



DAYSE ANDRADE ROMÃO

**VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE CICLAGENS EROSIVAS PARA
ESTIMAR O EFEITO DOSE-RESPOSTA DO pH NA EROSÃO
INICIAL DO ESMALTE DENTAL**

PIRACICABA-SP

2014



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

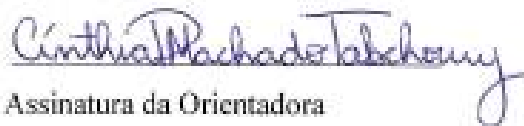
DAYSE ANDRADE ROMÃO

**VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE CICLAGENS EROSIVAS PARA
ESTIMAR O EFEITO DOSE-RESPOSTA DO pH NA EROSÃO
INICIAL DO ESMALTE DENTAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Dayse Andrade Romão, e orientada pela Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury.


Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

R662v Romão, Dayse Andrade, 1983-
Validação de um modelo de ciclagens erosivas para estimar o efeito dose-resposta do pH na erosão inicial do esmalte dental / Dayse Andrade Romão. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Cíntia Pereira Machado Tabchoury.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentes - Erosão. 2. Ácido cítrico. 3. Esmalte dentário. 4. Concentração de ions de hidrogênio. I. Tabchoury, Cíntia Pereira Machado, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Validation of a erosion cycling model to estimate the pH dose-response effect on initial erosion of dental enamel

Palavras-chave em inglês:

Tooth erosion

Citric acid

Dental enamel

Hydrogen-ion concentration

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Cíntia Pereira Machado Tabchoury [Orientador]

Cecília Pedroso Turssi

Wander José da Silva

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



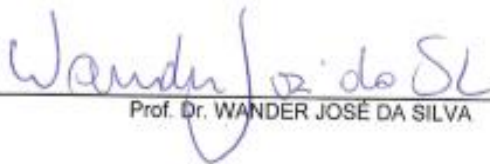
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata DAYSE ANDRADE ROMÃO aprovada.



Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY



Profa. Dra. CECILIA PEDROSO TURSSI



Prof. Dr. WANDER JOSÉ DA SILVA

RESUMO

Modelos in vitro devem mimetizar situações próximas das condições reais, entretanto poucos modelos para avaliar erosão em esmalte dentário nestas condições são encontrados na literatura, além de apresentarem algumas limitações. Assim, o objetivo do presente estudo foi validar um modelo de ciclagens erosivas que simule os episódios de erosão/exposição do esmalte dental à saliva, avaliando o efeito dose-resposta para soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH. O modelo de ciclagens erosivas de pH teve uma duração de 5 dias, de forma que blocos de esmalte bovino, selecionados quanto à dureza de superfície e análise de perfilometria, foram imersos em saliva humana estimulada por 1 h a 37°C sob agitação (100 rpm) antes do primeiro desafio erosivo de cada dia para formação de película adquirida. Em seguida os blocos dentais foram tratados 4 vezes ao dia com a solução de tratamento (2,5 mL/mm² de área exposta de esmalte dental) sob agitação (100 rpm) por 1 min e nos intervalos entre os tratamentos e durante à noite, os blocos foram imersos em saliva artificial a 37°C sem agitação. Para avaliação do modelo quanto ao efeito dose-resposta ao pH, os blocos (n=12) foram tratados com as seguintes soluções: G₁ - cacodilato pH 7,0 (controle); G₂ - ácido cítrico pH 2,5; G₃ - ácido cítrico pH 3,5; G₄ - ácido cítrico pH 4,5; G₅ - ácido cítrico pH 5,5; G₆ - ácido cítrico pH 7,0. Todas as soluções foram preparadas na concentração de 47,6 mM. Diariamente, ao final da ciclagem e após a imersão na saliva artificial durante à noite, os blocos foram avaliados quanto à dureza de superfície para cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e ao final do experimento a análise perfilométrica foi novamente realizada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey(p<0,05). Os resultados ao final da ciclagem mostraram que houve um aumento crescente da %PDS em função dos dias na maioria dos grupos e que os blocos tratados com solução de pH 2,5 apresentaram a maior %PDS (p<0,05). Na comparação entre grupos os resultados demonstram que no 4º dia de ciclagem foram verificadas diferenças significativas entre todos os grupos (p<0,05). Já os resultados após saliva apresentaram menores valores de %PDS quando comparados àqueles após ciclagem. Quanto à perfilometria, os blocos dentais tratados com soluções de pH 2,5 e 3,5 apresentaram as maiores perdas de superfície, diferindo entre si e dos demais grupos

($p < 0,05$). Conclui-se que o estudo proposto permitiu a validação de um modelo de ciclagens erosivas que demonstrou efeito dose-resposta para erosão inicial de esmalte dentário após exposição a diferentes valores de pH.

Palavras-chave: Ácido cítrico. Erosão dentária. Esmalte dentário. In vitro. pH.

ABSTRACT

In vitro models should mimic situations close to the real conditions, however, few models to assess tooth enamel erosion in these conditions are found in the literature, besides presenting some limitations. Thus, the objective of this study was validate a model that simulates cycling episodes of erosion/exposure of dental enamel to saliva, evaluating the dose-response effect for citric acid solutions with different pH values. The model of erosive cycling lasted 5 days, and bovine enamel blocks, selected according to the surface hardness and surface profilometry analysis, were immersed in stimulated human saliva for 1 h at 37°C under agitation (100 rpm) before the first erosive challenge in each day for salivary pellicle formation. Then the dental blocks were treated 4 times daily with the treatment solution (2.5 mL/mm² per area of exposed enamel) under stirring (100 rpm) for 1 min and in the intervals between treatments and during the night the blocks were immersed in artificial saliva at 37°C without stirring. To evaluate the model with regard to the dose-response to pH, blocks (n = 12) were treated with the following solutions: G1 - cacodylate pH 7.0 (control), G2 - citric acid pH 2.5, G3 - acid citric pH 3.5; G4 - citric acid pH 4.5; G5 - citric acid pH 5.5; G6 - citric acid pH 7.0. All the solutions were prepared in a concentration of 47.6 mM. Daily, at the end of the cycling and after immersion in artificial saliva during the night, the blocks were evaluated for surface hardness to calculate the percentage of surface hardness loss (%SHL) and at the end of the experiment profilometry analysis was performed again. The results were submitted to ANOVA and Tukey's test (p<0.05). The results showed a gradual increase in the %SHL at the end of the cycling model as a function of days in most of the groups and the blocks treated with pH 2.5 solution showed the highest %SHL (p<0.05). In the comparison of the groups, the results showed in the 4th cycling day significant differences among all groups (p<0.05). The results after saliva exposure showed lower %SHL when compared to those after cycling. Regarding profilometry, dental blocks treated with solutions pH 2.5 and 3.5 showed the highest surface losses, differing from each other and from the other groups (p<0.05). In conclusion, the proposed study allowed the validation of an erosive cycling model that

demonstrated dose-response effect for early tooth enamel erosion after exposure to different pH values.

Key Words: Citric acid. Tooth erosion. Dental enamel. In vitro. pH.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNCICE	47
ANEXO	55

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Dênis e Idelma** e ao meu marido **Sandro** por todo apoio, amor e confiança nas minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa da **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de mestrado, sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, minha orientadora, a quem não tenho palavras para descrever os meus agradecimentos. Agradeço pelos ensinamentos, apoio, paciência, confiança e conselhos profissionais e pessoais. Obrigada pelo meu crescimento e por acreditar em mim.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** pelos ensinamentos e exemplo de dedicação e profissionalismo na pesquisa. É uma honra ter sido sua aluna.

À **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**, pelos seus ensinamentos e desafios propostos, pois contribuíram para o meu crescimento e formação nesta minha fase de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Anderson Hara e ao técnico Adam Benjamim Kelly do Erosion Laboratory, Oral Health Research Institute - Indiana University**, pela valiosa contribuição nas análises de perfilometria, sempre com muita presteza e gentileza.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pelas ajudas e pelos momentos de descontração e convivência.

À **Érica Alessandra Pinho Sinhoreti** e **Ana Paula Carone**, secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP; à **Eliete Riguetto**, secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas; e à Sra **Maria Elisa dos Santos**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela atenção e disponibilidade.

Aos **Profs. Drs. Jose Ivo Limeira dos Reis** e **Lucineide de Melo Santos**, meus orientadores de iniciação científica, por seus conselhos e ensinamentos.

A todos os **voluntários** que participaram desta pesquisa, pela disponibilidade e colaboração.

A todos os **amigos da pós-graduação** pelos momentos de convivência e descontração, compartilhando conhecimentos e experiências.

Agradeço imensamente a toda minha família pelo apoio incondicional: ao meu marido **Sandro** pelos incentivos e companheirismo, compartilhando muitas decisões da minha vida. Aos meus amados pais, **Dênis** e **Idelma**, a minha eterna gratidão. Aos meus irmãos **Diogo** e **Douglas**. Ao meu sobrinho **Hugo** por entender a minha ausência e aos meus queridos avós, **Balbino** (in memorian) e **Adília**.

1 INTRODUÇÃO

Embora existam variações nos índices de prevalência e incidência da erosão dentária (Aidi et al., 2011; Huysmans et al., 2011), tem sido observado que a sua presença e progressão tem aumentado em crianças, jovens e adultos (Huysmans et al., 2011). A erosão dental é um processo químico de perda irreversível da estrutura dental por ácidos de origem não bacteriana (Lussi et al., 2011). Ao contrário da cárie dentária, a desmineralização ocorre a partir de um amolecimento da camada superficial do substrato dental seguida da dissolução contínua dos cristais, camada por camada, resultando em uma perda permanente do volume do dente remanescente sem a formação de lesão subsuperficial (Aidi et al., 2011; Lussi et al., 2011).

Neste processo de desmineralização, destaque tem sido dado aos ácidos provenientes principalmente de produtos da dieta, como os refrigerantes e os sucos industrializados que vêm sendo cada vez mais consumidos (Lussi et al., 2004), devido aos novos hábitos alimentares da população (Lussi et al., 2004). O consumo contínuo destes produtos torna o indivíduo suscetível a frequentes desafios ácidos que podem culminar na perda do substrato dental (Barbour et al., 2003; Lussi et al., 2011; West et al., 2011). O principal ácido encontrado nos produtos da dieta é o cítrico, um ácido fraco tricarbóxico que de acordo com as suas propriedades pode causar distintos níveis de dissolução mineral (Hugges et al., 2000; Barbour et al., 2003; Shellis et al., 2010).

Além do tipo de ácido, o potencial erosivo destes produtos pode ser influenciado por fatores químicos (pH, acidez titulável), biológicos (saliva, película adquirida) e hábitos do indivíduo (tempo de exposição, frequência e forma de ingestão) (Aidi et al., 2011; Young & Tenuta, 2011), sendo que o pH é considerado o principal responsável na dissolução das estruturas dentais devido à sua influência no grau de saturação da solução (Shellis et al., 2010; Barbour et al., 2011). Uma das formas de avaliar e compreender melhor estes fatores atuantes no processo dinâmico da erosão dentária é o uso dos modelos de estudos *in vitro*, pois estes modelos tentam simular ou mimetizar situações próximas das condições reais, não deixando de fornecer dados significativos com

elevado nível de controle científico (Arends, 1995; White, 1995; Zero, 1995; Barbour et al., 2011).

De uma forma geral, existem dois tipos de modelos *in vitro* para estimar o potencial erosivo de produtos da dieta: um modelo estático que avalia apenas o efeito erosivo e utiliza a exposição ao produto seguida de avaliação imediata, não reproduzindo o dinamismo do ambiente bucal, sendo encontrado em maior número na literatura (Larsen & Nyvad, 1999; Lussi et al., 2000; Johansson et al., 2001; Barbour et al., 2003; Hara & Zero, 2008; Stenhagen et al., 2010). Em contraste, há o modelo dinâmico que utiliza ciclos de exposição alternada entre ácido e solução remineralizante ou saliva (Lippert et al., 2004; Panich & Poolthong, 2009; Scaramucci et al., 2011).

Este modelo dinâmico de ciclagem erosiva que faz uso da exposição a um desafio ácido (solução ácida) alternado com exposição à solução remineralizante (ou saliva artificial) tem como vantagem a tentativa de mimetizar o processo de erosão. Assim, aumenta-se a chance da obtenção de resultados confiáveis e mudanças na estrutura dental podem ser detectadas, demonstrando a sua relevância clínica como reflexo de um hábito dietético. Porém, poucos trabalhos *in vitro* que fazem uso de modelos de ciclagem erosiva são encontrados na literatura (West et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). Além disso, os mesmos apresentam limitações em seus delineamentos, pois apenas ciclos repetidos e alternados entre as soluções foram realizados sem considerar e a frequência diária de ingestão, o tempo necessário para simular as funções remineralizante da saliva, a formação da película adquirida, além de não considerarem o fator agitação na exposição ao ácido (Panich & Poolthong, 2009; Scaramucci et al., 2011), sendo que adicionalmente a estas limitações, estes modelos não foram validados (West et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). Em acréscimo, um modelo para ser validado, precisa apresentar uma relação dose-resposta, demonstrando uma sensibilidade ao método aplicado com a presença de fatores que reflitam o dinamismo de desenvolvimento da erosão dentária.

Considerando o exposto, observa-se a necessidade do desenvolvimento de um modelo com metodologia válida que responda aos pré-requisitos do efeito dose-resposta entre pH e seu efeito na erosão do esmalte dentário, pois não há na literatura modelo *in vitro* de erosão que tenha sido validado. Assim, o objetivo do presente estudo foi validar

um modelo de ciclagens erosivas que simule os episódios de erosão/exposição do esmalte dental à saliva, avaliando o efeito dose-resposta para soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EROSÃO DENTAL

A erosão dental é um processo químico de perda irreversível dos tecidos dentais que envolve a dissolução de esmalte e/ou dentina por ácidos não derivados de bactérias. A desmineralização envolvida neste processo é caracterizada pelo amolecimento da superfície mineral devido à dissolução dos prismas periféricos sem a ocorrência de formação de lesão subsuperficial. Uma dissolução contínua dos cristais ocorre camada por camada, resultando em uma perda permanente do volume do dente com um amolecimento da camada da superfície remanescente. É importante acrescentar que esta perda mineral depende do tempo de exposição, do tipo de ácido ou da substância utilizada (Lussi et al., 1993; Aidi et al., 2011; Lussi et al., 2011).

Os ácidos responsáveis pela dissolução dos tecidos dentais podem ter origem extrínseca ou intrínseca. As fontes extrínsecas dos ácidos podem ser provenientes da dieta por meio do consumo de produtos ácidos (sucos, refrigerantes, vinhos, alimentos), do tipo de ocupação profissional, pela prática de esportes, tipo de medicamentos e produtos de higiene bucal. Destaque tem sido observado quanto aos ácidos da dieta, provenientes de alimentos e bebidas industrializados, principalmente de refrigerantes, pois são considerados os principais agentes erosivos, (Lussi et al., 2012) e isto tem sido relacionado principalmente às mudanças no estilo de vida da população. O contínuo aumento neste consumo torna o indivíduo suscetível a frequentes desafios ácidos que podem resultar na perda do substrato dental (Barbour et al., 2003; Lussi et al., 2011; West et al., 2011; Lussi et al., 2012).

Em acréscimo, o tipo de ocupação profissional e a prática de esportes são considerados fatores no processo de erosão dental. O contato frequente com ácidos no ambiente de trabalho pode aumentar a ocorrência ou severidade da erosão dental, pois tem sido observado que trabalhadores de indústria química, provadores de vinho e praticantes de alguns esportes podem apresentar um risco de ter erosão dental devido à exposição e maior contato dos dentes com substâncias ácidas (Lussi et al., 2011). Ainda, alguns medicamentos e produtos de higiene bucal são ácidos e seu potencial erosivo tem sido

investigado, entretanto poucas informações têm sido encontradas sobre a contribuição destes como fatores etiológicos para o desenvolvimento de erosão. Os medicamentos que apresentam potencial erosivo são aqueles que apresentam baixo pH, alta acidez titulável e que reduzem o fluxo salivar e a capacidade tamponante da saliva. Já os produtos de higiene bucal que podem causar erosão são aqueles que apresentam baixo pH (Hellwig & Lussi, 2006; Barbour et al., 2011).

Em relação aos ácidos de origem intrínseca, estes também apresentam sua importância no estudo da erosão, como por exemplo, o ácido clorídrico proveniente do estômago. O ácido clorídrico pode ter efeito erosivo se for mantido regularmente na cavidade bucal (Lussi et al., 2011) e a migração deste ácido pode estar relacionada a condições de regurgitação e vômito associados a desordens alimentares como bulimia e anorexia, doença do refluxo gastro-esofágico e em outras situações como alcoolismo crônico e gravidez (Bartlett, 2006). Logo, a erosão dental é uma condição proveniente de uma etiologia complexa em que diversos fatores relacionados ao desgaste erosivo podem estar associados (Larsen & Nyvad, 1999; Aidi et al., 2011; Lussi et al., 2011).

Após a exposição ao ácido, o substrato dental pode se tornar suscetível a outro processo de desgaste, a abrasão, devido ao amolecimento da superfície mineral, ocorrendo um aceleração de dissolução mineral. Erosão e abrasão são tipos de desgaste que interagem entre si e raramente acontecem sozinhos (Attin et al., 2003; Aidi et al., 2011; Wiegand et al., 2011). Ainda, a interação entre erosão e abrasão possui ação aditiva devido ao maior risco de desgaste gerado. Isto pode ser decorrente das forças abrasivas produzidas durante o processo de escovação realizada após a ingestão de produtos ácidos, acelerando o processo de perda mineral e também pela abrasão mecânica causada pela língua (Eisenburger & Addy, 2001; Hara et al., 2008; Lussi et al., 2011). A erosão dental é listada na Classificação Internacional das Doenças, pois a estrutura dental se torna tão desgastada que tem a sua função e aparência afetadas, gerando uma condição patológica (Ganss, 2006).

2.2 FATORES MODIFICADORES DO DESENVOLVIMENTO DA EROSÃO DENTAL

Devido a uma grande variedade de propriedades químicas dos produtos da dieta, o seu potencial erosivo pode ser influenciado por fatores químicos, biológicos e comportamentais. Logo, estes fatores têm sido bastante discutidos e recebido atenção nos estudos sobre erosão dental (West et al., 2000; Barbour et al., 2011; Young & Tenuta, 2011).

2.2.1 FATORES QUÍMICOS

Dentre os fatores químicos, o pH é considerado o principal responsável na dissolução das estruturas dentais devido à sua influência no grau de saturação da solução ácida. Segundo a literatura, aumentos na dissolução da apatita são decorrentes da diminuição nos valores de pH (Shellis et al., 2010; Barbour et al., 2011). Larsen & Nyvad (1999) avaliaram a capacidade erosiva de diferentes tipos de refrigerantes e sucos de laranja e verificaram que a dissolução do esmalte era inversamente proporcional ao pH da substância.

Barbour et al. (2003), por meio de uma análise por nanoindentação, avaliaram a dissolução do esmalte dental humano em soluções de ácido cítrico com valores de pH entre 2,30 e 6,30. Apenas uma exposição à solução ácida seguida de avaliação foi realizada. Mudanças significativas na dureza e redução do módulo de elasticidade foram verificadas após as exposições a todas as soluções, entretanto não foi encontrada diferença significativa na dureza das amostras tratadas com soluções de pH 2,30 a 2,90. Acima destes valores houve uma dependência linear da dureza em relação ao pH da solução. Shellis et al. (2010), em um estudo *in vitro*, avaliaram o grau de dissolução de esmalte, dentina e discos de hidroxiapatita em função do pH (2,45, 3,2, e 3,9) como uma das variáveis analisadas. As taxas de dissolução dos substratos foram normalizadas para melhor comparação entre os resultados, verificando-se um aumento de dissolução dos substratos à medida que o valor de pH diminui. Os autores ainda concluíram que seus resultados confirmam a importância do pH como o principal fator envolvido na erosão.

Além do pH, o tipo do agente erosivo é um item fundamental, pois os ácidos apresentam características diferentes que interferem no processo erosivo (Shellis et al., 2011). Os ácidos podem ser orgânicos, como os ácidos cítrico, málico, tartárico, láctico e acético, ou inorgânicos como o ácido fosfórico e clorídrico. Eles podem ser encontrados naturalmente em sucos, frutas e vegetais ou podem fazer parte de algumas bebidas, atuando como conservantes e adstringentes (West et al., 2000). O ácido clorídrico é outro tipo de ácido que também pode ser utilizado em estudos que avaliam a influência de fatores intrínsecos, principalmente os gastro-esofágicos. É um ácido forte que se dissocia completamente (Young & Tenuta, 2011; Attin et al., 2013).

O principal ácido encontrado nos produtos da dieta é o cítrico, sendo desta forma considerado um ácido de escolha na maioria dos estudos sobre desafios erosivos e sua inclusão tem sido sugerida para se permitir uma comparação entre os estudos que simulam um desafio erosivo (Barbour et al., 2011). O ácido cítrico é um ácido fraco, com três grupos carboxilas (COOH) e assim possui três valores de pKa, um para cada íon H⁺ reversivelmente ligado ao íon citrato (pK1= 3,13; pK2= 4,76; pK3= 6,40). Em situação de valores de pH mais baixos, os íons hidrogênio do ácido cítrico interagem com a apatita e o equilíbrio sofre uma transformação, pois há um fornecimento de íons H⁺ que se ligam diretamente aos íons da região do cristal, gerando uma dissolução superficial. Já em valores de pH mais elevados, quando dois ou todos os íons H⁺ são removidos da molécula do ácido cítrico, o ânion citrato forma um complexo estável com o cálcio por meio de interações eletrostáticas tridimensionais que para compensar o produto de solubilidade mais hidroxapatita será dissolvida, obtendo desta forma sua ação quelante. Em situações de valores intermediários de pH, ambos os mecanismos podem estar ocorrendo (Cury et al., 1981; Barbour et al., 2003; Featherstone & Lussi, 2006).

Um outro fator que influencia o efeito erosivo dos produtos da dieta é a concentração de ácidos encontrados em bebidas ou soluções, pois segundo a literatura um aumento na concentração do ácido ocasiona um aumento na desmineralização (West et al., 2000; Shellis et al., 2010). Um estudo in vitro (West et al., 2000) avaliou por meio de análise perfilométrica o efeito de diferentes valores de concentração (0,05, 0,1, 0,5 e 1%) de diferentes ácidos (cítrico, málico, láctico e fosfórico) em esmalte e dentina. Foi verificado

que as amostras submetidas a valores maiores de concentração do ácido apresentaram um aumento de desgaste erosivo. Shellis et al. (2010) verificaram em um estudo in vitro que as taxas de dissolução de esmalte foram significativamente maiores em concentração a 1% do que a 0,3% em determinados valores de pH (2,25 e 3,2).

Além de considerar os fatores pH, tipo de ácido e sua concentração, é necessário conhecer a influência da acidez titulável de uma solução ou bebida, pois a partir do seu conhecimento pode-se obter dados sobre a habilidade e potencial erosivo de um ácido (Shellis et al., 2010; Barbour et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). Em estudos in vitro, a acidez titulável pode ser avaliada ao se adicionar substância de característica básica com quantidade necessária para se alcançar um determinado valor de pH, e quanto maior for a quantidade adicionada, maior a acidez titulável de um ácido e mais mineral será dissolvido (Larsen & Nyvad, 1999; Cairns et al., 2002). No mesmo estudo em que foi avaliada a relação do pH e a dissolução de esmalte, Larsen & Nyvad (1999) também avaliaram o efeito da acidez titulável de sucos de laranja e refrigerantes. Os resultados demonstraram que os refrigerantes apresentaram menores valores de pH e poucos efeitos em relação à sua acidez titulável, enquanto que os sucos de laranja com valores maiores de pH demonstraram um elevado efeito na capacidade erosiva.

Adicionalmente a estes fatores, a temperatura da substância erosiva é outro fator que precisa ser controlado e monitorado no estudo sobre erosão dental, pois variações nos seus valores afetam a quantidade de perda mineral. Em uma solução de ácido fraco, o aumento da temperatura da solução favorece a dissociação dos íons, diminuindo o valor de pH e conseqüentemente aumentando o poder erosivo (Barbour et al., 2006; Shellis et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). West et al. (2000) verificaram em um estudo in vitro por análise perfilmétrica que aumentos na temperatura (5 a 60°C) de uma solução de ácido cítrico resultaram em maior perda mineral de tecido dental. Entretanto, valores relacionados à temperatura intra bucal de 36°C ou a temperatura ambiente de 25°C podem ser utilizados em modelos de estudos in vitro sobre a erosão dental (Eisenburger & Addy, 2003; Shellis et al., 2011).

2.2.2 FATORES BIOLÓGICOS

Os fatores biológicos são considerados relevantes e modificadores no desenvolvimento do processo da erosão dental de forma que simulem condições mais próximas da realidade clínica. Entre estes fatores encontra-se a presença da saliva, devido à sua capacidade tampão, diluição dos agentes erosivos e efeito remineralizador. A sua proteção natural pode ser atribuída à alta concentração de proteínas que se adsorvem seletivamente ao esmalte dental, permitindo a formação da película salivar adquirida, um filme orgânico que atua como barreira protetora através de uma permeabilidade seletiva, prevenindo o contato direto entre a superfície do dente e os ácidos e inibindo assim a desmineralização (Wetton et al., 2006; Lussi et al., 2011).

Devido a estas propriedades, vários modelos de estudo *in vitro* incluem a formação da película como uma etapa do protocolo experimental antes do desafio erosivo, porém, a sua inclusão depende do tipo de desafio erosivo, já que sua proteção é limitada (Young & Tenuta, 2011). Resultados obtidos de estudo *in situ* mostraram que o período de 2 h de formação de película já é o suficiente para oferecer alguma proteção contra desafio erosivo (Hannig et al., 2003). Outro estudo *in situ* (Hara et al., 2006) também avaliou o efeito protetor da película quando exposta a suco de laranja. Foi verificado que o período de formação de 2 h tem o potencial de proteger da desmineralização em estágios iniciais de erosão, mas não protegendo da total desmineralização. Hall et al. (1999) avaliaram o efeito preventivo da saliva humana sobre esmalte e dentina quando expostos a desafio erosivo em um estudo *in situ* e em *in vitro* por meio de análise de microrradiografia, sendo observada uma menor perda mineral nas amostras de esmalte e dentina no experimento *in situ* quando comparado ao *in vitro*.

Entretanto, é possível observar que menores tempos de exposição à saliva humana já permitem proteção contra erosão. Nieuw Amerongen et al. (1987) verificaram que uma película formada a partir de saliva composta (saliva submandibular e sublingual) permitiu um retardamento na formação da lesão de pelo menos 40 % após 30 min e que após 60 min de exposição a formação da lesão era completamente impedida. Wetton et al. (2006), em estudo *in vitro*, avaliaram o efeito de diferentes períodos de tempo de exposição à saliva (2 min, 1, 2, ou 4 h) na redução da erosão em esmalte e dentina humana e também

verificaram que o tempo de 1 h já oferecia proteção contra erosão para o esmalte dental humano.

Apesar dos seus benefícios, a saliva natural é um componente que apresenta algumas limitações no seu uso em estudos *in vitro*, como decomposição rápida e possibilidade de contaminação (Hara et al., 2008), e por isto muitos destes estudos têm incorporado saliva artificial aos modelos (Eisenburger et al., 2001; Wetton et al., 2006; Hara et al., 2008). Eisenburger et al. (2001) avaliaram a influência do tempo remineralizador (1, 2, 4, 6, 9 e 24 h) da saliva artificial após exposição a ácido cítrico e verificaram que os tempos de 1, 2 e 4 h já produziam uma remineralização parcial do esmalte dentário. Outro estudo *in vitro* comparou a capacidade remineralizante de saliva humana, saliva artificial e solução remineralizante e verificou por meio de microrradiografia que não houve diferença significativa em termos de perda mineral nos três grupos, entretanto em relação à profundidade da lesão o grupo tratado com saliva artificial apresentou lesões mais profundas quando comparado aos demais grupos (Amaechi & Higham, 2001). Porém, em um estudo *in vitro* de modelo de ciclagem de erosão-abrasão, foi observado que o grupo tratado com saliva artificial perdeu uma menor quantidade de minerais quando comparado aos demais grupos (água deionizada, saliva artificial modificada com mucina, saliva humana) (Hara et al., 2008).

2.2.3 FATORES COMPORTAMENTAIS

Além dos fatores químicos e biológicos que afetam e interferem no desenvolvimento da erosão dental, alguns fatores comportamentais devem ser considerados para simular a ingestão de produtos da dieta, como por exemplo, o tempo que a bebida fica em contato com a cavidade bucal e a sua forma e frequência de ingestão.

É considerado que o tempo de exposição recomendável de uma amostra a um tipo de solução ácida em um estudo *in vitro* seja no máximo 2 min, pois períodos maiores extrapolam uma condição de situação clínica (Young & Tenuta, 2011). Entretanto, é observado que a maioria dos estudos *in vitro* não utilizam valores padronizados de tempo e que as amostras são submetidas à exposição em solução ácida por diferentes valores de tempo (desde segundos até horas). Alguns estudos não comparam o fator tempo e não o

padronizam, enquanto que outros avaliaram a relação tempo e a capacidade desmineralizante de uma solução. Dentre estes, Amaechi et al. (1999) avaliaram in vitro a influência do tempo (6, 8, 10 e 12 h) de exposição das amostras em suco de laranja no desenvolvimento da erosão dental através de microradiografia e verificaram que os aumentos de perda mineral e de profundidade da lesão eram proporcionais ao aumento do tempo de exposição, entretanto estes valores de tempo são considerados elevados. Eisenburger et al. (2001) quantificaram a profundidade de lesão erosiva utilizando menores valores de tempo (2, 4 e 8 h) por meio de análise perfilométrica, correlacionando-os a diferentes valores pH e observaram que a profundidade da lesão erosiva é diretamente proporcional ao tempo de contato e inversamente proporcional aos valores de pH.

Entretanto, os estudos acima citados não verificaram a partir de qual momento pode-se verificar o início de uma relação dose-resposta. Com este fim, White et al. (2010) avaliaram o momento em que a redução de dureza e a perda mineral se tornam significantes por meio de nanoindentação (0, 2, 5, 10, 20, 30 e 60 s) e análise perfilométrica (2, 5, 10, 20, 40 e 60 min) em ácido cítrico pH 3,2 com concentração 14,4mM. Foi observado para a nanoindentação que uma redução de dureza significativa ocorre a partir de 5 s de exposição para dente humano e 10 s para dente bovino enquanto que na análise perfilométrica uma perda mineral foi verificada a partir de 20 min para dente humano e 10 min para dentes bovinos.

Outro fator associado ao comportamento está relacionado aos hábitos de ingestão, como por exemplo, segurar ou movimentar o líquido na boca antes de deglutir, o uso de canudos ou ingerir diretamente do recipiente (Eisenburger & Addy, 2003; Attin et al., 2013). Em estudos in vitro, alguns destes hábitos podem ser simulados pelos processos de agitação e/ou taxa de fluxo da solução, condições que precisam ser controladas, pois podem influenciar no resultado do processo de erosão, alterando a taxa de dissolução mineral (Shellis et al., 2011; West et al., 2011; Young & Tenuta, 2011).

Eisenburger & Addy (2003) verificaram uma forte dependência entre fluxo do líquido e erosão ao avaliarem diferentes condições de agitação (não agitação, agitação lenta e agitação rápida). Estes resultados também foram confirmados em outro estudo que avaliou o impacto das taxas de fluxo com diferentes velocidades na desmineralização de

dentina bovina e verificaram que aumentos nas taxas de fluxo resultavam em maior desmineralização do mineral (Wiegand et al., 2007). Attin et al. (2013) também verificaram que condições variadas de taxa de fluxo de diferentes ácidos (citríco e clorídrico) influenciam na desmineralização de esmalte. Além do tempo de contato do ácido com o substrato dental, e dos hábitos de ingestão, a frequência de ingestão é outro fator que precisa ser considerado. Um estudo *in situ* verificou que quanto maior a frequência de ingestão de uma bebida maior a perda mineral do esmalte dental e que estas perdas são irreversíveis (Fushida e Cury, 1999).

2.3 MODELOS LABORATORIAIS PARA ESTUDO IN VITRO DA EROSÃO DENTAL

Devido à influência dos fatores extrínsecos envolvidos no processo de erosão, muitos produtos ou bebidas têm sido avaliados e testados em estudos *in vitro*. Estes estudos apresentam como vantagem um controle maior na padronização dos modelos testados, pois as variáveis inseridas podem ser monitoradas e mensuradas (Barbour et al., 2011; West et al., 2011). De uma forma geral, existem dois tipos de modelos para o estudo da erosão *in vitro*: aqueles que utilizam apenas uma exposição ao produto seguida de avaliação imediata, sendo encontrados em maior número na literatura (Hughes et al., 2000; Lussi et al., 2000; Shellis et al., 2010; Attin et al., 2013) e os que utilizam ciclos de exposição entre ácido-solução remineralizante para mimetizar o processo de erosão na cavidade bucal (Lippert et al., 2004; Panich & Poolthong, 2009; Scaramucci et al., 2011). O modelo de ciclagem que faz uso da exposição a um desafio ácido (solução ácida) alternado com exposição à solução remineralizante (ou saliva artificial) tem como vantagem a tentativa de mimetizar uma situação clínica, pois, aumenta-se a chance da obtenção de resultados confiáveis e mudanças na estrutura dental podem ser detectadas demonstrando a sua relevância clínica como reflexo de um hábito dietético ou de desordens intrínsecas (Barbour et al., 2011; Shellis et al., 2011). Poucos trabalhos que fazem uso de modelos de ciclagem erosiva são encontrados na literatura e, além disso, pode ser observado que os mesmos não foram validados.

Lippert et al. (2004), em um estudo *in vitro*, utilizaram para ciclagem erosiva uma solução desmineralizante (ácido cítrico 0,3% com pH 3,35) alternada com solução remineralizadora (saliva artificial) para avaliar os estágios iniciais da erosão. O estudo foi composto por dois experimentos: no primeiro experimento foi avaliada a influência do tempo para remineralização, submetendo todas as amostras à desmineralização (120 s sob agitação) e posteriormente a diferentes tempos de remineralização (0,5, 1, 1,5, 2, 3 e 4 h) e em seguida à uma segunda desmineralização (60 s). No segundo experimento foram realizados ciclos alternados de desmineralização (30 s) e remineralização (1 h) com um total de 150 s para a desmineralização. As amostras foram submetidas à análise por microscópio de força atômica para avaliar dureza e redução de módulo de elasticidade. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa na dureza de superfície entre a fase de desmineralização e o tratamento remineralizador subsequente. Resultados semelhantes foram observados em relação à redução de módulo de elasticidade. Em geral não foi observada recuperação de dureza.

Wongkhantee et al. (2006) avaliaram o efeito do ácido presente em alguns alimentos e bebidas em 7 diferentes tipos de substratos (esmalte, dentina e 5 tipos de materiais restauradores). Foram realizados ciclos alternados de exposição a bebidas ou alimentos (5 s) e saliva artificial (5 s) com um total de 10 ciclos, perfazendo um total de 100 s. A dureza de superfície (Vickers) foi o método de escolha para verificar a perda mineral. Foi verificado que os grupos tratados com coca-cola, suco de laranja e bebida esportiva apresentaram redução significativa na dureza de esmalte, enquanto que em relação à dentina, resina microparticulada e resina modificada por ionômero, houve redução da dureza quando imersos apenas em coca-cola. Os demais grupos não apresentaram mudanças significativas na dureza de superfície.

Wetton et al. (2006) verificaram o efeito protetor da saliva em esmalte e dentina em diferentes períodos de tempo. Para este estudo *in vitro* foram realizados ciclos alternados de exposição à solução de ácido cítrico pH 3,2 (10 min) e saliva humana não estimulada (2 min, 1, 2 e 4 h) com um total de até 12 ciclos. Após 3, 6, 9 e 12 ciclos as amostras foram avaliadas por perfilometria. Para os dados de esmalte, foi verificado que ao

término de cada ciclo, a profundidade da lesão foi menor do que o grupo controle (água) e que o tempo de 1 h de exposição a saliva humana já apresentava efeito protetor.

Em um outro estudo *in vitro* (Panich & Poolthong, 2009), foi avaliada a perda de dureza do esmalte quando submetido a tratamento remineralizador com CPP-ACP (fosfopéptido de caseína estabilizados por cálcio amorfo). Inicialmente, as amostras foram submetidas à exposição alternada entre coca-cola (5 s) e saliva artificial (5 s), em um total de 10 ciclos. Este protocolo foi repetido por 2 vezes com 6 h de intervalo (amostras mantidas em saliva artificial com temperatura ambiente 25°C). A dureza de superfície foi avaliada e as amostras submetidas ao processo de remineralização (grupo 1- camada de CPP-ACP por 3 min e água deionizada; grupo 2- saliva artificial; grupo 3- camada de CPP-ACP e saliva artificial e o grupo 4- água deionizada). Foi observado que os grupos tratados com CPP-ACP apresentaram aumento estatisticamente significativo de dureza de superfície.

Scaramucci et al. (2011), em um estudo *in vitro*, avaliaram o potencial erosivo de suco de laranja modificado (adição de cálcio e fosfato de forma individual ou combinada) em esmalte e dentina. Foram realizadas 3 fases: na primeira fase o potencial erosivo de 15 tipos de suco de laranja modificado foi avaliado pela análise do pH-stat; na segunda fase três grupos foram avaliados (substância da fase 1 que apresentou a melhor ação protetora; um grupo controle positivo e um grupo controle negativo) e realizado um modelo de ciclagem de erosão (5 min na solução teste sem agitação a temperatura ambiente) alternado com saliva artificial (60 min sob agitação). O ciclo foi repetido 6 vezes ao dia com duração de 5 dias. Após a ciclagem foram realizadas análise perfilométrica e dureza de superfície. Na terceira fase do estudo, análise de dureza de superfície foi realizada e em seguida uma parte das amostras foi imersa em solução teste (30, 90, 150 min) e outra parte imersa em solução teste (30 min) seguida de imersão em saliva artificial (24 h). A análise de dureza final foi realizada. Na primeira fase foi verificado que a adição de polímeros de fosfato foi capaz de reduzir a dissolução da hidroxiapatita. Na segunda fase não foi observada na maioria dos grupos diferença significativa na perda de dureza. Na terceira fase foi verificada que não houve interferência dos aditivos no processo de remineralização.

Karlinsey et al. (2012) avaliaram o efeito remineralizador de 2 tipos de saliva artificial que apresentavam diferentes proporções de Ca/P_i (1,6 e 0,3). Amostras de esmalte dental bovino foram inicialmente imersas em solução de ácido cítrico 0,3% por 120 min ou em ácido cítrico 1% por 30 min e posteriormente avaliadas por dureza de superfície. Duas amostras de cada grupo foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, e as demais amostras foram imersas por 7 dias nas soluções de saliva artificial e depois submetidas a uma ciclagem de 3 dias: 2 h na saliva artificial (3 vezes ao dia) e 10 min na solução ácida (3 vezes ao dia) e imersão em saliva artificial overnight. Após o terceiro dia, as amostras foram analisadas por dureza de superfície e microscopia eletrônica de varredura. Foi verificada uma maior remineralização na solução de saliva artificial que apresentava 0,3 Ca/P_i.

Scaramucci et al. (2013), em um estudo in vitro, avaliaram o efeito protetor do fluoreto em diferentes concentrações (0, 275 e 1250 ppm de F) na perda de superfície do esmalte dental bovino sob condições de fluxo salivar normal e baixo. Inicialmente, as amostras foram individualmente inseridas em uma câmara selada e uma bomba peristáltica ligada para controlar o fluxo das soluções, em seguida eram tratadas com ácido cítrico pH 2,6 durante 2 min, seguido de saliva artificial a 0,5 (fluxo normal) ou 0,05 (fluxo baixo) ml/min. Este ciclo foi repetido 4 vezes ao dia, durante 5 dias. Duas vezes ao dia, uma escovação com suspensões abrasivas contendo flúor foi realizada durante 2 min. Os autores verificaram uma maior perda de superfície no grupo exposto a baixo fluxo salivar e que não houve efeito protetor adicional ao fluoreto de maior concentração.

Diferente dos trabalhos de ciclagem, um número maior de trabalhos que fazem uso de desafio erosivo seguido de avaliação de perda mineral tem sido encontrado e a comparação entre os seus resultados apresenta-se muito difícil. Isto ocorre devido à existência de uma grande variedade de modelos, pois muitas variáveis, tais como agitação, temperatura e volume por amostra, que afetam diretamente o desenvolvimento da erosão diferem entre os estudos e em alguns casos não são relatadas, além de em alguns estudos extrapolarem as situações clínicas (Barbour et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). Adicionalmente, foi verificado que não existem modelos ou protocolos de estudo largamente utilizados que fazem utilização de saliva artificial ou humana nos modelos de

ciclagem e que ainda não existe consenso sobre o tempo de duração de um desafio erosivo e sobre uso de soluções com diferentes graus de saturação em relação à hidroxiapatita (Barbour et al., 2011; Shellis et al., 2011; Young & Tenuta, 2011).

Segundo Barbour et al. (2011), a padronização de uma metodologia seria um pré-requisito necessário para oferecer informações suficientes em publicações, permitindo que os experimentos sejam repetidos. Com isto, verifica-se a necessidade de uma padronização entre os protocolos de estudo nos modelos de ciclagem que melhor refletem um desafio erosivo (Shellis et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). Entretanto, é necessário verificar se eles incluem todos os elementos relacionados com a erosão, ou seja, se apresentam metodologia e conteúdo válidos, e neste pré-requisito os modelos *in vitro* são incompletos.

Logo, faz-se necessário que os modelos propostos respondam a perguntas relacionadas com os efeitos dose-resposta, de apresentar sensibilidade em detectar o poder erosivo dos produtos ou soluções propostas. Portanto, o desenvolvimento de modelos de ciclagem erosiva precisa ser encorajado, pois nenhum dos modelos encontrados na literatura atualmente foi validado (Shellis et al., 2011; Young & Tenuta, 2011).

3 PROPOSIÇÃO

Assim, o objetivo do presente estudo foi validar um modelo de ciclagens erosivas que simule os episódios de erosão/exposição do esmalte dental à saliva, avaliando o efeito dose-resposta para soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

O modelo de ciclagens erosivas de pH apresentou uma duração de 5 dias, de forma que blocos de esmalte bovino, selecionados quanto à dureza de superfície e análise de perfilometria, foram imersos em saliva humana estimulada por 1 h a 37°C sob agitação (100 rpm) antes do primeiro desafio erosivo de cada dia. Em seguida foram tratados individualmente 4 vezes ao dia com suas respectivas soluções (2,5 mL/mm² de área exposta de esmalte dental) sob agitação (100 rpm) por 1 min e nos intervalos entre os tratamentos e durante a noite, os blocos foram imersos em saliva artificial a 37°C sem agitação. Os blocos (n=12) foram tratados com as seguintes soluções: G₁ - cacodilato pH 7,0 (controle); G₂ - ácido cítrico pH 2,5; G₃ - ácido cítrico pH 3,5; G₄ - ácido cítrico 4,5; G₅ - ácido cítrico pH 5,5; G₆ - ácido cítrico pH 7,0. Todas as soluções foram preparadas na concentração de 47,6 mM. Diariamente, após a ciclagem e após a imersão na saliva artificial, os blocos foram avaliados quanto à dureza de superfície e ao final do experimento a análise perfilométrica foi novamente realizada.

4.2 OBTENÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE DENTAL BOVINO

Incisivos bovinos hígidos foram armazenados em formaldeído 2% pH 7,0 por um período mínimo de 30 dias para desinfecção antes de qualquer procedimento experimental (White, 1987). Em seguida, os dentes foram examinados visualmente para descartar a possibilidade de manchas e trincas que pudessem interferir na condução do trabalho, sendo os dentes com estas características excluídos. Os dentes foram seccionados na porção cervical, separando coroa e raiz, em uma cortadeira elétrica Isomet (Buehler®), utilizando um disco diamantado dupla face (Buehler®). As coroas foram posteriormente seccionadas, obtendo-se blocos dentais com dimensões de 4 x 4 mm, da sua região vestibular mais plana, sendo os cortes feitos sob refrigeração com água purificada para evitar trincas no esmalte. Para tal, foram utilizados 2 discos diamantados posicionados paralelamente e separados por um espaçador de acrílico de 4 mm de espessura.

Em seguida, a altura dos blocos de esmalte foi reduzida para cerca de 2 mm por meio da planificação da porção dentinária. Para tal, a maior área de esmalte plano foi fixada com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3 cm x 8 mm), sendo a dentina desgastada utilizando lixas de granulação 600 e politriz (Arotec APL-4), verificando a altura de cada bloco com um paquímetro digital. Posteriormente, para a planificação e polimento da superfície do esmalte, 5 blocos dentais foram fixados em uma mesma peça de acrílico e planificados por meio de lixas d'água em ordem decrescente de granulação (600 e 1200) em uma politriz (Phoenix Beta Grinder/Polisher- Buehler®). Em seguida, a superfície do esmalte foi polida por disco de feltro embebido com solução diamantada. Estes 5 blocos foram fixados em uma mesma peça de acrílico para permitir uma melhor padronização na planificação.

Entre uma lixa e outra, os blocos dentais foram lavados em ultra-som (T7, Thornton) durante 5 min, utilizando água purificada, e ao final com solução detergente (Buehler®), com o objetivo de remover as partículas do feltro e solução diamantada. Os blocos dentais foram então armazenados em recipientes plásticos fechados, cobertos com papel absorvente umedecido com água purificada e conservados em geladeira a 4°C.

4.3 SELEÇÃO DOS BLOCOS DENTAIS

Para seleção dos blocos dentais, a dureza de superfície inicial foi mensurada a partir de três edentações realizadas próximas à região central de cada bloco, a 100 µm de distância entre as mesmas, utilizando o microdurômetro Future Tech modelo FM-7 acoplado a um software FM-ARS e penetrador tipo Knoop, com carga de 50 g por 5 seg (Fushida & Cury, 1999). Os critérios de seleção foram baseados na média e desvio padrão da dureza de superfície de cada bloco dental. Foram excluídos do experimento os blocos dentais que apresentaram desvio padrão maior do que 10% de sua média de dureza individual (variabilidade intra blocos) e aqueles que apresentaram sua média individual de dureza maior ou menor do que 10% da média de dureza calculada para todos os blocos inicialmente obtidos (variabilidade entre blocos).

Após a seleção pela dureza de superfície, os blocos dentais foram então analisados quanto à curvatura por perfilometria. Os blocos dentais foram posicionados no

perfilômetro ótico (Proscan 2000; Scantron, Venture Way, Taunton, UK), tendo a superfície experimental paralela ao plano horizontal. Uma área de 3 x 3 mm foi escaneada e as imagens analisadas usando um programa de computador (Proscan 2000; Scantron), que calculou a altura média da área experimental. Foram incluídos os blocos com curvatura na faixa de - 0,30 a + 0,30 μm . Após a seleção dos blocos dentais quanto aos critérios de dureza de superfície e de perfilometria, foram selecionados 72 blocos para o desenvolvimento do modelo.

4.4 PREPARO DOS BLOCOS SELECIONADOS PARA CICLAGEM

A superfície de esmalte dos blocos dentais tiveram duas áreas laterais isoladas por fita plástica adesiva (Adhesive Unplasticised Polyvinyl Chloride – UPVC), deixando uma área central de 4 x 1 mm para ser exposta aos tratamentos (Hara et al., 2008). Esta fita permitiu uma análise perfilométrica da superfície hígida como uma área de referência para uma comparação direta entre as superfícies antes e após as ciclagens erosivas.

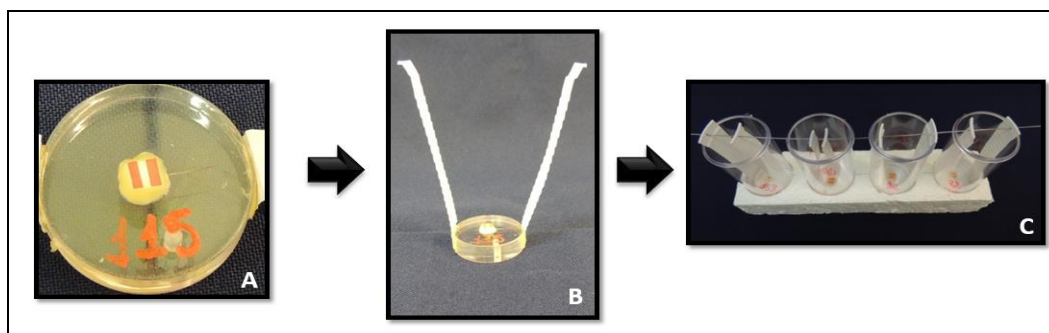


Figura 1- Preparo dos blocos dentais para o experimento. A: Áreas laterais isoladas por fita plástica adesiva; B - C: Bloco dental fixado em disco de acrílico com alças de sustentação.

4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO

Os valores de pH das soluções de ácido cítrico 47,6 mM e cacodilato 47,6 mM foram ajustados adicionando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) até que o pH da respectiva solução fosse atingido. Para tal, um eletrodo de pH, acoplado a um peagômetro, foi calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 e então imerso na solução que teve seu pH ajustado.

4.6 FORMAÇÃO DA PELÍCULA SALIVAR ADQUIRIDA

A saliva humana total estimulada foi obtida de 18 voluntários, a partir de estímulo mecânico com Parafilm. A saliva foi coletada por cada voluntário em tubos do tipo falcon (50 mL) individuais mantidos em gelo e centrifugada por 10 min à 3.800 g a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi então armazenado individualmente em freezer a - 80°C. A coleta foi realizada no período da manhã entre 7 e 9 h. O volume total de saliva a ser usado foi coletado antes do experimento. Todos os voluntários apresentavam bom estado de saúde geral e bucal, estavam em jejum e sem fazer qualquer higiene bucal anteriormente à coleta. De acordo com considerações éticas, um termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado aos voluntários para consentirem ou não a participação na pesquisa como doadores de saliva e para isto este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (processo n°. 106/2012) (Anexo).

Para os dias de desenvolvimento do modelo, as alíquotas de sobrenadante de saliva de cada voluntário foram descongeladas, homogeneizadas e utilizadas para formação da película adquirida. A sua formação foi realizada pela imersão dos blocos dentais individualmente na saliva humana, na proporção de 10 mL/bloco por 1 h a 37°C, sob agitação (Wiegand et al., 2008). No início de cada dia de ciclagem, novas alíquotas de saliva humana (sobrenadante) de cada voluntário eram descongeladas e os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados.

4.7 MODELO DE CICLAGENS EROSIVAS

O modelo de ciclagens erosivas para estimar a relação dose-resposta em função do pH apresentou duração de cinco dias. Durante os dias da ciclagem erosiva, antes do primeiro desafio erosivo de cada dia, os blocos dentais foram imersos individualmente por 1 h em saliva humana a 37°C, sob agitação (100 rpm) e posteriormente imersos nas respectivas soluções de tratamento (2,5 mL/mm² de área exposta de esmalte dental) a 37°C sob agitação (100 rpm) por um período de de 1 minuto 4 vezes ao dia. Estes blocos dentais permaneceram imersos em saliva artificial (2,5 mL/mm² de área exposta de esmalte dental), sem agitação, nos intervalos entre os desafios erosivos e após a ciclagem diária (Figura 2).

Os blocos dentais foram novamente imersos em saliva artificial, permanecendo por toda a noite até o próximo dia de ciclagem. A saliva artificial tinha a seguinte composição: 1,5 mM de Ca; 0,9 mM de PO₄ e KCl 150 mM em solução tampão tris 20 mM, pH 7,0 (Serra & Cury, 1992) e era trocada diariamente. Antes da imersão dos blocos de esmalte nas soluções de tratamento e na saliva artificial, os mesmos foram lavados com água purificada e cuidadosamente secos com papel absorvente.

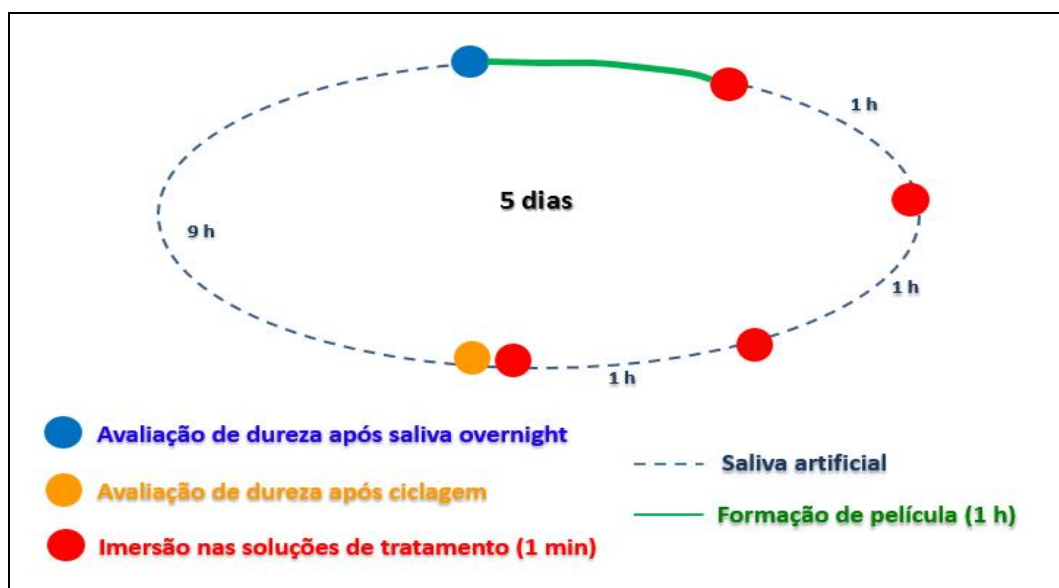


Figura 2 - Modelo de ciclagens erosivas com duração de 5 dias, com formação de película seguida da imersão em soluções de tratamento 4 vezes ao dia alternada com saliva artificial.

4.8 SOLUÇÕES DE TRATAMENTO

Para o desenvolvimento do modelo, os blocos dentais de esmalte dentário (n=12 blocos dentais/grupo) foram expostos as seguintes soluções de tratamento:

- G₁ – solução cacodilato pH 7,0 (controle);
- G₂ - solução de ácido cítrico pH 2,5;
- G₃ - solução de ácido cítrico pH 3,5;
- G₄ - solução de ácido cítrico pH 4,5;
- G₅ - solução de ácido cítrico pH 5,5;
- G₆ - solução de ácido cítrico pH 7,0.

A escolha dos valores de pH está relacionada aos valores encontrados em diferentes tipos de sucos, refrigerantes e bebidas. Alguns refrigerantes apresentam pH 2,5 (Attin et al., 2003; Zandim et al., 2008), sucos de fruta apresentam em média pH 3,5 (Lussi et al., 2000) e algumas outras bebidas apresentam valores de pH 4,5 (Lussi et al., 2004). Os valores de pH 5,5 e pH 7 das soluções de ácido cítrico foram escolhidos para observar o comportamento das amostras, pois a literatura relata que a dissolução do esmalte ocorre com $\text{pH} < 5,5$ e o pH 7 é um meio neutro, funcionando como um controle ou com efeito quelante (Cairns et al., 2002; Featherstone & Lussi, 2006; Ren et al., 2011). Todas as soluções foram preparadas na concentração de 47,6 mM, esta concentração em mM do ácido cítrico representa 1%, que é geralmente encontrada em sucos e refrigerantes (Shellis et al., 2011). Para o cacodilato, que representa uma solução tampão sem ação quelante, foi utilizada a mesma concentração em mM, a fim de se ter o mesmo número de moléculas do que na solução de ácido cítrico.

4.9 ANÁLISE DE DUREZA DE SUPERFÍCIE, PERFILOMETRIA FINAL E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A determinação da dureza de superfície pós-tratamento foi realizada nos 5 dias do modelo in vitro, após a ciclagem e após a imersão na saliva. Foram realizadas 3 endentações a 100 μm de distância das realizadas anteriormente na região central do bloco dental. A média destes valores foi usada para calcular a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ PDS} = \frac{\text{Dureza inicial} - \text{Dureza pós-experimento}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$

Ao final dos 5 dias de ciclagem erosiva, a perda de superfície também foi avaliada pela análise perfilométrica, conforme descrito anteriormente no item 4.3. Foi então calculada a perda da superfície pela subtração do valor inicial pelo valor final encontrado nesta análise. Uma análise por microscopia eletrônica de varredura também foi realizada ao final do experimento.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a verificação da validação deste modelo in vitro de ciclagens erosivas, os dados obtidos das análises de dureza realizadas diariamente com os blocos dentais e da análise perfilométrica anterior e posterior aos tratamentos foram analisados pela análise de variância. O teste de normalidade de Shapiro Wilk foi aplicado e o programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a aplicações dos testes estatísticos. Todos os testes foram aplicados com nível de significância a 5%.

5 RESULTADOS

5.1 PORCENTAGEM DE PERDA DE DUREZA DE SUPERFÍCIE (%PDS) APÓS CICLAGEM DIÁRIA

Os dados da tabela 1 apresentam os valores de %PDS dos blocos dentais após exposição a diferentes soluções de tratamento no modelo de ciclagens erosivas. Na comparação em função dos dias para cada grupo, os valores de %PDS dos blocos dentais tratados com cacodilato pH 7,0 foram negativos e o primeiro dia não apresentou diferença para segundo dia ($p>0,05$), diferindo estatisticamente dos dias seguintes ($p<0,05$), enquanto que os dias 2, 3, 4 e 5 não apresentaram diferença entre si ($p>0,05$). A %PDS dos blocos expostos ao ácido cítrico pH 2,5 apresentou diferença estatística entre todos os dias da ciclagem erosiva ($p<0,05$), com um aumento crescente em função dos dias. Porém, neste grupo não foi possível avaliar os blocos do dia 5, devido à impossibilidade de visualização das impressões feitas nos blocos dentais por perda da superfície. Em relação aos resultados dos blocos tratados com ácido cítrico pH 3,5 também é possível verificar altos valores de %PDS, entretanto, não houve diferença significativa entre alguns dias de ciclagem. O 1º dia apresentou diferença dos quatro dias subsequentes ($p<0,05$), enquanto que os dias 2 e 3 não diferiram entre si ($p>0,05$), e os dias 3, 4 e 5 apresentaram valores semelhantes em termos de %PDS ($p>0,05$). Para os resultados do tratamento com ácido cítrico pH 4,5, o primeiro dia apresentou uma menor %PDS em relação aos quatro dias subsequentes ($p<0,05$), enquanto que os dias 2 e 3 apresentaram valores similares de perda mineral, não diferindo entre si ($p>0,05$), o mesmo sendo observado para os dias 4 e 5 ($p>0,05$). Nos resultados do tratamento com ácido cítrico pH 5,5 é possível verificar diferenças estatísticas semelhantes ao grupo 4, porém este grupo apresentou menores valores de %PDS em função do tempo de ciclagem. E em relação aos blocos expostos ao ácido cítrico pH 7,0, os dados indicam uma %PDS similar entre os dias 1, 3, 4 e 5 ($p>0,05$), com diferença significativa entre os dias 1 e 2 e os demais grupos ($p<0,05$).

Na comparação entre os grupos de tratamento, verifica-se que no primeiro dia os blocos tratados com ácido cítrico pH 2,5 e 3,5 apresentam os maiores valores de %PDS com diferença estatística em relação às outras soluções de tratamento ($p<0,05$) e entre si

($p < 0,05$). No dia 2, observa-se que os blocos tratados com cacodilato pH 7,0 e ácido cítrico pH 7,0 apresentaram os menores valores de %PDS ($p > 0,05$), e que as demais soluções diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. Dados semelhantes podem ser observados para o dia 3, porém com maiores valores de %PDS. Em relação ao dia 4, os resultados demonstram que a %PDS de todos os blocos dos diferentes tipos de soluções de tratamento diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

Tabela 1- Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS; média±dp) dos blocos dentais em função dos grupos de tratamento em um modelo de ciclagens erosiva após ciclagem de cada dia (n=12).

Tratamento	Dias de ciclagem				
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Cacodilato pH 7,0 (controle)	-0,05±0,77 aA	-0,56±0,23 abA	-0,72±0,43 bA	-0,87±0,37 bA	-0,95±0,60 b
Ácido cítrico pH 2,5	31,69±2,58 aB	46,40±3,08 bB	59,63±4,18 cB	68,10±2,84 dB	-
Ácido cítrico pH 3,5	20,03±6,50 aC	38,95±5,37 bC	45,85±6,90 bcC	46,31±5,98 cC	50,29±5,66 c
Ácido cítrico pH 4,5	6,59±1,95 aA	20,98±3,99 bD	23,38±3,38 bD	28,89±3,99 cD	31,77±4,77 c
Ácido cítrico pH 5,5	3,88±2,72 aA	11,13±3,98 bE	12,20±3,90 bE	18,74±3,81 cE	21,27±4,23 c
Ácido cítrico pH 7,0	2,49±3,54 acA	-1,01±0,66 aA	4,23±3,91 cA	7,44±6,46 cF	6,54±5,12 c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey. As letras minúsculas mostram as diferenças nas linhas dentro do mesmo grupo de tratamento em função dos dias. As letras maiúsculas mostram as diferenças nas colunas entre os grupos de tratamento dentro do mesmo dia.

5.2 PORCENTAGEM DE PERDA DE DUREZA DE SUPERFÍCIE (%PDS) APÓS IMERSÃO EM SALIVA

Os dados da tabela 2 apresentam os dados de %PDS dos blocos dentais após imersão na saliva durante à noite em cada dia do modelo de ciclagens erosivas. Os resultados demonstram que a %PDS dos blocos tratados com cacodilato pH 7,0 não apresentou diferença estatística entre os dias da ciclagem erosiva ($p > 0,05$), e seus valores

foram negativos. Diferentemente, a %PDS dos blocos expostos ao ácido cítrico pH 2,5 apresentou diferença estatística em função dos dias ($p < 0,05$), de forma que os valores de %PDS se mostraram de forma crescente. Em relação aos blocos tratados com ácido cítrico pH 3,5, o primeiro dia apresentou o menor valor de %PDS com diferença estatística significativa dos quatro dias subsequentes ($p < 0,05$), que apresentaram valores de %PDS similares e não diferiram entre si ($p > 0,05$). Nos blocos tratados com ácido cítrico pH 4,5, o primeiro dia também apresentou a menor perda mineral com diferença significativa em relação aos demais ($p < 0,05$), e os dias 3, 4 e 5 apresentaram maiores %PDS do que os demais dias ($p < 0,05$), mas não diferindo entre si ($p > 0,05$). Nos resultados dos blocos expostos ao ácido cítrico pH 5,5, é possível observar que o 1º dia apresentou valor negativo, diferindo significativamente dos outros dias ($p < 0,05$). Entretanto, a perda mineral do dia 2 não diferiu significativamente do dia 4 ($p > 0,05$) e a mesma situação foi observada entre os dias 3 e 5 ($p > 0,05$) que apresentaram maiores valores de %PDS em comparação aos outros dias ($p < 0,05$). Os valores de %PDS dos blocos tratados com ácido cítrico pH 7,0 não apresentaram diferença significativa entre os três primeiros dias (1, 2 e 3) do modelo de ciclagens erosivas ($p > 0,05$), sendo que comparando os dias 3, 4 e 5 também não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Na comparação entre grupos, é possível verificar que no primeiro dia os blocos tratados com cacodilato pH 7,0, ácido cítrico pH 5,5 e pH 7,0 apresentaram valores negativos e similares de perda mineral ($p > 0,05$), enquanto que os valores de %PDS dos blocos tratados com ácido cítrico pH 2,5, 3,5 e 4,5 foram maiores e diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e dos demais grupos ($p < 0,05$). Para o dia 2 verifica-se valores negativos para os blocos tratados com cacodilato pH 7,0 e ácido cítrico pH 7,0 ($p > 0,05$), e que os blocos tratados com ácido cítrico pH 2,5, 3,5 e 4,5 apresentaram maiores valores de %PDS com diferença estatística entre si ($p < 0,05$), entretanto os blocos do tratamento com ácido cítrico pH 4,5 apresentaram valores de perda mineral semelhantes ao de pH 5,5 ($p > 0,05$). No dia 3, os blocos tratados com cacodilato pH 7,0 e ácido cítrico pH 7,0 ($p > 0,05$), também apresentaram os menores valores de %PDS ($p > 0,05$), e os demais grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre si. Dados semelhantes podem ser observados para o dia 4. Os blocos tratados com ácido cítrico pH

2,5 apresentaram os maiores valores de %PDS, seguido dos grupos tratados com ácido cítrico pH 3,5 e pH 4,5 com diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os dias da ciclagem quando comparados entre si.

Tabela 2- Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS; média±dp) dos blocos dentais em função dos grupos de tratamento em um modelo de ciclagens erosivas após imersão em saliva durante à noite (n=12).

Tratamentos	Dias de ciclagem				
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Cacodilato					
pH 7,0 (controle)	-0,64±0,32 aA	-1,13±0,57 aA	-1,05±0,51 aA	-1,23±0,73 aA	-1,09±0,57 a
Ácido cítrico pH 2,5	26,03±3,62 aB	35,51±8,10 bB	47,33±4,91 cB	53,80±5,97 dB	-
Ácido cítrico pH 3,5	18,88±5,81 aC	28,32±8,15 bC	36,46±7,66 bC	35,27±5,48 bC	35,27±8,16 b
Ácido cítrico pH 4,5	5,11±2,20 aD	11,01±2,37 bD	19,74±4,42 cD	20,18±4,75 cD	21,86±3,75 c
Ácido cítrico pH 5,5	-0,14±1,48 aA	7,20±3,50 bD	12,99±4,53 cE	11,04±3,97 bE	13,33±3,92 c
Ácido cítrico pH 7,0	-1,14±0,84 aA	-0,38±1,01 aA	0,40±1,71 abA	2,86±4,83 bA	3,09±3,06 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey. As letras minúsculas mostram as diferenças nas linhas dentro do mesmo grupo de tratamento em função dos dias. As letras maiúsculas mostram as diferenças nas colunas entre os grupos de tratamento dentro do mesmo dia.

Todos os resultados de porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) dos blocos dentais em função dos grupos de tratamento no modelo de ciclagens erosivas se encontram na Tabela 3. Entretanto para facilitar a apresentação dos dados estatísticos, os dados de %PDS foram apresentados em resultados após ciclagem (Tabela 1) e após saliva (Tabela 2).

Tabela 3: Percentual de perda de dureza superfície (%PDS; Média ± DP) do esmalte dental em função dos tratamentos e do tempo de ciclagem erosiva (n=12).

Tratamento	Tempo (Dias de ciclagem)									
	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	Após ciclagem*	Após saliva**	Após ciclagem	Após saliva	Após ciclagem	Após saliva	Após ciclagem	Após saliva	Após ciclagem	Após saliva
Caodilato pH 7,0 (controle)	-0,1±0,8	-0,6±0,3	-0,6±0,2	-1,1±0,6	-0,7±0,4	-1,1±0,5	-0,9±0,4	-1,2±0,7	-1,0±0,6	-1,1±0,6
Ácido cítrico pH 2,5	31,7±2,6	26,0±3,6	46,4±3,1	35,5±8,1	59,6±4,2	47,3±4,9	68,1±2,8	53,8±6,0	***	***
Ácido cítrico pH 3,5	20,0±6,5	18,9±5,8	38,9±5,4	28,3±8,2	45,9±6,9	36,5±7,7	46,3±6,0	35,3±5,5	50,3±5,7	35,3±8,2
Ácido cítrico pH 4,5	6,6±2,0	5,1±2,2	21,0±4,0	11,0±2,4	23,4±3,4	19,7±4,4	28,9±4,0	20,2±4,8	31,8±4,8	21,9±3,8
Ácido cítrico pH 5,5	3,9±2,7	-0,1±1,5	11,1±4,0	7,2±3,5	12,2±3,9	13,0±4,5	18,7±3,8	11,0±4,0	21,3±4,2	13,3±3,9
Ácido cítrico pH 7,0	2,5±3,5	-4,0±0,8	-1,0±0,7	0,6±1,0	4,3±3,9	-4,1±1,7	7,6±6,5	-5,0±4,8	6,7±5,1	-3,8±3,0

*Após ciclagem = após o último tratamento com as soluções de tratamento

** Após saliva = antes da formação da película adquirida

***Não foi possível visualizar as edentações na superfície dos blocos dentais

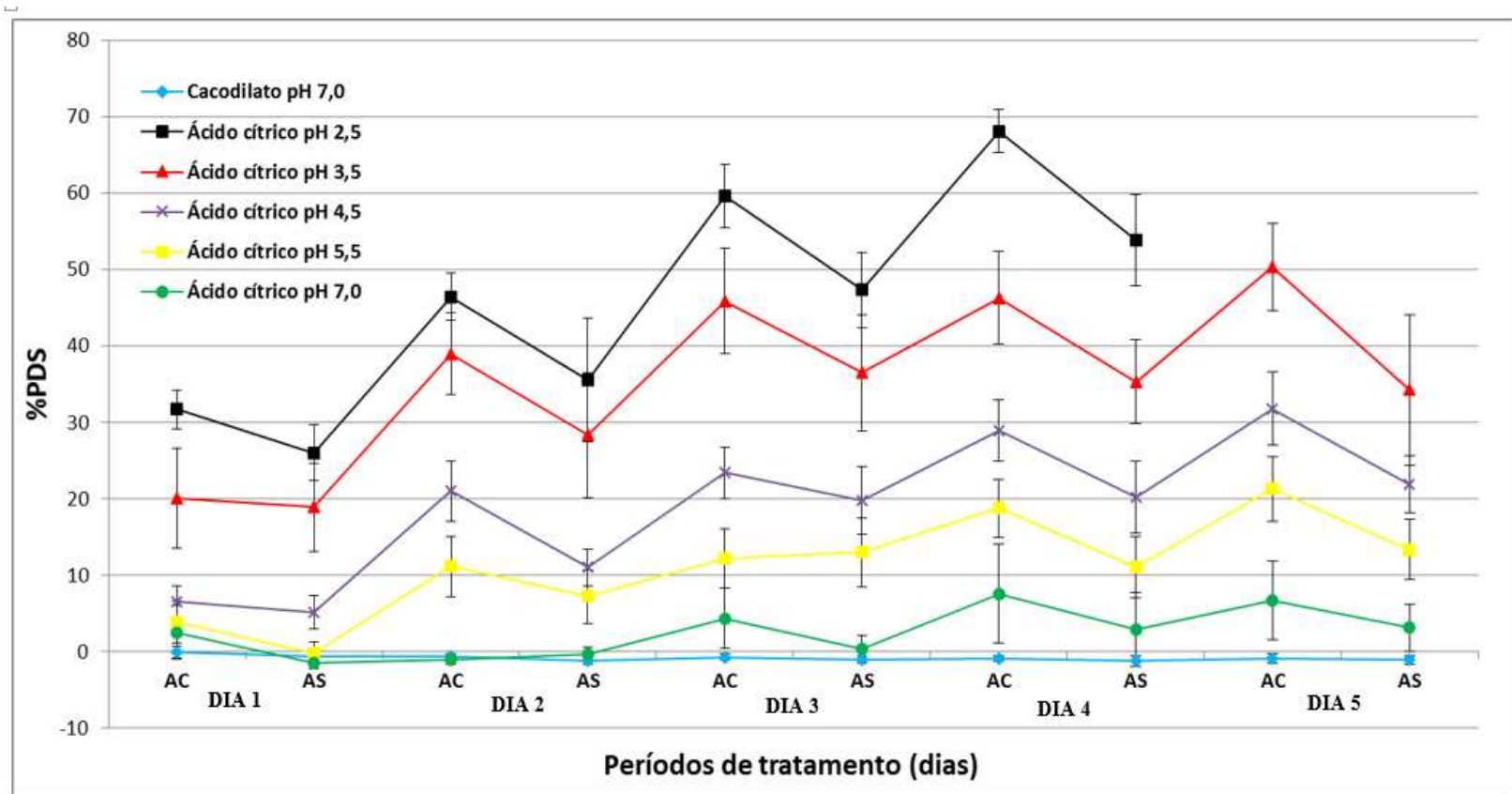


Figura 3 – Porcentagem de perda de dureza superfície (%PDS; Média \pm DP) do esmalte dental em função dos tratamentos e do tempo de ciclagem erosiva (n=12). AC = Avaliação após ciclagem. AS = Avaliação após saliva.

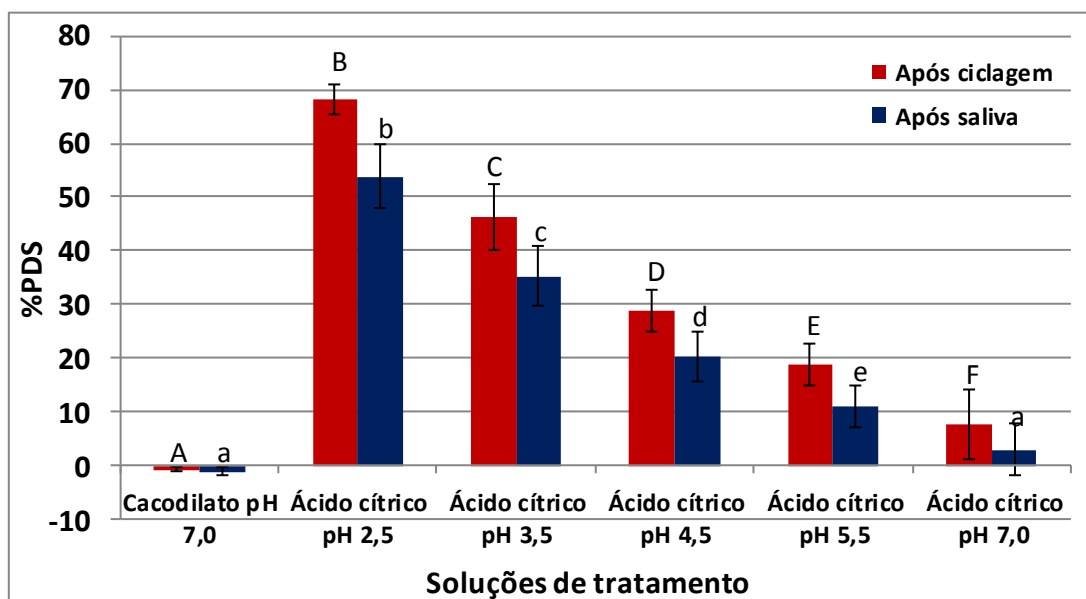


Figura 4 – Média da porcentagem de perda de dureza superfície (%PDS) do esmalte dental em um modelo de ciclagens erosivas após o 4º dia de tratamento (n=12). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão. As letras maiúsculas mostram as diferenças entre os grupos após a ciclagem. As letras minúsculas mostram as diferenças entre os grupos após a imersão em saliva.

5.3 ANÁLISE PERFILOMÉTRICA

Os dados de perfilometria representam a média de perda de superfície dos blocos dentais após exposição às soluções de tratamento do modelo de ciclagens erosivas. Na tabela 4 é possível observar os valores de perda de superfície dos blocos tratados com ácido cítrico pH 2,5 e 3,5 quando é comparada a avaliação inicial e final dos blocos. Os dados demonstram que os blocos dentais tratados com ácido cítrico pH 2,5 apresentaram a maior perda de superfície, diferindo estatisticamente de todos os demais grupos ($p < 0,05$) e que o grupo exposto ao ácido cítrico pH 3,5 também apresentou diferença estatística em relação aos outros grupos. Já os blocos tratados com cacodilato e ácido cítrico pH 7,0 apresentaram valores negativos de perda da superfície, e os blocos expostos ao ácido cítrico

pH 4,5 e 5,5 apresentaram valores muito similares de perda, não havendo diferença significativa entre estes quatro grupos de tratamento ($p>0,05$).

Tabela 4 – Valores (inicial e final) de perfilometria e de perda de superfície (μm) dos blocos dentais em função dos grupos de tratamento em um modelo de ciclagens erosivas (n=12).

Tratamento	Valores de perfilometria		Perda de superfície
	Inicial	Final	
Cacodilato pH 7,0 (controle)	-0,005 \pm 0,158 a	0,180 \pm 0,195 a	-0,185 \pm 0,295 a
Ácido cítrico pH 2,5	0,051 \pm 0,136 a	-9,044 \pm 1,148 b	9,093 \pm 1,099 b
Ácido cítrico pH 3,5	-0,038 \pm 0,159 a	-1,229 \pm 0,574 c	1,192 \pm 0,545 c
Ácido cítrico pH 4,5	0,083 \pm 0,105 a	-0,234 \pm 0,134 a*	0,280 \pm 0,161 a*
Ácido cítrico pH 5,5	0,097 \pm 0,132 a	-0,074 \pm 0,129 a**	0,190 \pm 0,221 a**
Ácido cítrico pH 7,0	0,084 \pm 0,165 a	0,114 \pm 0,165 a**	-0,036 \pm 0,265 a**

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. *n=9 e **n=11. Houve perda de blocos dentais nestes grupos.

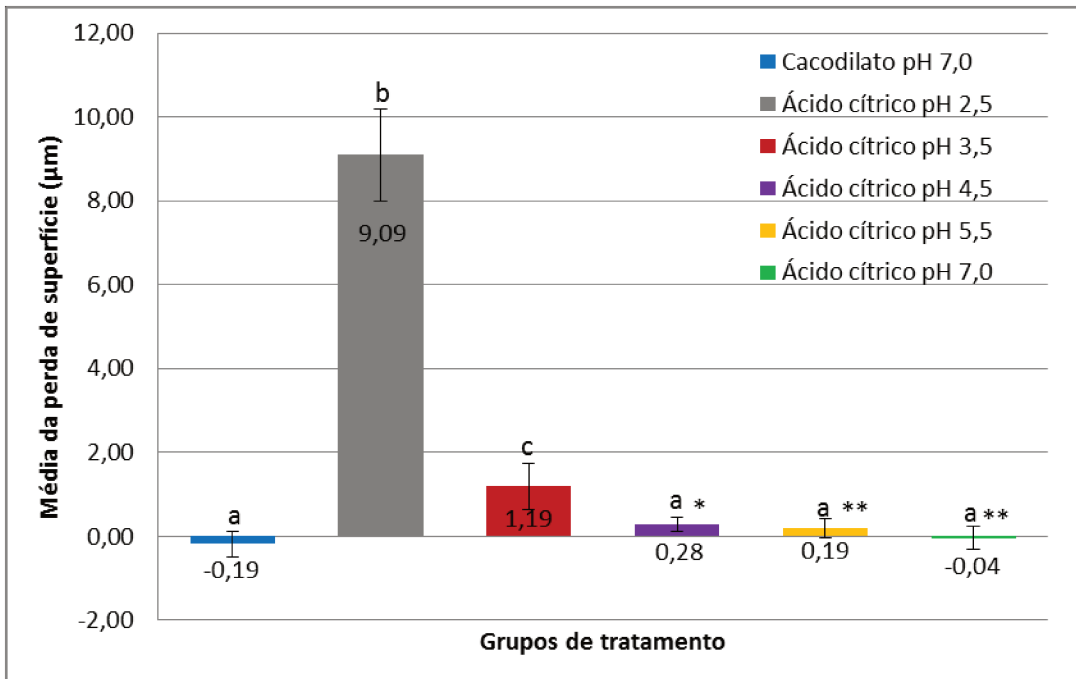


Figura 5 – Média de perda de superfície (μm), por análise perfilométrica, dos blocos dentais em função dos grupos de tratamento em um modelo de ciclagens erosivas (n=12). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05) pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão. *n=9 e **n=11. O valor de n destes grupos foi menor, pois os blocos foram perdidos.

5.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

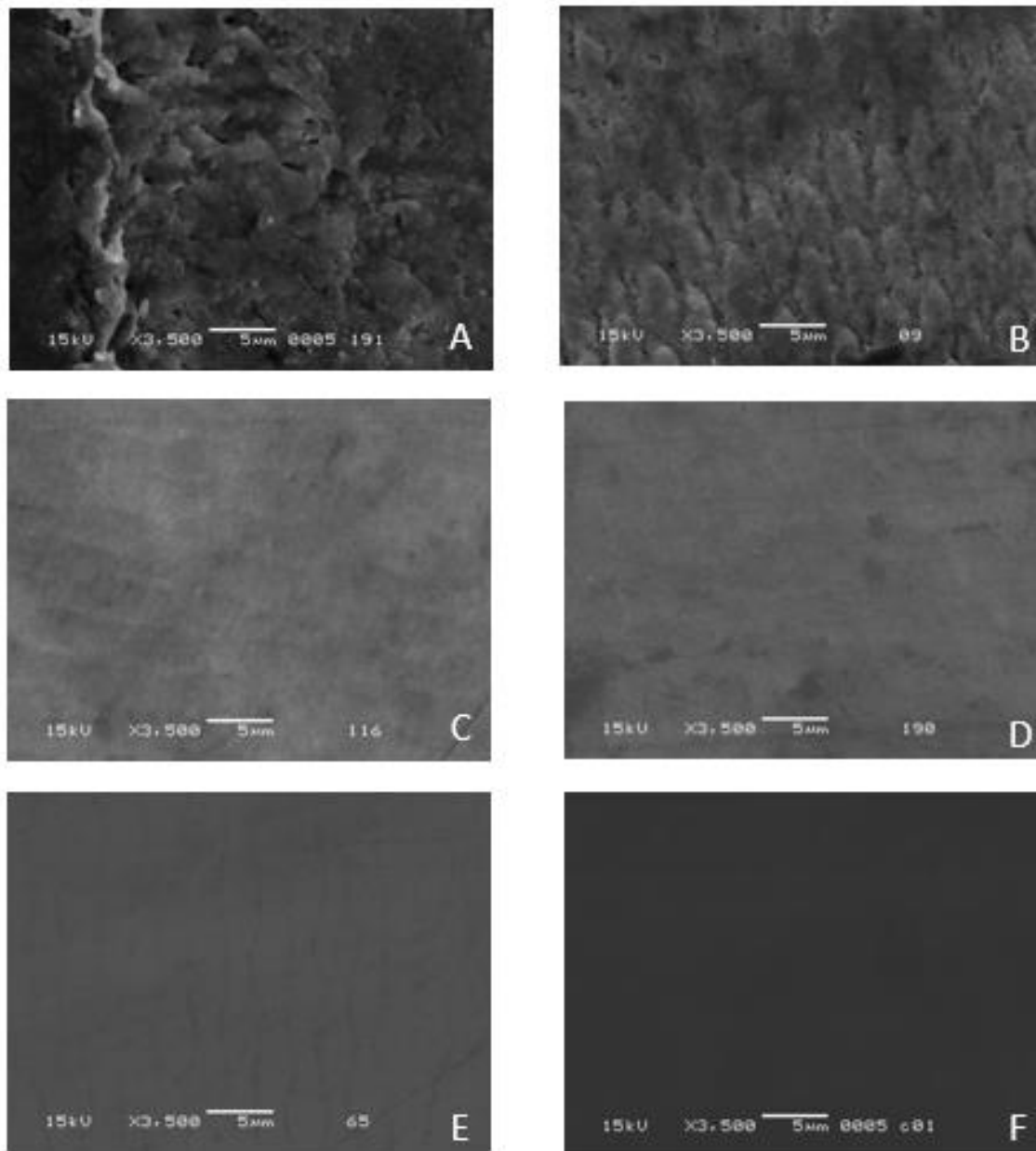


Figura 5 – Imagens dos blocos esmalte bovino tratado em diferentes soluções de tratamento ao final do modelo de ciclagens erosivas. A- Ácido cítrico pH 2,5; B- Ácido cítrico pH 3,5; C- Ácido cítrico pH 4,5; D- Ácido cítrico pH 5,5; E- Ácido cítrico pH 7,0; F- Cacodilato pH 7,0.

6 DISCUSSÃO

O presente modelo experimental foi desenvolvido com a proposta de mimetizar condições da cavidade oral próximas de uma realidade clínica, de forma que uma relação dose-resposta em termos de pH seja avaliada, pois há ausência na literatura de modelos *in vitro* dinâmicos para estudar a erosão dental (Shellis et al., 2011; Young & Tenuta, 2011). O modelo de ciclagens erosivas proposto neste estudo permitiu que as mudanças de perda mineral fossem avaliadas em todos os dias, além de analisar a perda de superfície no final do estudo.

Os achados de %PDS após a ciclagem, no primeiro dia de tratamento, demonstram que mudanças de perda mineral já puderam ser observadas quando os blocos dentais foram expostos a soluções de ácido cítrico de pH mais baixo, pois os grupos de pH 2,5 e 3,5 apresentaram %PDS ao redor de 30 e 20%, respectivamente, além de diferirem significativamente entre si e dos demais grupos. Isto está associado ao maior poder erosivo de soluções com estes valores de pH, principalmente do pH 2,5, pois soluções com baixos valores de pH fornecem íons hidrogênio, que atuam diretamente na superfície dental devido à sua ligação com íons carbonato ou fosfato (Featherstone & Lussi, 2006), promovendo perda mineral que evoluirá para perda da superfície dental. Além disto, o tempo de duração do ataque erosivo do primeiro dia (duração total de 4 min) e a presença da saliva artificial entre os tratamentos podem ter sido capazes de retardar a perda mineral ou amolecimento do esmalte dental. Logo, as soluções de pH 2,5 e 3,5 conseguiram provocar estágios iniciais de erosão dentária sensíveis à técnica aplicada, o que não pode ser observado nos demais grupos.

Mudanças nas %PDS, em função do tempo e dos valores de pH, na maioria dos grupos podem ser verificadas no segundo dia (tempo total de 8 min de exposição ao tratamento erosivo) e terceiro dia (tempo total de 12 min de exposição ao tratamento erosivo), como pode ser observado na tabela 1. Eisenburger et al. (2001) verificaram que a profundidade da lesão depende do valor do pH e do tempo de contato do ácido com o substrato, entretanto, em seu estudo, a exposição foi contínua e o tempo de exposição elevado (2, 4 e 8 h). Outro estudo também verificou uma dependência linear da dureza em

função do pH quando as amostras foram submetidas a 2 min de exposição ao ácido e avaliadas por nanoedentação (Barbour et al., 2003), porém este também foi um modelo estático, de exposição única. Assim, os resultados atuais confirmam que existe esta relação inversa entre o pH da solução na qual o bloco dental foi imerso e a perda mineral, e que este aumento da %PDS também ocorreu em função do tempo de exposição. Entretanto, os grupos tratados com tampão cacodilato pH 7,0 e ácido cítrico pH 7,0 não diferiram significativamente entre si, demonstrando a capacidade inerte de uma solução neste valor de pH na erosão dental e a pequena atividade quelante do ácido cítrico em pH 7,0. O tampão cacodilato foi escolhido por não ter ação quelante e por apresentar pKa 6,3, próximo ao valor de pH desta solução de tratamento, funcionando otimamente como tampão no pH escolhido para este grupo.

Quanto à análise dos resultados obtidos no quarto dia de tratamento, é possível observar uma relação dose-resposta em função de todos os valores de pH, pois quanto menor o pH maior a perda mineral, sendo observado também um leve efeito quelante do ácido cítrico pH 7,0. Entretanto, no quinto dia já não foi mais possível avaliar a dureza de superfície do grupo pH 2,5, pois houve impossibilidade de visualização das edentações. A análise de dureza de superfície foi utilizada para avaliar os estágios iniciais da erosão dental e amolecimento da camada superficial, entretanto em lesões avançadas a edentação não se apresenta claramente definida e nítida, impossibilitando que seja quantificada (Barbour & Rees, 2004; Schlueter et al, 2011). Nesta condição sugere-se que o modelo permitiu uma perda mineral em profundidade, sendo indicada a aplicação de outro método de análise, a perfilometria, técnica que quantifica a perda de substrato dental em profundidade (Barbour & Rees, 2004; Schlueter et al, 2011).

Assim, a exposição de 16 min às soluções de ácido cítrico, completada ao final do quarto dia, foi o tempo máximo no presente modelo para verificar a reação do esmalte dentário bovino quando exposto a uma ciclagem com solução de ácido cítrico pH 2,5 nas condições aplicadas. Logo, o tempo de 20 min de exposição intermitente produziu perdas minerais e de superfície avançadas no esmalte dental para o grupo pH 2,5, diferindo dos demais grupos. Assim, no quinto dia (20 min de exposição) foi possível apenas verificar uma resposta em termos de dureza de superfície, com a presença dos estágios iniciais da

erosão dental e com amolecimento da camada superficial, nos grupos restantes (ácido cítrico pH 3,5, 4,5, 5,5 e 7,0 e cacodilato pH 7,0) em função do pH para o modelo proposto. Com isto, é possível afirmar que o modelo apresentou no quarto dia uma relação dose-resposta para todos os diferentes valores de pH das soluções propostas. Assim, torna-se agora necessária a avaliação de produtos da dieta com diferentes valores de pH neste modelo de ciclagens erosivas, a fim de se avaliar como o modelo se comportará frente aos mesmos.

A respeito da %PDS após imersão na saliva durante à noite, os resultados em praticamente todos os grupos apontam para um ganho de dureza de superfície, porém não impedindo, posteriormente, a desmineralização após novos tratamentos erosivos. É possível observar, em função dos dias de ciclagem, que há uma redução na %PDS em relação aos dados após a ciclagem para a maioria dos grupos. Isto demonstra a capacidade da saliva artificial em repor alguma parte dos minerais perdidos no processo erosivo (Fushida & Cury, 1999; Amaechi & Higham, 2001; Eisenburger et al., 2001; Hara et al., 2008), fato bastante positivo para o modelo proposto.

Em relação às perdas de superfície, devido às condições propostas neste modelo de ciclagem, os resultados obtidos por perfilometria mostraram uma maior perda mineral no grupo exposto ao pH 2,5, confirmando os dados de %PDS. Este grupo apresentou os maiores valores de perda mineral após os tratamentos em todos os dias da ciclagem em relação aos demais grupos e no quinto dia de ciclagem, com um total de exposição intermitente de 20 min ao ácido cítrico, já não foi mais possível utilizar a análise de dureza de superfície, já que a perda foi mais agressiva em comparação aos outros grupos. Isto pode ser observado na literatura, em que técnicas como a perfilometria e microrradiografia foram utilizadas para avaliar perda de superfície para tempos a partir de 30 min de exposição em ácido cítrico (Ganss et al., 2005), enquanto que amostras de esmalte dental exposto a 2 min a solução de ácido cítrico em diferentes valores de pH foram avaliadas por nanoindentação (Barbour et al., 2003). Assim, como White et al. (2010) que verificaram a redução de dureza (análise nanoindentação) e a perda mineral (análise perfilométrica) em diferentes períodos de tempo e observaram que a redução de dureza ocorre a partir de 10 s enquanto que uma perda mineral foi verificada a partir de 10 min para dentes bovinos.

Os resultados também demonstraram que uma grande diferença de perda de superfície mineral pode ser verificada entre o pH 2,5 e 3,5 e que entre o pH 3,5 e 4,5 esta diferença de perda não é tão acentuada. Resultados similares podem ser observados em Eisenburger & Addy (2001) para estes grupos tratados com valores de pH mais baixos, pois verificaram que a profundidade da lesão no grupo exposto a ácido cítrico pH 2,5 foi 3 vezes maior que aquela no pH 3,2. Porém este estudo não foi desenvolvido como modelo de ciclagens, sendo então sugerido que novos estudos sejam realizados para verificar em mais detalhes a perda mineral entre pH 2,5 e pH 3,5 no modelo atualmente desenvolvido. Entretanto, Wetton et al (2006), ao avaliarem a perda de superfície em blocos de esmalte dental humano após três ciclos alternados entre saliva humana por 1 h e ácido cítrico pH 3,2 por 10 min, verificaram uma perda mineral aproximadamente 4 vezes maior que no presente estudo. Porém, este estudo utilizou o ácido cítrico com menor pH, uma maior agitação e maior tempo de exposição tanto contínua quanto intermitente ao ácido. Adicionalmente, não foi observada diferença entre os grupos tratados com pH 4,5 e 5,5 e isto pode ser explicado pelas reações químicas que ocorrem com o ácido cítrico para valores intermediários de pH, pois estaria ocorrendo tanto o mecanismo de ação dos íons hidrogênio atuando diretamente na superfície mineral quanto o efeito quelante (Featherstone & Lussi, 2006), não sendo então possível avaliar perdas mais avançadas nestes valores de pH neste período de 5 dias do modelo.

Em termos de dureza de superfície, o grupo exposto à solução de ácido cítrico pH 7,0 apresentou pequenas reduções na dureza de superfície, o que não pode ser verificado na perfilometria que apresentou dados que sugerem um ganho mineral, não sendo verificada nesta análise o seu efeito quelante (Featherstone & Lussi, 2006). Já o grupo tampão cacodilato pH 7,0 apresentou valores negativos encontrados tanto em dureza de superfície quanto em perfilometria. Estes dados podem ser relacionados à capacidade remineralizante tanto da saliva humana (Hanning et al., 2003; Wetton et al., 2006) quanto da saliva artificial (Amaechi & Higham, 2001; Hara et al., 2008), aos quais os substratos foram tratados nos 5 dias de ciclagem e não foram expostos a nenhuma solução desmineralizante. Estas alterações na superfície dos blocos dentais nas diferentes soluções de tratamento, tanto em termos de perda inicial quanto em profundidade, podem ser

observadas nas imagens por microscopia eletrônica de varredura, em que esta perda mineral decresce com o aumento do pH.

Avaliando os dados de dureza de superfície, ainda é possível observar as perdas minerais e capacidade remineralizante da saliva em função do tempo e uma relação dose-resposta para alguns dias da ciclagem, entretanto para perfilometria, esta relação dose-resposta foi verificada apenas para alguns valores de pH das soluções. Entretanto, isto pode ser explicado pelo próprio modelo proposto em função do tempo de exposição ao ácido cítrico aplicado por 1 minuto, pois pequenos tempos dependo do pH provocam estágios iniciais de erosão dentária com o amolecimento da camada superficial, enquanto que para estágios avançados de erosão dental, já é possível observar perda mineral. Uma outra resposta poderia ser a ausência de abrasão no modelo, pois a camada superficial amolecida seria removida e uma maior profundidade da lesão seria formada. Entretanto, sugere-se o desenvolvimento de um modelo com duração de 10 dias para avaliar como seria este efeito dose-resposta ao pH avaliado pela perfilometria.

Assim, o modelo proposto permitiu a inclusão de fatores relacionados ao dinamismo do ambiente bucal, buscando mimetizar o processo da erosão dentária. Logo, a verificação da perda de mineral por meio da sensibilidade do método de dureza de superfície permite sugerir que o presente estudo apresenta metodologia válida devido aos efeitos dose-resposta das soluções de ácido cítrico com diferentes valores de pH.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o modelo in vitro de ciclagens erosivas proposto simula e mimetiza fatores importantes no processo de erosão dental e que mostrou um efeito dose-resposta em função do pH em termos de perda mineral, além de mostrar uma perda de superfície dental para os valores de pH mais baixos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *[¶]

Aidi H El, Bronkhorst EM, Huysmans MCDJM, Truin GJ. Multifactorial analysis of factors associated with the incidence and progression of erosive tooth wear. *Caries Res* 2011; 45: 303–12.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *Journal of Oral Rehabilitation* 1999; 26: 624–30.

Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent*. 2001 Jul; 29(5): 371-6.

Arends J. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth: reaction paper. *Adv Dent Res* 1995; 9(3): 194-7.

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: 753-9.

Attin T, Becker K, Wiegand A, Tauböck TT, Wegehaupt FJ. Impact of laminar flow velocity of different acids on enamel calcium loss. *Clin Oral Invest*, 2013; 17(2): 595-600.

Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range $2.30 \leq \text{pH} \leq 6.30$ – a nanoindentation study. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 258–62.

Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent*. 2004; 32(8): 591-602.

*[¶] De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Barbour ME, Finke M, Parker DM, Hughes JA, Allen GC, Addy M. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. *J Dentistry* 2006; 34: 207–13.

Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential *Caries Res* 2011; 45 suppl 1: 24–32.

Bartlett D. Intrinsic causes of erosion; in Lussi A (ed): *Dental erosion: from diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci, Basel, Karger, 2006; 20: 119-39.

Cairns AM, Watson M, Creanor SL, Foye RH. The pH and titratable acidity of a range of diluting drinks and their potential effect on dental erosion. *J Dentistry* 2002; 30: 313–7.

Cury JA, Bragotto C, Valdrighi L. The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. I. Influence of pH. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981; 52(4): 446-8.

Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosive time on demineralisation. *Clin Oral Invest* 2001; 5: 108-111.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001; 35(3): 211-5.

Eisenburger M, Addy M. Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *Clin Oral Invest* 2003; 30: 1076-80.

Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion; in Lussi A (ed): *Dental erosion: from diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci, Basel, Karger, 2006; 20: 66-76.

Fushida CE, Cury JA. Estudo in situ do efeito da frequência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1999; 13: 127-34.

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

Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear; in Lussi A (ed): *Dental erosion: from diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci, Basel, Karger, 2006; 9-16.

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: 333–9.

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

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

Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium - containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 60–5.

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

Hellwig E, Lussi A. Oral hygiene products and acidic medicines; in Lussi A (ed): *Dental erosion: from diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci, Basel, Karger, 2006; 20: 112-18.

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

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

Johansson AK, Sorvaric R, Birkheda D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth-an in vivo and in vitro study. *J Dent* 2001; 29: 333- 40.

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

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.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004; 280: 442-48.

Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res* 1993; 27: 387-93.

Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 110-14.

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

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

Lussi A, Megert B, Shellis RP, Wang X. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *British J Nut* 2012; 107: 252-62.

Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res.* 1987; 21(4): 297-309.

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

Ren Y-F, Zhao Q, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Assessing fluoride treatment and resistance of dental enamel to soft drink erosion in vitro: Applications of focus variation 3D scanning microscopy and stylus profilometry. *J Dent* 2009; 37: 167-176.

Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MAP. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. *J Dent* 2011; 39: 841-48.

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

Serra MC, Cury JA. The in vitro effect of glass-ionomer restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralisation model. *Quintessence Int* 1992; 23: 143-47.

Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118(5): 475-82.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusion. *Caries Res* 2011; 45 suppl1: 69-77.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. *Caries Res* 2010; 44: 555–61.

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

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Res* 2011; 45 suppl 1: 43–52.

Wetton S, Hughes J, West NX, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion. A study in vitro. *Caries Res* 2006; 40: 213–17.

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res*. 1987; 21(2): 126-40.

White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res* 1995; 9(3): 175-93.

White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MCDNJM, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under single drink conditions. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 604-09.

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

Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T: Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontol Scand* 2008; 66: 225-30.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies-insights and rational concepts. *Caries Res* 2011; 45 suppl1: 53-9.

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.

Young A, Tenuta LMA. Initial Erosion Models. *Caries Res* 2011; 45 suppl 1: 33-42.

Zandim DL, Gilio C, Rossa Júnior C, Sampaio JEC. Influence of isotonic drinks in removing the smear layer from root surfaces after scaling. An in vitro study. *Rev Odontol Unesp*. 2008; 37(3): 267-73.

Zero DT. In Situ Caries Models. *Adv Dent Res* 1995; 9(3): 214-30.

APENDICE

PADRONIZAÇÃO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS AO PROCESSO DE EROSÃO

Efeito da agitação durante a exposição contínua dos blocos dentais ao ácido cítrico na perda mineral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da agitação durante a exposição ao ácido cítrico na perda mineral do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície, quando exposto de forma contínua ao ácido. Para isto, blocos de esmalte dental bovino (n=5), selecionados pela dureza de superfície conforme previamente descrito no item 4.3, foram imersos em ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 (2,5 mL/mm² de área exposta) na ausência e presença de agitação (100 rpm) a temperatura ambiente. A imersão dos blocos dentais no ácido cítrico foi feita de forma contínua e, após cada 2 minuto de imersão, a dureza de superfície foi novamente determinada para cálculo da porcentagem de perda de dureza (%PDS). Esse procedimento foi repetido até que não fosse mais possível visualizar as edentações feitas. Foram realizados três experimentos para este estudo preliminar.

Efeito da agitação durante a exposição dos blocos dentais ao ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosivas

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da agitação na perda mineral do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície, exposto ao ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosivas. Blocos de esmalte dental bovino (n=5), selecionados pela dureza de superfície conforme previamente descrito no item 4.3, foram imersos em ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 (2,5 mL/mm² de área exposta) a temperatura ambiente na ausência e presença de agitação (100 rpm). A imersão dos blocos dentais no ácido cítrico foi de forma intermitente (ciclagem erosiva com imersão no ácido cítrico por 2 min e na saliva artificial por 2 h a 37°C), sendo que após a quarta exposição diária ao ácido cítrico, os blocos dentais permaneciam imersos na saliva artificial overnight. Após cada 2 min de imersão no ácido e após cada tratamento na saliva artificial, a dureza de superfície foi

novamente determinada para cálculo da porcentagem de perda de dureza (%PDS). Esse procedimento foi repetido até que não fosse mais possível visualizar as edentações feitas.

Efeito da formação de película adquirida nos blocos dentais tratados no modelo de ciclagens erosivas

O objetivo deste estudo foi avaliar a perda mineral do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície, exposto ao ácido cítrico em ciclagem erosiva com a presença de saliva humana para formação de película adquirida. Antes do primeiro desafio erosivo de cada dia, blocos dentais de esmalte dental bovino (n=8), selecionados pela dureza de superfície, foram imersos por 2 h a 37°C sob agitação (100 rpm) em um “pool” de saliva humana estimulada e clarificada para formação da película adquirida. Posteriormente, estes blocos dentais foram submetidos à ciclagem erosiva: imersão por 2 min em solução de ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 (2,5 mL/mm² de área exposta) a temperatura ambiente com agitação (100 rpm) alternada com saliva artificial por 2 h a 37°C. Os blocos dentais permaneceram imersos na saliva artificial overnight. Após cada 2 min de imersão no ácido e após cada tratamento na saliva artificial e humana, a dureza de superfície foi novamente determinada para cálculo da porcentagem de perda de dureza (%PDS). Esse procedimento foi repetido até que não fosse mais possível visualizar as edentações feitas. Foram realizados dois experimentos para este estudo preliminar.

Efeito da duração de cada exposição ao ácido cítrico na perda mineral dos blocos dentais

O objetivo deste estudo foi avaliar a perda mineral do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície, exposto ao ácido cítrico em diferentes tempos de exposição. Blocos de esmalte dental bovino (n=8), selecionados pela dureza de superfície, foram imersos em solução ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 (2,5 mL/mm² de área exposta) a temperatura ambiente na presença de agitação (100 rpm) no seguintes tempos: 30 s, 1 e 2 min. Os blocos dentais foram submetidos ao modelo de ciclagens erosivas (imersão em ácido cítrico alternada com saliva artificial por 2 h a 37°C). Após cada imersão no ácido e após cada tratamento na saliva artificial, a dureza de superfície foi novamente determinada

para cálculo da porcentagem de perda de dureza (%PDS). Esse procedimento foi repetido 4 vezes, simulando um dia no modelo de ciclagens erosivas.

Efeito do tempo de exposição à saliva artificial entre os tratamentos com ácido cítrico

O objetivo deste estudo foi avaliar a perda mineral do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície, exposto ao ácido cítrico 47,6 mM alternado com saliva artificial em diferentes tempos de exposição. Blocos de esmalte dental bovino (n= 4), selecionados pela dureza de superfície, foram imersos em ácido cítrico 0,0476 M pH 3,5 (2,5 mL/mm² de área exposta) a temperatura ambiente na presença de agitação (100 rpm) por 1 minuto alternado com saliva artificial por 1 ou 2 h a 37°C. Após cada imersão na saliva artificial, a dureza de superfície foi novamente determinada para cálculo da porcentagem de perda de dureza (%PDS). Esse procedimento foi repetido 4 vezes, simulando um dia no modelo de ciclagens erosivas.

RESULTADOS

Efeito da agitação durante a exposição contínua dos blocos dentais ao ácido cítrico na perda mineral

A Figura 1 representa em termos de média e desvio padrão a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) para os grupos tratados na presença e ausência de agitação em função do tempo. A partir destes dados pode-se observar que houve um crescente aumento da %PDS para ambos os grupos, aqueles com ou sem agitação durante a imersão dos blocos dentais na solução de ácido cítrico em função do aumento do tempo. Numericamente, o grupo com agitação apresentou maiores valores de %PDS em todos os tempos avaliados. Inclusive, após 10 min de agitação não foi mais possível visualizar as impressões feitas nos blocos dentais. No entanto, no grupo sem agitação foi possível avaliar os blocos dentais até 12 min de exposição, ou seja, após 14 min de exposição não foi mais possível visualizar as edentações feitas nos blocos dentais. Estes dados demonstram que

houve uma menor perda mineral no grupo sem agitação quando comparado ao grupo com presença de agitação em função do tempo.

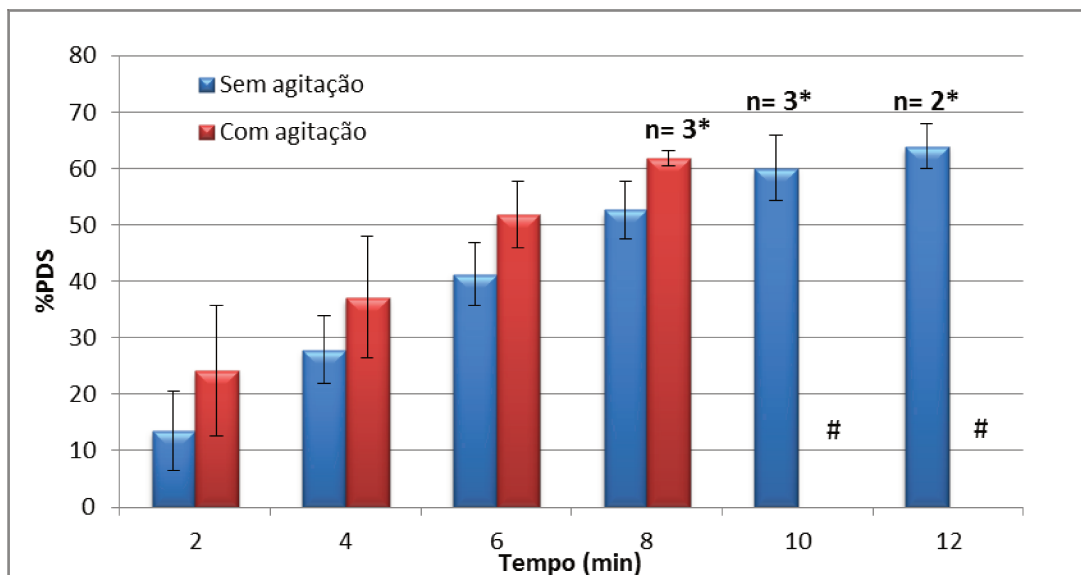


Figura 6 – Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS; média de 3 experimentos) dos blocos dentais após imersão em ácido cítrico 0,0476 M pH 3,5 na presença e ausência de agitação em função do tempo (n=5 blocos por experimento). #Não foi possível avaliar a dureza de superfície neste grupo e nestes tempos por impossibilidade de visualizar a edentação. As barras indicam o desvio-padrão. *O valor de *n* nestes tempos foi menor devido à impossibilidade de visualizar a edentação feita no microdurômetro.

Efeito da agitação durante a exposição dos blocos dentais ao ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosivas

Os dados da Figura 2 representam a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) em um modelo de ciclagens erosiva (imersão alternada em ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 e saliva artificial pH 7,0 por 2 h) para os grupos tratados na presença e ausência de agitação durante a imersão no ácido cítrico em função do tempo. De acordo com os resultados, é possível observar que para ambos os grupos, com e sem agitação, houve um aumento crescente na %PDS em função do tempo de exposição ao ácido cítrico. Para o grupo sem agitação, foi possível avaliar a dureza de superfície até 14 min, entretanto, o mesmo não pode ser observado para o grupo com agitação; com 12 min de agitação no ácido cítrico não foi possível visualizar as edentações na análise de dureza de

superfície. É possível observar que os blocos dentais do grupo com agitação puderam ser avaliados após tratamento com o ácido cítrico por um menor período de tempo (10 min), pois a partir da sexta exposição (12 min) já não foi mais possível visualizar as edentações. Entretanto, o seu tempo de exposição ao ácido cítrico em ciclagem erosiva foi maior do que em exposição contínua (ver figura 1).

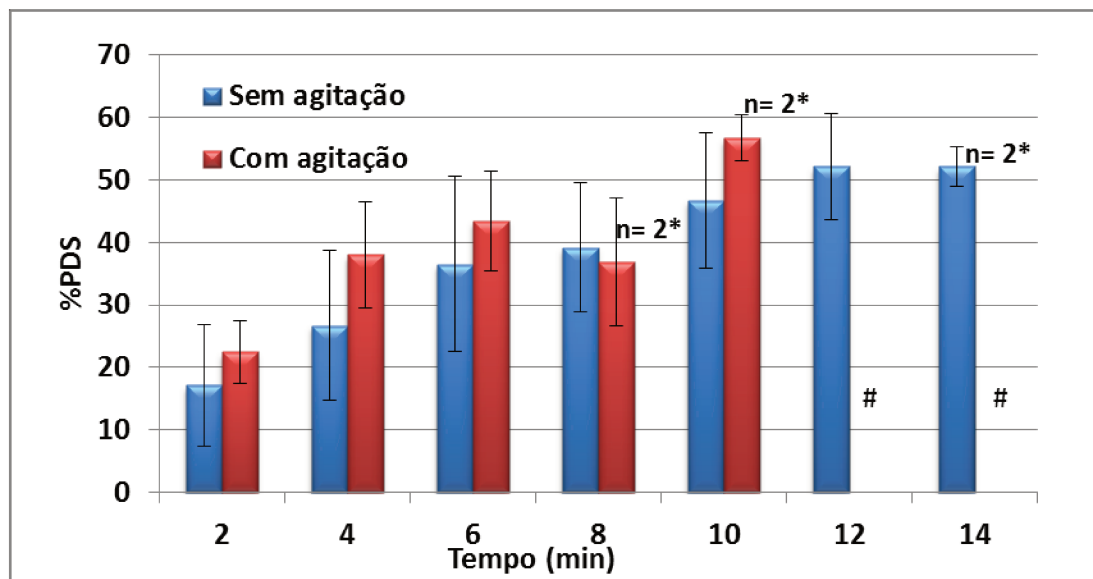


Figura 7- Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS, média de um experimento) dos blocos dentais tratados com ácido cítrico 0,0476 M pH 3,5 na presença e ausência de agitação em função do tempo de imersão no ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosiva (n=5 blocos dentais). # Não foi possível avaliar a dureza de superfície neste grupo e tempo por impossibilidade de visualizar a edentação. As barras indicam o desvio-padrão. *O valor de n nestes tempos foi menor devido à impossibilidade de visualizar a edentação feita no microdurômetro.

Efeito da formação de película adquirida nos blocos dentais tratados no modelo de ciclagens erosivas

Em relação à formação de película adquirida nos blocos dentais tratados no modelo de ciclagens erosiva, a Figura 3 mostra um crescente aumento da %PDS para ambos os grupos, com formação e sem formação de película adquirida em função do aumento do tempo de imersão dos blocos dentais no ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5. Nos primeiros tempos de avaliação, isto é, até 8 min, é possível verificar que os blocos dentais

do grupo com formação de película adquirida apresentaram numericamente maiores valores de %PDS, apesar de muito próximos dos valores do grupo sem formação de película adquirida. A partir de 10 min de exposição ao ácido cítrico não há diferença entre os grupos com ou sem formação de película adquirida quanto à perda de dureza de superfície.

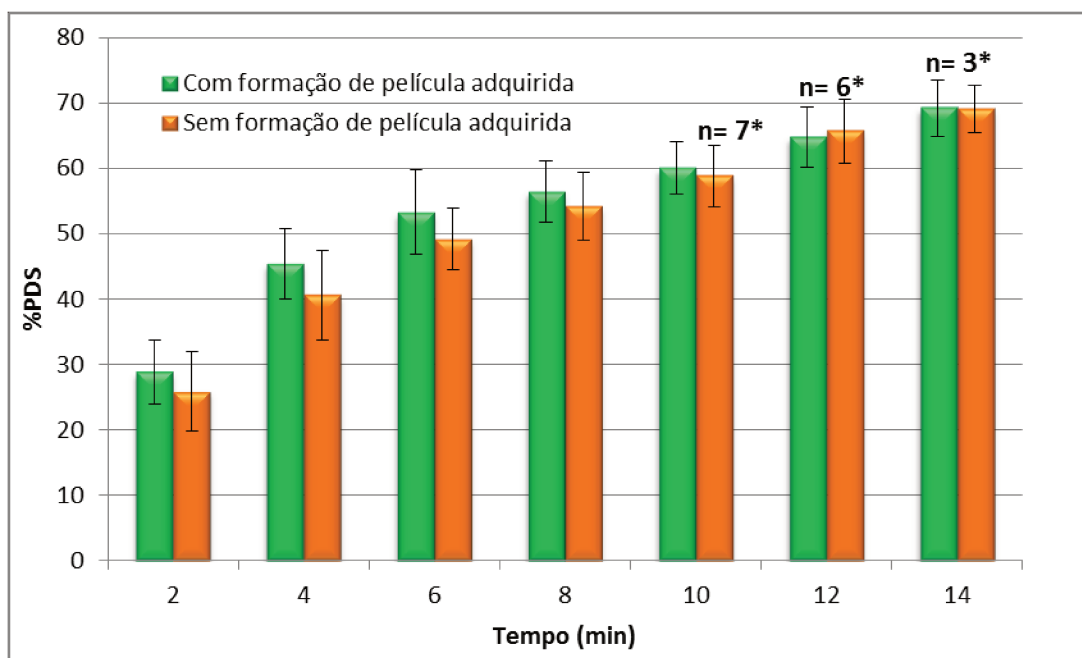


Figura 8 - Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS, média de 2 experimentos) dos blocos dentais com ou sem formação de película adquirida em função do tempo de imersão no ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosiva (n = 8 blocos dentais por experimento). As barras indicam o desvio-padrão. *O valor de n nestes tempos foi menor devido à impossibilidade de visualizar a edentação feita no microdurômetro.

Efeito da duração de cada exposição ao ácido cítrico na perda mineral dos blocos dentais

Os dados apresentados na Figura 4 mostram a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) dos blocos dentais em função da duração de cada tratamento erosivo (30 s, 1 ou 2 min) em um modelo de ciclagens erosiva (imersão alternada em ácido cítrico 47,6 mM pH 3,5 e saliva artificial pH 7,0 por 2 h). É possível observar que houve um crescente aumento da %PDS para todos os grupos em função do número de exposições. Em

termos de média, o grupo tratado com ácido cítrico 47,6 mM por 2 min apresentou a maior %PDS seguido do grupo tratado por 1 minuto e do grupo tratado por 30 s. No tempo de 2 min, o valor da %PDS é aproximadamente o dobro do valor do grupo tratado por 30 s, o que não se repete nas exposições posteriores, embora na quarta exposição é possível observar uma maior perda no grupo de 2 min quando comparado ao de 30 s. Enquanto que estas diferenças não são observadas entre os grupos de 1min e 30 s.

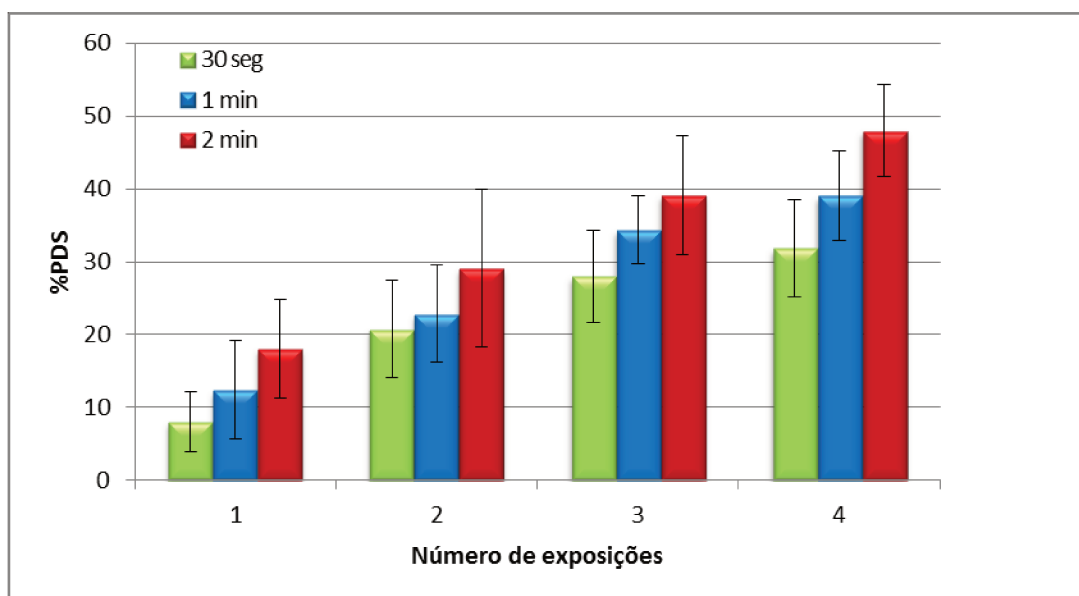


Figura 9 – Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS, média) dos blocos dentais em função do tempo de duração de cada tratamento erosivo e do número de exposições ao ácido cítrico em um modelo de ciclagens erosiva (n = 8 blocos). As barras indicam o desvio-padrão.

Efeito do tempo de exposição à saliva artificial entre os tratamentos com ácido cítrico

A porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) dos blocos dentais para os grupos tratados em diferentes tempos (1 h ou 2 h) de exposição à saliva artificial entre os tratamentos erosivos em um modelo de ciclagens erosiva está representada na Figura 5. A partir dos dados verifica-se uma linearidade na %PDS em função do número de tratamentos para ambos os grupos, principalmente para o grupo exposto à saliva artificial por 1 h. É possível observar que até o terceiro tratamento com ácido cítrico, em termos de média e desvio padrão, o grupo exposto à saliva artificial por 1 h entre os tratamentos

erosivos apresenta valores menores de %PDS quando comparado ao grupo exposto por 2 h, embora estes valores sejam próximos. Adicionalmente, é possível observar uma similaridade na %PDS após o quarto tratamento erosivo em ambos os grupos.

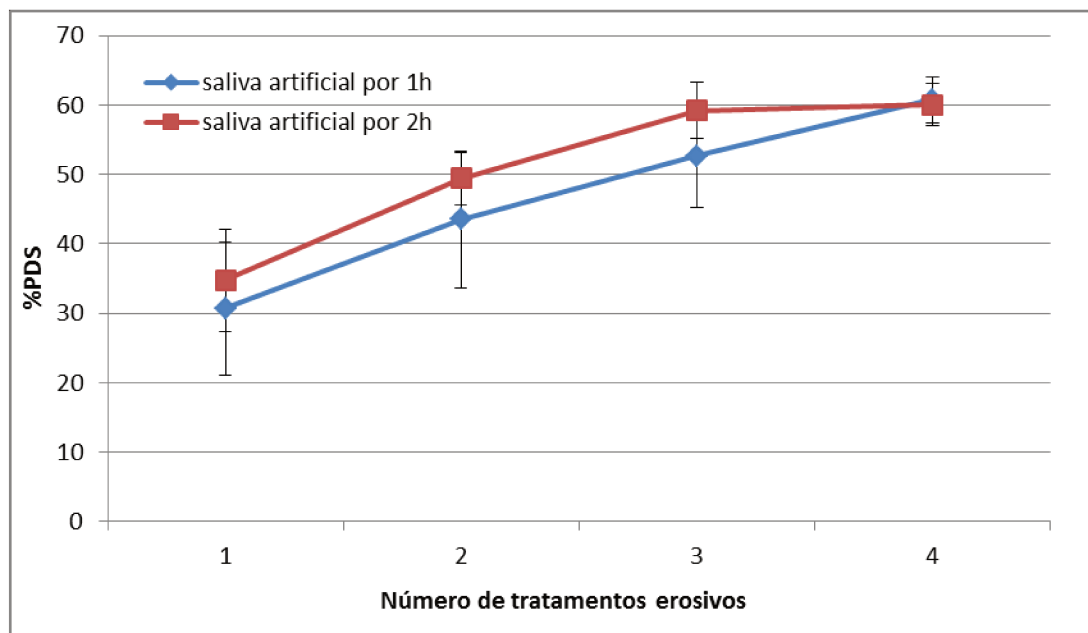




Figura 10 – Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS, média) dos blocos dentais em função do tempo de imersão na saliva artificial entre os tratamentos erosivos em um modelo de ciclagens erosiva (n=4 blocos dentais). As barras indicam o desvio-padrão.

ANEXO

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA




COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Desenvolvimento e validação de um modelo de ciclagens de pH para estimar a dose-resposta do potencial erosivo de produtos da dieta"**, protocolo nº 106/2012, dos pesquisadores Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Dayse Andrade Romão, Jaime Aparecido Cury e Lívia Maria Andaló Tenuta, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/10/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Development and validation of a pH cycling model to estimate the dose-response erosive potential of the dietary products"**, register number 106/2012, of Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Dayse Andrade Romão, Jaime Aparecido Cury and Lívia Maria Andaló Tenuta, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 10/17/2012.



Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.