attin et al., 2001; RIOS et al., 2006]. Os valores de rugosidade encontrados neste estudo foram maiores nos grupos onde a escovação foi realizada imediatamente após o desafio erosivo, porém não foi encontrada diferença estatística significativa em relação aos grupos onde a escovação foi adiada por uma hora [Hara et al., 2003; Ganss et al., 2007].

A goma de mascar sem adição de CPP-ACP apresentou valores de rugosidade inferiores aos grupos que não usaram goma, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística significativa entre eles. Estes resultados sugerem a importância da saliva na compensação e neutralização dos ácidos sobre as superfícies dos dentes [Amaechi e Higham, 2001; Hugues et al., 2000; Rios et al., 2006]. O fluxo salivar, a capacidade tampão, a saturação de íons cálcio e fosfato e a película adquirida constituem mecanismos de proteção da saliva contra os ataques ácidos, diminuindo a desmineralização e favorecendo a remineralização [Lussi et al., 2004; O'Sullivan e Curzon, 2000]. Contudo, o poder de atuação da saliva torna-se reduzido quando as bebidas erosivas são ingeridas com alta frequência, não diluídas conforme as instruções do fabricante e, no caso de crianças, acondicionadas em mamadeiras e ingeridas durante o sono [Hall et al., 1999].

Quando as condições de erosão foram comparadas dentro de cada período experimental, observou-se que os grupos expostos apenas à erosão apresentaram sempre os menores valores de rugosidade, seguidos da abrasão após uma hora, e por fim, da abrasão imediata. Porém não houve diferença estatística significativa entre eles. É importante lembrar que o dentifrício utilizado na escovação dos espécimes apresentava baixa abrasividade, o que pode não ter ocasionado um maior desgaste na abrasão [Hooper et al., 2003; Hara et al., 2009]. Além disso, para evitar a interferência de uma variável de confusão, optou-se por utilizar um dentifrício não-fluoretado no desenho do estudo, já que estudos anteriores demonstraram que o flúor age sinergicamente ao CPP-ACP promovendo maior ação remineralizante [Reynolds et al., 2008; Srinivasan et al., 2010]. Dentifrícios não-fluoretados têm sido

cada vez mais indicados para crianças de baixa idade, que também fazem ingestão de bebidas potencialmente erosivas.

A disponibilidade dos íons cálcio e fosfato na forma de CPP-ACP tem sido associada ao processo de remineralização do esmalte dentário [Cross et al., 2005; Cai et al., 2007; Cai et al., 2009]. Neste estudo, a concentração dos íons cálcio presentes na saliva após o uso da goma de mascar contendo CPP-ACP foi determinada nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos. Houve um aumento da concentração do cálcio imediatamente após o consumo da goma. Estes valores foram declinando ao longo do tempo e mostraram-se semelhante ao baseline aos 120 minutos. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre os diferentes períodos de medição. Tem sido mostrado que o CPP-ACP liberado pela goma de mascar liga-se a diferentes substratos no ambiente bucal. Assim, o nível de cálcio na saliva pode ter sido subestimado devido à ligação do CPP-ACP à superfície dos dentes [Reynolds et al., 2003; Cai et al., 2007]. Novas investigações avaliando o clearance salivar do CPP-ACP ao longo do tempo na saliva e na superfície dos dentes são necessários para elucidar a ação destes compostos no processo de remineralização após desafios erosivos.

Os dados deste estudo sugerem que o uso da goma de mascar com adição do CPP-ACP após a ingestão de bebidas potencialmente erosivas contribui para redução do incremento de rugosidade do esmalte dentário, sobretudo quando o desafio erosivo é seguido da abrasão.

Financiamento: Bolsa de estudos da pesquisadora (CAPES).

Conflito de interesses: Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

Addy M, Hunter ML: Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *Int Dent J* 2003; 53: 177-86.

Amaechi BT, Higham SM: In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent* 2001; 29:371–76.

Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R: In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. *Caries Res* 2001; 35: 216–222.

Cai F, Manton DJ, Shen P, Walker GD, Cross KJ, Yuan YI, Reynolds C, Reynolds EC: Effect of addition of citric acid and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to a sugar-free chewing gum on enamel remineralization. *Caries Res* 2007; 41: 377-83.

Cai F, Shen P, Walker GD, Reynolds C, Yuan YI, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *J Dent* 2009; 37: 763-68.

Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC: Enamel subsurface lesion remineralization with casein phosphopeptide stabilized solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008; 42:88–97.

Cross KJ, Huq NL, Palamara JE, Perich JW, Reynolds EC: Physicochemical characterization of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J Biol Chem* 2005; 280: 15362–9.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35:211–5.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M: Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 2003; 37: 450–455.

Field J, Waterhouse P, German M: Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent* 2010; 38: 182–190.

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

Hall AF, Buchanan CA, millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH: The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *J Dent* 1999; 27: 333-339.

Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M: Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 444–49.

Hara AT, Turssi CP, Teixeira EC, Serra MC, Cury JÁ: Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 423-7

Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT: Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res* 2009; 43: 57–63.

Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M: Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin periodontol* 2003; 30: 802-8.

Hughes JA, West NX, Parker DM, van der Braak, Addy M: Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent* 2000; 28: 147-152.

Ijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004; 38: 551–6.

Imfeld T: Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 151-5.

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

Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR: Preventive Effect of Commercial Desensitizing Toothpastes on Bovine Enamel Erosion in vitro, *Caries Res* 2010; 44: 85–89.

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

Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *American Journal of Dentistry* 2006;19: 319–25.

Mangueira DFB, Sampaio FC, Oliveira AFB: Association between socioeconomic factors and dental erosion in Brazilian schoolchildren. *J Public Health Dent* 2009; 69: 254-9.

Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Corrêa MSNP, Haddad AE, Bönecker M: Risk Indicators for Erosive Tooth Wear in Brazilian Preschool Children. *Caries Res* 2011; 45: 121–9.

O’Sullivan EA, Curzon MEJ: A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000: 186–192.

Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. *J Dent* 2009; 37: 949-54.

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

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003; 82: 206–11.

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008; 87:344–8.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, Buzalaf MAR: Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2006; 40: 218-223.

Rios D, Honorio HM, Francisconi LF, Magalhães AC, Machado MAAM, Buzalaf MAR: *In situ* effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *J Dent* 2008; 36: 152-57.

Sampaio FC, Silva FDSCM, Silva ACB, Machado ATAB, Araújo AAM, Souza LG, Souza EM: Natural fluoride levels in the drinking water, water fluoridation and estimated risk of dental fluorosis in a tropical region of Brazil. *Oral Health Prev Dent* 2010; 8:71-5.

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

Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugarfree chewing gum containing casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate. *Journal of Dental Research* 2001;80: 2066–70.

Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC: Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. *Arch Oral Biol* 2010 Jul; 55: 541-4.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C: Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Res* 2011; 45: 13-23.

Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP–ACP paste. *J Dent* 2008;3 6: 74–9.

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

West NX, Davies M, Amaechi BT: In vitro and in situ Erosion Models for Evaluating Tooth Substance Loss. *Caries Res* 2011; 45: 43-52.

Wiegand A, Attin T: Design of Erosion/Abrasion Studies – Insights and Rational Concepts. *Caries Res* 2011; 45: 53-59.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito protetor encontrado nos dois estudos propostos para avaliação do CPP-ACP a partir do conhecimento das alterações superficiais do esmalte através da análise da rugosidade superficial está de acordo com estudos anteriores. Entretanto o CPP-ACP incorporado nos produtos testados não foi capaz de impedir o aparecimento da erosão, sendo observada uma redução das alterações do esmalte dentário após desafio erosivo seguido ou não da abrasão.

No estudo 1, o efeito das pastas Mi Paste® e Mi Paste Plus® na redução das alterações do esmalte após desafio erosivo seguido ou não da abrasão foi comparado ao efeito dos dentifrícios fluoretados Sensodyne Pro-Esmalte® (1450 ppm) e Crest® (1100 ppm). Optou-se por incluir estes dois dentifrícios no estudo, pois a ação do flúor, mesmo em baixas concentrações, na redução das alterações do esmalte após desafio erosivo foi relatada. Os resultados deste estudo mostraram que as pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACP com adição de flúor apresentaram capacidade de reduzir o incremento de rugosidade semelhante aos produtos fluoretados de uso diário, após exposição a desafio erosivo. Observou-se ainda que os valores de rugosidade encontrados para a pasta Mi Paste Plus® foram menores do que os encontrados para a Mi Paste®, sugerindo uma ação sinérgica entre o CPP-ACP e o flúor, porém diferença estatística significativa não foi encontrada.

No estudo 2, a ação da goma de mascar com CPP-ACP incorporado (Trident Total®) após desafios erosivos seguidos ou não da abrasão pela escovação foi comparada a ação de uma goma de mascar sem o CPP-ACP (Trident®) e ainda à não utilização de uma goma de mascar. Os resultados mostraram que os grupos tratados com a goma de mascar com CPP-ACP apresentaram sempre os menores valores de rugosidade, mostrando ação protetora desta goma após a ingestão de bebidas ácidas. A goma de mascar sem adição de CPP-ACP apresentou valores de rugosidade inferiores aos grupos que não usaram goma, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística significativa entre eles, sugerindo a importância da saliva na compensação e neutralização dos ácidos sobre as superfícies dos dentes.

Apesar das limitações, os resultados dos estudos desenvolvidos sugerem que o CPP-ACP incorporado em pastas ou em gomas de mascar foi capaz de reduzir os efeitos deletérios da erosão dentária.

5 CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o efeito do fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) no controle da erosão dentária. Com base nos resultados obtidos pode-se apresentar as seguintes conclusões:

- As pastas contendo CPP-ACP e CPP-ACP com adição de flúor apresentaram capacidade de reduzir o incremento de rugosidade decorrente da erosão associada ou não a abrasão semelhante aos produtos fluoretados de baixa concentração de uso diário;
- Através das avaliações do MEV observou-se uma nítida diferença na lisura de superfície de todos os grupos experimentais em relação ao esmalte hígido. Os espécimes dos diferentes grupos apresentaram alterações superficiais em diferentes intensidades, sendo que nos grupos submetidos a erosão seguida de abrasão foi possível observar uma maior exposição dos primas de esmalte.
- O uso da goma de mascar com adição do CPP-ACP após a ingestão de bebidas potencialmente erosivas contribui para redução do incremento de rugosidade do esmalte dentário, sobretudo quando o desafio erosivo é seguido da abrasão.
- Observou-se um aumento da concentração do cálcio na medição realizada imediatamente após o uso da goma de mascar com CPP-ACP, porém não houve diferença significativa entre os valores médios de absorbância obtidos nos diferentes períodos de coleta.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, J. L. F.; NARVAI, P.C. Políticas de saúde bucal no Brasil e seu impacto sobre as desigualdades em saúde. **Rev Saúde Pública**, v. 44, n.2, p. 360-5, 2010.

AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. **Arch Oral Biol**, v. 46, n.8, p. 697-703, 2001.

ADDY, M.; SHELLIS, R. P. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 17-31, 2006.

ATTIN, T.; KNOFEL, S.; BUCHALLA, W.; TÜTÜNCÜ, R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. **Caries Res**, v. 35, p. 216–222, 2001.

ATTIN, T.; BUCHALLA, W.; PUTZ, B. In situ evaluation of different remineralization periods in improving the resistance of previously eroded bovine dentine against tooth-brushing abrasion. **Arch Oral Biol**, v. 46, p. 871-874, 2001.

CAI, F.; MANTON, D. J.; SHEN, P.; WALKER, G. D.; CROSS, K. J.; YUAN, Y. I.; REYNOLDS, C.; REYNOLDS, E. C. Effect of addition of citric acid and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to a sugar-free chewing gum on enamel remineralization. **Caries Res**, v. 41, p. 377-383, 2007.

CAI, F.; SHEN, P.; WALKER, G. D.; REYNOLDS, C.; YUAN, Y. I.; REYNOLDS, E. C. Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. **J Dent**, v. 37, p. 763-768, 2009.

DUGMORE, C.R.; ROCK, W.P. A multifactorial analysis of factors sociated with dental erosion. **Braz Dent J**, v.196, n. 5, p. 283-6, March, 2004.

FAN, Y.; SUN, Z.; MORADIAN-OLDAK, J. Effect of fluoride on the morphology of calcium phosphate crystals grown on acid-etched human enamel. **Caries Res.**, v. 43, n.2, p. 132-6, 2009.

FEATHERSTONE, J. D; LUSSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 66-76, 2006.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie dentária : a doença e seu tratamento clínico. In: _____ **Cariologia Clínica**. São Paulo: Ed. Santos, 2005, 352p.c.

FIELD, J.; WATERHOUSE, P.; GERMAN, M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. **J Dent**, v. 38, p. 182–190, 2010.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; BRUNE, V.; SCHÜRMANN, A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. **Caries Res**, v. 38, n. 6, p. 561-6, 2004.

GANSS, C.; SCHLUETER, N.; FRIEDRICH, D.; KLIMEK, J. Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ. **Caries Res**, v. 41, p. 146-151, 2007.

GEDALIA, I.; DAKUAR, A.; SHAPIRA, L.; LEWINSTEIN, I.; GOULTSCHIN, J.; RAHAMIM, E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. **Am J Dent**, v. 4, p. 120-122, 1991.

GRENBY, T. H.; ANDREWS, A. T.; MISTRY, M.; WILLIAMS, R. J. Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations in vitro. **J Dent**, v. 29, p. 83-92, 2001.

HALL, A. F.; BUCHANAN, C. A.; MILLETT, D. T.; CREANOR, S. L.; STRANG, R.; FOYE, R. H. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. **J Dent**, v. 27, p. 333-339, 1999.

HANNIG, C.; BECKER, K.; HÄUSLER, N.; HOTH-HANNIG, W.; ATTIN, T.; HANNIG, M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion – an ex vivo pilot study. **Arch Oral Biol**, v. 52, p. 444–49, 2007.

HARA, A.T; KELLY, S.A.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; ECKERT, G.J.; BARLOW, A.P; MASON, S.C.; ZERO, D.T. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. **Caries Res**, v. 43, n. 1, p. 57-63, 2009.

HOLBROOK, W. P.; FURUHOLM, J.; GUDMUNDSSON, K.; THEODÓRS, A.; MEURMAN, J.H. Gastric reflux is a significant causative factor of tooth erosion. **J Dent Res**, v. 88, n.5, p. 422-6, 2009.

HUGHES, J. A.; WEST, N. X.; PARKER, D. M.; van der BRAAK; ADDY, M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. **J Dent**, v. 28, p. 147-152, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, orçamento e gestão. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro, 2004.

IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci**, v. 104, p. 151-5, 1996.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva – An in situ study. **Caries Res**, v. 33, p. 455– 461, 1999.

KATO, M.T; LANCIA, M.; SALES-PERES, S.H.; BUZALAF, M.A. Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion in vitro. **Caries Res**, v. 44, n.2, p. 85-9, 2010.

KUMAR, V. L.; ITTHAGARUN, A.; KING, N. M. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. **Aus Dent J**, v. 53, p. 34-40, 2008.

LARSEN, M. J.; NYVAD, B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. **Caries Res**, v. 33, p. 81–87, 1999.

LENNON, A. M.; PFEFFER, M.; BUCHALLA, W.; BECKER, K.; LENNON, S.; ATTIN, T. Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. **Caries Res**. v. 40 p. 154–157, 2006.

LEWINSTEIN, I.; OFEK, L.; GEDÁLIA, I. Enamel rehardening by soft cheeses. **Am J Dent**, v. 6, n. 1, p. 40-48, 1993.

LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Res**, v. 38, n. 1, p. 34-44, 2004.

LUSSI, A.; HELLWIG E.; ZERO D.; JAEGGI T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. **Am J Dent**, v. 19, n. 6, p. 319-25, 2006.

MAGALHÃES, A.C.; RIOS, D.; MOINO, A. L. ; WIEGAND, A. ; ATTIN, T. ; BUZALAF, M. A.R. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. **Caries Res**, v. 42, p. 112-116, 2008.

MANDEL, I. D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. **J Am Dent Assoc**, v.119, p. 298– 304, 1989.

MANGUEIRA, D. F. B.; SAMPAIO, F. C.; OLIVEIRA, A. F. B. Association between socioeconomic factors and dental erosion in Brazilian schoolchildren. **J Public Health Dent**, v. 69, n. 4, p. 254-259, 2009.

MURAKAMI, C.; OLIVEIRA, L. B.; SHEIHAM, A.; CORRÊA, M. S. N. P.; HADDAD, A. E.; BÖNECKER, M. Risk Indicators for Erosive Tooth Wear in Brazilian Preschool Children. **Caries Res**, v. 45, p. 121-129, 2011.

NOVAKI, O. **Introdução à engenharia de fabricação mecânica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher; 1994. 128p.

O'SULLIVAN, E. A.; CURZON, M. E. Salivary factors affecting dental erosion in children. **Caries Res**, v. 34, n. 1, p. 82-7, Jan./Feb. 2000.

POGGIO, C.; LOMBARDINE, M.; DAGNA, A.; CHIESA, M.; BIANCHI, S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. **J Dent**, v. 37, p. 949-954, 2009.

RANJITKAR, S.; RODRIGUEZ, J. M.; KAIDONIS, J. A.; RICHARDS, L. C.; TOWNSEND, G. C.; BARTLETT, D. W. The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentin wear by toothbrush abrasion. **J Dent**, v. 37, p. 250-254, 2009.

REYNOLDS, E. C.; CAI, F.; SHEN, P.; WALKER, G. D. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugarfree chewing gum. **J Dent Res**, v. 82, n. 3, p. 206-211, 2003.

REYNOLDS, E. C.; CAI, F.; COCHRANE, N. J.; SHEN, P.; WALKER, G. D.; MORGAN, M. V.; REYNOLDS, C.. Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. **J Dent Res**, v.87, n.4, 2008.

RIOS, D.; HONORIO, H. M.; MAGALHAES, A. C. DELBEM, A. C. B.; MACHADO, M. A. A. M.; SILVA, S. M. B.; BUZALAF, M. A. R. Effect of salivary stimulation on

erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. **Caries Res**, v. 40, p. 218-223, 2006.

RIOS, D. HONORIO, H. M.; FRANCISCONI, L. F.; MAGALHÃES, A. C.; MACHADO, M. A. A. M.; BUZALAF, M. A. R.. *In situ* effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. **J Dent**, v. 36, p. 152-157, 2008.

SHELLIS, R.P.; GANSS, C.; REN, Y.; ZERO, D. T.; LUSSI, A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. **Caries Res**, v. 45 p. 69-77, 2011.

SRINIVASAN, N.; KAVITHA, M.; LOGANATHAN, S. C. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. **Arch Oral Biol**. v. 55, p. 541-4, 2010.

TAHMASSEBI, J. F.; DUGGAL, M. S.; MALIK-KOTRU, G.; CURZON, M. E. J. Soft drinks and dental health. **J Dent**, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2006.

TANTBIROJN, D.; HUANG, A.; ERICSON, M. D; POOLTHONG, S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. **J Dent**, v. 36, p. 74-79, 2008.

TEN CATE, J. M.; EXTERKATE, R.A; BUIJS, M.J. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. **Caries Res**. v. 40, p. 136-141, 2006.

WEGEHAUPT, F.J.; ATTIN, T. The role of fluoride and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate in the prevention of erosive/abrasive wear in an in vitro model using hydrochloric acid. **Caries Res**, v. 44, n. 4, p. 358-63, 2010.

WETTON, S.; HUGHES, J.; NEWCOMBE, R. G.; ADDY, M. The effect of Saliva Derived from Different Individuals on the Erosion of Enamel and Dentine. **Caries Res**, v. 47, p. 423-426, 2007.

WIEGAND, A.; KÖWING, L.; ATTIN, T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. **Arch Oral Biol**. v. 52, p. 1043-7, 2007.

WONGKHANTEE, S.; PATANAPIRADEJ, V.; MANEENUT, C.; TANTBIROJN, D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. **J Dent**, v. 34, p. 214-220, 2006.

ZERO, D. T. Etiology of dental erosion: extrinsic factors. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2; p. 162-177, Apr., 1996.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES
HUMANOS - CEP**

CERTIDÃO

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 31/08/2010, após análise do parecer do relator, resolveu considerar APROVADO o projeto de pesquisa intitulado EFEITO DO CPP-ACP INSERIDO EM UMA GOMA DE MASCAR NO CONTROLE DA EROSÃO DENTÁRIA. Protocolo CEP/HULW nº. 463/10, Folha de Rosto nº 362845, da pesquisadora LUCIANA VILAR DE OLIVEIRA DINIZ.

No final da pesquisa, solicitamos enviar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

João Pessoa, 31 de agosto de 2010.


Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - CEP/HULW

Profª Drª Iaponira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW - 4º andar. Campus I - Cidade Universitária.
Bairro: Castelo Branco - João Pessoa - PB. CEP: 58051-900 CNPJ: 24098477/007-05
Fone: (83) 32167302 — Fone/fax: (083)32167522 E-mail - cepulw@hotmail.com

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Doação dos Dentes)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Efeito do CPP-ACP inserido em uma goma de mascar no controle da erosão dentária sobre o esmalte

Pesquisadores responsáveis: Acad. Luciana
Prof^a. Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira
Prof. Franklin Delano Soares Forte

Prezado (a) Senhor (a)

Somos cirurgiões-dentistas e pesquisadores e estamos realizando um estudo com o objetivo de avaliar *in situ* o efeito do CPP-ACP inserido em uma goma de mascar no controle da erosão dentária sobre o esmalte.

Essa pesquisa se propõe a verificar os possíveis benefícios que um produto derivado da proteína do leite, o CPP-ACP inserido em um chiclete, pode ter na prevenção e controle da erosão dentária associada ou não ao desgaste pela escovação. Com isso, os cirurgiões-dentistas poderão dispor de mais um dado clínico para conscientização e prevenção da população quanto aos maus hábitos alimentares e suas conseqüências, sobretudo para a população que mais consome bebidas refrigerantes, ou seja, crianças e adolescentes.

Nesse estudo serão utilizados 110 dentes humanos terceiros molares, extraídos por razões ortodônticas ou impactação, dos quais serão obtidos os blocos de esmalte, para serem fixados em um aparelho intrabucal palatino que será posteriormente utilizado pelos voluntários do estudo. Os blocos serão confeccionados por um dos pesquisadores, no Laboratório de Técnicas Histológicas da UFPB, com toda técnica, segurança e higiene de acordo com as normas da Organização Mundial de Saúde e do Ministério da Saúde.

Esclarecemos que sua participação é voluntária, e o (a) senhor (a) pode retirar-se da pesquisa em qualquer fase da mesma sem constrangimento. Será garantido sigilo de todos os dados de identificação dos participantes frente a qualquer publicação ou informativo da pesquisa. Esperando contar com o seu apoio, desde já agradecemos a sua colaboração.

Atenciosamente,

A Coordenação da Pesquisa.

Contato com o pesquisador responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Luciana Vilar de Oliveira. Telefone: 3216-7254. End. Departamento de Morfologia - CCS/ UFPB, e-mail: lucianavilar114@hotmail.com. Qualquer dúvida ou esclarecimento, ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderlei (HU): 3216-7302.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DE PESQUISA

Declaro que fui devidamente esclarecido (a) e concordo com a minha participação na pesquisa intitulada: Efeito do CPP-ACP inserido em uma goma de mascar no controle da erosão dentária sobre o esmalte. Autorizo a doação dos dentes extraídos e a liberação dos dados obtidos para apresentação em eventos científicos e publicações, desde que a minha identidade seja garantida sob sigilo.

AUTORIZAÇÃO:

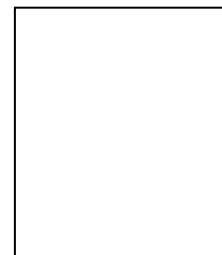
(Assinatura do participante da pesquisa)

(Assinatura do responsável do Menor)

(Assinatura da testemunha/analfabeto)

(Assinatura do Pesquisador responsável)

João Pessoa, _____ de _____ de 200__



APÊNDICE B – Carta de Esclarecimento ao Voluntário

CARTA DE ESCLARECIMENTO AO VOLUNTÁRIO

Muitas dúvidas existem a respeito do possível efeito erosivo da Coca-Cola sobre o tecido dentário humano, sobre o papel da escovação (fator abrasivo) no aparecimento e agravamento do desgaste dentário e sobre o poder da saliva em reverter o processo.

Para o esclarecimento dessas dúvidas, estudos *in situ*, ou seja, estudos onde são colocados aparelhos removíveis de acrílico no céu da boca contendo blocos de esmalte dentário, que serão submetidos às condições da cavidade bucal por um determinado período de tempo, têm sido preconizados, pois simulam justamente as condições bucais e os riscos envolvidos podem ser controlados, já que é utilizado um período experimental curto.

Face a necessidade de pesquisas com a finalidade de elucidar alguns aspectos envolvidos na erosão, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito que um produto derivado da proteína do leite, o CPP-ACP inserido em um chiclete terá sobre o esmalte dentário após episódios de erosão provocada pela Coca-Cola, estando estes episódios associado ou não a abrasão por escovação imediata (logo após a erosão) e mediata (uma hora após a erosão).

Para tal, será necessária a sua colaboração espontânea na utilização de um aparelho contendo blocos de esmalte humano previamente esterilizados.

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Voluntários)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E ODONTOLOGIA SOCIAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Efeito do CPP-ACP inserido em uma goma de mascar no controle da erosão dentária sobre o esmalte

Pesquisadores responsáveis: Luciana Vilar de Oliveira Diniz
Prof^{fa}. Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira
Prof. Franklin Delano Soares Forte

As informações a seguir descreverão o papel que Sr. (a) terá como participante desta pesquisa. O pesquisador responderá a qualquer dúvida que o (a) senhor (a) possa ter sobre este termo de consentimento e sobre o estudo. Por favor, leia-o atentamente.

Objetivos da pesquisa: Verificar os possíveis benefícios que um produto derivado da proteína do leite, o CPP-ACP inserido em um chiclete, pode ter na prevenção e controle da erosão dentária associada ou não ao desgaste pela escovação. Com isso, os cirurgiões-dentistas poderão dispor de mais um dado clínico para conscientização e prevenção da população quanto aos maus hábitos alimentares e suas consequências, sobretudo para a população que mais consome bebidas refrigerantes, ou seja, crianças e adolescentes.

Descrição: Para a realização deste estudo, o Sr. (a) utilizará um aparelho intrabucal, por três períodos de 7 dias, contendo blocos de dentes, devidamente esterilizados. O Sr. (a) deverá seguir o protocolo conforme orientação do pesquisador. Não poderá retirar o aparelho por mais de três horas por dia, a não ser durante os períodos de refeição. Quando for solicitado, você imergirá todo o aparelho em CocaCola[®] por cinco minutos, três vezes ao dia. O responsável poderá solicitar que você escove os blocos do aparelho imediatamente após ter feito a imersão do aparelho na CocaCola[®] e 1 hora após a imersão. Será entregue escova e creme dental e, sempre que necessário, poderá ser solicitado a sua reposição.

Autonomia – a participação é voluntária, e o (a) senhor (a) pode retirar-se da pesquisa em qualquer fase da mesma sem constrangimento. Será garantido sigilo de todos os dados de identificação dos participantes frente a qualquer publicação ou informativo da pesquisa.

Beneficência - A sua participação na pesquisa contribuirá para o estudo da erosão dentária e todos os voluntários serão orientados sobre higiene bucal e kits de higiene (escova + dentífrico).

Não Maleficência – Não haverá qualquer situação que provoque mal ao participante, pois esta metodologia vem sendo empregada em estudos nacionais e internacionais. Não há risco durante o experimento.

Justiça – O estudo é aleatório e todos os voluntários passarão pelas mesmas fases da pesquisa. Todos receberão instruções de higiene oral, e não haverá qualquer meio de discriminação dos participantes da pesquisa.

Os resultados obtidos serão publicados e divulgados em periódicos especializados, congressos e seminários. Será garantido sigilo de todos os dados de identificação dos participantes, que em hipótese alguma serão divulgados.

Contato com o pesquisador responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Luciana Vilar de Oliveira. Telefone: 3216-7254. End. Departamento de Morfologia - CCS/ UFPB, e-mail: lucianavilar114@hotmail.com. Qualquer dúvida ou esclarecimento, ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderlei (HU): 3216-7302.

Atenciosamente,

A Coordenação da Pesquisa.

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DE PESQUISA

Declaro que fui devidamente esclarecido (a) e concordo com a minha participação na pesquisa intitulada: Efeito do CPP-ACP inserido em uma goma de mascar no controle da erosão dentária sobre o esmalte. Autorizo a liberação dos dados obtidos para apresentação em eventos científicos e publicações, desde que a minha identidade seja garantida sob sigilo.

_____, ____ de _____ de 20____.

(nome completo)

(número do RG)

Endereço: _____

Telefone: _____

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. Todos os materiais utilizados não acarretarão em custo ao voluntário.
2. Durante o experimento, os voluntários deverão escovar seus dentes com o dentífrico fluoretado fornecido pela autora do trabalho e bem como escovar os blocos de esmalte com dentífrico não fluoretado.
3. A pesquisa será composta por três etapas, com duração de sete dias cada uma e com intervalo de sete dias entre as mesmas.
4. Os voluntários deverão utilizar um aparelho e só removerão para as principais refeições (café da manhã, almoço e jantar), ocasião em que o dispositivo ficará envolto por uma gaze encharcada por água deionizada fornecida pela pesquisadora. Em seguida realizarão a higiene bucal e esperarão ao redor de dez minutos para recolocar o aparelho.
5. Durante o uso do aparelho, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido, exceto água.
6. Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a refeição (máximo de uma hora).
7. Realize sua higiene bucal normalmente, utilizando o dentífrico fluoretado dado pela autora, após as refeições, sem o aparelho.
8. Os voluntários deverão imergir o aparelho em 125 mL da bebida Coca-Cola, fornecida pela autora, durante cinco minutos, nos horários pré- estabelecidos (8:00, 12:00, 16:00, 20:00 h). Caso não consigam seguir estritamente os horários, os voluntários deverão ter em mente que a imersão da bebida só poderá ser efetuada cinco minutos após as refeições e, que o aparelho deverá permanecer na boca pelo menos por três horas, para se executar uma nova imersão.
9. Em seguida deverão escovar uma fileira horizontal do aparelho, que estará indicada com as letras JÁ, no qual há dois blocos, com trinta segundos de escovação em cada bloco, com um mínimo de dentífrico, sem exercer pressão. O aparelho será então recolocado na boca, e após uma hora de permanência, será novamente retirado para que o voluntário possa realizar a escovação da fileira indicada com 1H, procedendo a escovação da mesma forma. Em duas das fases, ou seja, por quatorze dias, após a escovação imediata seguida da recolocação do aparelho na boca, o voluntário deverá mascar o chiclete (um tablete do Trident e do Trident Xtra Care) fornecido pela autora por vinte minutos. Esta informação será reforçada durante o experimento.
10. Para realizar a escovação, os pacientes deverão certificar qual fileira deve ser escovada (imediato –JÁ e mediato – 1H). Para haver uma padronização da amostra, os voluntários serão treinados em relação em à escovação sem força, utilizando uma porção de dentífrico correspondente a uma sujeira em toda a extensão das cerdas, sem exercer pressão.

11. Anotar os horários de imersão do aparelho na bebida e os períodos em que o aparelho ficará fora da boca justificando-os.
12. Uma vez ao dia, antes de dormir, os voluntários deverão realizar a desinfecção do aparelho utilizando 0,2% de clorexidina, por dois minutos, sempre respeitando as três horas de permanência na boca após a escovação.
13. O chiclete deve ser mascado vigorosamente durante os vinte minutos alternando o lado (direito e esquerdo) tomando cuidado para que ele não grude no aparelho.
14. Os voluntários deverão retornar a clínica, logo que acabe o período de experimento, para troca dos aparelhos e blocos.
15. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja repostado.
16. Observar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se as proteções de esmalte cosmético, nas metades dos fragmentos permanecem intactas, caso caiam entrar em contato com a autora imediatamente.
17. Qualquer dúvida entrar em contato com a autora do trabalho, no telefone: 91346759.

APÊNDICE E – Ficha de descrição do uso do aparelho

FICHA DE DESCRIÇÃO DO USO DO APARELHO

Nome: _____

Turma: _____ Protocolo: _____

[illegible]