



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GABRIELA SOUZA ARANTES

**ANÁLISE PERFILOMÉTRICA DA AÇÃO DE DIFERENTES TIPOS
DE SALIVAS ARTIFICIAIS EM EROSÃO DENTAL**

2017

GABRIELA SOUZA ARANTES

**ANÁLISE PERFILOMÉTRICA DA AÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE
SALIVAS ARTIFICIAIS EM EROSÃO DENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres
Coorientadora: Profa. Dra. Graziela Ribeiro Batista

São José dos Campos
2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Arantes, Gabriela Souza

Análise perfilométrica da ação de diferentes tipos de salivas artificiais em erosão dental / Gabriela Souza Arantes. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

36 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Carlos Rocha Gomes Torres.

1. Erosão dental. 2. Saliva artificial. 3. Perfilômetro. I. Torres, Carlos Rocha Gomes, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento Odontologia Restauradora

Profa. Dra. Taciana Marco Ferraz Caneppele

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento Odontologia Restauradora

Prof. Dr. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento Odontologia Restauradora

São José dos Campos, 9 de novembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Solange Souza Arantes e João Francisco Penzinger Arantes e ao meu pequeno irmão, João Felipe Souza Arantes, pelo incentivo e amor eterno. Não há palavras para agradecer-lhes por tudo que fizeram e fazem por mim, por batalharem ao meu lado e me proporcionarem trilhar um caminho de estudo e agora minha profissão, por deixarem muitas vezes os seus sonhos de lado para sonharem junto comigo. Espero a cada dia retribuir todo esse carinho a vocês e que hoje vocês possam sentir a minha gratidão e meu enorme amor.

Ao meu amor e namorado Thiago Fonseca, por sempre me apoiar e incentivar a vencer meus desafios.

Dedico a todos os meus familiares principalmente a minha madrinha e anjo da guarda Angela Maria, que esteve comigo quando lutei para entrar aqui e que hoje olha por mim, minha eterna saudade. Aos meus amigos, que sabem o quanto desejei e batalhei para chegar aqui e me formar como cirurgiã dentista e aos meus amigos que a Unesp me proporcionou durante esses anos, a todos vocês que me apoiaram sempre e me motivaram, um grande e carinhoso abraço, vocês são meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me guiou em toda minha caminhada universitária, me dando saúde e força para vencer todos os desafios.

A esta universidade, seu corpo docente e direção, pela oportunidade de aprendizado e confiança.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres e minha coorientadora Profa. Dra. Graziela Ribeiro Batista, que me proporcionaram não só conhecimento, mas a efetividade no processo de educação da minha formação profissional, por terem me ensinado, me inspirado e me feito aprender com toda paciência e amor pelo o que fazem. Agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, por toda atenção e por compartilharem seus conhecimentos.

Agradeço a minha querida amiga que esse trabalho me proporcionou, Marina Gullo Augusto, que esteve sempre presente me ajudando de todas as formas possíveis, obrigada por tanta dedicação e apoio para se concluir

esse trabalho.

As minhas amigas Julia Gomes Gaspare, Larissa Jesus Ronconi e Mônica Queiroz as pessoas mais queridas que conheci durante a graduação que estiveram comigo em todos os momentos, me ajudando nessa jornada. Com toda certeza vocês estarão comigo para todo sempre.

A todos os docentes, técnicas e secretárias do departamento de Odontologia Restauradora, pela dedicação e contribuição com seus conhecimentos.

Aos funcionários de limpeza, manutenção e secretaria, os quais sem eles não teríamos concluído esse trabalho.

"Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu". Ana Vilela

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Delineamento do estudo	12
2.1.1 Preparação dos espécimes e distribuição dos grupos	14
2.1.2 Preparo das soluções	18
2.1.3 Preparo do ácido clorídrico para desafio erosivo	20
2.1.4 Protocolo experimental	20
2.1.5 Ciclagem dos espécimes	22
2.1.6 Mensuração do desgaste	22
2.1.7 Análise estatística	23
3. Resultados	24
4 DISCUSSÃO.....	28
5 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32

Arantes GS. Análise perfilométrica da ação de diferentes tipos de salivas artificiais em erosão dental [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro o efeito de diferentes formulações de saliva artificial com ou sem a presença de mucina na prevenção da erosão dental. A partir das raízes de dentes bovinos, foram preparadas amostras cilíndricas de dentina que posteriormente foram embutidas em resina acrílica e após polimento das mesmas, foi realizada a leitura dos perfis superficiais utilizando perfilômetro de contato. Na sequência, houve uma distribuição aleatória das amostras em 10 grupos (n=20), de acordo com a solução utilizada. Foram utilizadas água deionizada e 4 soluções de saliva artificial seguindo as formulações descritas por Klimek, Vieira, Eisenburger e Amaechi. Para cada uma delas foi feita ou não a adição de mucina. As amostras ficaram armazenadas em sua respectiva solução durante 120 min sob agitação mecânica e em seguida foram submetidas à erosão durante 60s com HCl (pH 2,6) e novamente armazenadas por mais 120 min e posteriormente submetidas a um segundo ciclo de desafio erosivo (HCl, pH: 2,6, 60s), após o qual os perfis das amostras foram novamente avaliados. Os dados obtidos foram analisados em relação a sua distribuição normal utilizando o teste de Kolmogorov Smirnov e posteriormente foi feita a análise estatística utilizando o teste ANOVA 2 fatores (tipo de saliva e presença de mucina) e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os valores do teste ANOVA mostraram diferença estatística significativa para o fator tipo de saliva ($p=0,00$) e para a interação entre os dois fatores ($p=0,04$), para o fator presença de mucina não houve diferença estatística significativa ($p=0,36$). Os resultados do teste de Tukey para o desgaste erosivo (μm) foram: Água deionizada: $4,60\pm 0,91$ A; Água deionizada + Mucina: $4,07\pm 0,93$ AB; Amaechi: $3,72\pm 0,83$ BC; Klimek: $3,60\pm 0,91$ BC; Amaechi+ Mucina: $3,34\pm 0,73$ BC; Vieira: $3,31\pm 0,60$ C; Klimek + Mucina: $3,27\pm 0,57$ C; Vieira + Mucina: $3,20\pm 0,58$ C; Eisenburger: $2,36\pm 0,45$ D; Eisenburger + Mucina: $2,18\pm 0,54$ D. Pode-se concluir que a adição de mucina às soluções não aumentou a efetividade em prevenir a erosão dental, no entanto dentre as soluções testadas nesse estudo a solução de saliva artificial segundo Eisenburger, apresentou um maior efeito preventivo contra erosão em superfície de dentina.

Palavras-chave: Erosão dental. Saliva artificial. Perfilômetro.

Arantes GS. *Profilometric analysis of the effect of different types of artificial saliva solutions in dental erosion [graduation final work]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the erosion-preventive effect of different artificial saliva formulations in vitro. Cylindrical dentin samples were obtained from the roots of bovine teeth, they were embedded in acrylic resin and, after polishing, the surface profiles were measured using a contact profilometer. Subsequently, the samples were randomly distributed into 10 groups (n = 20), according to the storage medium. The tested solutions were: deionized water and 4 solutions of artificial saliva according the formulations described by Klimek, Vieira, Eisenburger and Amaechi. For each of them the addition of mucin was made or not. The samples were stored in their respective solution for 120 min under mechanical stirring. They were then subjected to erosion for 60s with HCl (pH 2.6) and again stored for another 120 min and then subjected to a second cycle of erosive challenge (HCl, pH: 2.6, 60s), after that the profiles were measured again. The data were analyzed in relation to their normal distribution using the Kolmogorov Smirnov test and the statistical analysis was performed using the ANOVA 2 way (saliva type and presence of mucin) and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The results of the ANOVA test showed significant statistical difference for the factor saliva type ($p=0,00$) and for the interaction between them ($p=0,04$, for the factor presence of mucin there was not statistical difference ($p=0,36$). The results of the Tukey test were: Deionized water: 4.60 ± 0.91 A; Deionized water + Mucine: 4.07 ± 0.93 AB; Amaechi: 3.72 ± 0.83 BC; Klimek: 3.60 ± 0.91 BC; Amaechi + Mucine: 3.34 ± 0.73 BC; Vieira: 3.31 ± 0.60 C; Klimek + Mucine: 3.27 ± 0.57 C; Vieira + Mucine: 3.20 ± 0.58 C; Eisenburger: 2.36 ± 0.45 D; Eisenburger + Mucine: 2.18 ± 0.54 D. The conclusion is that the addition of mucin to the solutions did not increase the effectiveness in preventing tooth erosion. However, among the solutions tested in this study the solution of artificial saliva according to Eisenburger presented a greater preventive effect against erosion on the dentin surface.

Keywords: *Dental erosion. Artificial saliva. Profilometer.*

1 INTRODUÇÃO

A erosão dental é causada pelo contato direto dos dentes com ácidos de origem intrínseca ou extrínseca e seu desenvolvimento e progressão podem ser modificados por diversos fatores comportamentais e biológicos. Como este vem se tornando um problema crescente que afeta adultos e crianças [1], as pesquisas em relação a este assunto também vêm se intensificando. A maioria dessas pesquisas é realizada in vitro, pois permitem o controle e padronização das diversas variáveis que interferem no processo erosivo. Quando comparados aos estudos in situ ou in vivo, os estudos realizados in vitro são relativamente menos dispendiosos e permitem uma avaliação rápida de produtos e tratamentos, além de ser mais simples a aprovação dos mesmos em relação aos aspectos éticos. Por outro lado, os estudos in vitro deveriam simular as condições clínicas de maneira mais próxima possível as condições in situ ou in vivo para que os resultados sejam compatíveis com a situação clínica.

Um fator de extrema importância no desenvolvimento e progressão das lesões erosivas é a saliva, que forma uma película de proteção na superfície dental minimizando os efeitos dos ácidos através da diluição deste e de suas propriedades de tamponamento [2, 3]. Idealmente, esses efeitos também deveriam ser alcançados em estudos in vitro, quando da utilização de substitutos para a saliva.

A literatura mostra que diferentes fórmulas de salivas artificiais são utilizadas em estudos de erosão dental in vitro. De acordo com os resultados encontrados na literatura, a fórmula mais utilizada é a descrita por Klimek et al [4], que foi a primeira fórmula de saliva artificial utilizada para estudos; seguida das formulações descritas por Vieira et al [5], Amaechi et al [6], e Eisenburger et al [7]. Outras fórmulas são descritas, porém não são utilizadas com frequência [8-16] Devido as diferentes composições das fórmulas de salivas artificiais o processo erosivo pode ser afetado de diferentes maneiras, um dos componentes que pode estar presente nas formulações artificiais é a mucina, uma proteína salivar que na saliva humana exerce um efeito protetor contra a erosão dental

Um estudo recente [17] mostra que as diferentes formulações de salivas artificiais, assim como a saliva humana utilizada in vitro, quando comparadas a saliva humana in situ não teriam o mesmo desempenho na proteção contra a erosão. Entretanto, acredita-se que a composição das salivas artificiais possa interferir nessa capacidade de proteção contra a desmineralização causada pela erosão, uma vez que outros estudos [18;19] mostraram que as salivas artificiais utilizadas in vitro podem apresentar grande variação em relação ao efeito remineralizador das diferentes formulações artificiais, atribuindo essas variações às diferentes composições das soluções testadas.

Com base em dados disponíveis na literatura, pode-se considerar que a adição de proteínas sintéticas às fórmulas de salivas artificiais poderia torná-las mais semelhantes às condições encontradas in vivo ou in situ e dessa forma as soluções artificiais poderiam interferir na formação de película e conseqüentemente na prevenção do processo erosivo. A utilização de fórmulas artificiais com propriedades semelhantes à saliva humana poderia levar a resultados de pesquisas ainda mais representativos, além de facilitar os protocolos de realização de tais pesquisas, uma vez que não haveria necessidade do envolvimento de indivíduos para realização de protocolos experimentais nesse tipo de trabalho.

Baseado nas informações expostas, o objetivo deste estudo in vitro foi avaliar o efeito de diferentes formulações de saliva artificial com ou sem a presença de mucina na prevenção da erosão dental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento do estudo

Unidades experimentais:

200 espécimes de dentina obtidos a partir raízes de dentes bovinos.

Fatores em estudo:

- Substrato dental em um nível:
 - Dentina.
- Meio de armazenamento em 10 níveis:
 - Água deionizada;
 - Água deionizada + Mucina;
 - Saliva artificial segundo Klimek;
 - Saliva artificial segundo Klimek + Mucina;
 - Saliva artificial segundo Vieira;
 - Saliva artificial segundo Vieira + Mucina;
 - Saliva artificial segundo Amaechi;
 - Saliva artificial segundo Amaechi + Mucina;
 - Saliva artificial segundo Eisenburger.
 - Saliva artificial segundo Eisenburger + Mucina.

Variável de resposta:

- Desgaste erosivo (μm).

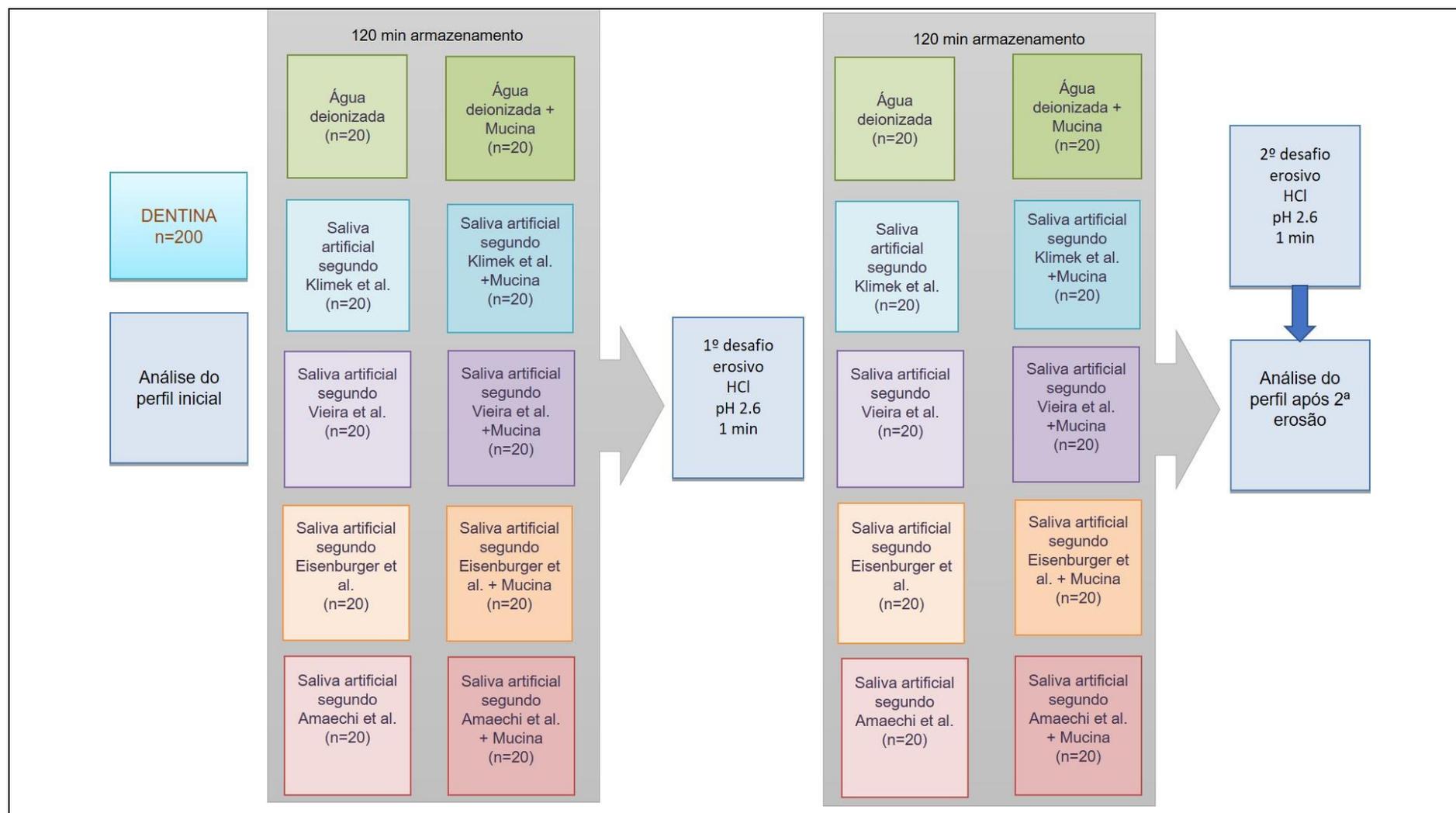


Figura 1 – Fluxograma do delineamento experimental.
 Fonte: elaborado pelo autor

2.1.1 Preparação dos espécimes e distribuição dos grupos

Foram preparados 200 cilindros de dentina a partir de raízes de dentes bovinos íntegros e recentemente extraídos (Figura 2A), que foram armazenados em solução de timol a 0,5% até o momento do uso [20]. Os dentes bovinos foram seccionados em sua porção cervical para a separação das coroas, utilizando disco de corte em torno de baixa rotação (Figura 2B e 2C). Após a separação, as raízes foram fixadas na base de um equipamento de corte circular (Figura 2D e 2E) e utilizando-se uma broca trefina de ponta diamantada com diâmetro interno 3 mm, sob irrigação constante, para a obtenção de cilindros de dentina (Figura 2F).

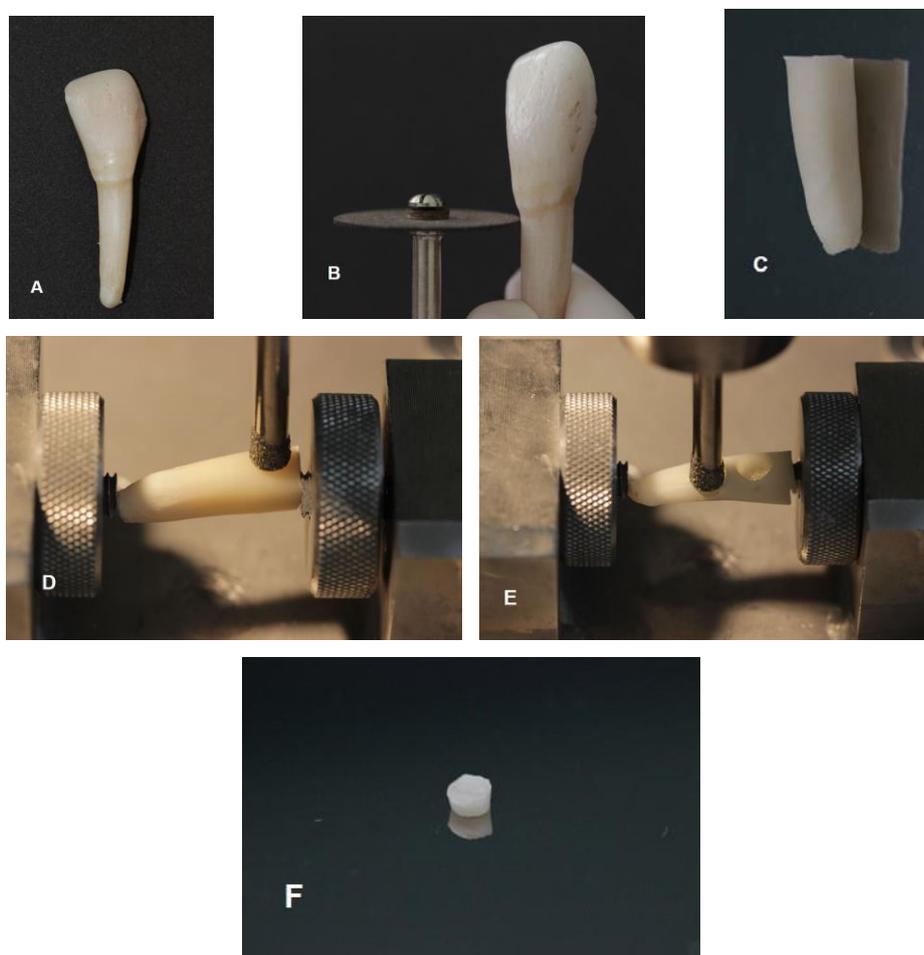


Figura 2– A) Dente incisivo bovino; B) Remoção da porção coronária com disco diamantado; C) Raiz do incisivo bovino; D) Raiz posicionada na cortadeira circular; E) Raiz sendo cortada pela broca trefina ; F) Amostras de 3mm de dentina.

Fonte: elaborado pelo autor

Obtidos os cilindros de dentina estes foram embutidos em resina acrílica autopolimerizável (JET- São Paulo, Brasil) (Figura 3B). Para essa etapa foi utilizada uma matriz de silicone com 6 mm de diâmetro e 3,1 mm de profundidade, sendo que no interior desta existia uma outra cavidade em segundo nível, com 3 mm de diâmetro e 0,1 mm de profundidade, onde o espécime de dentina foi posicionado com sua porção externa voltada para o interior da matriz (Figura 3A). A matriz apresenta uma concavidade em um dos lados, para que o espécime seja posicionado adequadamente no momento das leituras de perfil. Após a inserção da resina acrílica os espécimes foram levados a uma polimerizadora de pressão, onde seguindo as normas do fabricante foi preenchida com a água até o nível estabelecido e mantida em pressão por 10 minutos, em seguida foi despressurizada e aguardou-se 5 minutos antes de abri-la (Figura 3C).

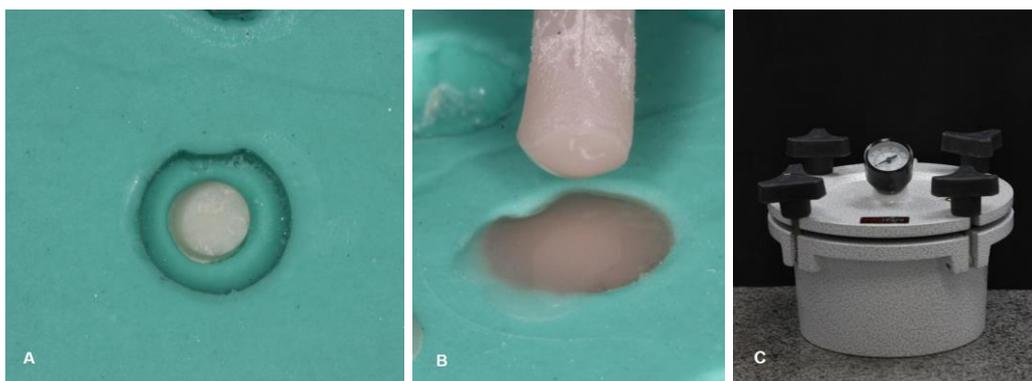


Figura 3 – A) Amostra de dentina sendo posicionada na matriz de silicone; B) Inserção da resina acrílica com pipeta Pasteur; C) Polimerizadora de pressão.
Fonte: elaborado pelo autor

Após a completa polimerização dos espécimes, as suas bases foram aplainadas em politriz Motorizada Polipan-U, (Panambra Zwick, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) com lixa de granulação 600-P e em seguida foi realizado o polimento com as lixas; 1200, 2500 e 4000-P (Stuers, Erkrath, Germany) (Figura 4) com a ajuda de um dispositivo de metal, para que a base ficasse paralela à superfície do espécime, sendo respeitado 20 segundos para cada amostra e a lixa sendo trocada a cada 30 amostras lixadas, para se obter um uma padronização do polimento.

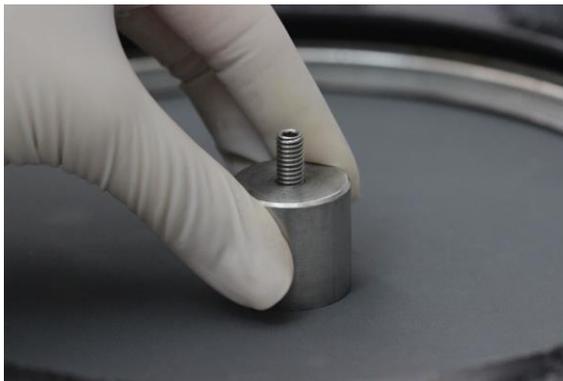


Figura 4 - Dispositivo de metal na lixadeira.
Fonte:elaborado pelo autor

Após o polimento com cada granulação de lixa, os espécimes foram limpos com água deionizada (200 ml) em aparelho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 5) durante 1 minuto, para assim remover quaisquer resíduos que poderiam interferir na lisura dos espécimes.

Posteriormente foram realizados dois riscos paralelos na superfície dos espécimes (Figura 6), sobre a resina acrílica e lateralmente à superfície de dentina, utilizando dispositivo projetado em uma pequena mesa de coordenadas XY, com uma base giratória, contendo uma ponta de aço. Estas marcações paralelas serviram como guias para orientação a sobreposição dos gráficos resultantes das leituras dos perfis obtidos.



Figura 5 - Ultrassom para limpeza dos espécimes.
Fonte:elaborado pelo autor

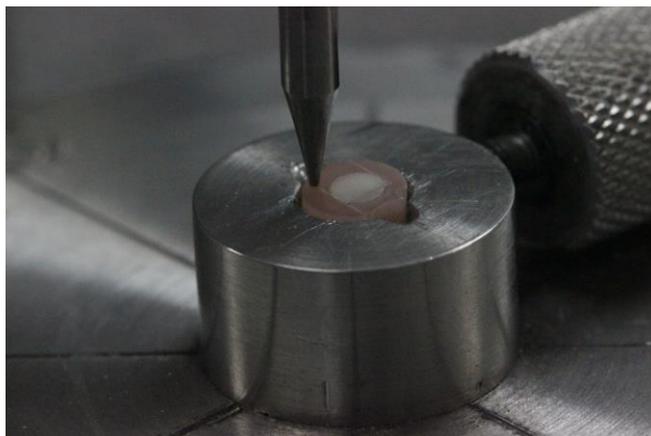


Figura 6 - Espécimes sendo riscadas na mesa de coordenadas XY.
Fonte: elaborado pelo autor

Os espécimes foram mantidos em ambiente com umidade relativa 100% até o momento do uso, quando foram então distribuídos aleatoriamente em 10 grupos de acordo com o meio de armazenamento aos quais foram submetidos. Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupos experimentais	Número de espécimes por grupo (n)
Água deionizada (controle negativo)	20
Água deionizada + Mucina (controle positivo)	20
Saliva artificial segundo Klimek et al.	20
Saliva artificial segundo Klimek et al. +Mucina	20
Saliva artificial segundo Vieira et al.	20
Saliva artificial segundo Vieira et al. + Mucina	20
Saliva artificial segundo Amaechi et al.	20
Saliva artificial segundo Amaechi et al. + Mucina	20
Saliva artificial segundo Eisenburger et al	20
Saliva artificial segundo Eisenburger et al. + Mucina	20

2.1.2 Preparo das Soluções

Para o preparo das soluções de saliva artificial, todos os componentes foram pesados em uma balança analítica (Shimadzu ATX UniBloc, Tamboré-SP, Brasil). Para a dissolução dos componentes foi utilizado um balão volumétrico de 500 ml, onde foi dissolvido cada componente por vez adicionando-se água deionizada. Para a completa dissolução dos sais, o balão volumétrico foi colocado sobre um agitador mecânico. Após o preparo das soluções foi medido o pH de cada saliva utilizando um PHmetro (Digimed Dm-20, São Paulo, Brasil), onde foram adicionadas gotas de HCl (ácido clorídrico) ou de KOH (hidróxido de potássio) – 1M para o ajuste, chegando assim no pH ideal de cada saliva segundo as referências encontradas na literatura. Após o ajuste do pH as soluções foram armazenadas em geladeira até o momento de uso. Na Tabela 2 encontram-se descritos os componentes de cada solução de saliva artificial assim como seus respectivos valores de pH.

Tabela 2 – Composição e pH das soluções de salivas artificiais

Componentes	Salivas artificiais			
	Segundo Klimek et al.	Segundo Vieira et al.	Segundo Amaechi et al.	Segundo Eisenburger et al.
C ₆ H ₈ O ₆	2 mg/l			
C ₆ H ₁₂ O ₆	30 mg/l			
NaCl	580 mg/l			
CaCl ₂	170 mg/l			
NH ₄ Cl	160 mg/l			
KCl	1270 mg/l	11182,50 mg/l	624,73 mg/l	2236,50 mg/l
NaSCN	160 mg/l			
KH ₂ PO ₄	330 mg/l		326,620 mg/l	544,360 mg/l
CH ₄ N ₂ O	200 mg/l			
Na ₂ HPO ₄	340 mg/l			
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O		60,12 mg/l		
NaF		0,066 mg/l		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O		160,19 mg/l		
C ₄ H ₁₁ NO ₃ Tris Buffer		12114,00 mg/l		
K ₂ HPO ₄			804,712 mg/l	
CaCl ₂ .2H ₂ O			166,130 mg/l	77,690 mg/l
C ₈ H ₈ O ₃			2000 mg/l	
CMC-Na			10000 mg/l	
MgCl ₂ .6H ₂ O			58,96 mg/l	
MgCl ₂				19,04 mg/l
C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S HEPES				4766,20 mg/l
Mucina*	2700 mg/l	2700 mg/l	2700 mg/l	2700 mg/l
Água deionizada	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
pH	6.4	7.0	6.75	7.0

* Apenas nos grupos onde será adicionada mucina

2.1.3. Preparo do ácido clorídrico para desafio erosivo

Para a obtenção do ácido clorídrico (HCl) na concentração e quantidade necessária para a promoção de um desgaste erosivo mensurável pela perfilometria (0.0025 mmol, 2 ml/ mm² da área do espécime), foi feita uma diluição do HCl P.A 37%. Para determinação da quantidade necessária para a realização deste estudo foi feito o cálculo descrito na figura 7. Para a diluição utilizou-se água deionizada com ajuda de um conta gotas até se obter a concentração ideal (0.0025 Mol) em seguida foi medido o pH da solução que resultou num valor de pH = 2,6.

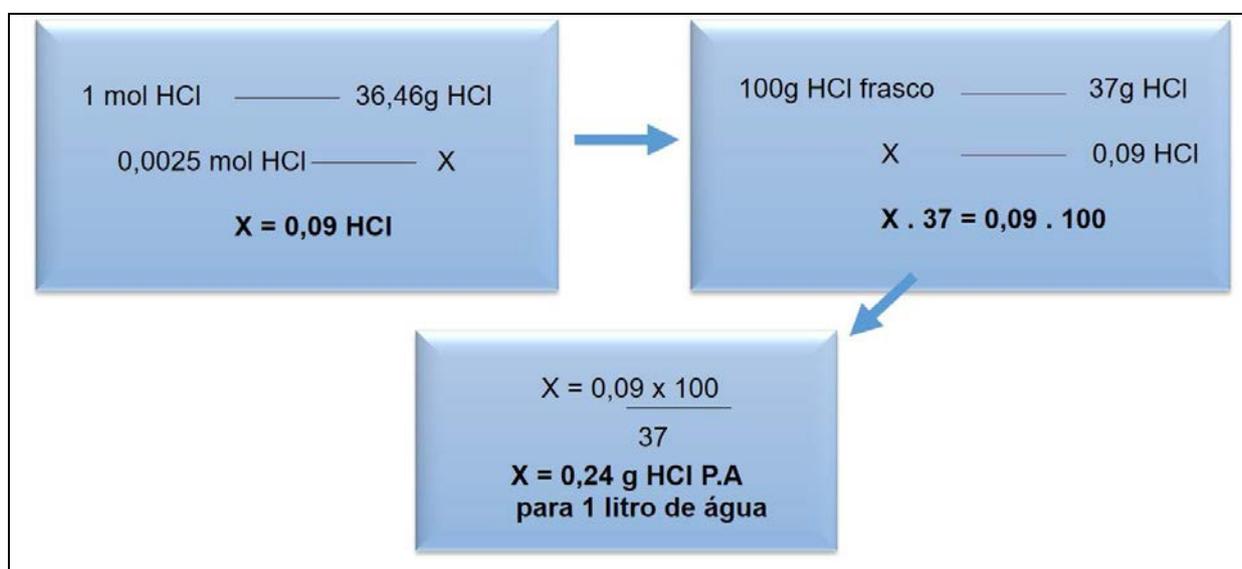


Figura 7- Cálculo para obtenção de HCl 0,0025 mol a partir da solução de HCl P.A (37%).

Fonte: elaborado pelo autor

2.1.4. Protocolo experimental

Para mensuração dos perfis foi utilizado um perfilômetro de contato Mahr Surf GD 25, Mahr – Goettingen, Alemanha, e o software Mahr Surf XCR 20 4.50-07 SP3 (Figura 8). O efeito do ácido sobre o tecido dentinário leva a perda de conteúdo mineral e consequente exposição da camada orgânica de colágeno [21], para que a análise da perda mineral em tecido dentinário seja realizada de maneira adequada é importante que esse tecido permaneça hidratado, pois o ressecamento da matriz orgânica poderia levar a mensurações errôneas [22].



Figura 8- Perfilômetro de contato Mahr-Goettingen
Fonte:elaborado pelo autor

Para realização do experimento, os espécimes foram numerados e medidos os perfis iniciais das superfícies (Figura 9A). No momento da mensuração as amostras foram removidas do meio de armazenamento e permaneceram molhadas durante todo o procedimento. Foram realizadas três varreduras com extensão de 4,20 mm a uma distância de 0,25 mm entre elas, sendo previamente programadas no software do perfilômetro, sendo as posições em 8,60; 8,85 e 9,10. (Figura 9B)

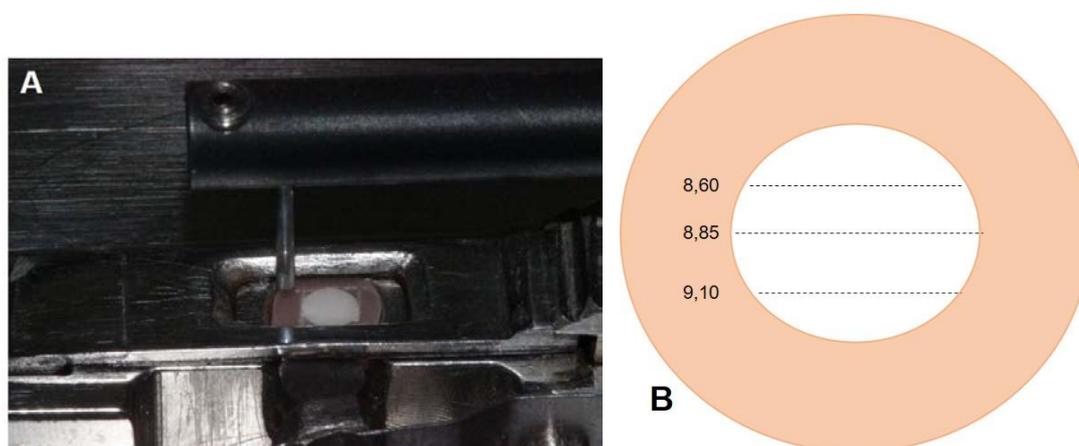


Figura 9 – A) Espécimes posicionadas no perfilômetro para realização da mensuração de perfil; B) Esquema ilustrativo das distâncias entre as leituras.
Fonte:elaborado pelo autor

2.1.5 Ciclagem dos espécimes

Após mensuração dos perfis iniciais os espécimes foram submetidos ao armazenamento em meio úmido até o início das ciclagens. Para cada grupo foram confeccionadas matrizes de silicone onde os espécimes foram inseridos e levados para armazenamento em seu respectivo meio, e permaneceram mantidos sob agitação em temperatura ambiente por 120 min. Após serem retirados dos meios de armazenamento os espécimes foram então submetidos ao primeiro desafio erosivo.

Para realização do desafio erosivo as matrizes com os espécimes inseridos foram levadas à imersão em ácido clorídrico (2 ml/mm² da área do espécime) 0,0025 mMol, pH 2.6 por 1 min, sob agitação em um agitador multifuncional de Kline (Biomixer, Jiangsu, China) a uma frequência de 120 rpm sob temperatura controlada (25°C), e a seguir lavadas em água deionizada por 10 segundos.

Posteriormente os espécimes foram novamente armazenados em seus respectivos meios por mais 120 min e então submetidos a um segundo desafio erosivo, idêntico ao realizado anteriormente. Após o segundo desafio erosivo foram feitas novas mensurações dos perfis, para comparação entre as medidas.

2.1.6 Mensuração do desgaste

Para a mensuração da quantidade de desgaste em cada espécime os gráficos obtidos no Software Mahr Surf XCR 20 4.50-07 SP3 para perfil inicial e final de cada espécime foram sobrepostos utilizando-se o próprio software (Figura 10A). Em cada espécime foram obtidas três sobreposições, cada uma referente a uma coordenada de medição (8,60; 8,85 e 9,10), em seguida foi obtida uma média de cada espécime em µm. Após se obter a média individual de cada espécime, os valores foram então tabulados no programa Excel para Windows 2016.

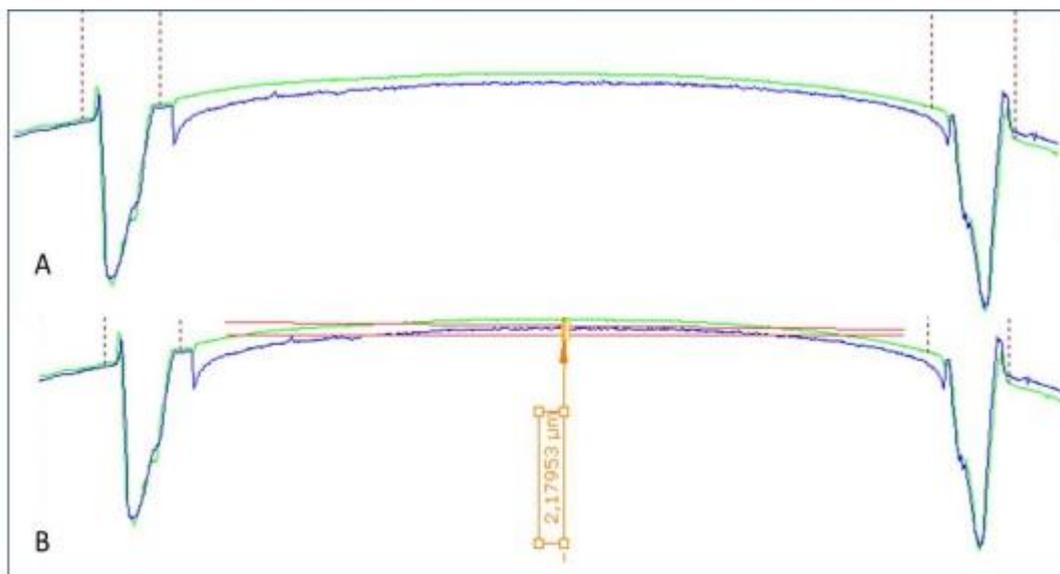


Figura 10- A- Sobreposição dos perfis obtidos antes (verde) e após (azul) a exposição ao ácido. B- Valor da altura resultante da sobreposição dos perfis.

Fonte: elaborado pelo autor

2.1.7 Análise estatística

Foram testadas as seguintes hipóteses de nulidade:

H0₁ – Os diferentes meios de armazenamento testados não resultam em diferenças significativas na prevenção dos desgastes erosivos.

H0₂ – A adição de mucina às formulações de salivas artificiais não resulta em diferenças significativas na prevenção dos desgastes erosivos.

Para a realização da análise estatística foi empregado o programa SigmaPlot 13 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA).

3. RESULTADOS

Os dados referentes ao desgaste da superfície de dentina para cada espécime foram analisados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov – Smirnov. E foi constatada a distribuição normal dos valores obtidos (Figura 11). Posteriormente foi realizada a análise de variância ANOVA a dois fatores (tipo de saliva e presença de mucina), seguido pelo teste de Tukey (5%) para comparação entre os grupos experimentais.

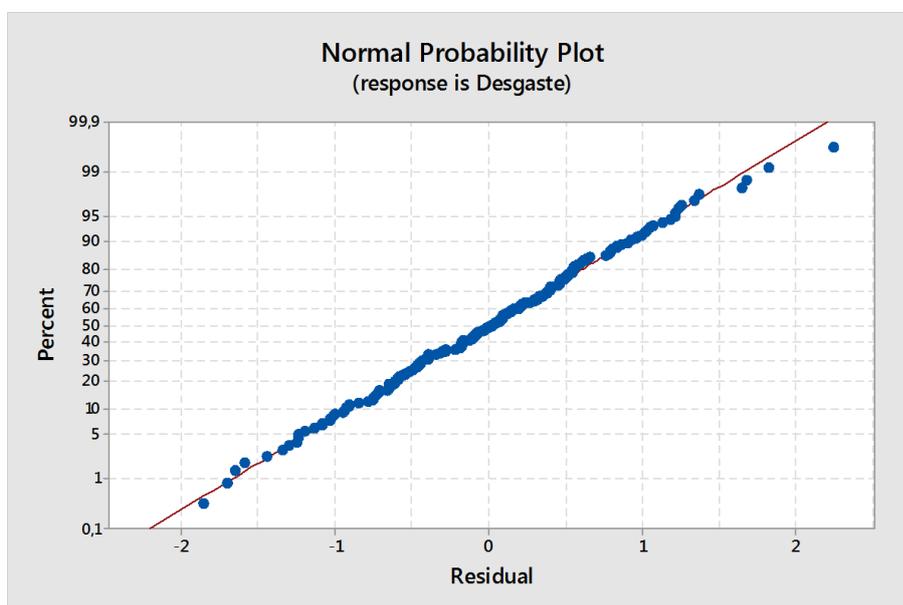


Figura 11- Gráfico da distribuição normal de probabilidade.
Fonte: elaborado pelo autor

Para avaliar os diferentes meios de armazenamento e a adição de mucina nas diferentes formulações, os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA (dois fatores).

Os resultados mostram diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tipos de salivas artificiais na prevenção do desgaste erosivo ($p=0,00$) e para a interação entre os dois fatores ($p=0,04$). Não houve diferença estatística significativa para a adição de mucina às formulações ($p=0,360$), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3- Resultado do teste de análise de variância ANOVA 2 fatores

Fator	Grau de liberdade	Média	Razão (F)	P – Valor
Saliva	4	21,87	41,08	0,00
Mucina	1	0,44	0,84	0,36
Saliva* Mucina	4	1,34	2,53	0,04
Erro	190	0,53		

F=F-ratio (* $p < 0,05$)

Os valores de média para o desgaste erosivo em dentina (μm) com os respectivos desvios-padrões e os resultados do teste de Tukey (5%) para a comparação entre os diferentes grupos experimentais, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores das médias, desvio-padrão e resultados do teste de Tukey (5%) para desgaste erosivo em dentina

Saliva	Média (μm) \pm Desvio padrão	Grupos homogêneos		
Água deionizada sem mucina	4,60 \pm (0,91)	A		
Água deionizada com mucina	4,07 \pm (0,93)	A	B	
Amaechi sem mucina	3,72 \pm (0,83)		B	C
Klimek sem mucina	3,60 \pm (0,91)		B	C
Amaechi com mucina	3,34 \pm (0,73)		B	C
Vieira sem mucina	3,31 \pm (0,60)			C
Klimek com mucina	3,27 \pm (0,57)			C
Vieira com mucina	3,20 \pm (0,58)			C
Eisenburger sem mucina	2,36 \pm (0,45)			D
Eisenburger com mucina	2,18 \pm (0,54)			D

* Grupos seguidos pelas mesmas letras não mostram diferenças estatísticas significativas

É possível notar que houve menor desgaste erosivo nos grupos onde se utilizou a soluções segundo Eisenburger. Para os grupos Amaechi, Vieira e Klimek não houve diferença estatística significativa entre eles. Para os grupos onde foi utilizada água deionizada sem adição de mucina notam-se os maiores resultados de desgaste erosivo (Figura 12).

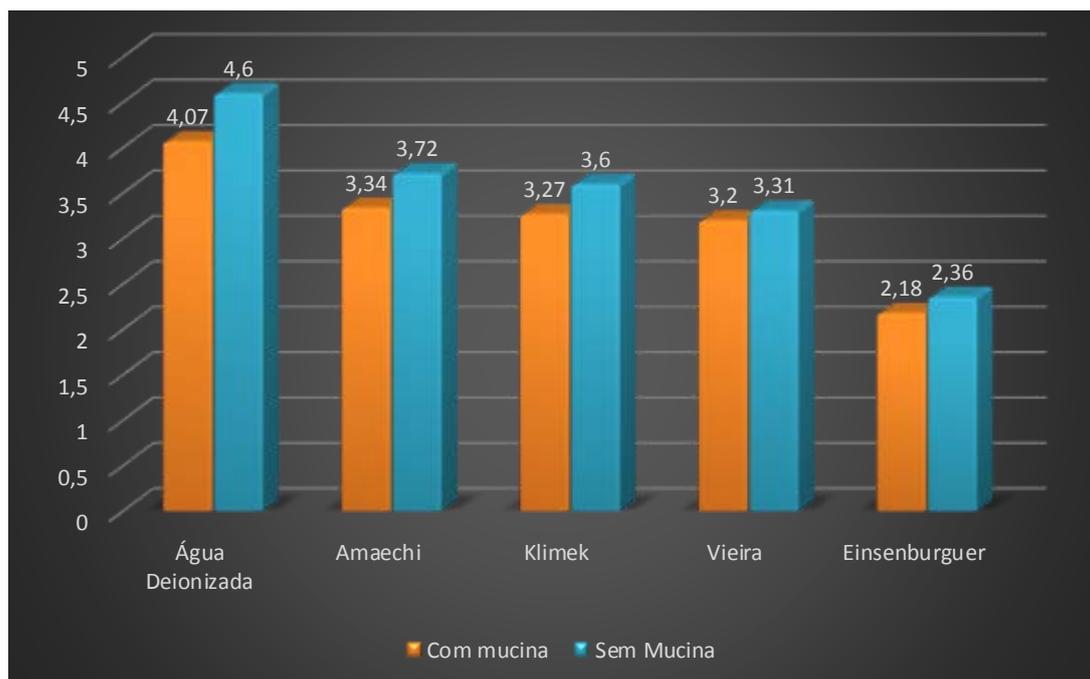


Figura 12- Gráfico comparativo dos desgates erosivos entre as diferentes soluções, com e sem mucina.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi comparado o efeito preventivo da erosão de diferentes formulações de salivas artificiais e também o efeito preventivo do desgaste erosivo quando feita a adição de mucina nos diferentes tipos de salivas artificiais.

A saliva tem um importante papel na proteção dos tecidos dentais devido à sua capacidade de formar uma película protetora sobre as superfícies dentárias, diminuindo os efeitos dos ácidos por propriedades de diluição [23].

No presente estudo, os espécimes sofreram processos erosivos em um curto prazo (1 minuto) utilizando ácido clorídrico, para simular as condições clínicas em pacientes que sofrem de refluxo gástrico ou bulimia [24-25].

Um estudo prévio [7] mostra que a imersão de 2 horas em saliva parece apropriada para permitir uma remineralização parcial após os desafios erosivos, ou seja, esse período é eficaz para apresentar um efeito protetor significativo contra a erosão [26].

A análise perfilométrica de contato foi realizada nesse estudo a fim de quantificar o desgaste erosivo e o efeito preventivo dos diferentes tipos de salivas artificiais.

Os resultados deste estudo mostraram uma diferença entre as salivas artificiais utilizadas, sendo o maior efeito preventivo para a saliva artificial segundo Eisenburger et al [7]. Essa saliva apresenta em sua formulação o componente Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$), que é um agente tampão químico orgânico, denominado de ácido sulfônico zwitterionic. Acredita-se que a característica tamponante deste componente promova uma adequação do pH fisiológico do meio, evitando assim o desenvolvimento de lesões pelo desgaste erosivo [27]. Isso ocorre pela neutralização dos excessos de íons H^+ ou OH^- , mantendo o pH ideal da saliva em torno de 7 [7].

O tampão Hepes é classificado como um tampão “bom” se comparado a um conjunto de tampões descritos pelo estudo de Good et al [28]. Segundo esse estudo o Hepes apresenta características como; alta solubilidade, impermeabilidade a membrana plasmática, estabilidade química e enzimática e pKa entre 6 e 8, onde Ka

se refere a uma constante acidez, portanto pKa está relacionado com pH dos ácidos, onde deve-se manter entre esses valores a fim de efetuar sua capacidade tamponante [29]. De acordo com essas características, supõe-se que na solução de saliva artificial utilizada sua ação seria restringir as alterações de pH, causadas pelos desafios erosivos, prevenindo o desgaste da estrutura dental [27].

As demais salivas artificiais utilizadas neste estudo, não apresentam os mesmos componentes de tamponamento, portanto essa pode ser a razão para que não apresentem um papel preventivo tão eficaz contra a erosão dental quanto a solução preconizada por Eisenburger et al [7].

Além do HEPES, a saliva Eisenburger apresenta em sua formulação, a adição de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), esse que segundo a literatura acarreta diversos benefícios para o organismo humano [29], sendo um deles, a atuação nos ossos do corpo e também nos dentes, onde os íons de magnésio não apenas regulam os comportamentos celulares, mas também o processo de remineralização [30]. Acredita-se que essa ação possa ser efetiva contra a progressão de lesões causadas pela erosão.

Dentre os componentes químicos presentes na saliva humana, as proteínas são as mais abundantes e importantes. As espécies moleculares encontradas na saliva são representadas por fosfoproteínas, glicoproteínas ácidas e básicas e mucina, onde elas formam coberturas orgânicas sobre as superfícies da mucosa e dentes [31].

A mucina é a glicoproteína que mais se destaca, pois é uma proteína de característica hidrofílica que retém a água tendo uma função de lubrificação [32], são moléculas de alto peso molecular que proporcionam viscosidade à saliva. O motivo da utilização da mucina nesse trabalho foi determinar se ela seria capaz de proporcionar um efeito preventivo da erosão em dentina, porém os resultados mostraram que sua adição não resultou em diferenças significativas na prevenção ao desgaste erosivo [33].

Estudos prévios relatam que as mucinas salivares contribuem em grande parte para o efeito protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte [34], porém nesse estudo foram utilizadas apenas amostras de dentina. A desmineralização erosiva de dentina resulta na exposição de uma camada externa

de matriz orgânica totalmente desmineralizada, seguida de uma zona parcialmente desmineralizada até que a dentina interna seja atingida [35-39]. A saliva penetra no sistema tubular da dentina para produzir não apenas uma camada de película na superfície, mas um menisco de líquido viscoso nos orifícios dos túneis [36]. Em um estudo in situ anterior realizado ao longo de 14 dias, mostrou-se que a saliva oferecia uma melhor proteção contra a erosão do esmalte do que a da dentina [37]. Devido à composição diferente dos tecidos duros dentários, pode-se assumir que as propriedades protetoras da película podem variar para o esmalte e dentina. Um estudo recente encontrou um efeito protetor, mas limitado, da película adquirida em superfícies de dentina [38].

Acredita-se ainda, que em protocolos onde se associa o desgaste abrasivo da dentina ao desafio ácido, a perda tecidual seja maior, uma vez que o processo abrasivo seria capaz de afetar a camada orgânica exposta pela perda mineral provocada pelo ácido, removendo essa camada de colágeno e dessa forma promovendo um desgaste mais substancial que seria mais facilmente mensurado pela perfilometria, entretanto não se pode afirmar que isso realmente ocorra, uma vez que este não foi o protocolo adotado neste estudo.

Na maioria dos estudos in vitro, onde se emprega saliva artificial as formulações não possuem proteínas salivares, o que não permitiria a formação adequada de películas adquiridas, causando impacto no processo erosivo [40], por essa razão optou-se em adicionar a mucina às soluções artificiais utilizadas no presente estudo, na intenção de verificar se melhores resultados seriam obtidos.

Entretanto a adição de mucina nas formulações de salivas artificiais utilizadas, não apresentam resultados significantes para a prevenção da erosão em dentina. Há que se levar em consideração que o comportamento da mucina sintética utilizada nos estudos in vitro, pode ser diferente da mucina encontrada na saliva humana. Sua estabilidade nas formulações e a combinação com os demais componentes utilizados pode diferir daquilo que se encontra nas condições in situ. Sendo assim, é necessário um aprofundamento em pesquisas referentes ao potencial preventivo da mucina em erosão dental na superfície dentinária.

5 CONCLUSÃO

Considerando as limitações desse estudo, pode-se concluir que:

- A hipótese de nulidade $H0_1$ foi rejeitada, pois a solução de saliva artificial segundo Eisenburger apresentou melhores resultados para o efeito preventivo do desgaste erosivo em dentina.
- A hipótese de nulidade $H0_2$ foi aceita, uma vez que a adição de mucina às soluções utilizadas neste estudo não resultou em diferenças significativas no efeito preventivo do desgaste erosivo em dentina.

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, destaca-se a necessidade de estudos futuros que abordem os efeitos preventivos da solução de saliva artificial segundo Eisenburger não só em erosão, mas também na associação em processos abrasivos, assim como devem ser também estudados de maneira mais aprofundada os efeitos preventivos da mucina em erosão dental de dentina, comparando-os com os efeitos obtidos em erosão de esmalte.

REFERÊNCIAS

1. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:44-65.
2. Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:197-205.
3. Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:206-14.
4. Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res.* 1982;16(2):156-61.
5. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JÁ, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005;39(6):514-20.
6. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel *Caries Res.* 1998;32(5):351-6.
7. 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.
8. Engle K, Hara AT, Matis B, Eckert GJ, Zero DT. Erosion and abrasion of enamel and dentin associated with at-home bleaching: an in vitro study. *J Am Dent Assoc.* 2010;141(5):546-51.
9. Wang X, Megert B, Hellwig E, Neuhaus KW, Lussi A. Preventing erosion with novel agents. *J Dent.* 2011;39(2):163-70.
10. Min JH, Kwon HK, Kim BI. The addition of nano-sized hydroxyapatite to a sports drink to inhibit dental erosion: in vitro study using bovine enamel. *J Dent.* 2011;39(9):629-35.
11. 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 Den.* 2006;34(3):214-20.
12. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MA. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. *J Dent.* 2011;39(12):841-8.

13. Newby CS, Creeth JE, Rees GD, Schemehorn BR. Surface microhardness changes, enamel fluoride uptake, and fluoride availability from commercial toothpastes. *J Clin Dent*. 2006;17(4):94-9.
14. Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JD. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res*. 1990;24(3):181-8.
15. Piekarcz C, Ranjitkar S, Hunt D, McIntyre J. An in vitro assessment of the role of tooth mousse in preventing wine erosion. *Aust Dent J*. 2008;53(1):22-5.
16. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo In: Leach SA (ed) *Factors relating to demineralisation and demineralisation of the teeth*. Oxford: Oxford University Press; 1986.
17. Batista GR, Torres CRG, Sener B, Attin T, Wiegand A. Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. *Caries Res*. 2016;50(1):78-86.
18. Ionta FQ, Mendonca FL, de Oliveira GC, de Alencar CR, Honorio HM, Magalhaes AC. et al. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *J Dent*. 2014;42(2):175-9.
19. Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Zero DT. The effect of human saliva substitutes in an erosion-abrasion cycling model. *Eur J Oral Sci*. 2008;116(6):552-6.
20. 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(11) 753-759.
21. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(5):390-6.
22. Attin T, Becker K, Roos M, Attin R, Paque F. Impact of storage conditions on profilometry of eroded dental hard tissue. *Clin Oral Investig*. 2009;13(4):473-8.
23. Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:206–14.
24. 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.
25. Wegehaupt FJ, Taubock TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intraoral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odontol Scand*. 2012;70:177–83.
26. Alencar CR, Mendonça FL, Guerrini LB, Jordão MC, Oliveira GC, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. Effect of different salivary exposure times on the

rehardening of acid-softened enamel. *Braz Oral Res.* 2016 Oct 10;30(1):e104. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0104

27. Santos TL, Inaba J, Viana AG. Avaliação da capacidade tamponante da saliva [internet]. 13º Conex- apresentação oral-resumo expandido; 2016. 2238-9113. Disponível em: http://sites.uepg.br/conex/anais/anais_2016/anais2016/1050-5000-1-PB-mod.pdf

28. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry.* 1966 Feb;5(2):467-77

29. Ferguson WJ, Braunschweiger KI, Braunschweiger WR, Smith JR, McCormick JJ, Wasmann CC, et al. Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal Biochem.* 1980 May 15;104(2):300-10

30. Zhang K, Lin S, Feng Q, Dong C, Yang Y, Li G. et al. Nanocomposite hydrogels stabilized by self-assembled multivalent bisphosphonate-magnesium nanoparticles mediate sustained release of magnesium ion and promote in-situ bone regeneration. *Acta Biomater.* 2017 Dec;64:389-400. doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.039.

31. Pinheiro CE. Curso de bioquímica da cárie dental I - bioquímica da saliva. *Rev Paul Odontol.* 1982;4(3):40-43.

32. Feio M, Sapeta P. Xerostomia in palliative care. *Acta Med Port.* 2005 Nov-Dec;18(6):459-65. Epub 2006

33. Edgar W, Mullane D, Hay DI. The functions of salivary proteins; *Saliva and Oral Health.* 1999. 105–122.

34. 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

35. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Jr, Marshall SJ, Marshall GW. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995;74:1179–84.

36. Wynn RL, Meiller TF. Drugs and dry mouth. *Gen Dent.* 2001 Jan-Feb;49(1):10-2, 14.

37. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012 Sep-Oct;20(5):493-502.

38. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol.* 2007 May;52(5):444-9. Epub 2006 Nov 28.

39. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1179-84.

40. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 1994 Sep;73(9):1523-9