



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

RAYSSA FERREIRA ZANATTA

**INFLUÊNCIA DE TENSOATIVOS SOBRE O EFEITO PROTETOR
DA PELÍCULA E INTERAÇÃO COM NaF NO
DESENVOLVIMENTO DA EROSÃO DENTAL**

2016

RAYSSA FERREIRA ZANATTA

**INFLUÊNCIA DE TENSOATIVOS SOBRE O EFEITO PROTETOR DA PELÍCULA E
INTERAÇÃO COM NaF NO DESENVOLVIMENTO DA EROSÃO DENTAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Dentística.

Orientadora: Profa. Adjunta Alessandra Bühler Borges

São Jose dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. 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).

Zanatta, Rayssa Ferreira

Influência de tensoativos sobre o efeito protetor da película e interação com NaF no desenvolvimento da erosão dental / Rayssa Ferreira Zanatta. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
120 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientador: Alessandra Bühler Borges.

1. Erosão dental. 2. Película Adquirida. 3. Tensoativos. 4. Fluoreto de Sódio. I. Borges, Alessandra Bühler, 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

Profa. Dra. Alessandra Bühler Borges (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães

Universidade de São Paulo (USP)
Faculdade de Odontologia de Bauru

Profa. Dra. Tais Scaramucci Forlin

Universidade de São Paulo (USP)
Faculdade de Odontologia

São José dos Campos, 08 de dezembro de 2016

DEDICATÓRIA

Para Maria das Graças e Rebson Zanatta, os melhores pais que eu poderia ter! O sucesso de hoje é fruto da educação que vocês me proporcionaram, e sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Agradeço a Deus todos os dias pela família que nós somos. Vocês são minha maior riqueza e o meu amor por vocês não pode ser descrito em palavras.

Para meu irmão Rafael, que segura as pontas em casa na minha ausência. Tenho o maior orgulho da pessoa que você é. Te amo!

E para meu querido Daniel, que mesmo depois de uma década ainda me faz ter borboletas no estômago. Te amo por tudo que você é e pela pessoa que eu sou quando estou com você! Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me “trazer” até aqui e por dividir comigo as minhas melhores lembranças.

“Happiness is only real when shared”
(“A felicidade só é real quando compartilhada”)
Christopher McCandless

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, fonte de força nos desafios diários, fé nos momentos de angústia, paz e gratidão nos momentos de alegria! Tua presença me fez ter coragem de buscar sempre mais e acreditar que no fim tudo daria certo!

“Buscai, assim, em primeiro lugar, o Reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas vos serão acrescentadas. – Matheus 6:33)

A minha orientadora **Profa. Alessandra Bühler Borges** que me ofereceu todos os meios de chegar a este fim. Não existem palavras que descrevem a minha enorme gratidão por tudo que você pôde me proporcionar nestes últimos anos! Sua confiança no meu potencial me fez buscar pelo melhor que eu poderia oferecer e contribuir com o crescimento do nosso grupo. Suas palavras, nem sempre confortáveis aos ouvidos, me fez valorizar e buscar alcançar o melhor que eu poderia ser e oferecer, e por isso serei eternamente grata. Você soube, como poucos, a dar aquele “empurrãozinho” que me fez sair da minha zona de conforto! O seu incentivo para que eu fosse fazer o doutorado sanduíche e todo esforço para que desse certo me fez ter a mais incrível e fantástica experiência da minha vida! Devo a você todo o meu crescimento profissional (e também pessoal) dos últimos quatro anos! Espero muito que meu empenho nesse (e outros projetos) tenha atendido à suas expectativas e me desculpe pelo que deixei a desejar! Nossa parceria me fez alcançar resultados muito além das metas que me propus no começo do doutorado, e por ver como deu certo, espero ainda que possamos continuar juntas, nesse maluco mundo da pesquisa. MUITO, MUITO, MUITO OBRIGADA!

Ao **Prof. Carlos Rocha Gomes Torres**, deixo um muito obrigado por toda dedicação e confiança depositada em mim. Ainda nas primeiras semanas em São José pude perceber que mesmo como orientada da Profa Alessandra nossos caminhos estariam sempre interligados, e hoje percebo a minha sorte em tê-lo como figura ativa na minha formação acadêmica. A sua visão do meu potencial no começo de tudo permitiu que eu pudesse crescer e mostrar o meu trabalho. Serei sempre grata a você por todo conhecimento científico-acadêmico que adquiri nestes anos, por todas as oportunidades de escrever e mostrar nossos trabalhos no Brasil e fora dele, e por todas as portas que você abriu para mim (inclusive literalmente na Grécia). Du bist ein wunderbarer Professor! Vielen Dank für alles!

Ao **Prof. Carlos José Soares**, exemplo de profissional e pesquisador, cujo trabalho e dedicação me ensinou os primeiros passos na pós-graduação. Sem eles eu não conseguiria chegar até aqui. Tenho o maior orgulho da oportunidade que você

me deu de escrever parte da minha história na FOUFU, e meu respeito pelo seu trabalho na UFU e fora dela cresce todos os dias!

*Às minhas amigas queridas **Daniele, Ana Julia, Lucélia, Laura**, e também ao **Rafael e Gabriel**, por me acolherem quando tudo ainda era muito confuso e me fazerem sentir em casa! Vocês são minha família longe de Uberlândia, foram responsáveis pela minha sanidade mental ao longo desses anos e fizeram com que vivê-los valesse a pena! Sou muito feliz por ter vocês em minha vida e por ter tido a oportunidade de escrever esse capítulo da minha história com vocês. Obrigada por estarem presente antes de todo o “efeito fapesp” acontecer (rsrsr). Dani, obrigada por todas as horas no laboratório, mas principalmente por aquelas fora dele! Poder contar com você no desenvolvimento desse trabalho e de todos os outros foi fundamental para meu sucesso. Obrigada por estar sempre presente! Ana Julia, obrigada pelas risadas, pelos puxões de orelha e por incentivar hábitos de vida mais saudáveis. Lucélia querida, obrigada pelo carinho e pelas sábias palavras quando sempre precisava (e pelos áudios no WhatsApp quando estava na Alemanha que alegravam a minha semana). Amo todos vocês!!*

*Ao **Prof. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, meu primeiro “contato” com o programa de pós-graduação do ICT-UNESP, em uma época que tudo era muito novo e diferente. Seu sorriso e palavras nas primeiras disciplinas me fizeram crer que o desafio ao qual eu me lançava poderia ser vencido. Obrigada pela confiança e parceria dos últimos (e próximos) anos.*

*Aos **Profs. Cesar Rogério Pucci e Eduardo Bresciani** que sempre ofereceram um sorriso e mão amiga, não medindo esforços para ajudar no meu crescimento dentro do programa!*

*A **Profa. Graziela Batista**, por toda convivência neste último ano do doutorado, pelas mensagens quando estava na Alemanha e todas considerações no exame de qualificação que só enriqueceram o meu trabalho. Vielen dank Gratzi! Ich wünsche Ihnen viel Erfolg und Glück in deine Leben.*

*Pós-graduação muitas vezes é sinônimo de longos e longos dias no laboratório! E como é importante contar com àqueles que estão no mesmo barco e remando na mesma direção. Não seria este um ambiente suportável se não tivesse por lá tanta gente para dividir todos os momentos de alegria e de desespero. Valeu **Tânia, Maria Ângela, Marina, Stella, Natalia, Daphne, Bia Maria e Maria Bia, Leticia e Érica**, por todos os momentos de risadas e convivência, fundamentais na manutenção da minha (e nossa) sanidade mental! Não poderia deixar uma nota de agradecimento ao grupo de amigos e voluntários que prontamente se dispuseram a doar saliva necessária para a execução desse trabalho. Sei bem que não foi uma*

experiência das mais agradáveis, porém sem a ajuda e bom humor de vocês nada disso seria possível.

*Um obrigado também aos alunos de IC **Karen, Morgana e Ítallo** por me permitirem contribuir com a vivência científica de vocês. Orientá-los foi um enorme prazer!*

*Um muito obrigado para amigas de longa data **Laila, Larissa e Liana** que nunca me deixaram esquecer que existe vida fora da pós-graduação, e se fazem presente mesmo de tão longe. Amo vocês meninas!*

*Um agradecimento à **minha família**, em especial a minha querida **Patrícia**, por todo carinho e zelo comigo, muitas vezes se preocupando mais que minha mãe com meu bem-estar e sucesso. A **Kélen** por ser a irmã que eu não tive e cuja presença é sempre constante com o que quer que seja! A minha cunhada **Roberta** por já fazer parte de algumas das minhas grandes conquistas e levar alegria onde passa! Precisamos repetir nossa “Deustchesreise”. A minha avó **Helena** por todos puxões de orelha quando fico tempo de mais longe de casa! Aos demais tios, tias, primas e primos o meu muito obrigada por me ensinarem o conceito de família e nunca me deixarem esquecer das minhas raízes! Amo muito todos vocês*

*O meu muito obrigado a **Francisco, Lori, Liza e Laís** por toda torcida para que eu chegasse até aqui, por todas as viagens europeias que fizemos e ainda faremos, e por sempre me fazerem sentir parte da família.*

*Meinen besonderen Dank an die Professorin **Annette Wiegand**, die mich in Göttingen akzeptierte. Sie erlaubte mir, die unglaublichste und fantastischste Erfahrung meines Lebens zu haben! Ich bewundere die Forscherin und Expertin, die Sie sind. In der Zeit, die ich bei UMG verbracht habe, ist mein Respekt nur gestiegen. Ich bedanke mich für jedes Detail, um meinen Aufenthalt in Deutschland zu erleichtern. Ich werde diese 7 Monate nie vergessen und ich hoffe sehr, dass ich in der Zukunft noch Erfahrungen mache, die ich mit Ihnen und Ihrer Arbeitsgruppe teilen kann.*

*Und zuletzt meinen Dank an **Marta Lungová**, die mehr als eine Freundin auf der anderen Seite des Atlantiks war. Du warst ein Engel in meinem Leben und hast alles einfacher gemacht. Du warst das freundliche Gesicht unter all den Unbekannten und die Gewissheit, dass ich nicht allein war. Ich wünsche dir viel Erfolg und hoffe, dass wir uns irgendwann wieder treffen können.*

AGRADECIMENTOS

Á **Faculdade de Odontologia** do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa. Dra. Rebeca de Nicoló.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora**, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges e também do coordenador da especialidade de Dentística, Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves.

Ao **corpo docente do programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora**, em especial aos Profs. da Especialidade de Dentística: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves, Prof. Dr. Eduardo Bresciani, Prof Dr. César Pucci, Profa. Dra. Maria Filomena Huhtala, Profa. Dra. Taciana Canepelle, Prof. Dr. Clóvis Paganni, pelo convívio, conhecimento e experiências compartilhadas.

As **secretárias e técnicas** do departamento de Odontologia Restauradora, em especial Josiane e Fernanda, por toda colaboração nos momentos de necessidade.

Á **FAPESP** pela concessão das bolsas de doutorado (Processo 2013/12069-5) e doutorado sanduíche (Processo BEPE 2015/08383-1) fundamentais na construção e desenvolvimento, não somente deste trabalho, como também do meu crescimento profissional e pessoal.

*"É possível encontrar a felicidade mesmo nas horas mais
sombrias, se você se lembrar de acender a luz."
(Albus Dumbledore)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Erosão dental	19
2.2 Atuação da película adquirida na erosão	26
2.3 Influência do fluoreto de sódio no desenvolvimento da erosão	31
2.4 Produtos de higiene oral - agentes tensoativos	35
2.5 Metodologias usadas no estudo da erosão	38
2.6 Uso de dentes bovinos em pesquisa	43
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Delineamento experimental	46
4.2 Comitê de ética	47
4.3 Ensaio laboratoriais	47
4.3.1 Mensuração do ângulo de contato – Goniometria	48
4.3.1.1 Preparo das amostras para Goniometria	49
4.3.1.2 Divisão dos grupos	50
4.3.1.3 Preparo das soluções	52
4.3.1.4 Goniometria	52
4.3.1.5 Análise estatística	53
4.3.2 Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR)	54
4.3.2.1 Preparo das amostras para espectroscopia (FTIR)	54
4.3.2.2 Divisão dos grupos	56
4.3.2.3 Preparo das soluções	56
4.3.2.4 Coleta de saliva	56
4.3.2.5 Mensuração da absorbância inicial	57
4.3.2.6 Tratamento dos espécimes e formação da película adquirida	58

4.3.2.7 Mensuração da absorbância final	58
4.3.2.8 Análise estatística	61
4.3.3 Avaliação do potencial antierosivo das soluções testadas	61
4.3.3.1 Preparo dos espécimes	61
4.3.3.2 Microdureza Inicial	64
4.3.3.3 Divisão dos grupos	65
4.3.3.4 Perfilometria inicial	66
4.3.3.5 Preparo das soluções	68
4.3.3.6 Desafio erosivo	69
4.3.3.7 Microdureza final	70
4.3.3.8 Ensaio de perfilometria	72
4.3.3.9 Análise estatística	73
4.3.4 Análises de flúor	73
4.3.4.1 Flúor disponível nas soluções	73
4.3.4.2 Flúor solúvel em KOH	74
4.3.4.3 Análise estatística	75
4.4 Hipóteses de nulidade	75
5 RESULTADO	76
5.1 Energia de superfície – Goniometria	76
5.2 Formação da película adquirida – FTIR	77
5.3 Análise da microdureza	79
5.4 Análise da perfilometria	83
5.5 Análise de Flúor	85
6 DISCUSSÃO	87
6.1 Energia de superfície e formação de película adquirida	87
6.2 Erosão do esmalte	89
7 CONCLUSÃO	94
REFERENCIAS	95
APÊNDICE	111
ANEXOS	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparo dos incisivos bovinos	48
Figura 2 – Embutimento das amostras de goniometria	49
Figura 3 – Divisão dos grupos para goniometria	50
Figura 4 - Esquema ilustrativo da definição das concentrações de agentes tensoativos que foram usados no estudo	51
Figura 5 – Posicionamento das amostras e da seringa no ensaio de goniometria e definição dos ângulos de contato	53
Figura 6 – Corte das amostras circulares.....	55
Figura 7 - Posicionamento das amostras no espectrofotômetro e absorbância inicial	57
Figura 8 - Esquema de formação de película e leituras da absorbância	59
Figura 9 - Espectros inicial e final antes e depois da normalização dos dados	60
Figura 10 – Embutimento das amostras	62
Figura 11 – Polimento das amostras	63
Figura 12 – Ensaio de microdureza	64
Figura 13 – Esquema da divisão dos grupos	65
Figura 14 - Matriz de silicone individualizada para cada grupo	66

Figura 15 – Preparo e posicionamento das amostras para o teste de perfilometria	67
Figura 16 – Esquema da região de leitura dos perfis nas amostras	68
Figura 17 - Esquema do ciclo erosivo realizado durante 5 dias	70
Figura 18 – Esquema ilustrativo da localização das mensurações de dureza ...	71
Figura 19 – Sobreposição dos perfis inicial e final e leitura de perda estrutural	72
Figura 20 – Gráfico boxplot da absorbância (%) para as bandas de amida I e II	77
Figura 21 – Exemplos de espectros inicial e final para todos os grupos e espectro da água	78
Figura 22 - Gráfico boxplot dos valores de dureza após o tratamento (KN3)	80
Figura 23 - Gráfico boxplot dos valores de dureza após o segundo ácido (KN4)	82
Figura 24 - Gráfico boxplot dos valores de perda de estrutura após 5 dias de ciclo erosivo	84
Figura 25 – Esquema de ranhuras confeccionada nas amostras	112
Figura 26- Posicionamento e esquema de leituras das amostras no perfilômetro	113
Figura 27 – Sobreposição dos perfis inicial e final	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão (em graus) do ângulo de contato para todos os grupos, e resultados do teste de Dunnett	77
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de dureza KN2 (desmineralização) para todos os grupos testados	80
Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de dureza KN3 (remineralização) para todos os grupos testados e resultado do teste de Dunnett	82
Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de dureza KN4 (proteção) para todos os grupos testados, e resultado dos testes de Dunnett e Bonferroni	84
Tabela 5 - Média e desvio padrão dos valores de perfilometria para todos os grupos testados, e resultado dos testes de Dunnett e Sidak	86
Tabela 6 – Média e desvio padrão do flúor adsorvido ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) no esmalte, e resultado do teste de Dunn	87

Zanatta RF. Influência de tensoativos sobre o efeito protetor da película e interação com NaF no desenvolvimento da erosão dental [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

A erosão dental é um processo multifatorial que envolve a desmineralização do esmalte/dentina pela ação química de ácidos extrínsecos ou intrínsecos. A película adquirida é um filme, livre de bactérias, que cobre os dentes e atua como barreira de difusão ou membrana permeável seletiva, prevenindo o contato direto de ácidos com a superfície dos dentes. Os dentifrícios, normalmente usados no controle do biofilme bucal, possuem agentes tensoativos, que podem influenciar na adsorção de proteínas salivares, e atuar diretamente na formação da película adquirida e na liberação de fluoretos para o meio bucal. Assim, verificou-se a ação destes agentes na formação e proteção da película adquirida, sua interação com fluoreto de sódio (NaF) no esmalte, e consequentemente sua interferência na proteção contra a erosão dental. Foram testados três tensoativos (Lauril Sulfato de Sódio - LSS, Tween 20 – T20 e Cocoamidopropil Betaína - CAPB), em duas concentrações (1,0% e 1,5%). A água foi utilizada como controle negativo. Amostras de esmalte bovino foram submetidas a um modelo de des/remineralização com ácido cítrico durante 5 dias, imersão em saliva humana para formação de película adquirida e em soluções com os tensoativos testados, associados ou não ao NaF (275 ppm). A solução de NaF foi utilizada como controle positivo. A análise da energia de superfície do esmalte foi determinada por goniometria e a formação de película adquirida quantificada por espectroscopia (FTIR). A erosão inicial foi determinada por microdureza no primeiro dia (mensurada após o primeiro ácido, após o tratamento e após o segundo ácido) e a perda de estrutura de esmalte foi definida por perfilometria ao final de cinco dias de ciclo. Ainda, foi quantificado o flúor solúvel em KOH adsorvido na superfície do esmalte com eletrodo específico. Os resultados de goniometria mostraram que apenas o LSS e o CAPB em ambas concentrações diminuíram o ângulo de contato entre a água e o esmalte. Quanto à quantificação da formação de película, não foi possível verificar diferença significativa entre os grupos testados. Com relação à erosão, os dados de dureza mostraram que os tensoativos, independente da concentração, não interferiram no reendurecimento do esmalte, porém o LSS a 1% e 1,5% interferiu no potencial de proteção do NaF, e o T20 a 1% e 1,5% e o CAPB a 1,5% protegeram o esmalte, porém não foram superiores ao efeito do NaF. Já a análise perfilometria mostrou que o T20 a 1% resultou em menores valores de perda que a 1,5%, e ainda que o CAPB 1% e 1,5% foi capaz de proteger comparado ao controle negativo, no entanto nenhum agente associado ao NaF protegeu mais do que o controle positivo. Os dados da concentração de flúor KOH-solúvel indicaram que os tensoativos reduziram a adsorção do CaF_2 ao esmalte. Conclui-se que os tensoativos testados reduziram o ângulo de contato da água com o esmalte (exceção do T20). O LSS reduziu o potencial protetor do NaF e da película na erosão inicial e nenhum agente testado interferiu na capacidade protetora do NaF contra a progressão do desgaste erosivo.

Palavras-chave: Erosão dental. Tensoativos. Película adquirida. Saliva. Desgaste do esmalte. Perfilometria. Flúor.

Zanatta RF. Influence of surfactant agents on acquired pellicle protector effect and sodium fluoride interaction during dental erosion development. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

Dental erosion can be defined as a multifactorial process that induces tooth dissolution by intrinsic or extrinsic acids. Acquired pellicle is a film, free from bacteria, that covers all tooth tissues, and acts as a selective membrane that prevents direct contact of the acids with enamel/dentin surface. Dentifrices, frequently used in the biofilm control, have some constituents, such as surfactant agents, which influence on the adsorption of salivary proteins, and may directly affect the formation of salivary pellicle and the fluoride release on oral environment. Thus, it was verified the influence of surfactants over the protective effect of the acquired pellicle, and on the interaction of fluoride with enamel. Three different surfactants were tested (Sodium Lauryl Sulphate - SLS, Tween 20 – T20 and Cocoamidopropyl Betaine - CAPB), in 2 different concentrations (1.0% and 1.5%). Water was used as negative control. Bovine enamel samples were selected and submitted to an *in vitro* des/remineralization model with citric acid during 5 days, immersion in human saliva for acquired pellicle formation and immersion in the surfactant solutions, associated or not with sodium fluoride (NaF – 275ppm). A NaF solution was used as positive control. The surface wettability was determined by contact angle between water and the enamel using a tensiometer, and the acquired enamel pellicle formation was assessed using a spectrophotometer (FTIR). Initial erosion was defined by microhardness at the first cycle day (measured after the first acid, after treatment and after the second acid), and the structure loss was determined by profilometry. The KOH-soluble fluoride was also quantified after the end of the cycle. The surface energy analysis showed that only SLS and CAPB in both concentrations decreased the contact angle between enamel and water. Regarding the proteins quantification, no differences were found between the groups. Concerning initial erosion, microhardness data showed that all surfactants, in both concentrations, did not interfere with enamel remineralization, but 1% and 1,5% SLS interfered on NaF protective effect. 1% and 1,5% T20 and 1,5%, CAPB despite presenting some protective effect against new acid challenge, did not promote the same protection as NaF. Profilometry results showed that the 1% T20 promoted lower surface loss than at 1.5%, while 1% and 1.5% CAPB protected enamel compared to negative control group. However, no agent associated with NaF showed higher protection than the positive control. KOH-soluble fluoride analysis showed that all surfactants reduced the CaF_2 adsorption over enamel surface. It can be concluded that the surfactants tested reduced the enamel contact angle (except for T20). The SLS decreased the protective potential of NaF associated with the pellicle in initial erosion and no agent tested interfered with the protective effect of NaF on enamel erosive wear.

Keywords: Tooth erosion. Surfactant. Acquired pellicle. Saliva. Enamel wear. Profilometry. Fluoride.

1 INTRODUÇÃO

A erosão dental é um processo multifatorial (Lussi, 2006) que envolve a desmineralização da superfície dos dentes pela ação química de ácidos extrínsecos ou intrínsecos, de origem não bacteriana, ou ação de agentes quelantes (Larsen, 1990; Ganss, 2006; Huysmans et al., 2011). Dentre as características clínicas do desgaste erosivo destaca-se a perda superficial de estrutura, aparência de derretimento da estrutura dental, aparecimento de sulcos e/ou orifícios na superfície oclusal/incisal e cavidades rasas próximas à junção amelocementária (Ganss, 2006). O desgaste erosivo acomete tanto dentes decíduos quanto permanentes, e pode aparecer em qualquer superfície dental, sendo mais comum na face oclusal e superfície vestibular de todos os dentes superiores e inferiores, e na superfície lingual dos dentes anteriores superiores (Jaeggi, Lussi, 2006). Algumas dessas faces dentais também estão associadas com a atrição e/ou abrasão, o que pode dificultar o diagnóstico diferencial da erosão com os demais desgastes dentais (Bartlett, 2005; Lussi, 2006).

Antes de entrar em contato com o esmalte dental, o ácido precisa se difundir através da película adquirida (Nekrashevych, Stosser, 2003; Featherstone, Lussi, 2006). Esta é um filme, livre de bactérias, que cobre os tecidos orais sólidos, composta por proteínas, tais com mucinas, glicoproteínas, e proteínas ricas em prolina, além de várias enzimas (Hannig C et al., 2005; Buzalaf et al., 2012). A película adquirida é detectável sobre as superfícies dentais em poucos minutos após sua remoção por profilaxia, escovação dental ou dissolução química (Hara et al., 2006b). Ela atua como uma barreira de difusão ou uma membrana permeável seletiva, que previne o contato direto de ácidos com a superfície dental (Lussi et al., 2011), além de dificultar a perda de íons cálcio do esmalte, possuindo assim efeito protetor na desmineralização da superfície do esmalte (Hannig M, Balz, 1999; Hannig C et al., 2005; Featherstone, Lussi, 2006; Buzalaf et al., 2012). Sua principal fonte é a saliva, que também influencia na redução da perda mineral em situações erosivas de curta duração (Hannig M, Balz, 1999; Hara et al., 2006b; Buzalaf et al., 2012). Como durante a exposição aos ácidos essa película é parcialmente removida (com exceção de sua camada basal mais densa) (Lussi et al., 2011), o seu efeito protetor é minimizado ou

perdido (Hannig M, Balz, 2001; Hannig M et al., 2003; Nekrashevych, Stosser, 2003; Hara et al., 2006a).

Testes laboratoriais sugerem que a formação de película possui efeito protetor eficaz dependendo da concentração do ácido, duração do ataque erosivo e do seu estágio de formação, a fim de limitar a taxa de difusão de íons cálcio e agentes ácidos (Nekrashevych, Stosser, 2003). Ainda, a película adquirida e a saliva têm a capacidade de remineralizar a superfície de esmalte exposta a substâncias erosivas, favorecendo a recuperação da sua resistência mecânica (Amaechi, Higham, 2001; Hara et al., 2006b).

Produtos de higiene oral, incluindo dentifrícios, são usualmente utilizados para a remoção de material orgânico da superfície do dente e controle do biofilme bucal (Moore, Addy, 2005; Veeregowda et al., 2011). No entanto, alguns de seus constituintes, como os detergentes, influenciam também na adsorção de proteínas salivares (van der Mei et al., 2002; Veeregowda et al., 2011), podendo estes atuar diretamente na formação da película adquirida.

Os detergentes que compõem os dentifrícios são classificados como agentes tensoativos, sendo eles, moléculas de dupla afinidade, o que pode ser caracterizado físico-quimicamente como uma dualidade polar-apolar; com parte polar hidrófila (possui grande afinidade por solventes, em especial a água) e a parte apolar, hidrófoba (Salager, 2002). Pode-se especular que tal característica dual permite que tais agentes exerçam influência sobre a formação da película adquirida por meio de interações com as proteínas polares, ou ainda com sua fase apolar composta por alguns lipídios. Ainda, por serem moléculas de dupla afinidade, ao se ligarem em superfícies sólidas, os tensoativos têm a capacidade de modificar sua característica interfacial, ou tensão superficial (Nihei et al., 2013), influenciando diretamente a energia livre nelas existente.

O tensoativo mais encontrado em dentifrícios é o Lauril Sulfato de Sódio (LSS), classificado como aniônico (Rantanen et al., 2002) e amplamente utilizado na remoção de moléculas orgânicas de superfícies (Taube et al., 2010). Investigações da ação de tensoativos na película adquirida e no desenvolvimento de lesões erosivas são escassas. De acordo com Moore and Addy (2005), o LSS é capaz de atuar na remoção da película adquirida e ainda contribuir com o aumento do desgaste dentinário em situações abrasivas. Em alguns produtos observa-se a troca do LSS

pelo Cocoamidopropil Betaína (CAPB), considerado menos irritante à mucosa (Rantanen et al., 2002), e também com menor potencial de remoção da matriz orgânica dentinária quando associado à abrasivas o comparado ao LSS (Moore, Addy, 2005).

Além do potencial de limpeza, os dentifrícios usualmente contêm flúor, na maioria das vezes sob a forma de fluoreto de sódio (NaF). É reconhecido que os dentifrícios fluoretados são efetivos agentes anticariogênicos (Zero, 2006; Walsh et al., 2010) e considerados o principal fator responsável pelo declínio da cárie em muitos países, tendo sido amplamente adotados como principal forma de prevenção da doença cárie (Zero, 2006). Ambas lesões, cárie e erosão, são causadas por ácidos, sendo diferenciadas principalmente por sua origem; assim, uma vez que os dentifrícios já estão amplamente difundidos pelo mundo, indaga-se se o uso do NaF para controle da erosão também seria efetivo. Em estudos *in vitro*, Ganss et al. (2008) e Jager et al. (2013) mostraram que o flúor é um agente protetor contra a erosão dental, e sua ação protetora é essencialmente atribuída à formação de precipitados similares ao fluoreto de cálcio (Magalhaes et al., 2009a) que se adsorvem na superfície dental, formando uma barreira de adição mineral a ser dissolvida durante o ataque ácido, antes de chegar ao esmalte adjacente (Ganss et al., 2001; Lussi, Jaeggi, 2006a). No entanto, especula-se que o LSS usado na composição dos dentifrícios poderia reduzir a disponibilidade e na ligação do flúor com a superfície dental (Barkvoll et al., 1988b; Zero, 2006). Diante disso, questiona-se se diferentes tipos e concentrações de tensoativos influenciam na formação e efeito protetor da película adquirida, ou ainda na interação do fluoreto de sódio com o esmalte, alterando consequentemente, sua característica protetora contra o desenvolvimento da erosão dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erosão dental

No final do século XX houve uma notável diminuição na perda dos elementos dentários, em virtude das políticas de prevenção e controle da cárie e da doença periodontal. Além disso, no início de século XXI, começou a ser observado o aumento da longevidade do ser humano e, conseqüentemente, dos seus dentes (Hara et al., 2006b), demandando do cirurgião dentista um maior conhecimento a respeito dos efeitos deletérios do desgaste dental, bem como o reconhecimento das similaridades e diferenças de suas categorias: abrasão, atrição, abfração e erosão (Addy, Shellis, 2006; Lussi, 2006).

Por definição, abrasão é o desgaste físico resultante de processos mecânicos envolvendo objetos e substâncias estranhas ao organismo, e tem como principais fatores etiológicos produtos de higiene oral (por exemplo, escovas de dente com cerdas muito rígidas, excesso de força durante a escovação e uso de dentífrícios muito abrasivos), hábitos de morder e segurar objetos com os dentes (canetas, cachimbo, etc) e exposição ocupacional a partículas abrasivas. Já a atrição é definida como desgaste físico resultante da ação do dente com seu antagonista, sem a intervenção de agentes externos, ocorrendo fisiologicamente durante a mastigação e patologicamente em casos de contato prematuro, má oclusão e bruxismo. A abfração é o desgaste físico provocado pelo acúmulo de tensões flexurais na região amelo-cementária, provocando o aparecimento de microfraturas no esmalte e na dentina. Diferente das lesões anteriores, a erosão dental é um processo químico, resultando no amolecimento do esmalte, e que pode evoluir para o desgaste dental, sendo provocada por ácidos intrínsecos ou extrínsecos ou ação de agentes quelantes nas superfícies dentais livres de placa (Ganss, 2006; Ganss et al., 2014). Os fatores extrínsecos relacionados com a erosão incluem o consumo de bebidas e alimentos ácidos, como frutas cítricas, refrigerantes, vitamina C efervescente, dentre outros (Lussi et al., 2004; Buzalaf et al., 2012; Li et al., 2012); já os intrínsecos incluem

vômitos recorrentes devido a desordens fisiológicas, como anorexia, bulimia e refluxo gástrico (Bartlett, 2006; Zero, Lussi, 2006).

A erosão dental tem sido relatada a longo tempo na literatura, porém somente nas últimas décadas é que este assunto tem ganhado espaço nas pesquisas e chamado atenção da comunidade odontológica (ten Cate, Imfeld, 1996; Lussi, 2006; Lussi, Carvalho, 2014). O lançamento em 1996 da edição especial da *European Journal of Oral Sciences* intitulada “*Etiology, mechanisms and implications of dental erosions*” trouxe uma seleção de textos mostrando a prevalência, etiologia, avaliação de riscos, prevenção e alternativas de tratamentos, bem como mostrando caminhos e recomendações para pesquisas futuras (ten Cate, Imfeld, 1996). De fato, nos últimos anos houve um aumento significativo no número de pesquisas a respeito da erosão dental, pulando de cinco estudos por ano na década de 70, para mais de 50 nos anos 2000 (Lussi, 2006), e mais de 100 em 2013 (Lussi, Carvalho, 2014). Reforçando o aumento do interesse da comunidade científica e reconhecimento da importância sobre o tema, em 2006 foi lançada uma edição da *Monographs in Oral Science* exclusiva sobre erosão dental intitulada “*Dental erosion: From diagnosis to therapy*”; e em 2011 o periódico *Caries Research* lançou uma edição suplementar, intitulada “*Methodology and Models in Erosion Research*” voltada para comunidade científica, tratando das metodologias e modelos existentes para o estudo da erosão. Em 2014 uma nova edição da *Monographs in Oral Science* foi lançada com o mesmo título (“*Dental erosion: From diagnosis to therapy*”), contendo atualizações a respeito dos estudos relacionados à erosão dental.

A fisiopatologia da lesão erosiva é bastante complexa e para entendê-la é preciso primeiro se atentar para alguns fatos envolvendo os tecidos minerais bucais. Embora esmalte e dentina sejam formados essencialmente por minerais (hidroxiapatita carbonatada), água, proteínas e lipídios, ambos se diferenciam pela quantidade e organização desses componentes (Featherstone, Lussi, 2006; Ganss et al., 2014). A hidroxiapatita pura tem estrutura formada por cálcio, fosfato e hidroxila: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Já a hidroxiapatita carbonatada que forma os tecidos minerais dentais é deficiente em cálcio, que muitas vezes é substituído por outros íons como sódio, magnésio e potássio. Além disso, as maiores alterações na sua estrutura ocorrem pela substituição do fosfato por carbonatos, causando importantes distúrbios estruturais e tornando-a mais solúvel a ácidos comparada à hidroxiapatita pura e a

fluorapatita (substituição do íon hidroxila por fluoretos) (Featherstone,Lussi, 2006). A erosão ocorre tanto pela ligação do íon hidrogênio (H^+), derivado de ácidos fortes e fracos, quanto pela ação de ânions (agentes quelantes) que podem se ligar ao fosfato e ao cálcio, respectivamente. O ácido cítrico, por exemplo, se dissocia em água tanto em íons de hidrogênio quanto em ânions ácidos (citrato), com a capacidade de se ligar com ao fosfato e ao cálcio da estrutura dental (Featherstone,Lussi, 2006; Shellis et al., 2014).

O início do processo erosivo se dá com uma brusca queda do pH, quando ocorre, por exemplo, a ingestão de alguma bebida ácida. Como a solução está subsaturada de íons que constituem o tecido mineral dental, a dissolução tem início e permanece até que a concentração desses íons aumente. Quando o pH se eleva pela ação tampão da saliva, a solução se torna supersaturada e permite o reendurecimento da estrutura. Se o íon fluoreto estiver presente, pode possibilitar a formação de fluorapatita, que é menos solúvel em meio ácido comparado a hidroxiapatita (Featherstone,Lussi, 2006).

No esmalte a lesão se desenvolve primariamente nas áreas de prismas de recobrimento, seguido da dissolução dos prismas centrais (Buzalaf et al., 2012; Ganss,Lussi, 2014). Quando a substância ácida atinge a superfície do esmalte, o íon de hidrogênio (H^+) do ácido (ou o agente quelante) se liga aos íons fosfato ou cálcio da hidroxiapatita, promovendo a dissolução dos cristais de esmalte, resultando em um processo de amolecimento (*softening*) (Addy,Shellis, 2006; Ganss et al., 2014). Esta camada amolecida possui espessura em torno de 0,2 a 5 μm (Lussi et al., 2011; Attin,Wegehaupt, 2014) e dá ao esmalte uma aparência de colmeia (Meurman, Frank, 1991; Featherstone,Lussi, 2006; Ganss,Lussi, 2014).

Os componentes não ionizados eventualmente se difundem para o interior da área de esmalte interprismático, dando continuidade à dissolução do tecido mineralizado (Lussi,Hellwig, 2001; Buzalaf et al., 2012) camada por camada. À medida que vai progredindo no esmalte, a dissolução na camada mais superficial atinge um ponto em que o esmalte se perde por completo (Eisenburger et al., 2000; Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2014). Ainda, essa região de superfície desmineralizada (*softening*) apresenta uma significativa redução da microdureza (Maupome et al., 1998; Lussi et al., 2011) fazendo com que a superfície amolecida esteja mais susceptível a impactos mecânicos (Attin et al., 1997; Addy,Shellis, 2006) e mais

vulnerável à abrasão (Lussi,Carvalho, 2014; Wiegand,Schlueter, 2014). Evidências mostram que o envolvimento de processos abrasivos aumenta a perda de estrutura em dentes susceptíveis à erosão, e mostram ainda que dentes erodidos são mais susceptíveis à abrasão e atrição do que os hígidos (Attin et al., 2000; Attin et al., 2001; Lussi,Hellwig, 2006; Lussi et al., 2012; Magalhães et al., 2014; Shellis,Addy, 2014). O avanço das lesões erosivas, que caracteriza o desgaste erosivo, pode levar à perda completa do esmalte e início de perda dentinária. A exposição erosiva de dentina ocorre primariamente em regiões e sítios com baixa espessura de esmalte, como na superfície vestibular próximo à margem gengival e nas cúspides méso-vestibulares de molares inferiores (Schlueter et al., 2012; Ganss et al., 2014).

Assim, o processo erosivo pode ser dividido em dois estágios. No inicial ocorre a formação de uma camada amolecida do tecido mineral do esmalte, devido a sua desmineralização parcial (Lussi et al., 2004; Ganss et al., 2014). Essa camada (*softening*) tem o potencial de ser parcialmente remineralizada, e a progressão das lesões erosivas pode ser retardada (Ganss et al., 2001; Buzalaf et al., 2012). No entanto, caso o desafio ácido persista, tem-se início ao segundo estágio, no qual a progressão das lesões erosivas avança, com aprofundamento do *softening*, levando a perda gradual de tecido mineral e tornando o reparo impossível (Hara et al., 2006b; Lussi et al., 2012). Deve haver um equilíbrio entre esse processo de desmineralização e remineralização da superfície do esmalte, uma vez que se o desafio ácido for maior que o processo de adaptação do tecido dental, ocorrerá o aparecimento do desgaste erosivo clinicamente (Lussi et al., 2004).

Dados sistemáticos de prevalência da erosão são escassos na literatura, no entanto indicam um aumento na população jovem (Jaeggi,Lussi, 2014; Lussi,Carvalho, 2014), atribuído a mudanças no estilo de vida e nos hábitos dietéticos (Nekrashevych,Stosser, 2003; Zero,Lussi, 2006), que provocaram um aumento na quantidade e frequência no consumo de alimentos ácidos (Zero,Lussi, 2006; Li et al., 2012; Lussi,Carvalho, 2014). Usualmente um produto é considerado ácido quando possui pH menor do que 7,0. Em estudos de desmineralização relacionados a lesões cariosas, o pH considerado crítico para dissolução do esmalte é 5,5 e da dentina 6,5 (Schmidt-Nielsen, 1946; Meurman,ten Cate, 1996). Diversos estudos (Lussi et al., 2004; Zero,Lussi, 2006; Kitchens,Owens, 2007; Ehlen et al., 2008; Torres CP et al., 2010; Caneppele et al., 2012; Barbour,Lussi, 2014) discutem o potencial erosivo de

bebidas e alimentos ácidos (determinado por meio da mensuração do pH e/ou quantificação de íons cálcio, fosfato e fluoretos), e mostram uma intensa relação entre o seu consumo e o aparecimento de lesões erosivas. Corroborando, Margaritis et al. (2011) mostraram que o aumento do consumo de bebidas carbonadas e refrigerantes resultaram no aumento da prevalência da erosão dental.

Embora o pH seja o fator dominante no processo erosivo (Barbour et al., 2011), o potencial erosivo de bebidas e alimentos ácidos não depende exclusivamente dele, mas também das suas propriedades de quelação com o cálcio, da concentração de íons cálcio e fosfato presentes na sua composição e da capacidade tampão do ácido (teor de ácido titulável) (Barbour, Lussi, 2014). Quanto maior a capacidade tampão do ácido presente nas bebidas e alimentos, maior será o tempo que a saliva levará para neutralizá-lo (Lussi et al., 2004; Lussi, Jaeggi, 2006a). Sucos de frutas, refrigerantes, vinagres e alguns chás são conhecidamente erosivos por conterem ácidos (cítrico, fosfórico e acético) com pH menor que 4,5 em sua composição. Geralmente tais soluções ácidas são pouco saturadas em relação à hidroxiapatita e apresentam alta capacidade tampão (Magalhães et al., 2009b). A frequência e duração do contato do ácido com as estruturas dentais também são importantes variáveis para o aparecimento de lesões erosivas; além das propriedades termodinâmicas dessas bebidas, que determinam sua capacidade de aderência à estrutura dental (Magalhães et al., 2009b). A presença de íons cálcio, fosfato e fluoreto na composição de algumas bebidas e alimentos também determina seu potencial erosivo, uma vez que aumentam a saturação do meio com relação a esses íons e evitam a perda dos mesmos na hidroxiapatita (Featherstone, Lussi, 2006; Lussi, Jaeggi, 2006a; Lussi, Carvalho, 2014). Ainda, a tentativa de suplementação em soluções e bebidas ácidas de alguns íons, tais como cálcio; de algumas proteínas, como a caseína; ou ainda sais, como o lactato de cálcio pentahidratado, e o polifosfato de sódio, tem mostrado bons resultados na redução de seu potencial erosivo (Gallagher, 2009; Scaramucci et al., 2011; Buzalaf et al., 2012; Barbour, Lussi, 2014).

Ainda que a queda do pH próximo à superfície dental provocada pela ingestão única de bebida ácida seja o suficiente para causar a formação do *softening*, é improvável que esta cause perda de estrutura mineralizada (Addy, Shellis, 2006). Embora seja um assunto controverso na literatura, estudos mostram que o esmalte amolecido pode ser remineralizado após exposição à saliva ou a soluções

remineralizantes, a base de fluoretos por exemplo (Amaechi,Higham, 2001; Ganss et al., 2001; Shellis et al., 2014). Evidências indicam que o contato desse esmalte amolecido com substâncias remineralizantes ou saliva por tempo adequado é capaz de promover o ganho mineral do tecido (Ganss et al., 2001; Lussi et al., 2004; Buzalaf et al., 2012), e consequentemente reestabelecer sua resistência mecânica (Amaechi,Higham, 2001; Shellis et al., 2014).

O fluxo salivar, a composição eletrolítica e proteica da saliva, e a sua capacidade tampão têm grande influência nos processos erosivos (Magalhaes et al., 2009b). De fato, a saliva tem sido considerada o fator biológico mais importante na prevenção da erosão (Morge et al., 1989; Hara et al., 2006b), atuando de diversas formas: primeiro, pela influência da película adquirida, que será discutida no próximo tópico desta revisão; segundo, pela ação de diluição dos ácidos; terceiro, pela ação de limpeza (*clearance*), gradualmente eliminando os ácidos por meio da deglutição; quarto, pela capacidade tampão promovendo a neutralização dos ácidos; quinto, pela supersaturação de íons minerais dos tecidos orais duros, fornecendo cálcio, fosfatos e fluoretos necessários para remineralização; e sexto, pela presença de inúmeras proteínas com importantes funções contra a erosão dental (Morge et al., 1989; Lussi et al., 2004; Addy,Shellis, 2006; Hara et al., 2006b; Jager et al., 2011; Buzalaf et al., 2012; Vukosavljevic et al., 2014).

Estudos clínicos indicam que indivíduos com diminuição na quantidade do fluxo salivar ou na sua capacidade tampão têm maiores chances de desenvolver erosão dental, evidenciando o importante papel da saliva (Magalhães et al., 2009b). A taxa de fluxo salivar não estimulada é considerada normal quando maior que 0,3 ml/min, com produção normal diária entre 0,5 e 1,5 litros (Morge et al., 1989). O maior fluxo salivar com maior conteúdo de bicarbonatos aumenta a capacidade de saliva de neutralizar e eliminar (*clearance*) os ácidos ingeridos. Ainda, regiões e sítios orais com menor irrigação salivar ou com irrigação essencialmente composta por saliva mucosa (mais densa e viscosa) têm maiores chances de apresentar erosão do que sítios protegidos por saliva serosa (Hara et al., 2006b). Condições de boca seca geralmente aparecem em pacientes com idade mais avançada ou que fazem uso de alguns tipos de medicamentos ou radioterapia na região da cabeça e pescoço. Pacientes que realizam esportes frequentemente também podem ter seu fluxo salivar reduzido se não se reidratarem adequadamente (Lussi,Jaeggi, 2006b). A diminuição do fluxo

salivar e capacidade de produzir saliva também alteram o *clearance*, diminuindo a taxa de remoção das substâncias da cavidade oral pela deglutição (Hara et al., 2006b; Buzalaf et al., 2012). Com relação à remineralização promovida pela saliva, estudos *in situ* avaliando a recuperação da microdureza da superfície do esmalte indicam uma taxa de recuperação em torno de 37% após 24 horas de exposição ao meio bucal (Hara et al., 2006b).

As lesões erosivas podem acometer todas as superfícies dentais, porém são mais comuns na superfície vestibular e oclusal de todos os dentes superiores e inferiores, e na superfície lingual dos dentes anteriores superiores (Jaeggi, Lussi, 2006). Em estágios iniciais, nota-se a perda de brilho nas superfícies livres, e posteriormente ocorre o achatamento ou formação de concavidades rasas nas áreas convexas localizadas coronalmente à junção amelo-cementária (Lussi et al., 2004; Ganss, Lussi, 2006; Magalhaes et al., 2009b). A preservação de uma faixa de esmalte ao longo da margem gengival ocorre principalmente devido ao líquido crevicular presente no sulco gengival, cujo pH entre 7,5 e 8,0 colabora com a neutralização dos ácidos próximo a esse local (Lussi et al., 2004; Magalhaes et al., 2009b). Nas superfícies oclusais observa-se o arredondamento das cúspides e na presença de restaurações, as bordas destas aparentam se elevar acima do nível das superfícies dos dentes adjacentes (Lussi et al., 2004; Ganss, 2006; Magalhaes et al., 2009b). O diagnóstico precoce das lesões erosivas ativas é de fundamental importância, pois estas progridem quando nenhum tratamento ou medida preventiva é implementada (Lussi, 2006). Esta progressão pode levar a grandes perdas de estrutura dental, incluindo significantes reduções verticais da coroa clínica, causando problemas oclusais, com perda de dimensão vertical e das guias canina e anterior, além de desordens na articulação temporomandibular e hipersensibilidade dentinária (Ganss, 2006; Ganss, Lussi, 2006; Schlueter et al., 2012). Embora esteja listada na Classificação Internacional de Doenças (CID), a erosão dental por si só não pode ser considerada uma patologia. Diferentemente da cárie e da doença periodontal, que nunca devem ocorrer, o desgaste erosivo contribui para a perda fisiológica de tecido dental que ocorre durante a vida. No entanto, como o avanço dessa lesão pode levar a perda de função dos órgãos orais, deve ser diagnosticada e tratada sempre que possível (Ganss, 2014).

O desgaste erosivo pode ser um sério problema tanto para o paciente quando para o dentista, especialmente quando descoberto ou diagnosticado em estágios mais avançados. A população geral deve ser esclarecida quanto aos impactos negativos do consumo regular de ácidos, em especial adolescentes e adultos jovens. O cirurgião dentista também precisa compreender melhor a ocorrência desse processo e saber diagnosticá-lo em estágios precoces, a fim de garantir a longevidade da dentição (Lussi, Hellwig, 2006; Schlueter et al., 2012).

2.2 Atuação da película adquirida na erosão

A película adquirida é um filme orgânico composto basicamente por proteínas salivares adsorvidas que cobre todos os substratos duros e membranas mucosas da cavidade oral (Lendenmann et al., 2000; Hara et al., 2006b; Buzalaf et al., 2012). Fisiologicamente, ela tem a função de lubrificação e redução do atrito entre os dentes e os tecidos adjacentes, promoção de uma matriz para remineralização do esmalte, e proteção contra ácidos de origem bacteriana ou não (Lendenmann et al., 2000; Siqueira et al., 2012b), sendo assim um importante fator relacionado com a etiologia e progressão da erosão dental (Buzalaf et al., 2012).

A capacidade protetora da película adquirida formada *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*, tem sido estabelecida em diversos estudos *in vitro* (Amaechi et al., 1999; Hannig M, Balz, 1999, 2001; Hannig M, 2002; Nekrashevych, Stosser, 2003; Hara et al., 2006a; Cheaib, Lussi, 2011; Buzalaf et al., 2012; Masson et al., 2013; Vukosavljevic et al., 2014). Tal capacidade foi descrita pela primeira vez por Hannig M e Balz (1999), em um estudo com formação da película *in vivo* submetida ao desafio erosivo de curta duração *in vitro* com ácido cítrico. Essa proteção ocorre porque ela funciona como uma membrana seletiva que reduz a difusão de ácidos e consequentemente diminui a taxa de dissolução da hidroxiapatita (Hara et al., 2006a), além de restringir a difusão e o transporte de íons entre os meios interno e externo do esmalte (Hannig M, 2002; Hannig M et al., 2003; Hara et al., 2006a; Buzalaf et al., 2012). No entanto, o efeito protetor da película só será mantido enquanto ela estiver presente sobre as estruturas dentais. A escovação com dentifrícios abrasivos pode ser um fator de remoção da

película, contudo, ela volta a se formar instantaneamente sobre o esmalte escovado (Hannig M, 2002).

A película é formada pela grande afinidade existente entre as proteínas, peptídeos, lipídios e outras macromoléculas presentes na saliva, adsorvidas com as superfícies orais e também pelas interações intermoleculares existentes entre essas proteínas (Imai,Tamaki, 1999; Lendenmann et al., 2000; Hannig M, 2002; Hara et al., 2006b). Os possíveis mecanismos de formação da película adquirida envolvem interações eletrostáticas, formação de agregados hidrofóbicos e forças de Van Der Walls (Imai,Tamaki, 1999). Evoluções nos estudos proteômicos já permitiram identificar mais de 100 proteínas com variadas funções na película adquirida (Siqueira et al., 2007).

A formação da película adquirida sobre o esmalte é um processo dinâmico que começa poucos segundos após sua remoção (Imai,Tamaki, 1999; Lendenmann et al., 2000), seja pela escovação, dissolução química ou profilaxia, (Hara et al., 2006b), e ocorre essencialmente em duas etapas. Na primeira fase ocorre adsorção inicial de proteínas conhecidas como proteínas precursoras da película, que possuem alta afinidade pela hidroxiapatita e se ligam a ela por meio de interações eletrostáticas com as regiões hidrófobas do dente, deixando as cadeias hidrófobas das proteínas expostas à superfície (Siqueira et al., 2012b; Zimmerman et al., 2013). Estudos indicam que nessa primeira etapa as proteínas que primeiramente se adsorvem à hidroxiapatita são as PRPs (proteínas ricas em prolina), estaterinas, histatinas, mucinas, amilase, cistatinas, lisozimas e lactoferrinas (Siqueira et al., 2012b; Chun et al., 2015). As histatinas possuem um comprovado efeito contra a desmineralização do esmalte *in vitro* (Siqueira et al., 2012b). Nessa primeira etapa a espessura da película atinge 10 a 20 nm de espessura e permanece estável por aproximadamente 30 minutos (Siqueira et al., 2012b).

A segunda etapa pode complementar a primeira, ou ocorrer independentemente, e consiste em agregados proteicos ou estruturas similares a micelas que podem adsorver na superfície dental ou interagir com a camada proteica previamente formada por meio de interações proteína-proteína (Skjorland et al., 1995; Hara et al., 2006b; Siqueira et al., 2012b; Zimmerman et al., 2013). Essa segunda fase contribui para o rápido aumento em espessura da película (Hannig M, 2002; Siqueira et al., 2012b), e caracteriza o seu estágio de maturação da película, atingindo seu pico

entre 30 e 60 minutos (Siqueira et al., 2012b). Acredita-se que a mucina seja uma das principais proteínas responsáveis por carrear outras proteínas salivares na formação da película neste estágio de maturação (Cheaib, Lussi, 2011; Chun et al., 2015) contribuindo com a formação de tais micelas. Portanto, no somatório dos dois estágios de formação, sugere-se que ocorra um equilíbrio na adsorção de proteínas em um intervalo de aproximadamente 2 horas (Imai, Tamaki, 1999; Lendenmann et al., 2000; Hara et al., 2006b).

No entanto, a influência da composição da película no seu efeito protetor ainda não é completamente entendida. Variações na presença e quantidade das proteínas que a formam podem influenciar na sua capacidade de neutralizar ácidos e remineralizar o esmalte (Hara et al., 2006b; Moazzez et al., 2014). A mucina, por exemplo, é excretada principalmente pelas glândulas submandibulares, enquanto que a parótida é responsável pela excreção de saliva com alta concentração de amilase e proteínas ricas em prolina (Hannig M, Balz, 2001). Estudos *in vitro* indicam que a mucina promove melhor proteção contra desafios erosivos ao esmalte (Nieuw Amerongen et al., 1987). Cheaib and Lussi (2011), por exemplo, demonstraram em estudo *in vitro* que a adição de mucina e caseína na saliva humana previamente colhida contribuiu para maior proteção da película adquirida (formada por 2 horas sobre o esmalte dental) contra desafios erosivos.

O estudo de Moazzez et al. (2014) comparou a película adquirida formada *in situ* em indivíduos saudáveis e indivíduos com hábitos alimentares envolvendo o consumo abundante de ácidos e apresentando lesões erosivas. Após formação da película por uma hora, os espécimes foram submetidos ao desafio erosivo com ácido cítrico (pH 3.2 e concentração 0,6%) por 10 minutos, e os autores observaram que a película dos indivíduos que possuíam lesões erosivas resultou em menor proteção contra ao desgaste comparado com o grupo controle. O estudo de Ogeda (2010) também demonstrou uma significativa diferença na formação de película entre pacientes com sinais clínicos de desgaste erosivo e pacientes saudáveis controle. Os autores encontraram menor quantidade de proteínas e cálcio na película de pacientes apresentando lesões erosivas. Eles verificaram que tais pacientes apresentaram menor quantidade de esterinas na película formada em amostras de esmalte e hidroxiapatita *in situ*.

A sequência de formação da película em duas etapas previamente descritas é sustentada por trabalhos com microscopia eletrônica de transmissão que indicam a formação de uma camada globular frouxamente estruturada acima de uma camada basal mais eletrodensa (Hannig M, Balz, 1999; Imai,Tamaki, 1999; Siqueira et al., 2012b), com espessura entre 200 e 500 nm após 2 horas de formação *in situ*. O estudo de Hannig M (1999), mostrou que a camada da película formada *in situ* durante 2 horas em sítios vestibulares de molares inferiores alcançou espessuras entre 200-500 nm, enquanto que na região lingual ela se apresentou com espessura entre 20 e 80 nm. Ainda, enquanto a película formada na região vestibular tem uma camada mais eletrodensa com aglomerados de estrutura globular, a da região lingual é caracterizada por uma estrutura mais granular. Em outro estudo, Hannig M e Balz (2001) mostraram, também por meio de microscopia eletrônica de transmissão, que a parte mais superficial da película formada *in vivo* por 24 horas é mais frouxamente arranjada e possui uma maior solubilidade ao ácido cítrico (tempo de exposição de 30, 60 e 300 segundos) quando comparada à camada basal, mais eletrodensa e mais ácido resistente. Ainda usando microscopia eletrônica de transmissão, Hara et al. (2006a) mostraram que a película adquirida formada *in situ* durante 2 horas foi capaz de reduzir a desmineralização causada por suco de laranja (pH 3,8) durante 10 minutos, porém após 20 minutos de exposição esse efeito protetor foi completamente perdido.

O número de estudos relacionados ao efeito protetor da película adquirida aumentou nos últimos anos, com resultados conflitantes publicados em relação ao tempo de formação e, conseqüentemente, seu grau de maturação. Não há ainda um consenso a respeito do tempo de formação da película usado nos estudos laboratoriais, variando desde algumas horas, até dias e semanas (Imai,Tamaki, 1999). Estudos *in vitro* prévios (Zahradnik et al., 1976; 1978; Nieuw Amerongen et al., 1987) mostraram que maiores tempos de formação resultavam em maior eficiência protetora. Estes experimentos indicavam um maior grau de maturação da película, contribuindo com o aumento da sua capacidade de proteção contra a desmineralização do esmalte. Já Hannig M e Balz (1999), por exemplo, não encontraram diferenças no efeito protetor da película formada *in vivo* por 7 dias e por 24 horas, mas observaram que a exposição do esmalte ao ácido cítrico a 1% por 5 minutos foi suficiente para remover a camada superficial globular da película. Amaechi

et al. (1999) avaliaram o efeito protetor da película adquirida formada *in situ* por 60 minutos, e observaram o efeito protetor com desafio erosivo provocado por suco de laranja, com pH de 3,8, por 5 minutos, seis vezes ao dia (totalizando 30 minutos diários de exposição). Nekrashevych e Stosser (2003) avaliaram o efeito protetor da película adquirida formada *in vitro* no esmalte dental durante 24 horas e submetido ao desafio erosivo com ácido cítrico a 0,1% e 10% durante 1, 5 e 10 minutos e observaram que a película protegeu por completo o esmalte submetido ao desafio erosivo com ácido cítrico a 0,1% por 1 minuto e parcialmente àquele submetido ao desafio com ácido cítrico a 0,1% por 5 minutos; sendo completamente perdido após 10 minutos de exposição. Os autores concluíram então que a concentração do ácido e o tempo de exposição influenciaram a capacidade protetora da película. A película formada *in situ* por 30, 60 e 120 minutos (Bartlett, 2006) ou 2, 6, 12 e 24 horas (Hannig M et al., 2003), respectivamente, não alterou sua habilidade de reduzir a desmineralização do esmalte. No entanto, a resistência da película pareceu ser dependente do seu tempo de formação, uma vez que a película formada com 2 horas se dissolveu mais rápido comparada àquela formada por 6, 12 e 24 horas (Hannig M et al., 2003). Wetton et al. (2006) avaliaram o efeito protetor da película em esmalte e dentina formada *in vitro* por 1, 2 e 4 h, utilizando no desafio erosivo ácido cítrico a 0,3%, com pH 3,2 por 10 minutos, e encontraram menor perda estrutural no esmalte com os tempos de formação de 2 e 4 horas.

A espessura da película adquirida sofre variação sobre os dentes ao longo dos arcos dentais, e pode ser responsável pelo padrão de distribuição das lesões erosivas nos dentes (Amaechi et al., 1999; Magalhaes et al., 2009b; Vukosavljevic et al., 2014). Há uma relação inversamente proporcional entre o aparecimento das lesões erosivas e a espessura da película, cuja região de maior espessura geralmente é a face lingual dos dentes anteriores inferiores (região constantemente banhada pela saliva excretada pelas glândulas submandibulares e sublinguais) e a de menor espessura geralmente é a superfície lingual anterior superior (Amaechi et al., 1999; Vukosavljevic et al., 2014). A região lingual anterior e posterior do arco inferior com a maior espessura de película formada *in situ* se mostrou menos susceptível ao aparecimento da erosão, após a exposição *in vitro* em suco de laranja por 2 horas, do que a região lingual anterior superior, cuja película formada *in situ* era mais fina (Lussi et al., 2004).

A presença ou quantificação das proteínas salivares é comumente realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (Lendenmann et al., 2000; Hannig M, Balz, 2001) ou varredura (Lendenmann et al., 2000), ensaios proteômicos com eletroforese (Siqueira et al., 2012a; Martins et al., 2013) ou cromatografia líquida de fase reversa associada a espectroscopia de massa (Hu et al., 2005; Delecrode et al., 2015a; 2015b). Existe ainda na literatura evidências suportando o uso da espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR) para identificação de proteínas salivares (Imai, Tamaki, 1999; Elangovan et al., 2007; Lubarsky et al., 2012; Caetano Junior et al., 2015; Mikkonen et al., 2016).

A espectroscopia infravermelha transformada de Fourier utiliza absorção de energia na região do infravermelho para identificar compostos, por meio da absorbância ou transmitância da energia das ligações químicas neles presentes. É uma técnica relativamente simples, de alta sensibilidade, não destrutiva, com rápida aquisição de dados e requer baixa quantidade de amostras (no caso de saliva, por exemplo, alguns microlitros são suficientes) (Caetano Junior et al., 2015).

A análise da saliva utilizando esta técnica mostra bandas de absorbância na região entre 1500-1750 cm^{-1} referentes a proteínas, e muitas vezes entre 1050-1200 cm^{-1} para carboidratos (Mikkonen et al., 2016). A análise da formação de película adquirida utilizando essa técnica visa quantificar a absorbância nos picos de amida I (1648 cm^{-1}) e amida II (1516 cm^{-1}) (Caetano Junior et al., 2015), presente em proteínas salivares. Trabalhos como o de Imai e Tamaki (1999), por exemplo, utilizaram essa técnica para a quantificação da formação de película adquirida em materiais de próteses totais e cristais de hidroxiapatita, avaliando os picos de amida I e II (Imai, Tamaki, 1999). Lubarsky et al. (2012), por sua vez, também avaliaram as regiões de absorbância das ligações de amida I e II para quantificar a remoção de proteínas da superfície do esmalte.

2.3 Influência do fluoreto de sódio no desenvolvimento da erosão

Os fluoretos são reconhecidamente capazes de induzir a remineralização e reduzir significativamente a desmineralização dos tecidos orais duros nos meios

levemente ácidos em que ocorrem nos desafios cariogênicos (Buzalaf et al., 2012). No entanto, no caso da erosão dental, a efetividade do flúor na sua prevenção e tratamento tem sido questionada (Huysmans et al., 2014).

A ação dos fluoretos na erosão dental tem sido primariamente atribuída a formação de precipitados similares ao fluoreto de cálcio (CaF_2) nas superfícies dentais (Petzold, 2001; Lussi et al., 2004; Magalhaes et al., 2009b). A formação de camadas desses precipitados de CaF_2 e seu efeito protetor dependem do pH, da concentração de flúor e do tipo de sal de fluoreto presente no agente fluoretado (Magalhaes et al., 2009b). Petzold (2001) avaliou a precipitação de fluoreto de sódio e fluoreto de amina a 0,1% em pH ácido (4,5) sobre o esmalte humano e observou a deposição de precipitados de fluoreto de cálcio, cobrindo o espécime com uma fina camada após 60 segundos de contato dele com a solução fluoretada.

Embora seja controverso se essas partículas se formam *in vivo*, acredita-se que tais precipitados formam uma barreira que funcionaria como uma adição mineral a ser dissolvida durante o ataque ácido, antes de chegar ao esmalte adjacente (Ganss et al., 2001; Lussi, Jaeggi, 2006a). Acredita-se também que os precipitados de fluoreto de cálcio se adsorvam à superfície do esmalte e da dentina e liberem íons flúor ao longo do tempo. No entanto, a solubilidade desses precipitados é instável e pequenas variações na sua composição química poderiam ser suficientes para afetar a disponibilidade de fluoretos em longo prazo (Petzold, 2001).

O real efeito protetor desses fluoretos na erosão dental ainda não está totalmente esclarecido (Larsen, Richards, 2002; Magalhães et al., 2007), uma vez que esses depósitos similares ao CaF_2 são supostamente dissolvidos em contato com a maioria dos ácidos presentes em bebidas (Larsen, Richards, 2002).

A maioria dos estudos que focam no efeito protetor do flúor contra a erosão dental tem empregado compostos fluoretados usados por muito tempo no combate à cárie, como fluoreto de sódio (NaF) e o fluoreto estanhoso (SnF_2) (Magalhaes et al., 2009b). Os veículos de entrega do flúor mais comumente utilizados são os dentifrícios e os enxaguatórios orais, com concentração usual de 1100 a 1500 ppm para os primeiros e de 225 ppm para os enxaguatórios (Rugg-Gunn, Banoczy, 2013). Soluções, géis e vernizes com maiores concentrações podem ser encontrados para uso e aplicação profissional (Huysmans et al., 2014). Estudos mostram que dentifrícios fluoretados tem um efeito benéfico contra a erosão dental (Moron et al.,

2013; Magalhães et al., 2014), no entanto a prevalência da erosão tem aumentado mesmo com o uso desses dentifrícios (Ganss et al., 2013; Lussi, Carvalho, 2014).

Em estudos testando dentifrícios, as formulações são usualmente produzidas na forma de suspensões com concentração de fluoreto entre 250 e 500 ppm, dependendo da concentração de flúor e do fator de diluição (Huysmans et al., 2014). Esse fator de diluição busca simular a diluição do dentifrício com a saliva que ocorre no momento da escovação, e usualmente é feita na proporção de 1:3 (uma porção de suspensão para 3 de água destilada) (Duke, Forward, 1982; Turssi et al., 2010).

Não há um consenso na literatura a respeito da concentração do fluoreto de sódio eficaz contra o desgaste erosivo do esmalte, e nem se maiores concentrações promovem maior proteção. Tratamentos com verniz fluoretado (2,26%) por 24 horas e enxaguatórios orais (1,2%) por 48 horas realizados previamente a ciclos erosivos mostraram proteção *in vitro* contra erosão (Sorvari et al., 1994). Moron et al. (2013) avaliaram o efeito protetor *in vitro* de diferentes concentrações de flúor em dentifrícios, com concentrações de 0, 550, 1100 e 5000 ppm e verificaram que a presença de fluoreto de sódio foi eficaz na redução do desgaste erosivo comparado ao grupo placebo (0 ppm). Corroborando, o estudo de Magalhães et al. (2007) também mostrou que a escovação *ex vivo* do esmalte imediatamente após ao desafio erosivo com um dentifrício com 1100 ppm de fluoreto de sódio apresentou um efeito benéfico comparado a um dentifrício não fluoretado. O estudo de Jones et al. (2014) demonstrou que o uso de dentifrícios com 5000 e 1100 ppm de fluoreto de sódio tem efeito protetor similar no desgaste do esmalte. Scaramucci et al. (2013) em estudo *in vitro* também concluíram que o fluoreto de sódio foi capaz de reduzir o desgaste erosivo/abrasivo do esmalte, mas o uso de fluoreto de sódio na concentração de 5000 ppm não promoveu maior proteção do que a concentração convencional de 1100 ppm. Estudos *in situ* utilizando altas concentrações de fluoreto de sódio na forma de gel (maior que 10000 ppm), também se mostraram eficazes na redução da progressão de lesões erosivas (Lagerweij et al., 2006; Róžańska, 2015)

Alguns produtos de higiene oral, como enxaguatórios, exibem um baixo pH na sua formulação para manter a estabilidade de alguns dos seus compostos, dentre eles o flúor, e também favorecer a incorporação de fluoreto de cálcio na estrutura dental (Hellwig, Lussi, 2006). Embora possuam um baixo pH, o estudo *in situ* de Lussi and Jaeggi (2001) compararam diversos produtos de higiene oral com bebidas e alimentos

ácidos e observaram que a maioria dos produtos testados não reduziu a microdureza do esmalte. Os autores sugeriram que após o uso dos produtos ácidos, o tecido mineral sofreu pequena dissolução, elevando o pH do meio e possibilitando a precipitação de hidroxiapatita fluoretada (Lussi,Jaeggi, 2001). No entanto, o estudo de Moron et al. (2013) previamente citado testou dentifrícios experimentais contendo fluoreto de sódio (0, 500 e 1100 ppm), com pH ácido (4,5) e neutro (7,0) e não verificou diferença no efeito protetor do fluoreto de sódio em ambas situações.

Existem ainda tentativas de se melhorar a efetividade do NaF, combinando-o com outros agentes, visando melhorar a eficácia protetora contra agentes erosivos. Borges et al. (2014) testaram o uso de uma solução de lactato de cálcio previamente à aplicação de soluções de NaF *in vitro* e verificaram um aumento na precipitação de flúor na superfície dental, porém concluíram que essa precipitação não foi suficiente para promover redução na perda de estrutura frente a desafios erosivos comparada com o NaF utilizado isoladamente. A adição de CPP-ACP (casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate) ao fluoreto de sódio na forma de dentifrício em baixas e altas concentrações (1450 e 5000 ppm) também não se mostrou eficaz *in vitro* na redução da erosão do esmalte, comparado ao fluoreto de sódio sozinho (Amaral et al., 2014). No estudo *in vitro* de Moezizadeh and Alimi (2014) o uso de dentifrícios com associação do CPP-ACP mostrou efeito protetor contra desafio erosivo comparado ao grupo controle, que não recebeu tratamento, no entanto, mostrou resultados inferiores comparado ao enxaguatório contendo 0,2% de NaF (Moezizadeh,Alimi, 2014). Já a adição de arginina e carbonato de cálcio (tecnologia Pro-Argin) a um dentifrício com 1450 ppm de fluoreto de sódio na forma de monofluorfosfato de sódio se mostrou eficaz na proteção contra desafios erosivos comparado ao monofluorfosfato de sódio (1450 ppm) sozinho (Sullivan et al., 2014). Joiner et al. (2014) testaram a associação de silicato de cálcio e fosfato com 1450 ppm de fluoreto de sódio em um sistema dual de aplicação de gel e dentifrício e observaram que produtos de higiene oral contendo silicato de cálcio, sais de fosfato e fluoreto de sódio tem ação positiva no reparo de esmalte desmineralizado por desafio erosivo.

Outros compostos fluoretados têm sido testados nos estudos de prevenção e tratamento da erosão dental, apresentando resultados favoráveis. Alguns exemplos são o fluoreto de amina (AmF), o tetrafluoreto de titânio (TiF₄) e o fluoreto de estanho (SnF₂) (Ganss et al., 2008; Magalhaes et al., 2009a; 2011). Formulações com esses

fluoretos, em especial o SnF_2 e o TiF_4 , têm apresentado melhores evidências de efetividade, pela capacidade de formar precipitados resistentes à dissolução ácida sobre o esmalte (Buzalaf et al., 2014). Estudos laboratoriais com o TiF_4 indicam que este é um agente promissor, especialmente na forma de verniz, no entanto sua eficácia depende de um baixo pH, requerendo cuidados especiais na sua aplicação e inviabilizando a auto aplicação pelo paciente (Comar et al., 2013). Estudos clínicos futuros precisam ser conduzidos para avaliar diferenças no desempenho das diferentes formas de aplicação e condutas clínicas a serem tomadas, além de confirmar os resultados laboratoriais prévios. A associação do SnF_2 com alguns detergentes (como o LSS) tem sido associado com alterações de cor dos tecidos duros e moles (Veeregowda et al., 2011), porém estudos adicionais específicos para isso devem ser realizados.

2.4 Produtos de higiene oral - agentes tensoativos

A interação entre a película adquirida e agentes antierosivos tem alto potencial de interesse na área da pesquisa. A associação desses agentes com produtos de higiene oral tais como os dentifrícios tem sido estudada com o objetivo de melhorar a proteção do esmalte e dentina contra a erosão.

Detergentes são incorporados na composição dos dentifrícios com intuito de aumentar seu poder de limpeza, e são classificados como tensoativos ou agentes surfactantes (tradução livre do inglês *surfactant: surface active agent*). Mesmo possuindo grande variação na composição química, os tensoativos apresentam em comum moléculas de dupla afinidade, com uma parte polar hidrófila e outra parte apolar hidrófoba (Salager, 2002).

Quando se ligam a superfícies sólidas, os tensoativos tem a capacidade de alterar sua tensão superficial (Nihei et al., 2013). A adesão da placa bacteriana, por exemplo, é afetada pela energia livre na superfície dos substratos, com relato na literatura de um aumento da adesão de bactérias em superfícies dentais com altas taxas de energia livre quando comparados àquelas com pouca energia livre (Nihei et al., 2013). Em geral, o aumento da energia de superfície provoca a diminuição do

ângulo de contato, permitindo que os líquidos se espalhem melhor por ela. A essa capacidade de espalhamento do líquido, dá-se o nome de molhabilidade. Uma das formas de se medir a capacidade de molhamento de superfícies é por meio da mensuração do ângulo de contato formado entre uma gota de água com a superfície a ser estudada. O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado. Um ângulo de contato mais próximo a 0° demonstra afinidade química entre a superfície e o líquido, com consequente espalhamento deste. No entanto, ângulo de contato superior a 90° demonstra baixíssima afinidade entre o líquido e a superfície sólida, sendo que o ângulo de 180° demonstra nenhuma interação entre líquido-superfície (Ogeda, 2010). Assim, em resumo, o ângulo de contato é uma medida indireta da energia livre de superfície de uma superfície sólida, indicando a capacidade de molhabilidade de um sólido, sendo uma inversamente proporcional à outra (Yilmaz et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que os tensoativos presentes em produtos de higiene oral, como dentifrícios, afetam as propriedades de adsorção de filmes salivares em cristais de hidroxiapatita (Veeregowda et al., 2011) e no esmalte dental (van der Mei et al., 2002). O estudo *in vitro* de van der Mei et al. (2012) demonstrou que existe uma relação entre a energia de superfície do esmalte dental e a formação de filmes salivares. Esses filmes salivares utilizados no estudo constituíam de saliva humana dialisada. Nesse estudo os autores mostraram a dinâmica de ligação que ocorre entre os constituintes salivares e o esmalte dental por meio de interações polares-apolares e concluíram que o meio bucal sofre constantes alterações com relação à energia de superfície (do esmalte) quando dentifrícios são utilizados, podendo, portanto, alterar a dinâmica de formação dos filmes salivares. O estudo de Busscher et al. (2003), utilizou eletroforese e mostrou que a exposição da película ao Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou ao fluoreto de sódio não altera a sua mobilidade, ou seja, ambos os agentes não alteram a energia de superfície a ponto de alterar a formação da película.

De acordo com seu grupo hidrófilo, os tensoativos são classificados em quatro tipos: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfotéricos (Nihei et al., 2013). Os aniônicos possuem um ou mais grupamentos funcionais que em solução aquosa se ionizam e fornecem íons orgânicos carregados negativamente (ânions). Um exemplo desse tipo

de agente é o Lauril Sulfato de Sódio (LSS). Os agentes catiônicos fornecem íons orgânicos carregados positivamente (cátions) ao ionizarem em solução aquosa (Salager, 2002), e quando adicionados em dentifrícios podem exibir características antibacterianas. Esse tipo de tensoativo possui baixa utilização em dentifrício, pelo alto custo, e um exemplo seria o Cloreto de Cetilpiridínio (Joiner, 2007). Os anfotéricos apresentam em sua estrutura tanto um radical aniônico, como um catiônico, de forma que o pH da solução aquosa é que determina sua característica: geralmente em baixo pH eles se comportam como catiônicos e em alto pH, como aniônicos (Salager, 2002). Um exemplo desse tipo de tensoativo é o Cocoamidopropil Betaína (CAPB), que se apresenta em forma de íon interno com um átomo de nitrogênio quaternário de carga positiva e um grupo acetato com carga negativa. O CAPB é o agente anfotérico mais comum e de maior uso no mundo, exibindo importantes propriedades superficiais, tais como diminuição da tensão superficial e aumento da molhabilidade de superfícies, além de ser baixo irritante celular, sendo muito utilizado como cotensoativo em diversas formulações de shampoos, detergentes, sabonetes e cremes dentais (Staszak et al., 2015). Os tensoativos não-iônicos são aqueles que não se ionizam em soluções aquosas, e, portanto, tem carga neutra; um exemplo é o Polisorbato 20, comercialmente conhecido como Tween 20 (T20). Este é composto por ésteres de ácidos graxos do sorbitol de polioxietileno, sendo que a natureza hidrófoba é dada por cadeias de hidrocarbonetos e a natureza hidrófila, pelas subunidades do óxido de etileno (Kerwin, 2008).

O LSS é o tensoativo aniônico mais comumente utilizado em dentifrícios e tem um conhecido efeito anti-biofilme, porém especula-se que pode interferir na associação do flúor com o esmalte dental (Zero, 2006). Ainda, indaga-se que o LSS pode causar um retardo na formação de película adquirida sobre o esmalte (Rykke et al., 1990). Veeregowda et al. (2011) avaliaram a interação do LSS com o NaF e o SnF_2 e observaram que os íons Na^+ não permitiram as ligações cruzadas na formação de película, formando um filme mais fino e menos capaz de proteger cristais de hidroxiapatita contra a desmineralização. Já o estanho (Sn^{2+}) permitiu a formação de tais ligações e promoveu a formação de um filme mais espesso com melhor capacidade protetora. O sulfato dodecil de sódio é um agente tensoativo aniônico como o LSS, e estudos indicam que mesmo em baixas concentrações (0,1, 0,25, 0,5 e 2%) ele possui capacidade de remover toda película adquirida formada *in situ* e *in*

vitro sobre o esmalte (Svendsen et al., 2008). No entanto o estudo de Jones et al. (2014) mostrou que os tensoativos aniônicos derivados do dodecil fosfato (dodecil fosfato de sódio e dodecil fosfato de potássio) foram capazes de evitar um aumento da dissolução do esmalte exposto ao ácido, mesmo promovendo maior remoção da película adquirida formada *in situ*. Segundo os autores, isso pode ter ocorrido devido a um possível efeito protetor dos tensoativos, que se adsorveram sobre o esmalte, funcionando como uma barreira protetora contra desmineralização enquanto a película adquirida estava sendo formada após exposição a ácidos.

Há na literatura muitos relatos sobre os efeitos negativos do LSS considerado irritante da mucosa oral (Moore et al., 2008). Embora haja relatos do CAPB causando queilite em alguns pacientes (Agar, Freeman, 2005), ele é considerado menos irritante da mucosa do que o LSS (Rantanen et al., 2002) e tem sido escolhido como agente tensoativo de alguns dentifrícios. Até o presente momento, pouco se sabe sobre o efeito de agentes tensoativos, em especial o LSS, o CAPB e o T20, na formação da película adquirida, e sua influência no desenvolvimento da erosão dental.

2.5 Metodologias usadas no estudo da erosão

Grenby (1996) considera fundamental para o entendimento da erosão dental o uso combinado de metodologias distintas, permitindo a adequada mensuração das alterações erosivas em diferentes estágios. Como já foi extensivamente discutido, a desmineralização causada pela erosão produz dois padrões distintos: formação de uma superfície amolecida (*softening*) seguido da perda de estrutura; portanto metodologias específicas devem ser utilizadas na investigação de cada uma dessas fases (Attin, 2006; Attin, Wegehaupt, 2014). Vários métodos têm sido utilizados no estudo do potencial de desmineralização do esmalte erodido. Técnicas diretas medem perda mineral por meio de análises químicas e microradiografias. Métodos indiretos determinam outras características físicas do esmalte, tais como microdureza ou perfilometria (Attin et al., 2000; Eisenburger et al., 2001; Young, Tenuta, 2011).

É conhecido que a perda de estrutura do esmalte *in vivo* ocorre em maior tempo do que em situações erosivas *in situ* e *in vitro*, que envolvem ciclos repetidos

de desmineralização/remineralização (Brevik et al., 2013). Os controles clínicos randomizados são considerados estudos padrão ouro (West et al., 2011), no entanto, a detecção da perda de estrutura do esmalte *in vivo* requer monitoramento sistemático e a sua quantificação ainda é um desafio, pois os métodos analíticos disponíveis atualmente envolvem, por exemplo, exposições prolongadas à radiação (raios-X ou microtomografias) ou mensurações destrutivas (análise de microdureza ou perfilometria) (West et al., 2011; Brevik et al., 2013). Além disso, a maioria dos dispositivos e equipamentos disponíveis para detecção de perda mineral requerem o preparo de amostras específicas, por isso a maioria dos estudos que avaliam as alterações erosivas e erosivo-abrasivas nos tecidos minerais orais é realizada *in vitro* ou *in situ* (Attin, 2006; West et al., 2011; Attin, Wegehaupt, 2014).

Modelos *in situ* e *in vitro* são criados na tentativa de superar os desafios impostos pelos estudos *in vivo* e ainda fornecer respostas significativas que reflitam o que ocorre na cavidade oral. As vantagens desses modelos de estudos são a possibilidade de implementação de controles padronizados, o isolamento de variáveis e uso de tecnologias de mensuração precisas para determinar pequenas perdas de estruturas. Embora os estudos *in situ* permitam replicar as variações biológicas que influenciam a erosão, os estudos *in vitro* apresentam como vantagens a possibilidade de serem executados em curtos períodos de tempo, requererem menor número de operadores e evitarem a necessidade de participantes, além de permitirem que o pesquisador analise diversas variáveis simultâneas que definem a trajetória de um futuro estudo clínico (West et al., 2011).

Muitos dos métodos descritos na literatura fazem uso de superfícies dentais polidas, removendo cerca de 100 µm do esmalte, incluindo sua superfície aprismática, permitindo assim criar áreas de referência e uma melhor precisão na mensuração dos defeitos induzidos pelo processo erosivo (Attin, 2006; West et al., 2011). No entanto, como a camada superficial mais mineralizada é removida, pode-se resultar em um efeito exacerbado das condições testadas. Para o monitoramento das alterações erosivas que ocorrem nas superfícies dentais em um determinado período de tempo, muitas vezes se faz necessário a fixação do espécime nos dispositivos de mensuração para que sua posição seja reproduzível, de forma que quanto menor for a perda mineral, mais importante é esse aspecto (Attin, 2006).

Os desafios ácidos promovidos nos estudos *in vitro* e *in situ* são geralmente realizados *ex vivo* e algumas variáveis devem ser levadas em consideração, tais como o tipo de agente erosivo (ácido derivado de bebidas, como o cítrico, ou derivado do ácido clorídrico em simulação de erosão intrínseca); a presença de um controle positivo; o pH do agente erosivo; a presença de agitação; a constância da composição dos agentes erosivos, garantindo que não ocorra sua supersaturação; a temperatura; e a duração do desafio erosivo (Shellis et al., 2011).

Na cavidade oral, o contato dos tecidos dentais com o substrato ácido é geralmente limitado a alguns segundos antes dele ser eliminado pelo *clearance* da saliva (Attin, Wegehaupt, 2014). Portanto, em condições naturais, as lesões erosivas primárias criam uma perda mineral muito pequena, possivelmente na escala nanométrica (Attin, 2006). Nos estudos laboratoriais *in vitro*, geralmente são realizados desafios erosivos na forma de ciclos a fim de mimetizar os procedimentos diários (West et al., 2011). No entanto, a exposição ácida nesses ciclos costuma ser exagerada para permitir a mensuração cumulativa do desgaste erosivo no final do estudo (Barbour et al., 2011; Wiegand, Attin, 2011; Hara et al., 2013). A duração da erosão em estudos *in vitro* varia entre 15 segundos a 40 minutos por ciclo, sendo a maioria dos tempos de imersão escolhido entre 1 a 5 minutos (Wiegand, Attin, 2011). Para estudos *in vitro*, acredita-se que a exposição ao ácido por 10 minutos simula a ingestão de 10 ml de uma bebida ácida, mantendo-a na boca por 15 segundos antes de degluti-la, e esperar outros 15 segundos para ingeri-la novamente, repetindo esse processo por 39 vezes. Este ciclo simularia a ingestão regular de 400 ml de uma bebida durante 20 minutos, e é considerado um comportamento de alto risco para o desenvolvimento de lesões erosivas (Morge et al., 1989; Hara et al., 2006b).

As alterações na superfície do esmalte que levam à formação do *softening* têm sido caracterizadas na maioria dos estudos como uma redução da microdureza (Attin, Wegehaupt, 2014). Este método consiste em produzir micro identações na superfície do esmalte (ou da dentina) com uma pequena ponta de diamante de dimensões geométricas previamente conhecidas, com carga e tempo pré-determinados (Attin, 2006; Schlueter et al., 2011; Shellis et al., 2011). As pontas de diamante mais utilizadas no estudo da erosão são a Knopp e a Vickers, sendo a primeira rombóide e a segunda com formato tetra-piramidal (Attin, 2006). Os valores de dureza do esmalte dependem da técnica utilizada e não podem ser considerados

constantes. Os valores obtidos com ponta Knoop, por exemplo, são inversamente proporcionais à carga utilizada (maiores cargas determinam menores valores de dureza) (Lussi et al., 2011). Dessa forma, a comparação entre diferentes estudos deve sempre levar em consideração a técnica de mensuração utilizada.

Para que sejam produzidas indentações com bordos bem definidos é recomendado que as superfícies dentais a serem analisadas estejam polidas antes das leituras iniciais e posicionadas perpendicularmente ao longo eixo do indentador (Schlueter et al., 2011). Para dureza Knoop, a carga recomendada no esmalte é de 50 g (0,49N) (Attin, 2006), permitindo que o diamante Knoop penetre em torno de 1,5 μm do esmalte hígido (Schlueter et al., 2011). Este método é interessante por permitir a avaliação da erosão em estágios iniciais, mesmo com pouco tempo de exposição das superfícies dentais ao ácido (Nekrashevych, Stosser, 2003; Attin, 2006; Shellis et al., 2011). Uma importante limitação do método de microdureza é a necessidade de bordos bem definidos na endentação. Substratos muito erodidos produzem indentações com bordos irregulares, tornando sua mensuração imprecisa (Schlueter et al., 2011).

O método da microdureza só é viável para mensuração da erosão inicial, de forma que na persistência ou recorrência do desafio ácido a estrutura dental se perde. A perfilometria é um método viável na quantificação da perda de superfície e na obtenção de sua rugosidade, podendo ser realizada tanto pelo escaneamento ótico com laser ou por contato por meio de uma ponta metálica ou de diamante com dimensões de 2-20 μm (Attin, 2006; Schlueter et al., 2011). Os aparelhos a laser têm a vantagem de digitalizar toda a superfície e gerar uma imagem tridimensional da superfície, além de possuírem melhor resolução que os aparelhos por contato. Embora a literatura defina que o perfilômetro de contato tenha resolução para detectar perda mínima de superfície de 1 μm (Attin, 2006), Attin and Wegehaupt (2014) citam que o limite de detecção deveria ser maior do que a rugosidade apresentada pelo espécime erodido (em torno de 0,4 μm na superfície do esmalte), e Hooper et al. (2003) conseguiram detectar perdas em torno de 0,5 μm . Em se tratando de medidas muito pequenas e precisas, o polimento das amostras também é preconizado nessa metodologia (Schlueter et al., 2011).

Como um método para avaliação da perda de estrutura, a perfilometria exige alguns cuidados no preparo da amostra, como por exemplo, a proteção de uma parte

da superfície durante o desafio erosivo a fim de criar uma região referência para o pesquisador (Schlueter et al., 2011). Para isto, geralmente se utiliza esmalte para unhas ou fita adesiva em sítios das amostras com o intuito de protegê-los do contato com o ácido. Após o desafio erosivo essa fita adesiva ou esmalte para unhas é removido da superfície da amostra e as leituras são realizadas. Utilizando essa metodologia observa-se no perfil uma espécie de degrau entre a área protegida e a erodida. Uma das limitações desse método é a necessidade de uma correta planificação das amostras (Schlueter et al., 2011), uma vez que o esmalte apresenta uma curvatura natural, e a não eliminação dessa curvatura pode levar a mensurações subestimadas de perda de estrutura.

No entanto, também é possível a comparação de um perfil inicial (*baseline*) com um perfil final utilizando programas computacionais que permitem a sobreposição deles (Attin, 2006). Nesse último caso, se faz necessário o embutimento da amostra com um material ácido-resistente (como resina acrílica ou epóxi) e a criação de sulcos de referências que facilitam a sobreposição dos perfis. Ainda, é preciso criar dispositivos que garantam o reposicionamento das amostras na mesma posição inicial (*baseline*), para que as leituras ocorram no mesmo lugar (Attin et al., 2009). Dessa forma, a perda é mensurada pela comparação da distância vertical entre o perfil inicial e o final (Schlueter et al., 2010). Uma das vantagens das mensurações usando o reposicionamento é a possibilidade de compensar pequenas inclinações das amostras, uma vez que a perda é obtida por meio da diferença do perfil inicial com o final.

A quantificação dos processos erosivos é extremamente importante nos estudos de erosão, uma vez que métodos qualitativos (como microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e confocal) são mais sensíveis a variações do operador (Attin, Wegehaupt, 2014). No entanto, alguns cuidados devem existir quando métodos quantitativos são utilizados, tais como a calibração do aparelho e o operador, e a padronização das amostras. Embora os limites de detecção e precisão dos aparelhos utilizados dependam do substrato analisado, os métodos para mensuração devem apresentar um coeficiente de variação menor que 10% dentro de um mesmo estudo (intra-estudo) e, com o passar do tempo, o aparelho de mensuração deve manter um coeficiente de variação menor que 20% (inter-estudo) para um mesmo substrato (Attin, 2006). Variações maiores que 20% inter-estudo podem indicar a necessidade

de calibração ou manutenção do aparelho, e maiores que 10% intra-estudo indicam a necessidade de substituição da amostra (Attin, Wegehaupt, 2014).

2.6 Uso de Dentes Bovinos em Pesquisa

Dentes humanos perdidos principalmente por doença periodontal, terceiros molares e pré-molares extraídos com finalidade ortodôntica são os mais usados em pesquisas. No entanto, fatores como a melhora nas condições de saúde bucal, maior fiscalização com relação ao uso de tecidos humanos para pesquisa, envolvendo a aprovação desses estudos em comitês de ética, além da demanda de mais tempo, aumentam a dificuldade em obtê-los para pesquisa (Castanho et al., 2011; Laurance-Young et al., 2011). Por essas razões, busca-se alternativas para estudos *in vitro*, e dentes bovinos tem sido a opção mais frequentemente usada (Castanho et al., 2011).

Dentes de mamíferos são mais adequados do que de outros animais quando em substituição aos de humanos, pois sua morfologia e composição são similares, apesar de óbvias diferenças anatômicas e de permeabilidade (Reis et al., 2004). Dentes de cães e macacos são usados em estudos *in vivo*, no entanto, as condições de adesão e composição dos dentes bovinos são de fácil padronização, tornando-os preferidos em estudos *in vitro* (Reis et al., 2004; Castanho et al., 2011; Anido-Anido et al., 2015). Somado a isso, esses dentes ainda são de fácil acesso, grande disponibilidade, ausência de cáries e tamanho favorável a procedimentos técnicos (Fonseca et al., 2004; Soares et al., 2010; Yassen et al., 2011).

Em revisão de literatura comparando o uso de dentes bovinos como substitutos humanos em pesquisas, Yassen et al. (2011), concluíram que os dados na literatura são inconsistentes e as diferenças morfológicas, de composição química e propriedades físicas devem ser consideradas durante a interpretação de resultados obtidos em qualquer experimento usando dentes bovinos para obtenção de resultados clínicos. Esses resultados são compatíveis com aqueles encontrados por Schilke et al. (2000), Barreto (2009), Soares et al. (2010) e Anido-Anido et al. (2012).

A erosão do substrato dental, independente da espécie, é um processo multifatorial, dependendo do pH, pKa, concentração e tipo do ácido e tempo de

exposição. A possibilidade da utilização de substratos dentais alternativos provê melhores indicações do comportamento do esmalte perante processos erosivos do que se tinha conhecimento (Laurance-Young et al., 2011). Os incisivos bovinos permitem que vários espécimes sejam obtidos de um mesmo dente, de forma que elas podem ser alocadas em diferentes grupos aumentando o poder de comparação entre eles (Wiegand, Attin, 2011). Ainda, Rios et al. (2006) encontraram uma relação direta para o esmalte humano e bovino com relação a perda de estrutura e redução de microdureza após desafio erosivo *in situ/ ex vivo*. Os autores discutem que embora o esmalte bovino seja mais poroso e tenha menor conteúdo mineral, o comportamento dele comparado ao humano foi similar, e que a saliva humana foi capaz de reduzir a perda mineral e o desgaste em ambos substratos.

Embora as evidências empíricas sugiram diferenças entre o esmalte humano e bovino, elas não devem excluir seu uso em pesquisas *in vitro*. No entanto, o pesquisador deve sempre levar em consideração as diferenças da dieta, do meio e da genética entre o substrato alternativo e o substrato humano no momento da interpretação dos resultados (Attin et al., 2007; Laurance-Young et al., 2011).

3 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo é avaliar a influência de diferentes tensoativos frente à formação e efeito protetor da película adquirida, além da interação com o fluoreto de sódio no desenvolvimento da erosão dental, bem como avaliar se tais agentes influenciam na energia de superfície do esmalte dental.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se os tensoativos em diferentes concentrações alteram a energia de superfície do esmalte dental;
- b) Avaliar se os tensoativos em diferentes concentrações influenciam a formação da película adquirida;
- c) Avaliar se os tensoativos em diferentes concentrações alteram o efeito remineralizador e protetor do NaF na erosão inicial do esmalte;
- d) Avaliar se os tensoativos em diferentes concentrações, alteram o efeito protetor do NaF no desgaste erosivo do esmalte;
- e) Avaliar se os tensoativos em diferentes concentrações alteram a adsorção do flúor na superfície do esmalte.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

4.1.1 Unidade Experimental

Foram utilizadas 273 amostras de esmalte bovino

4.1.2 Fatores em estudo

- a) Tensoativos – 4 níveis:
 - Lauril Sulfato de Sódio (LSS),
 - Tween 20 (T20) – Polisorbato 20,
 - Cocoamidopropil Betaína (CAPB)
 - Controle (água ultrapurificada)
- b) Concentrações dos agentes tensoativos – 2 níveis:
 - 1,0%
 - 1,5%
- c) Associação com Fluoreto de Sódio (275 ppm) – 2 níveis:
 - Presença de Fluoreto de Sódio
 - Ausência de Fluoreto de Sódio

4.1.3 Variáveis Resposta

Ângulo de contato da superfície do esmalte; absorbância de proteínas na superfície do esmalte; microdureza da superfície do esmalte; análise de perfilometria da superfície do esmalte; análise dos níveis de flúor adsorvido ao esmalte.

4.1.4 Metodologias

Ensaio de goniometria para mensuração do ângulo de contato; quantificação de proteínas por espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR); ensaio de microdureza Knoop; ensaio de perfilometria de contato; detecção do flúor adsorvido ao esmalte com eletrodo sensível a este íon.

4.2 Comitê de ética

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, por envolver o uso de dentes bovinos extraídos de animais abatidos em frigorífico. O parecer emitido pelo Comitê segue no Anexo A.

Também foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP por intermédio da Plataforma Brasil, por envolver o uso de saliva humana. O parecer emitido (Anexo B) foi aprovado e recebeu número 367.946. O modelo do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) preenchido pelos doadores voluntários de saliva se encontra no Anexo C.

4.3 Ensaios Laboratoriais

Em todos os testes in vitro conduzidos neste estudo foram utilizadas amostras obtidas a partir de dentes incisivos bovinos (Figura 1A) recém-extraídos de animais jovens, com idade média de três anos. Os dentes foram limpos com curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, USA) para remoção completa dos tecidos moles aderidos à superfície, e, após limpeza, foram armazenados em solução de timol a 0,2%, com pH 7,0, durante todo o período de preparo dos espécimes.

Os dentes bovinos foram cortados transversalmente ao seu longo eixo, abaixo da junção amelocementária, para remoção da parte radicular, com disco diamantado de dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) (Figura 1B). A polpa dental foi removida com auxílio de limas endodônticas (Maillefer, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e a câmara pulpar foi irrigada com água ultrapurificada para remoção de detritos.

Figura 1 – Preparo dos incisivos bovinos



Legendas: a) dentes incisivos bovinos; b) remoção da porção radicular do incisivo bovino com disco diamantado dupla face.

Fonte: Elaborado pelo autor.

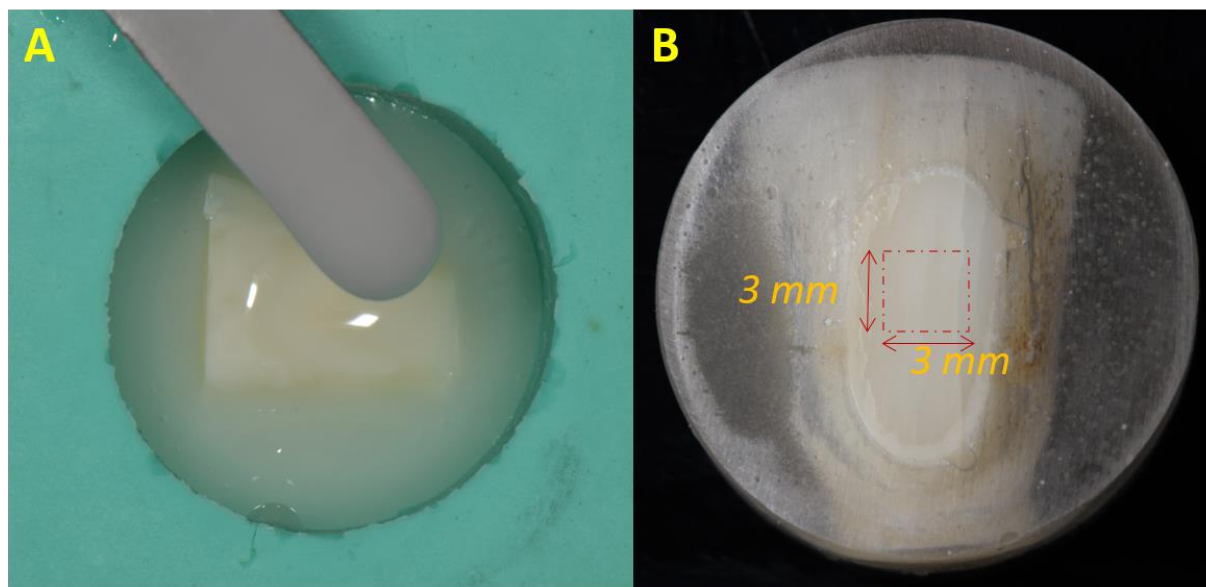
4.3.2 Mensuração do ângulo de contato - Goniometria

A alteração da energia de superfície provocada pelos tensoativos foi obtida por meio da mensuração do ângulo de contato entre a água e a superfície do esmalte utilizando um goniômetro de bancada (Theta Lite, Biolin Scientific, Estocolmo, Suécia).

4.3.2.1 Preparo das amostras para Goniometria

Após remoção da porção radicular e limpeza da câmara pulpar, 35 coroas bovinas foram selecionadas e embutidas em resina acrílica (Extec Fast Cure Acrylic, Extec Corp, Enfield, CT, USA) com auxílio de uma matriz de silicone (Figura 2A). Após a cura da resina, os espécimes foram planificados com lixas de carbeto de silício de granulação #P1200 até a exposição de uma área de 9 mm² de esmalte (Figura 2B); e polidos com lixas de carbeto de silício de granulação #P2400 – 60 s e #P4000 – 120 s. A cada troca de lixa, e após a última, foi realizado um banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com 200 ml de água ultrapurificada durante 10 minutos, para remoção dos grãos abrasivos e detritos na superfície polida do esmalte.

Figura 2 – Embutimento das amostras de goniometria



Legenda: a) matriz de silicone utilizada no embutimento das coroas. b) amostras de esmalte polidas com área de 9 mm² exposta.

Fonte: elaborado pelo autor.

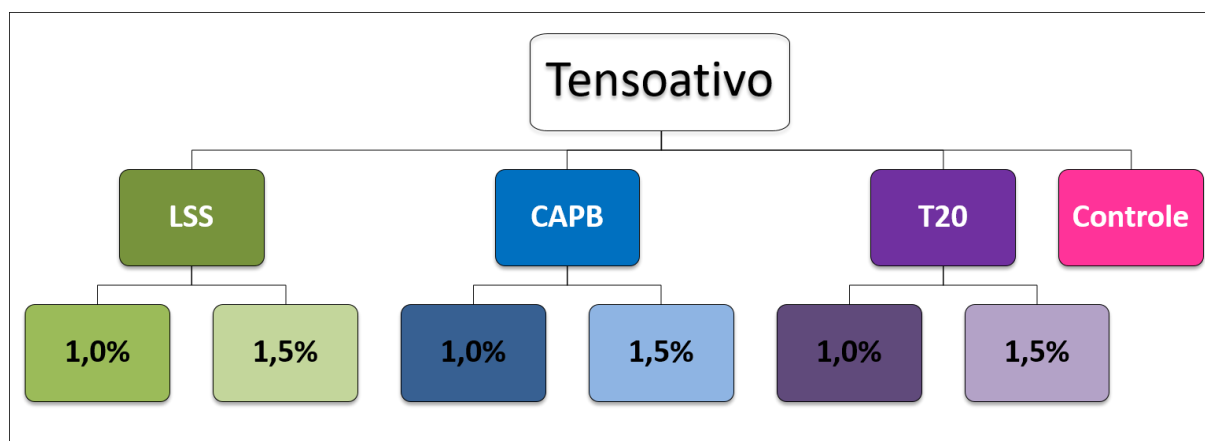
As amostras foram analisadas em estereomicroscópio (Carl Zeiss – Stemi 2000 - 10X), para descarte daquelas que apresentaram trincas e imperfeições (Torres

CR et al., 2012) e posteriormente armazenadas em solução de timol a 0,2% para reidratação (Borges et al., 2012).

4.3.2.2 Divisão dos grupos

Os 35 espécimes de esmalte bovinos foram distribuídos de forma aleatória em 7 grupos (n = 5), listados na Figura 3, de acordo com o tipo e a concentração do tensoativo utilizada. O grupo controle foi água ultrapurificada.

Figura 3 – Divisão dos grupos para goniometria



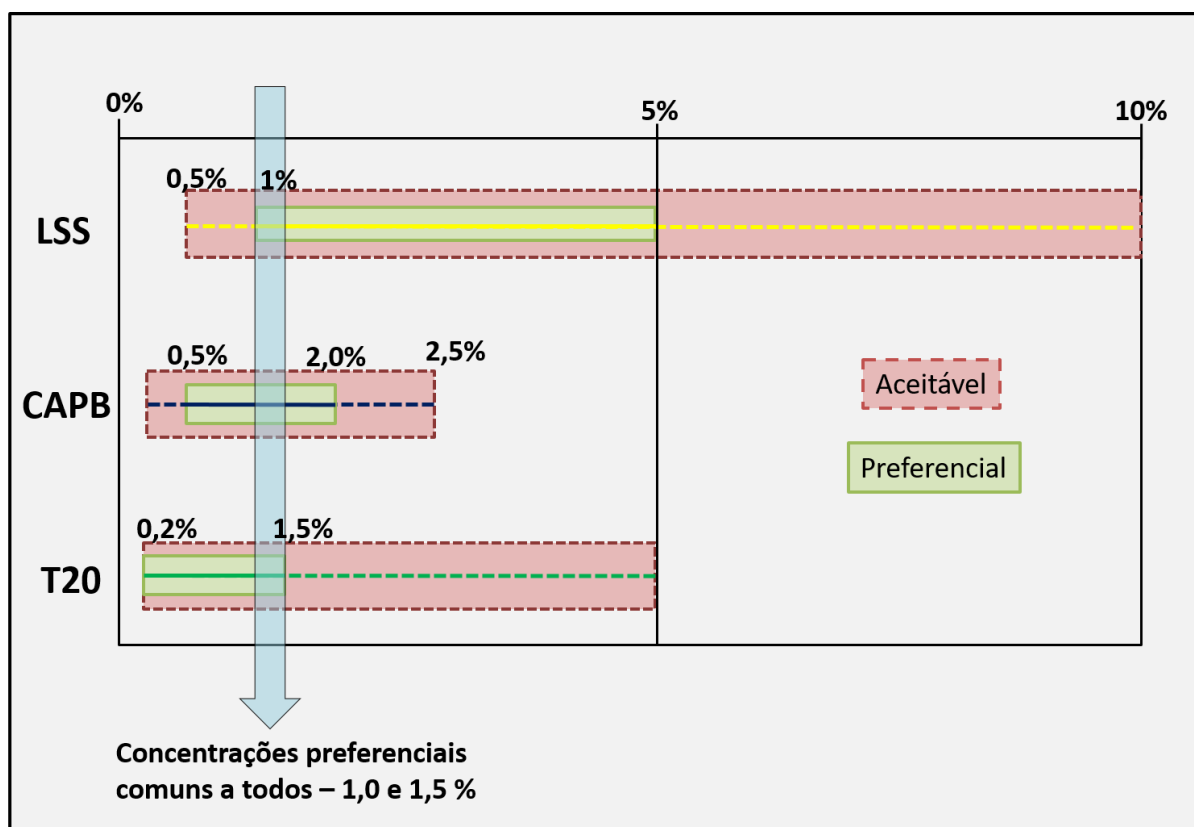
Legenda: LSS refere-se a Lauril Sulfato de Sódio, CAPB refere-se a Cocoamidopropil Betaína e T20 refere-se ao Polisorbato 20 (Tween 20).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A concentração dos agentes tensoativos usados no estudo foi determinada com base em dados da literatura, buscando-se concentrações comuns para todos os agentes a serem testados. Para o LSS, a concentração presente em dentifrícios deve ser entre 0,5% e 10%, sendo preferencialmente entre 1% e 5% (Masters et al., 2012). Já para o CAPB, a concentração deve ser entre 0,2% e 2,5%, mas preferencialmente entre 0,5% e 2,0% (Strand, 2011). Por último, para o T20, a concentração deve ser entre 0,2% e 5%, e preferencial entre 0,2% e 1,5% (Fisher et al., 2002).

Assim, a concentração mínima e máxima preferencial e comum para todos os tensoativos testados foi de 1.0% e 1.5%. A Figura 4 ilustra o esquema de definição das concentrações.

Figura 4 – Esquema ilustrativo da definição das concentrações de agentes tensoativos que foram usados no estudo



Legenda: LSS - Lauril Sulfato de Sódio, CAPB - Cocoamidopropil Betaína e T20 - Polisorbato 20 (Tween 20).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As características químicas dos tensoativos utilizados estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1 - Características químicas dos tensoativos utilizados

	LSS	CAPB	T20
Tipo	Aniônico	Anfotérico	Não-iônico
Formula Química	$C_{12}H_{25}SO_4Na$	$C_{19}H_{38}N_2O_3$	$C_{58}H_{114}O_{26}$
Massa Molar	288,372 g/mol	342,52 g/mol	1227,54 g/mol
Densidade	1,05 g/cm ³	1,05 g/cm ³	1,10 g/cm ³
pH solução (1% e 1,5%)	10,5	5,1	5,3
CMC	8,2 mM	0,28mM	0,08 mM
Concentração de uso em peso	1,0%: 36,42 mM 1,5%: 54,63 mM	1,0%: 30,65 mM 1,5%: 45,98 mM	1,0%: 8,96 mM 1,5%: 13,44 mM

Legenda: LSS – LSS refere-se a Lauril Sulfato de Sódio, CAPB refere-se ao Cocoamidopropil Betaína e T20 refere-se ao Polisorbato 20 (Tween 20). CMC refere-se à concentração micelar crítica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2.3 Preparo das soluções

As soluções de cada tensoativo foi obtida por diluição em água ultrapurificada, sob leve agitação em agitador magnético, até a concentração de uso respectiva de cada grupo.

4.3.2.4 Goniometria

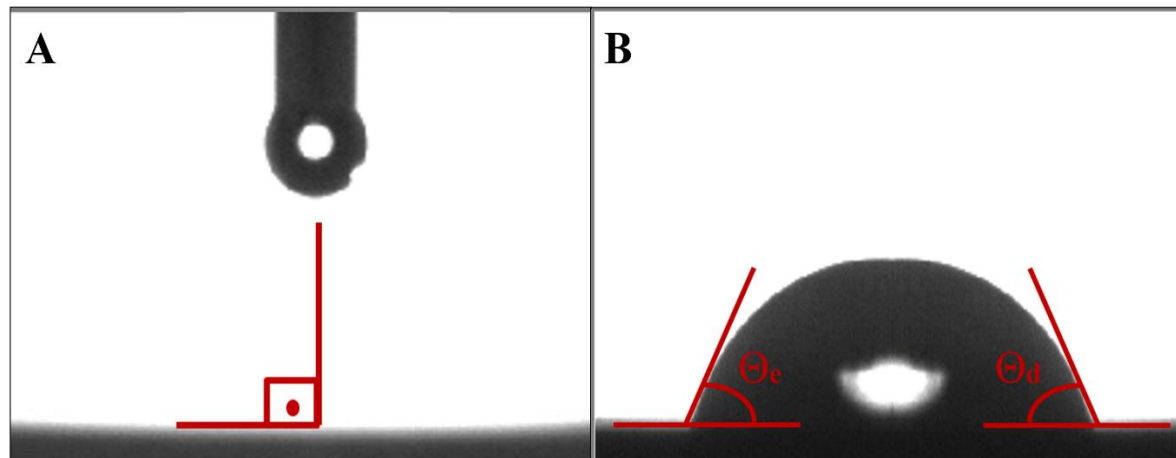
Antes da mensuração do ângulo de contato, as amostras foram imersas nas soluções respectivas de cada grupo por 2 minutos, considerado um tempo médio de escovação, em temperatura ambiente, e sob leve agitação em agitador de plataforma horizontal (TS2000A, Biomixer). Por serem agentes comuns em dentifrícios, foi considerado para fins desse estudo o tempo médio de escovação, ainda que abrasão não tenha sido realizada em nenhum momento.

Após a imersão nas soluções, as amostras foram posicionadas sobre papel absorvente para remoção do excesso de umidade. O ângulo de contato foi obtido pela

técnica da gota sêssil, a qual prevê a deposição de um líquido (no caso, água ultrapurificada) na superfície de um sólido (esmalte) com auxílio de uma microseringa.

Uma lente de baixo aumento foi utilizada na mensuração do ângulo de contato pelo goniômetro. As amostras secas foram colocadas na base do equipamento, corrigindo-se o paralelismo entre a agulha e a superfície do esmalte (Figura 5A). Então, uma gota de 0,5 μ l de água ultrapurificada foi aplicada sobre a superfície do esmalte, perpendicular à amostra (90°) e com velocidade constante. Foram realizadas leituras de 30 segundos, com pausa inicial de 10 segundos, e 20 imagens por segundo. A captação das imagens e processamento dos ângulos de contato foi realizada por um software específico (One Attension, Biolin Scientific, Estocolomo, Suécia). A mensuração dos ângulos direito e esquerdo foi obtida em triplicata (Figura 5B) e a média entre eles considerado para cálculo das médias finais.

Figura 5 – Posicionamento das amostras e da seringa no ensaio de goniometria e definição dos ângulos de contato



Legenda: a) perpendicularismo entre a superfície do esmalte e ponta da agulha e aplicação da gota de água; b) esquema da mensuração do ângulo esquerdo (Θ_e) e do ângulo direito (Θ_d) evidenciando um ângulo menor que 90°.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2.5 Análise estatística

A estatística descritiva dos dados de goniometria consistiu no cálculo da média e desvio-padrão para todos os grupos. A estatística inferencial consistiu nos

testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov e Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Levene), e no teste de ANOVA um fator (tensoativo). A diferença entre os tensoativos e o grupo controle foi obtida pelo teste de Dunnett e a avaliação do efeito da concentração entre os tensoativos foi realizada por meio do Teste T-Student. O nível de significância adotado foi o de 5%.

4.3.3 Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier - FTIR

A influência dos tensoativos na formação da película adquirida foi avaliada por meio de espectroscopia transformada infravermelha de Fourier (FTIR). Esta análise foi realizada vinculada ao Processo Fapesp 2014/06442-8.

4.3.3.1 Preparo das amostras para espectroscopia (FTIR)

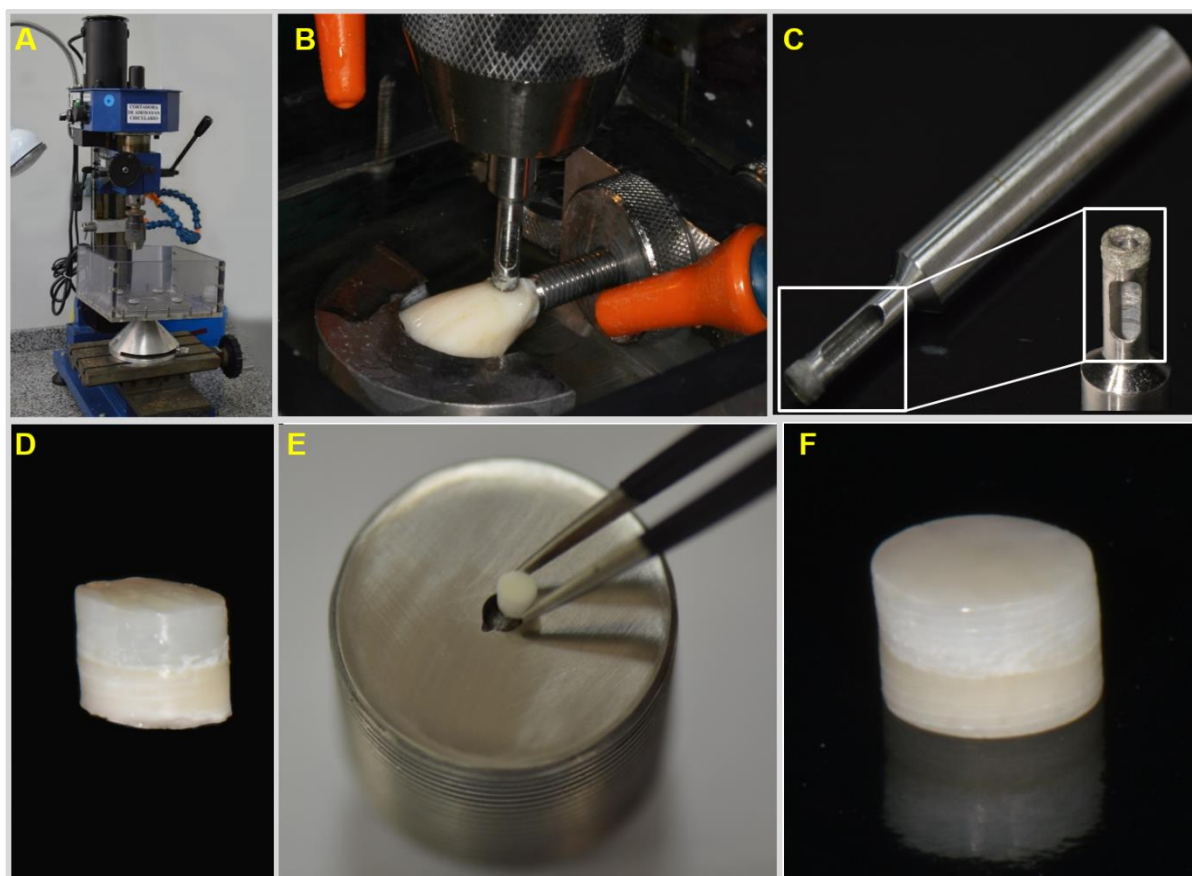
As coroas obtidas a partir dos dentes bovinos foram fixadas na base do equipamento de corte circular (Figura 6A) com a face vestibular voltada para cima (Figura 6B). Cortes foram realizados com uma broca trefina (Figura 6C) de diâmetro interno de 3 mm (Borges et al., 2012) a fim de gerar setenta amostras circulares (Figura 6D).

A espessura dos espécimes foi padronizada com auxílio de um dispositivo metálico circular, que possuía um diâmetro ligeiramente maior que 3,0 mm e altura definida em 3,1 mm com auxílio de paquímetro digital (Starret, Itu, SP, Brasil). As amostras foram posicionadas no interior do dispositivo com o lado de esmalte voltado para dentro (Figura 6E), e a dentina remanescente foi desgastada em politriz circular com lixas de carbetto de silício de granulação #1200 (FEPA-P; Struers, Ballerup, Dinamarca) (Torres CR et al., 2012).

Após desgaste da dentina e consequente padronização da espessura dos espécimes, estes foram novamente posicionados no dispositivo metálico ajustado, por meio de um parafuso interno, em 3,0 mm, com a face de dentina voltada para dentro,

a fim de polir a superfície do esmalte. O conjunto dispositivo-espécime foi levado à politriz circular com lixas de carbeto de silício de granulação #P2400 por 60 segundos, e de granulação #P4000 por 120 segundos. A Figura 6F mostra um espécime polido, pronto para o teste. As amostras foram analisadas em estereomicroscópio (Carl Zeiss – Stemi 2000 -10X), para descarte daquelas que apresentaram trincas e imperfeições (Torres CR et al., 2012). Posteriormente as amostras foram armazenadas em solução de timol a 0,2% para reidratação (Borges et al., 2012).

Figura 6 – Corte das amostras circulares



Legenda: a) Máquina de corte circular; b) Posicionamento da coroa na máquina de corte circular com a face vestibular voltada para cima. Todos os cortes foram feitos sob constante irrigação; c) Broca trefina diamantada com 3,0 mm de diâmetro, com aproximação da ponta cortante no canto inferior direito; d) Amostra de esmalte e dentina obtida com 3,0 mm de diâmetro; e) posicionamento da amostra com a face de dentina voltada para fora no dispositivo para padronização da altura; f) amostra com a face de esmalte polida pronta para o teste.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3.2 Divisão dos grupos

As amostras foram divididas em 7 grupos ($n = 10$) de acordo com o tensoativo (LSS, CAPB, T20) e a concentração utilizada (1,0% e 1,5%), como listado na Figura 3. A água ultrapurificada foi utilizada como grupo controle.

4.3.3.3 Preparo das soluções

As soluções dos tensoativos foram preparadas da mesma forma descrita para o teste de goniometria, especificado no tópico 4.3.1.3.

4.3.3.4 Coleta de Saliva

Para formação de película adquirida sobre a superfície de esmalte das amostras, foi necessário a coleta de saliva humana. Foram selecionados 20 indivíduos de ambos os gêneros, saudáveis, livres de cárie e sem histórico de xerostomia. Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto à proposta da pesquisa, e assinaram termo de compromisso livre e esclarecido (ANEXO C).

Antes da coleta foi analisado o fluxo salivar dos voluntários, que deveriam possuir fluxo salivar estimulado maior ou igual a 0,8 ml/min e fluxo salivar não estimulado maior ou igual a 0,2 ml/min. Os voluntários que se encaixaram nesses parâmetros receberam instruções para se alimentarem normalmente pela manhã e realizarem escovação dental com dentifrício sem flúor (Cocórico, Bitufo, São Paulo, Brasil) previamente à coleta, que ocorreu duas horas após o café da manhã.

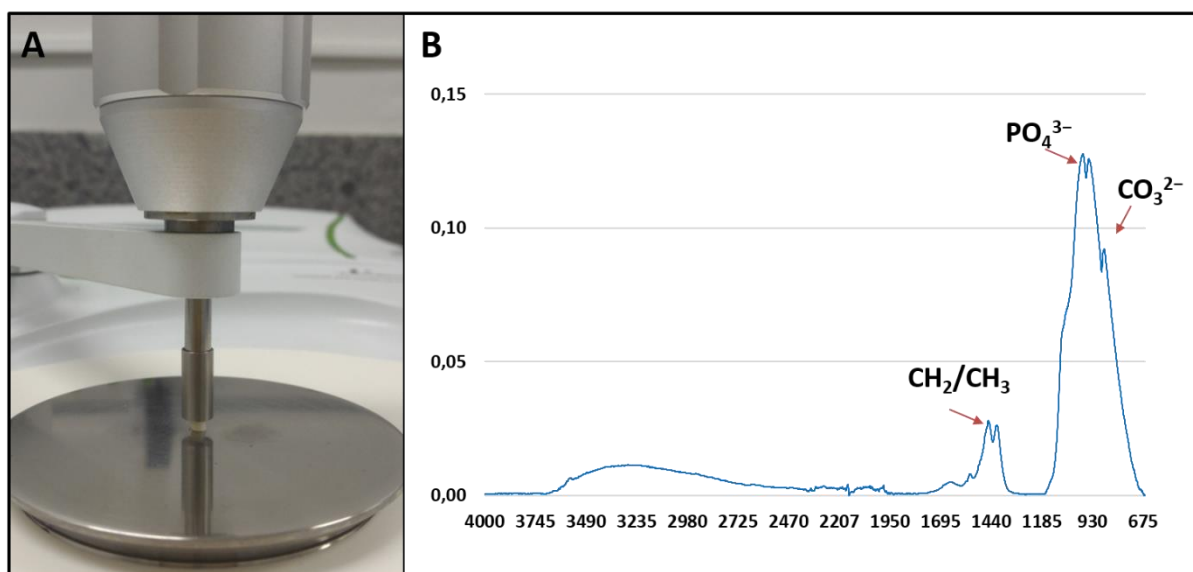
A estimulação do fluxo salivar se deu por mastigação de Parafilm® M (Bemis Company, Inc, Neenah, Wisconsin, EUA) e a saliva coletada foi armazenada em tubos Falcon resfriados. Antes do processo de centrifugação, a saliva coletada foi misturada para formação de um *pool*. O uso de *pool* salivar é considerado um “banco biológico”

que inviabiliza cruzar informações dos espécimes individuais com os doadores, evitando assim viés (Carvalho et al., 2016). Na sequência, o *pool* salivar foi centrifugado (10000 rpm/4°C por 5 minutos) (Masson et al., 2013); dividido em tubos Eppendorf e congelado (-80°C) (Cheaib, Lussi, 2011), até o momento de uso, por um período de até 6 meses (van der Mei et al., 2012). A saliva coletada foi utilizada para formação de película no teste de espectroscopia e na ciclagem erosiva descrita adiante (item 4.3.3).

4.3.3.5 Mensuração da absorbância inicial

A mensuração da absorbância inicial de todos os espécimes foi realizada em o espectrofotômetro Frontier FTIR (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), calibrado em 32 espectros por segundo, resolução de 4 cm^{-1} e obtidos entre 600 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . Os espécimes foram posicionados sobre o cristal do equipamento com a face de esmalte voltada para baixo (Figura 7A) e o espectro inicial obtido (Figura 7B).

Figura 7 – Posicionamento das amostras no espectrofotômetro e absorbância inicial



Legenda: a) Amostra posicionada com esmalte voltado para o cristal do espectrofotômetro pronta para leitura; b) Espectro inicial do esmalte evidenciando as bandas de fosfato (PO_4^{3-} : 980 cm^{-1}), carbonato (CO_3^{2-} : 870 cm^{-1}) e hidrocarbonetos (CH_2/CH_3 : 1440 cm^{-1}).

Fonte: Elaborado pelo autor.

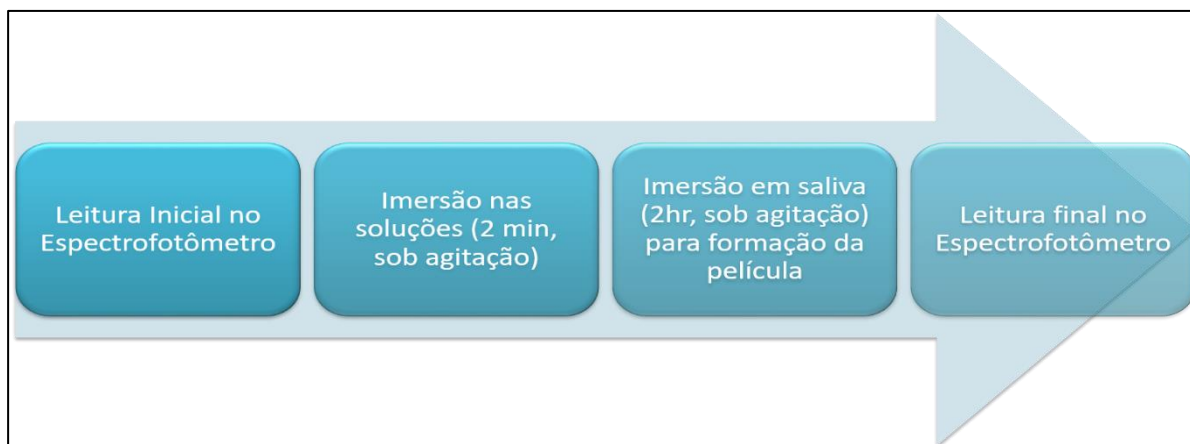
4.3.3.6 Tratamento dos espécimes e formação da película adquirida

Após a obtenção dos espectros iniciais de todos os espécimes, estes foram imersos em 2 ml da solução respectiva de cada grupo por 2 minutos considerado um tempo médio de escovação, em temperatura ambiente, e sob leve agitação em agitador horizontal (Agitador de Kline, TS2000A, Biomixer), com velocidade constante de 60 rpm. Após esse tempo, os espécimes foram removidos da solução e mergulhados em 2 ml de saliva humana, previamente descongelada a temperatura ambiente, para formação da película adquirida. Eles foram mantidos imersos durante 2 h, também em temperatura ambiente, e sob agitação com um agitador horizontal (Cheaib, Lussi, 2011) em velocidade constante de 60 rpm. Na sequência, as amostras foram removidas da saliva e lavadas com água ultrapurificada por 5 segundos para remoção das proteínas não adsorvidas (Masson et al., 2013). Em seguida foram posicionados sobre papel absorvente para secagem de forma passiva, evitando a remoção da película formada.

4.3.3.7 Mensuração da absorbância final

Imediatamente após a formação da película adquirida, os espécimes foram levados novamente ao espectrofotômetro para obtenção dos espectros finais. Foram utilizados os mesmos parâmetros de calibração do aparelho listados para a mensuração da absorbância inicial (Item 4.3.25). A Figura 8 mostra o esquema de formação de película e leituras da absorbância.

Figura 8 - Esquema de formação de película e leituras da absorbância

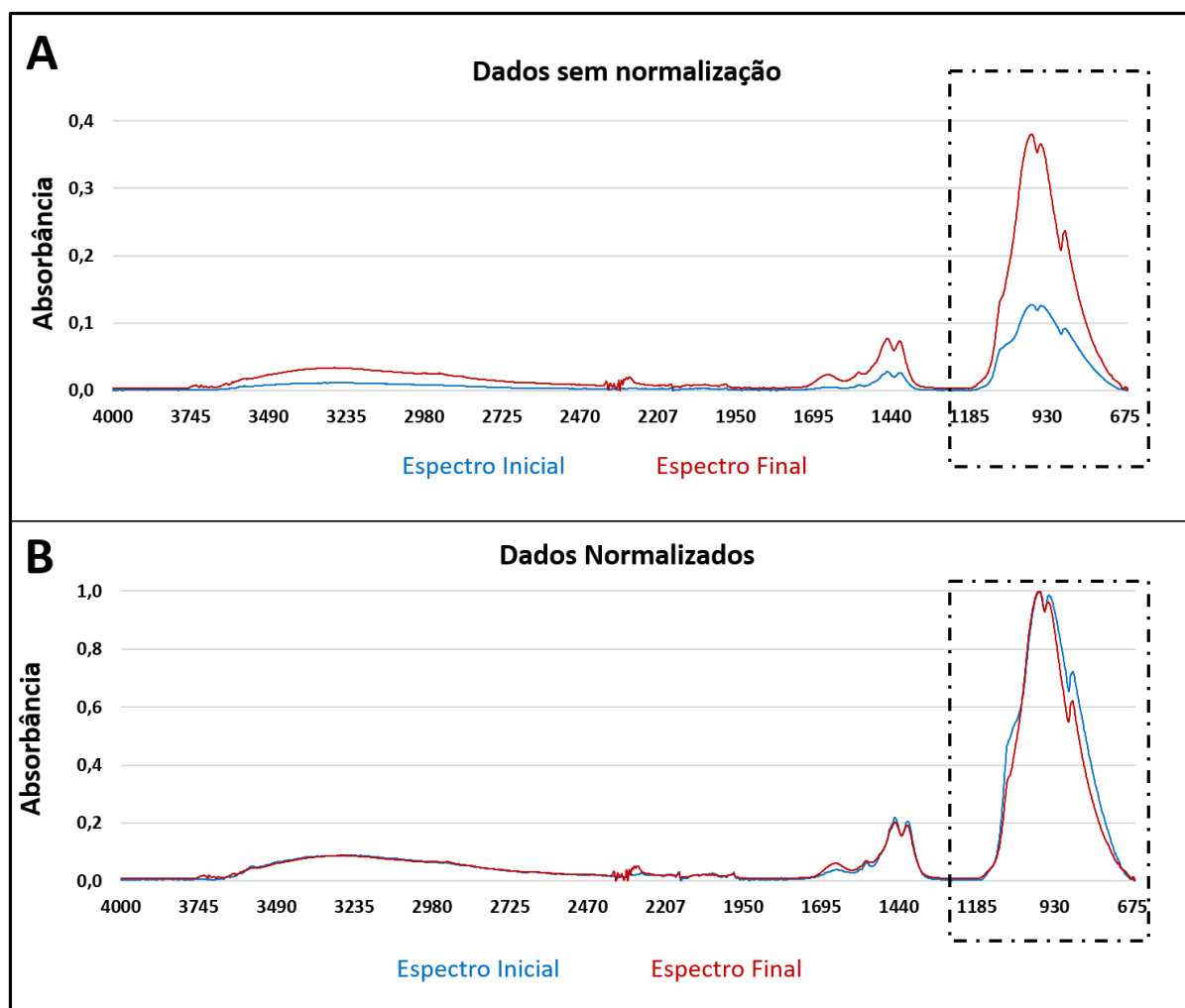


Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantidade de proteínas adsorvidas sobre a superfície do esmalte foi realizada pela comparação da absorbância inicial e final nas bandas da amida I (pico 1648 cm^{-1}) e amida II (pico 1516 cm^{-1}). A banda de amida I corresponde a estruturas beta-pregueadas, enquanto a banda de amida II corresponde a estruturas alfa-hélices comumente encontradas em proteínas do tipo α -amilase, albumina, mucina e proteínas ricas em prolina (Caetano Junior et al., 2015). O pico em torno de 980 cm^{-1} correspondente ao fosfato nos cristais de hidroxiapatita (Figura 7) foi utilizado como controle interno do espectro, uma vez que o esmalte não recebeu nenhum tratamento que oferecesse redução da quantidade de fosfato, e, portanto, não reduziria sua intensidade.

Os dados de absorbância foram submetidos a correção da linha de base (Spectrum 100, Perkin Elmer) e normalizados entre 0 e 1 para o alinhamento da escala de absorbância (Excel 2016, Microsoft Office, Microsoft, Redmond, EUA). A Figura 9A mostra os espectros iniciais e finais antes da normalização, e a Figura 9B mostra os mesmos espectros após a normalização, evidenciando a mudança na altura dos espectros ocorrida pela diferença de escala durante a coleta dos dados de absorbância.

Figura 9 – Espectros inicial e final antes e depois da normalização dos dados



Legenda: a) espectros antes da normalização evidenciando diferença significativa na altura do pico de fosfato; b) Espectros de A após a normalização dos dados entre 0 e 1, evidenciando a altura semelhante do pico de fosfato.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a normalização dos dados, o aumento da absorbância de ambas bandas de amida (I e II) foi calculada por meio da razão da absorbância final pela inicial e expresso em porcentagem por meio da fórmula:

$$\%A = [(Af/Ai) - 1] * 100$$

na qual %A se refere ao aumento em porcentagem da absorbância, Af é o valor de absorbância final na banda de amida (I ou II), e Ai é a absorbância inicial na mesma banda.

4.3.3.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística sendo a que estatística descritiva consistiu no cálculo da média e desvio-padrão para todos os grupos. A estatística inferencial consistiu nos testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov e Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Levene). Não satisfeita a condição de normalidade (dados não paramétricos), foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância adotado em ambos testes foi o de 5%.

4.3.4 Avaliação do potencial antierosivo das soluções testadas

O potencial efeito protetor e remineralizador das soluções de tensoativos associados ao fluoreto de sódio foi medido por meio de microdureza e perfilometria.

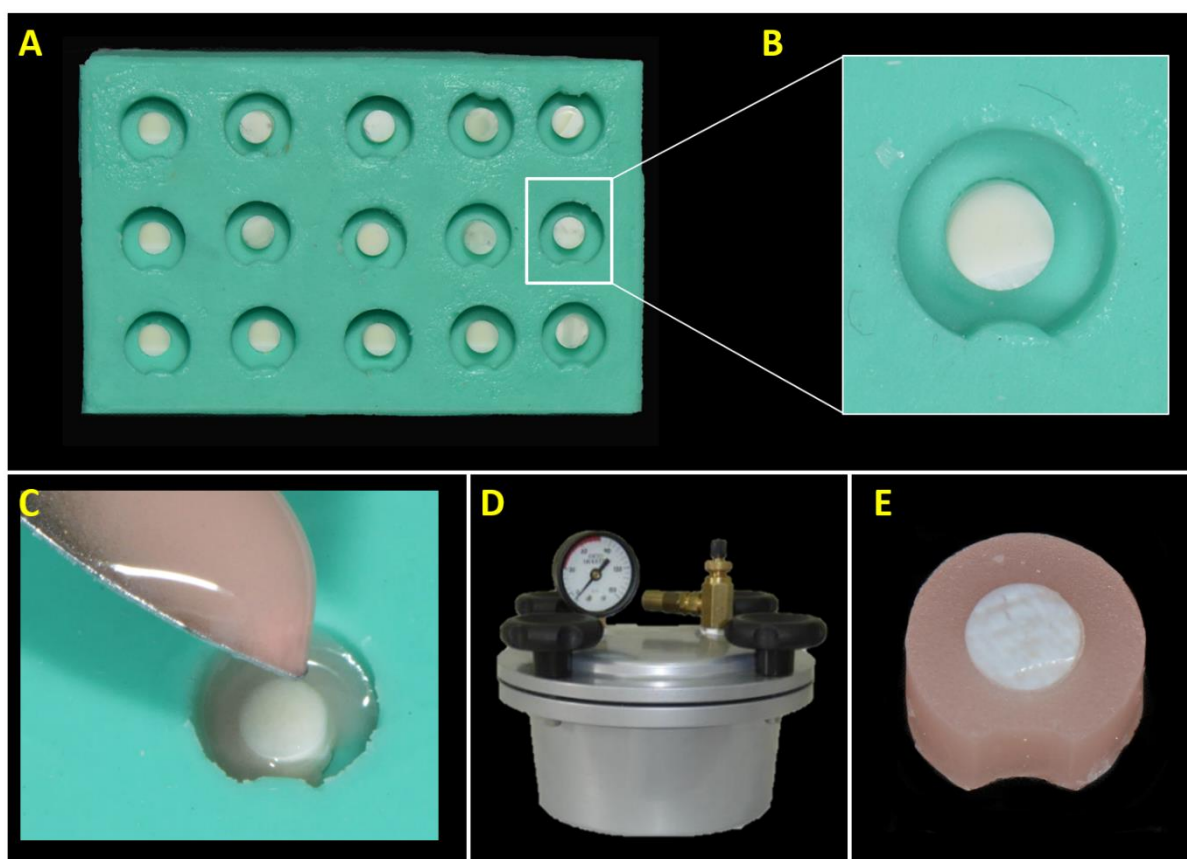
4.3.4.1 Preparo dos espécimes

Após a seleção dos incisivos bovinos, corte das raízes e limpeza da câmara pulpar como descrito previamente (Figura 1), 168 amostras circulares foram obtidas com broca trefina e tiveram sua espessura padronizada, como descrito no tópico 4.3.2.1 e ilustrado na Figura 6A a 6E. Após a padronização da espessura, as amostras foram embutidas em resina acrílica rosa (Jet, Clássico - Artigos Odontológicos, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) com auxílio de uma matriz de silicone (Figura 10A). Esta possuía um orifício de 6 mm de diâmetro e 3,1 mm de espessura, sendo que no seu interior havia uma cavidade em segundo nível, com 3 mm de diâmetro e 0,1 mm de espessura, permitindo o posicionamento central dos espécimes com a face de esmalte virada para baixo (Torres CR et al., 2012) (Figura 10B). Após o posicionamento do espécime na matriz, a resina acrílica era colocada com auxílio de uma espátula (Figura

10C) e então a matriz era levada a uma panela polimerizadora, com 30 psi de pressão, para evitar a formação de bolhas (Figura 10D).

Após a presa final da resina, o espécime embutido tinha uma projeção de esmalte de 0,1 mm de altura que foi posteriormente desgastado. Na face lateral da matriz havia uma projeção em formato de curva, com objetivo de produzir na amostra uma depressão para auxílio de seu correto posicionamento no perfilômetro. A Figura 10E mostra o exemplo de um espécime embutido.

Figura 10 – Embutimento das amostras



Legenda: a) matriz de silicone; b) Amostra em posição com a face de esmalte voltada para baixo para o embutimento com resina acrílica; c) resina acrílica rosa sendo colocada na matriz com auxílio de uma espátula; d) panela polimerizadora utilizada em 30 psi; e) amostra embutida, evidenciando 0,1 mm de espessura do esmalte.

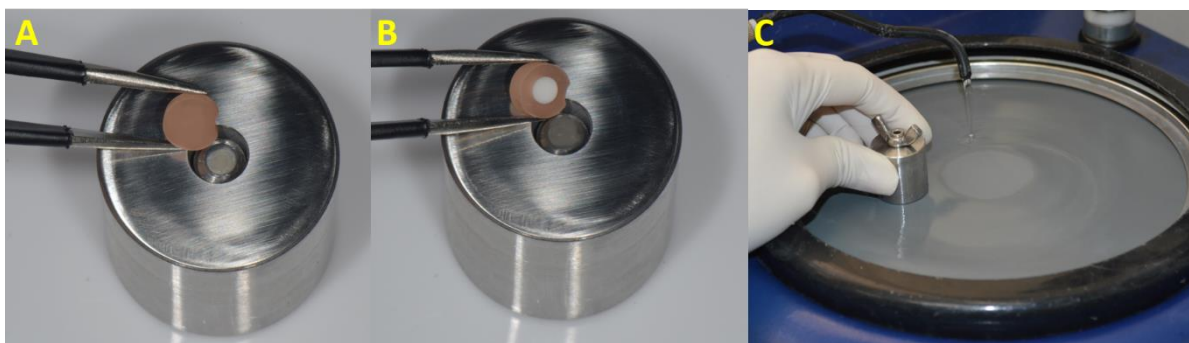
Fonte: Elaborado pelo autor.

A planificação da base de resina dos espécimes foi realizada com auxílio de outro dispositivo metálico ajustado em 3,1 mm de espessura por meio de um parafuso

interno (Figura 11A). A amostra foi posicionada com o lado de esmalte para dentro e a base do espécime foi lixada com lixa de carbeto de silício de granulação #1200.

Para desgaste da superfície de esmalte sobressalente (0,1 mm) o dispositivo foi ajustado em 3,0 mm e o espécime colocado com a face de esmalte voltada para fora (Figura 11B). O polimento da superfície de esmalte foi feito com lixas de carbeto de silício de granulação #P1200, #P2400 e #P4000 (Borges et al., 2012) (Figura 11C), sob refrigeração com água, durante 15 s, 60 s e 120 s, respectivamente.

Figura 11 – Polimento das amostras



Legenda: a) dispositivo metálico ajustado em 3,1 mm para polimento da base de resina; b) Dispositivo metálico ajustado em 3,0 mm para polimento da superfície do esmalte; c) Polimento das amostras em politriz circular.

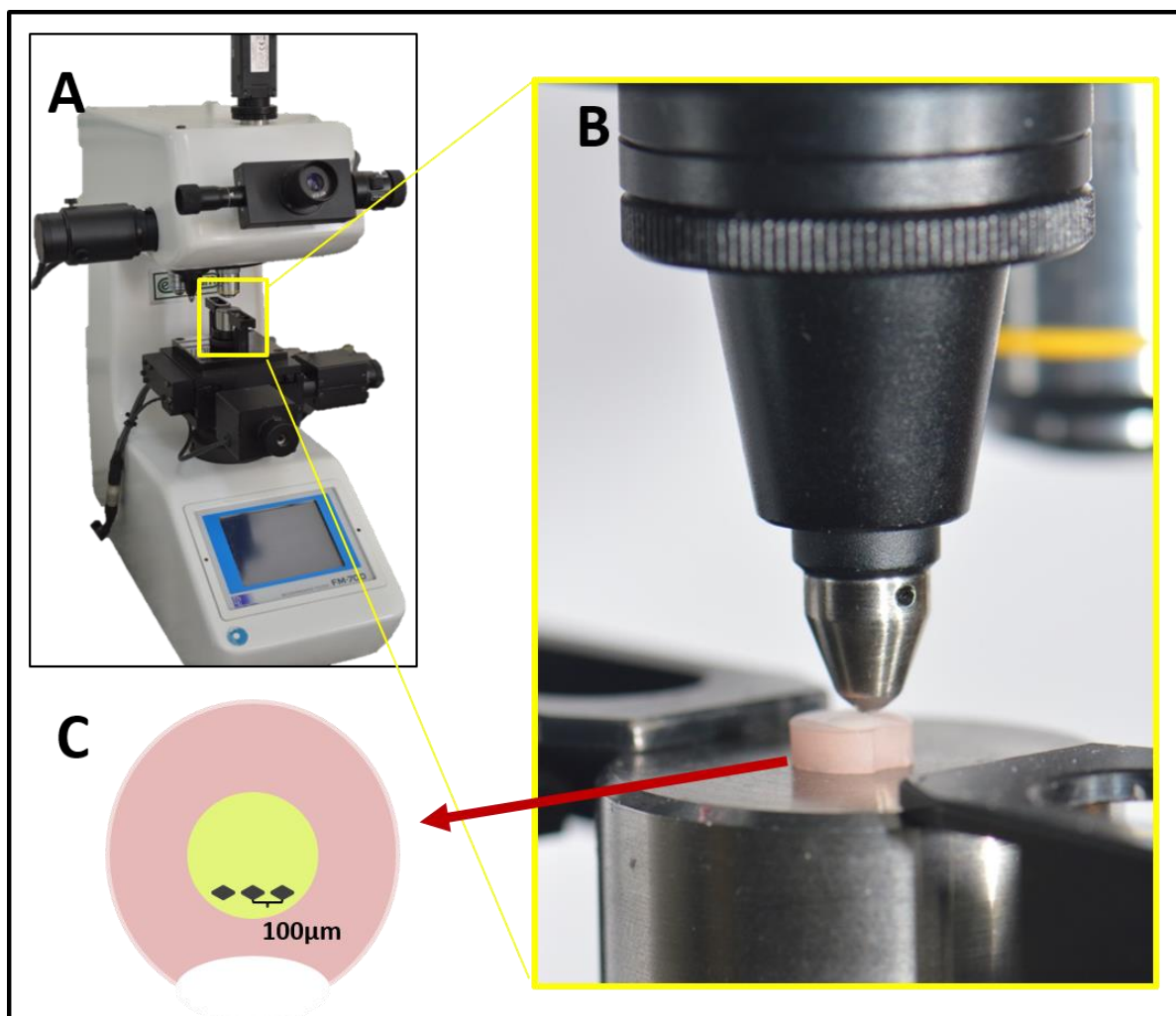
Fonte: Elaborado pelo autor.

A cada troca de lixa foi realizado um banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com água ultrapurificada por 10 minutos, para remoção dos resíduos de grãos abrasivos que porventura pudessem interferir na lisura do tecido. As amostras foram armazenadas em solução de timol a 0,2% para reidratação (Borges et al., 2012), e posteriormente analisadas em estereomicroscópio (Carl Zeiss – Stemi 2000 -10X), para descarte daquelas que apresentaram trincas e imperfeições (Torres C et al., 2012).

4.3.4.2 Microdureza inicial

O ensaio de microdureza objetiva avaliar a erosão inicial nas amostras (Lussi et al., 1993). A microdureza inicial de todos os espécimes foi obtida com indentador Knoop montado em microdurômetro (FM-700, Future-Tech, Tóquio, Japão) (Figura 12A), com aplicação de carga de 50 gramas durante 10 segundos (Borges et al., 2012) (Figura 12B).

Figura 12 – Ensaio de microdureza



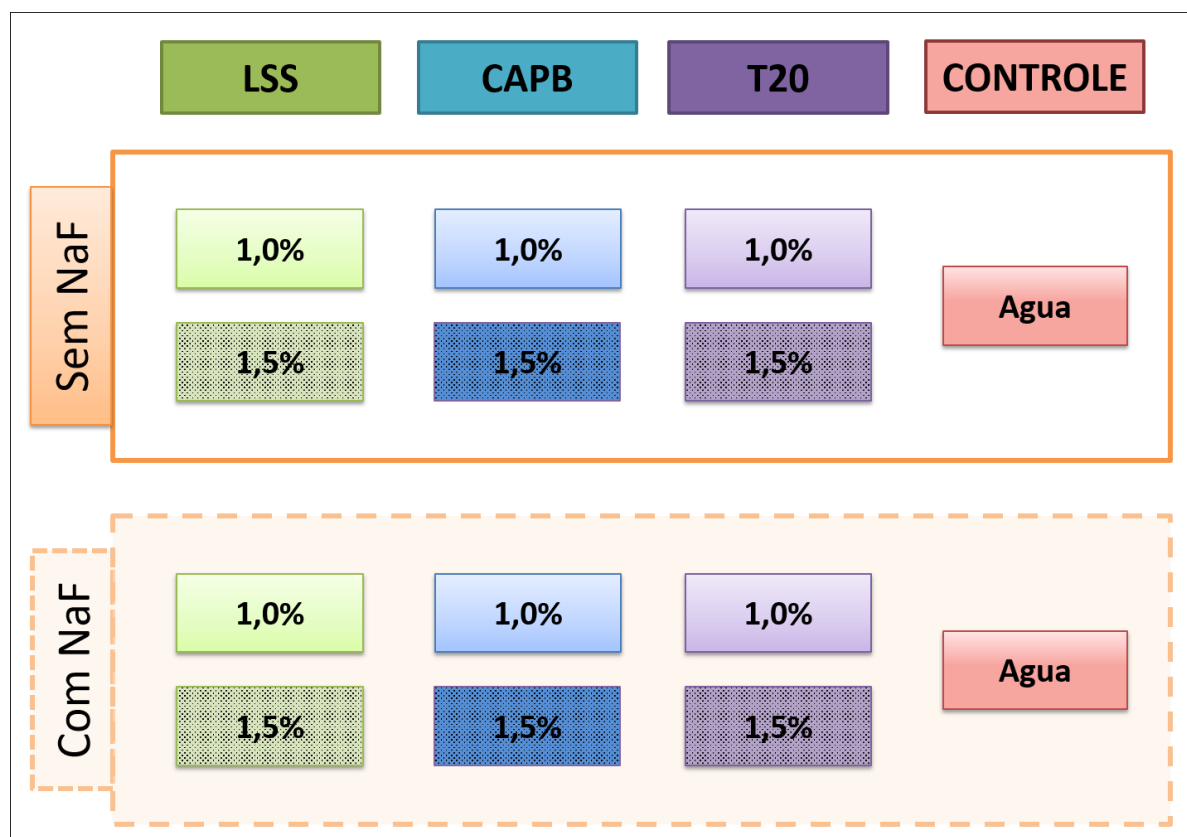
Legenda: a) microdurômetro; b) amostra posicionada para receber aplicação de carga; c) esquema da distribuição das indentações.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram realizadas três indentações na parte inferior dos espécimes (próximo à marcação curva da resina, de forma a não interferir com as leituras de perfilometria), com distância de 100 μm entre elas, e obtido o valor médio de dureza (Figura 12C). Após a determinação da dureza inicial dos espécimes, todos que apresentaram valor discrepante em 10% da média foram descartados e substituídos.

4.3.4.3 Divisão dos grupos

Os espécimes de esmalte bovinos foram distribuídos de forma aleatória em 14 grupos (n=12), descritos na Figura 13 de acordo com o tipo e concentração do tensoativo, e a presença ou não de fluoreto de sódio (NaF).

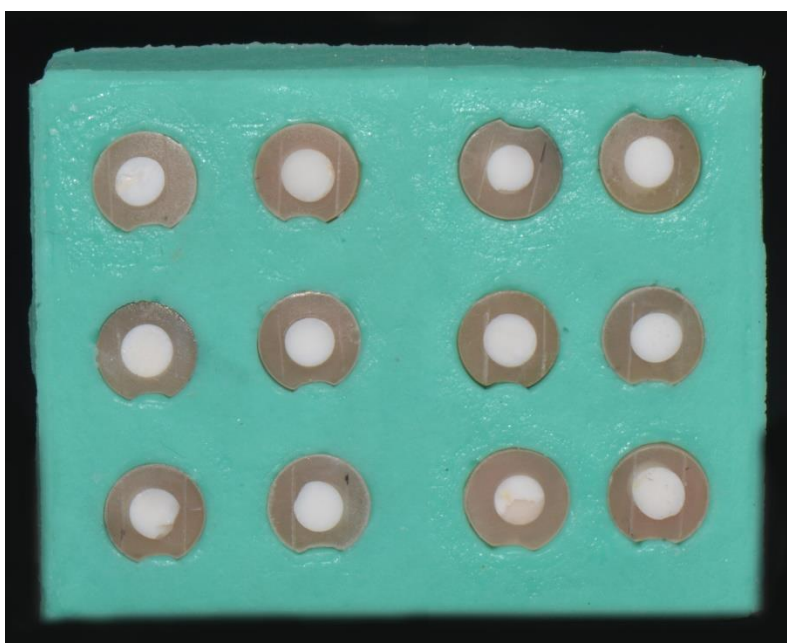
Figura 13 – Esquema da divisão dos grupos



Legenda: Distribuição das amostras em 14 grupos. LSS: Lauril Sulfato de Sódio. CAPB: Cocoamidopropil Betaína. T20: Tween 20. NaF: fluoreto de sódio.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A aleatorização foi realizada utilizando a ferramenta online gratuita “Random Sequence Generator”, disponibilizada no site www.random.org. Após a aleatorização dos espécimes em cada grupo, estes foram colocados em matrizes de silicone identificadas para cada grupo, com o esmalte voltado para cima, permitindo que todos sofressem o ciclo erosivo, a formação de película e os tratamentos com as soluções de tensoativos ao mesmo tempo (Figura 14).

Figura 14 - Matriz de silicone individualizada para cada grupo



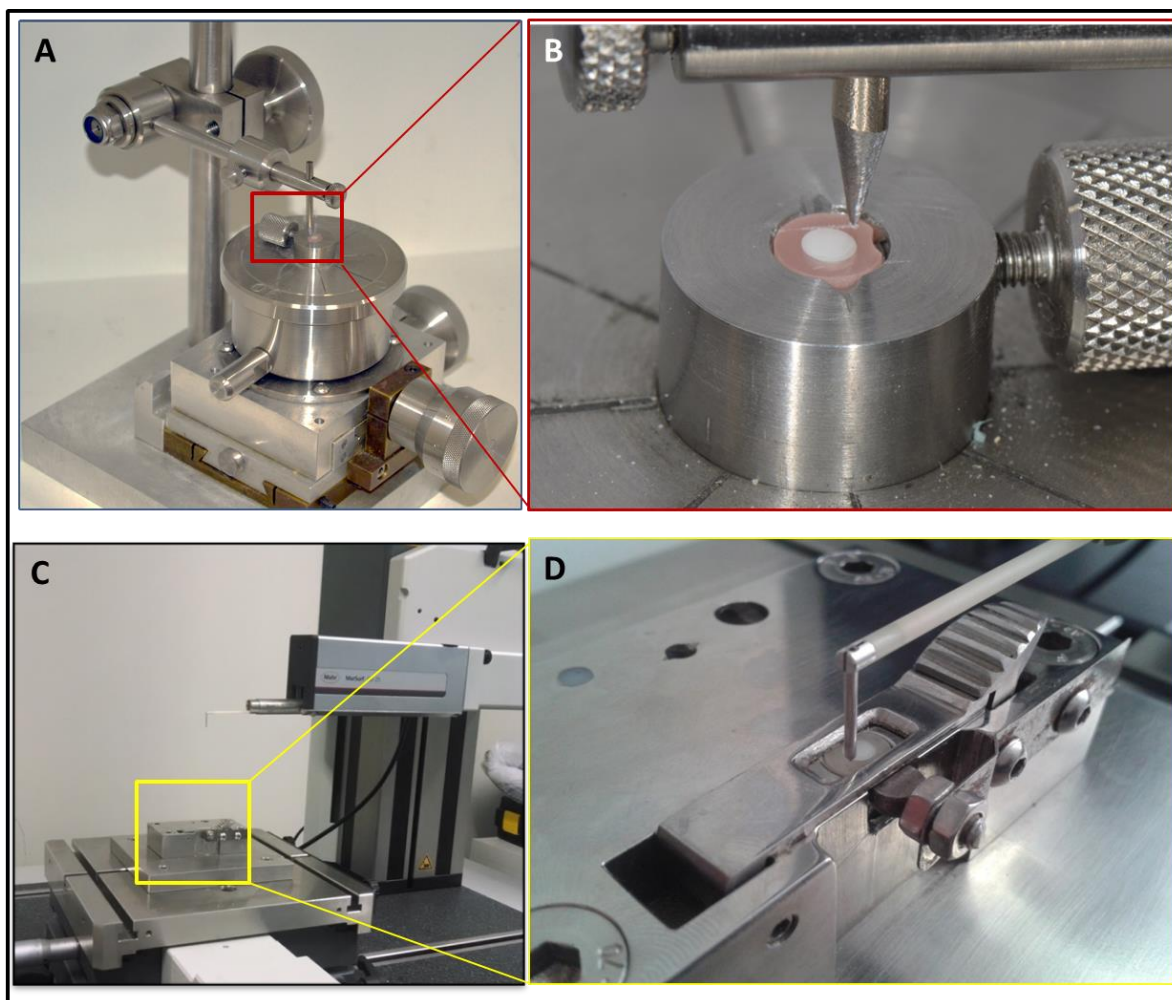
Legenda: Amostras posicionadas na matriz de silicone permitindo que todas sofressem o ciclo erosivo, a formação de película e os tratamentos com as suspensões de dentífrico ao mesmo tempo.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4.4 Perfilometria inicial

Para mensuração da perda superficial foi realizado o ensaio de perfilometria. No primeiro momento foi realizado a obtenção dos perfis iniciais de todos os espécimes. Para auxílio no teste de perfilometria, foram realizadas duas marcações paralelas entre si nas laterais da superfície da resina acrílica, com o auxílio de um dispositivo contendo uma ponta afiada (Figura 15A e 15B). Estas marcações serviram

como guias para orientação do posicionamento dos gráficos resultantes das leituras dos gráficos obtidos na análise perfilométrica, possibilitando a sobreposição dos perfis iniciais com os finais. Para garantir que os perfis iniciais e finais fossem realizados na mesma posição, as amostras foram posicionadas em um dispositivo metálico fixado ao perfilômetro. Este dispositivo garantia que a amostra fosse colocada sempre na mesma posição, de forma que a ponta do perfilômetro sempre percorresse os mesmos pontos na superfície do esmalte (Figura 15C e 15D).

Figura 15 – Preparo e posicionamento das amostras para o teste de perfilometria

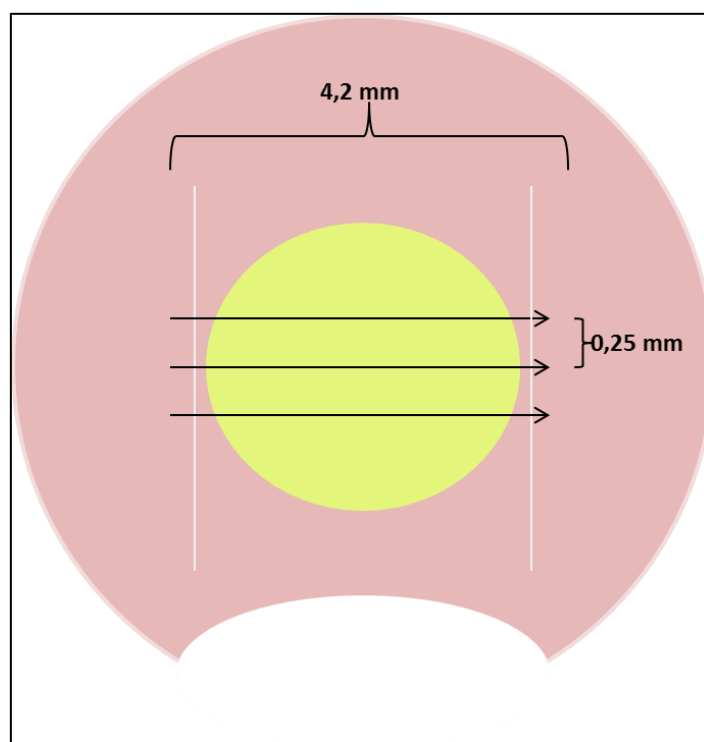


Legenda: a) dispositivo para confecção dos riscos na amostra; b) ponta afiada utilizada para confecção dos riscos; c) perfilômetro de contato utilizado nos testes; d) amostra em posição no dispositivo permitindo que a leitura fosse sempre realizada na mesma região.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os perfis foram obtidos com perfilômetro (MaxSurf XT 20, Mahr-Göttingen, Alemanha), realizando três varreduras com extensão de 4,2 mm e distância de 0,25 mm entre cada uma. A Figura 16 mostra um esquema da região das leituras nas amostras.

Figura 16 – Esquema da região de leitura dos perfis nas amostras



Fonte: Elaborado pelo autor.

A reprodutibilidade e confiabilidade do perfilômetro foram determinadas por testes específicos seguindo a metodologia proposta por Attin et al. (2009) e está descrita no APÊNDICE A.

4.3.4.5 Preparo das soluções

As soluções de tensoativos nos grupos sem fluoreto de sódio foram preparadas da mesma forma descrita no item 4.3.1.3. Já nos grupos contendo o

fluoreto, os tensoativos foram diluídos em água ultrapurificada até a concentração de uso respectiva de cada grupo, e à solução foi adicionado NaF, na concentração de 275 ppm, a fim de simular um dentifrício com 1100 ppm. A concentração reduzida de NaF se deve ao fato da solução representar a diluição na concentração de 1:3 (uma porção de solução para 3 de água ultrapurificada), simulando a diluição que ocorre do dentifrício com a saliva no momento da escovação (Duke, Forward, 1982). Novamente, reitera-se que por serem agentes comuns em dentifrícios, foi considerado para fins desse estudo a diluição que ocorre deste com a saliva, ainda que abrasão não tenha sido realizada em nenhum momento.

4.3.4.6 Desafio erosivo

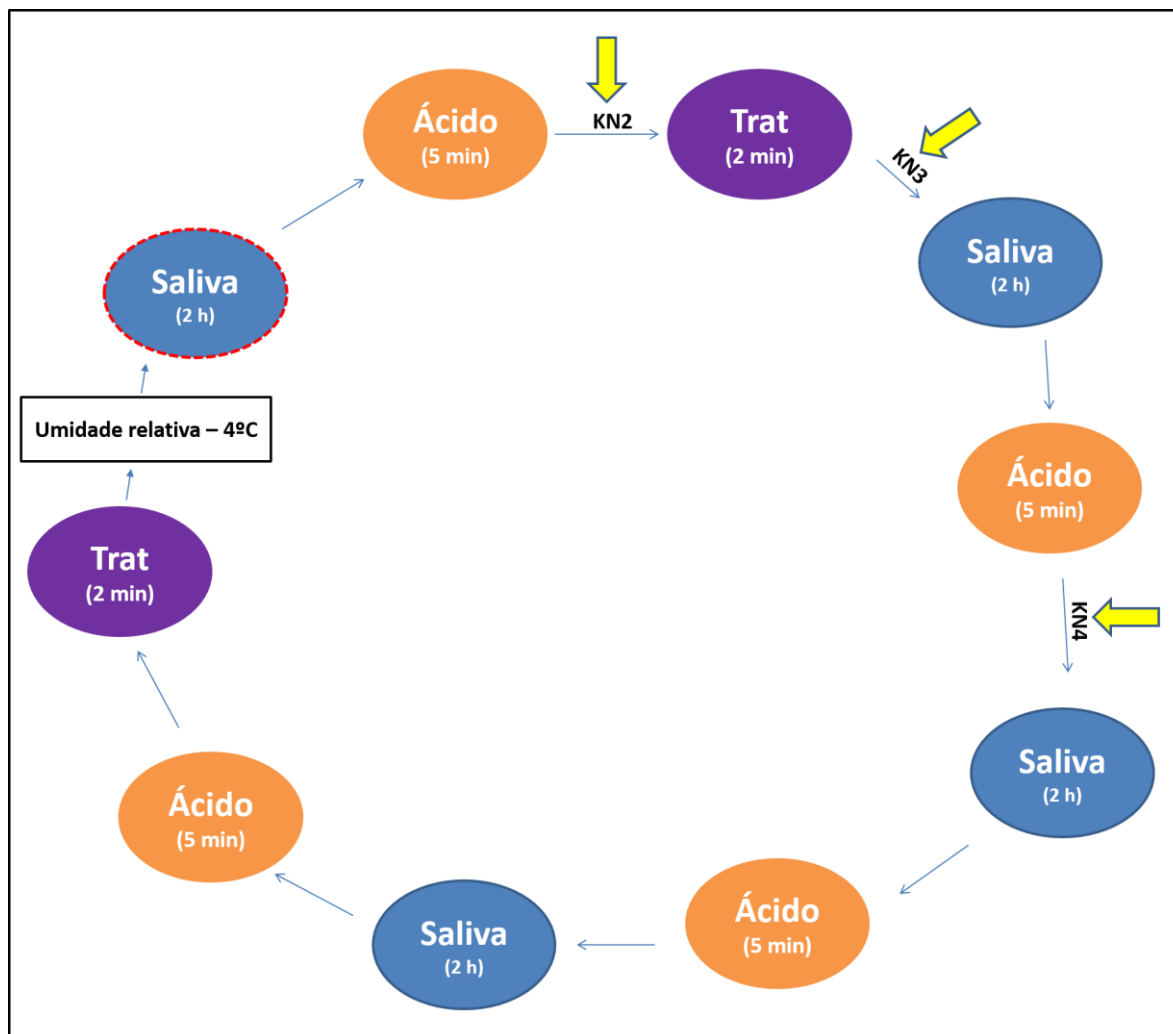
A ciclagem de des/remineralização simulando o desafio erosivo consistiu na imersão das amostras em saliva para formação da película adquirida (4 vezes), imersão das amostras nas soluções de tensoativos respectivas de cada grupo (2 vezes, simulando duas escovações diárias) e imersão no ácido (4 vezes) (Hara et al., 2013), conforme esquematizado na Figura 17. Este ciclo foi realizado por 5 dias consecutivos, e as amostras mantidas em umidade relativa, a 4°C, durante a noite.

Para formação de película adquirida, a saliva coletada foi descongelada em temperatura ambiente no momento do uso. Os espécimes foram mergulhados em 2 ml de saliva durante 2 h sob agitação como descrito no item 4.3.2.6. Após a remoção da saliva, os espécimes foram lavados em água ultrapurificada por 20 s para remoção das proteínas não adsorvidas.

A imersão no ácido foi realizada com solução de ácido cítrico (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) a 0,3%, com pH natural (2,6), por 5 minutos (Hara et al., 2013), em temperatura ambiente.

As imersões nas soluções de tensoativos de cada grupo tiveram duração de 2 minutos considerado um tempo médio de escovação, em temperatura ambiente, e sob leve agitação em agitador horizontal. Após cada imersão no ácido e nas soluções com tensoativos, as amostras foram cautelosamente lavadas em água ultra purificada.

Figura 17 - Esquema do ciclo erosivo realizado durante 5 dias



Legenda: As setas amarelas (KN- *Knoop Number*) indicam o momento de mensuração da microdureza no primeiro dia do ciclo. Trat. indica a aplicação do tensoativo respectivo de cada grupo associado ou não ao NaF e a linha pontilhada vermelha indica o momento de início do ciclo em cada dia.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4.7 Microdureza Final

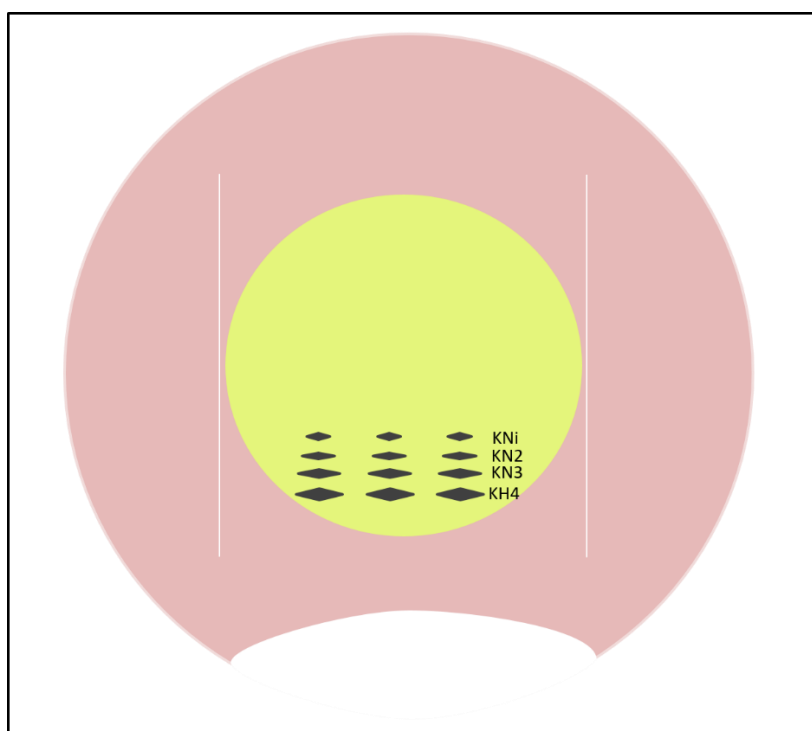
Para obtenção dos dados relativos à erosão inicial das amostras, a microdureza foi medida em 4 momentos:

- a) $KN_{inicial}$: valores usados para seleção dos espécimes utilizados no estudo;

- b) KN2: valor mensurado após o primeiro desafio ácido e utilizado como *baseline*;
- c) KN3: valor mensurado após o primeiro tratamento para verificar o potencial remineralizante do NaF nas soluções;
- d) KN4: valor mensurado após o segundo ácido a fim de verificar se os tensoativos associados ou não ao NaF promoveram proteção do esmalte.

Todos os parâmetros de dureza utilizados nas mensurações finais foram os mesmos utilizados na mensuração da dureza inicial. Ainda, as indentações finais foram feitas abaixo das iniciais, como ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Esquema ilustrativo da localização das mensurações de dureza.



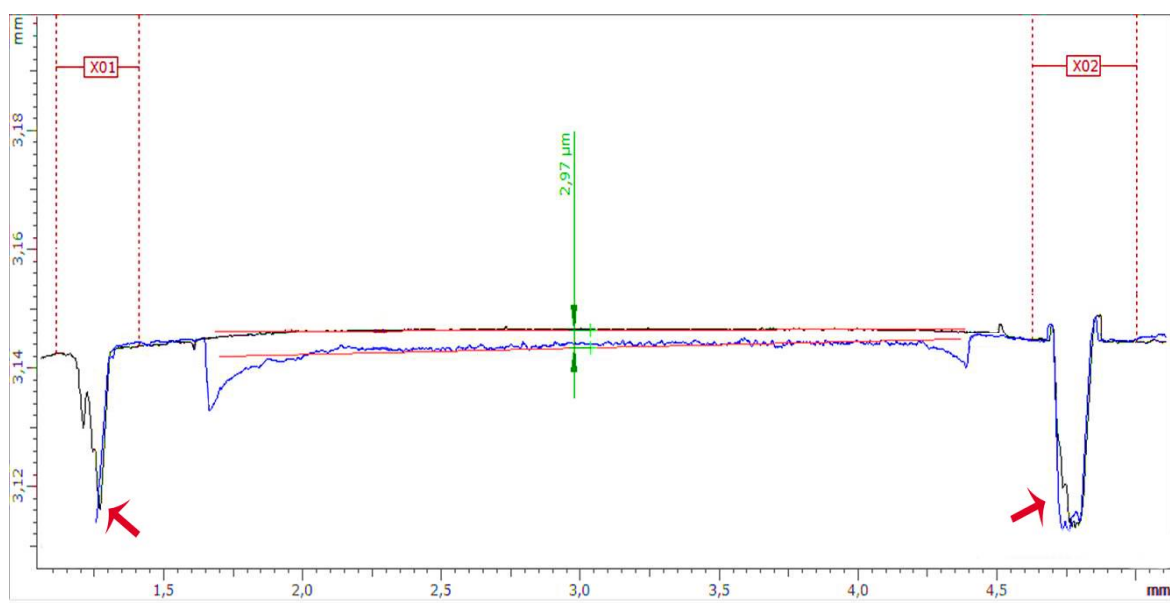
Legenda: KNi refere-se a dureza inicial; KN2 refere-se a dureza mensurada após o primeiro desafio ácido; KN3: refere-se a dureza mensurada após o primeiro tratamento e KN4 refere-se a dureza mensurada após o segundo ácido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4.8 Ensaio de Perfilometria

Para quantificação do desgaste da superfície do esmalte, os perfis finais foram obtidos após os cinco dias de ciclo erosivo, utilizando os mesmos parâmetros da perfilometria inicial. O desgaste do esmalte foi calculado por comparação entre os perfis iniciais e pós-tratamento, usando as marcações nas amostras como guias (Figura 19).

Figura 19 – Sobreposição dos perfis inicial e final e leitura de perda estrutural



Legenda: Leitura dos perfis obtidos antes (preto) e após (azul) a exposição ao ácido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os perfis foram sobrepostos e a altura resultante da diferença entre os mesmos determinou a perda de estrutura dental, calculada com auxílio de software (Mahr Surf XCR 20 4.50-07 SP3, 2011). A sobreposição dos perfis foi realizada utilizando como referência as depressões (setas na Figura 19) formadas nos perfis a partir das marcações de referência das amostras (Figura 15B).

4.3.4.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística sendo a que estatística descritiva consistiu no cálculo da média e desvio-padrão. A estatística inferencial consistiu nos testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov e Pearson) e homocedasticidade para os dados de dureza e perfilometria. Verificado a normalidade, foi utilizado os testes T-Student e ANOVA dois fatores; seguidos pelos testes de comparações múltiplas Dunnett, Bonferroni ou Sidak. A aplicação de cada teste dependeu da hipótese testada. O nível de significância adotado para todos os testes foi o de 5%.

4.3.5 Análises de flúor

4.3.5.1 Flúor disponível nas soluções

A concentração de flúor nas soluções foi determinada por meio de eletrodo sensível ao flúor (PerfectION, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suíça). O eletrodo foi calibrado pela construção de uma curva de calibração com 5 soluções padrão de fluoreto de sódio de concentração conhecida (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm e 1000 ppm). Para calibração, 1 ml de cada solução foi misturado em 1 ml de TISAB II, e as medidas foram feitas em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob agitação constante, e em triplicata. Após a calibração do eletrodo, 1 ml das soluções de tensoativos testadas foi misturado com 1 ml de TISSAB II e então obtido os valores de milivoltagem da mesma forma que as soluções padrão. Os valores de fluoreto nas soluções estão listados no Quadro 2.

Quadro 2 – Valores em ppm de fluoreto nas soluções

	1%	1,5%
LSS	276,3 ($\pm$ 7,3)	256,0 ($\pm$ 6,6)
CAPB	280,4 ($\pm$ 11,6)	281,2 ($\pm$ 12,4)
T20	278,1 ($\pm$ 8,2)	284,4 ($\pm$ 1,8)
Controle	290,3 ($\pm$ 8,1)	

4.3.5.2 Flúor solúvel em KOH

Após o quinto dia do ciclo e as mensurações de perfilometria final, todas as amostras dos grupos contendo fluoreto de sódio foram separadas para análise do flúor solúvel em KOH adsorvido na superfície do esmalte, pelo método descrito por Caslavská et al. (1975).

O eletrodo foi calibrado misturando 0,5 ml de soluções padrão de fluoreto de sódio em KOH de concentrações conhecidas (0,001 ppm; 0,01 ppm; 0,1 ppm; 1,0 ppm e 10 ppm), com 0,5 ml de TISAB II. A partir dos valores de milivoltagem obtidos foi construída uma curva de calibração para cálculo da quantidade de fluoreto em ppm. As mensurações foram feitas sob agitação e em temperatura ambiente.

Para mensuração do fluoreto adsorvido na superfície os espécimes foram mergulhados em 0,5 ml de solução de KOH a 1 M, sob leve agitação, por 24 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, os espécimes foram lavados em água deionizada e armazenados. Uma amostra da solução de KOH (0,25 ml) foi transferida para um recipiente plástico e neutralizado com 0,25 ml de solução de HClO₄ a 1 M. Então, 0,5 ml de solução de TISABII foi adicionada ao recipiente, e os valores de milivoltagem obtidos pelo eletrodo calibrado.

4.3.5.3 Análise estatística

Os resultados do flúor adsorvido à superfície do esmalte foram submetidos à análise estatística sendo a que estatística descritiva consistiu no cálculo da média e desvio-padrão. A estatística inferencial consistiu nos testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov e Pearson) e homocedasticidade. Verificado a não-normalidade, foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.4 Hipóteses de nulidade

As seguintes hipóteses nulas foram formuladas:

- H₀₁***: Os tensoativos em diferentes concentrações não influenciam na energia de superfície do esmalte;
- H₀₂***: Os tensoativos em diferentes concentrações não influenciam na formação da película adquirida;
- H₀₃***: Os tensoativos testados em diferentes concentrações não influenciam o potencial de proteção e remineralização do fluoreto de sódio sobre o esmalte na erosão inicial;
- H₀₄***: Os tensoativos em diferentes concentrações não influenciam o potencial protetor da película adquirida e do fluoreto de sódio no desgaste erosivo;
- H₀₅***: Os tensoativos em diferentes concentrações não alteram a adsorção do flúor na superfície do esmalte.

5 RESULTADO

5.1. Energia de superfície – Goniometria

A avaliação da alteração da energia de superfície do esmalte promovida pelos tensoativos foi realizada pelo cálculo do ângulo de contato por meio de goniometria. A condição de normalidade foi verificada e aceita para todos os dados (Kolmogorov-Smirnov – $p > 0,20$ e Pearson $p = 0,82$). A Tabela 1 mostra os valores médios e desvio padrão do ângulo de contato para todos os grupos.

Tabela 1 - Média e desvio padrão (em graus) do ângulo de contato para todos os grupos, e resultados do teste de Dunnett

	1%	1.5%	p (Teste-T: concentração)
LSS	41,3 ($\pm 7,0$)	30,7 ($\pm 9,2$)	0,608
CAPB	20,0 ($\pm 10,6$)	30,5 ($\pm 6,8$)	0,405
T 20	50,0 ($\pm 6,4$) *	45,0 ($\pm 12,1$) *	0,244
Controle	58,6 ($\pm 7,5$) *		

* Asterisco mostra semelhança dos grupos com o grupo controle (Teste de Dunnett).

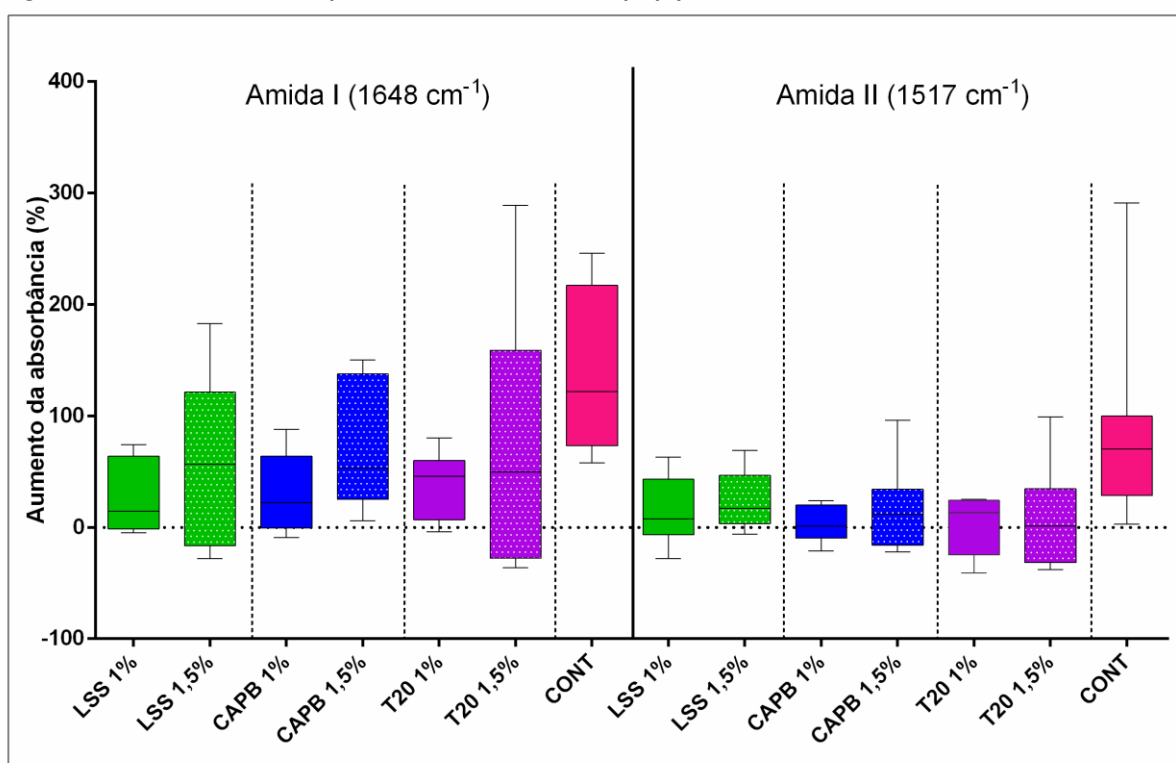
A comparação entre as duas concentrações utilizadas no estudo foi feita com teste T-Student para cada tensoativo, e observou-se que não houve diferença estatística entre elas (Tabela 1).

A avaliação da alteração da energia de superfície foi realizada com o teste ANOVA-um fator, seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) para comparação com o grupo controle. Observou-se que o LSS e o CAPB em ambas concentrações apresentaram valores menores do que o grupo controle, enquanto o T20 em ambas as concentrações foi similar a ele.

5.2. Formação da película adquirida - FTIR

Os valores de absorvância em porcentagem nas bandas de amida I (pico 1648 cm^{-1}) e amida II (pico 1516 cm^{-1}) não se apresentaram dentro da condição de normalidade (Kolmogorov-Smirnov $p < 0,0001$ e Pearson $p < 0,0001$, para ambas bandas). A Figura 20 mostra a absorvância média e desvio padrão nas bandas de amida I e II obtidos para todos os grupos. Os dados do aumento percentual da absorvância para cada banda foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (análise de variância não paramétrica), o qual não revelou diferença estatística entre os grupos (amida I: $p = 0,0534$, amida II: $p = 0,0590$).

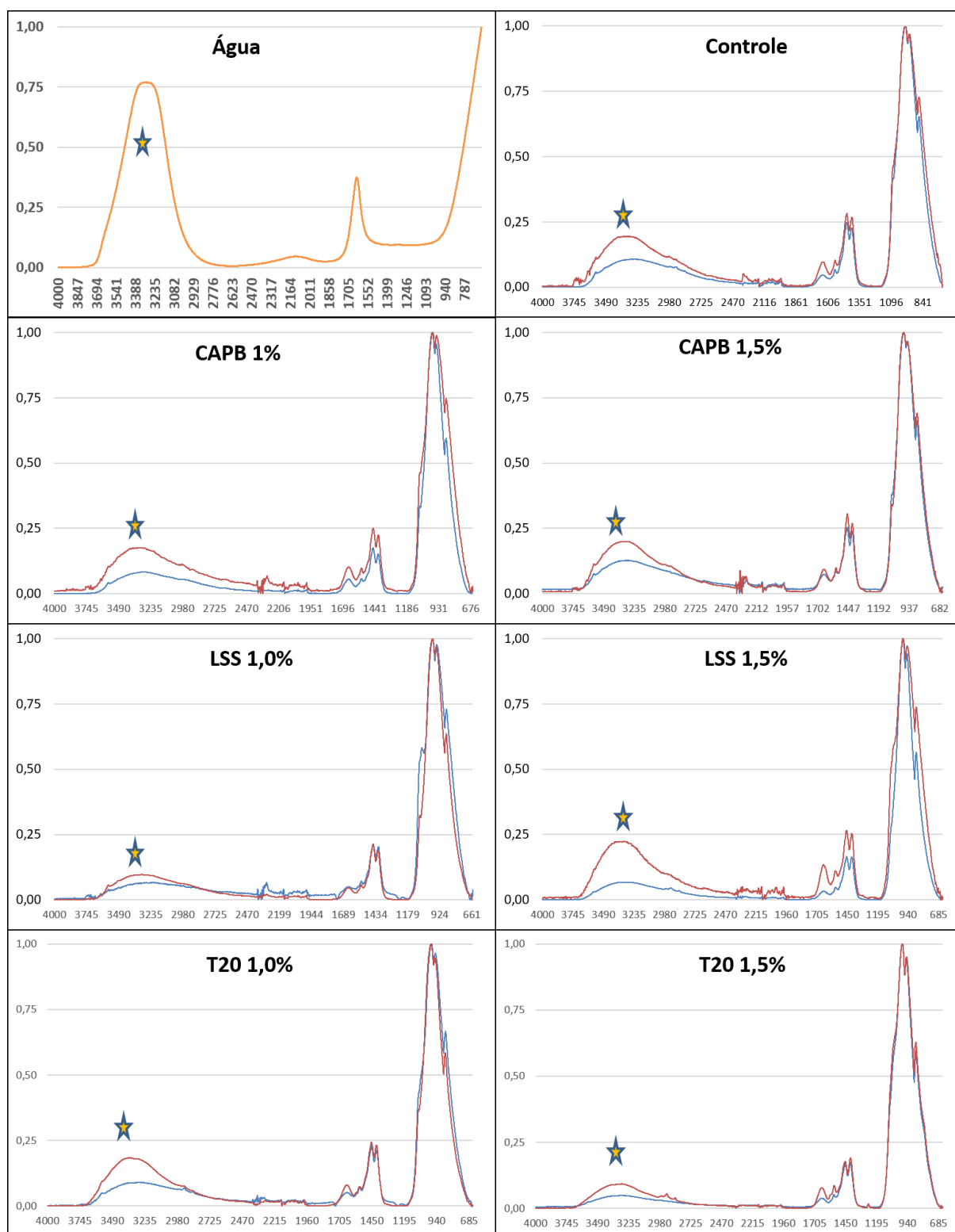
Figura 20 – Gráfico boxplot da absorvância (%) para as bandas de amida I e II



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar do resultado estatístico, a análise dos espectros mostrou um expressivo aumento da absorvância na região entre 3400 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} para todos os grupos (Figura 21).

Figura 21 – Exemplos de espectros inicial e final para todos os grupos e espectro da água



Legenda: espectro azul refere-se à mensuração inicial e o vermelho à final. A estrela evidencia o aumento expressivo da absorbância na região entre 2900 e 3500 cm⁻¹.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro da água (Figura 21) mostra picos importantes entre 2900 e 3500 cm^{-1} e entre 1400 e 1700 cm^{-1} referente às ligações de OH^- . A análise dos espectros dos tensoativos mostram também aumentos de absorbância nessas regiões. Assim, o aumento da absorbância verificado em todos os grupos na região referente a amida I e II pode ter sido afetado pela presença de água nas amostras, ainda que a secagem dos espécimes tenha sido realizada previamente à leitura final.

5.3. Análise da microdureza

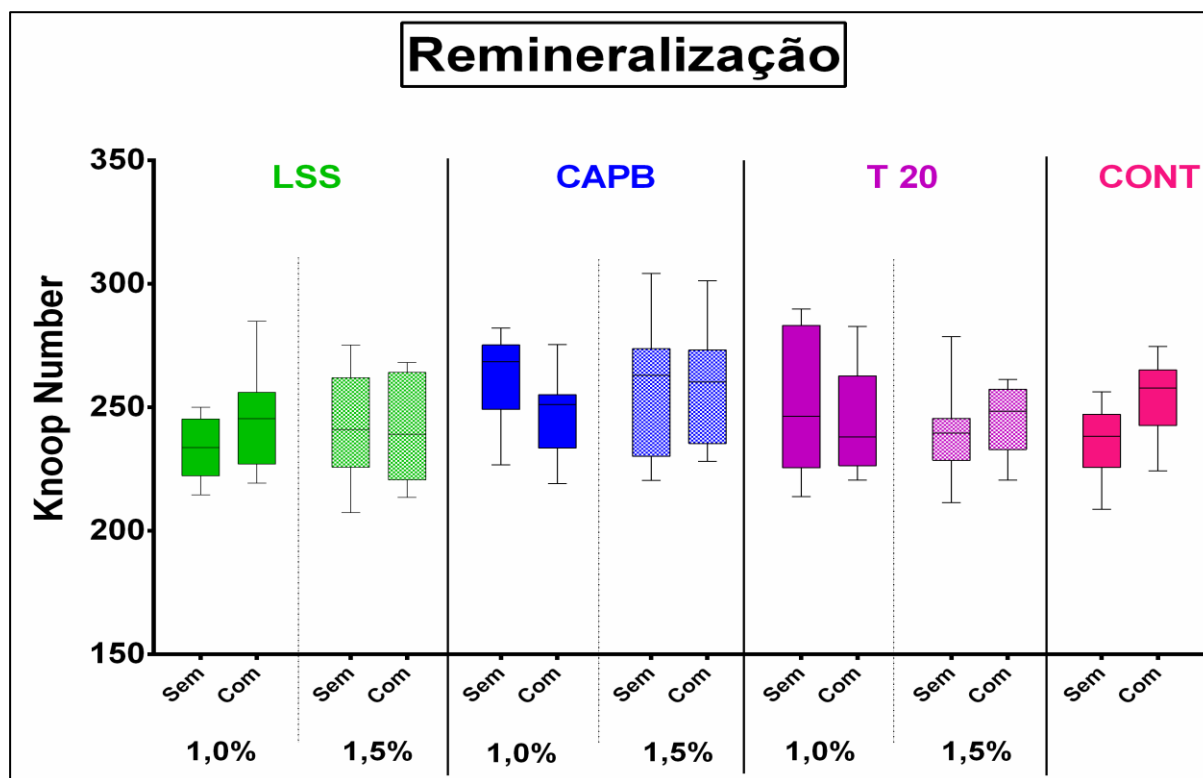
A influência dos tensoativos na erosão inicial foi realizada pelo teste de microdureza Knoop. Os dados de dureza após o primeiro ácido (KN2 - desmineralização) foram usados como *baseline* e se apresentam na Tabela 2. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA dois fatores, o qual revelou ausência de diferença estatística entre eles ($p>0,05$).

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de dureza KN2 (desmineralização) para todos os grupos testados

Desmineralização		Sem NaF		Com NaF	
LSS	1,0%	258,0 ($\pm 18,8$)	Aa	260,4 ($\pm 16,4$)	Aa
	1,5%	262,8 ($\pm 19,1$)	Aa	255,5 ($\pm 13,5$)	Aa
CAPB	1,0%	256,3 ($\pm 15,6$)	Aa	251,2 ($\pm 17,7$)	Aa
	1,5%	256,2 ($\pm 15,7$)	Aa	261,7 ($\pm 17,2$)	Aa
T20	1,0%	262,5 ($\pm 15,6$)	Aa	243,7 ($\pm 25,6$)	Aa
	1,5%	259,8 ($\pm 16,8$)	Aa	246,6 ($\pm 19,7$)	Aa
CONTROLE	/	248,5 ($\pm 18,3$)	Aa	249,7 ($\pm 18,0$)	Aa

Os dados de dureza após o tratamento (KN3 - remineralização) se apresentaram dentro da condição de normalidade (Kolmogorov-Smirnov $p=0,11$ e Pearson $p=0,08$) e estão apresentados no gráfico da Figura 22.

Figura 22 - Gráfico boxplot dos valores de dureza após o tratamento (KN3)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para análise do efeito da concentração dos agentes foi realizado o teste T-Student comparando todos os agentes, com e sem NaF, na concentração 1,0% com 1,5%. Não houve diferença entre as concentrações testadas ($p>0,05$ para todos os grupos).

A avaliação do efeito dos tensoativos na remineralização do esmalte foi feita por meio de teste ANOVA dois fatores (tensoativo e presença de NaF) o qual revelou diferença significativa apenas entre os tensoativos ($p=0,003$). O teste de comparações múltiplas adotado foi o Dunnett para comparação dos agentes sem NaF com o grupo controle negativo, e comparação dos agentes com NaF com o grupo controle positivo. Observou-se que apenas o CAPB em ambas concentrações apresentou valores de

dureza maior que o grupo controle (água). Todos os tensoativos associados ao fluoreto de sódio foram similares ao grupo controle positivo (água + NaF). Ainda, não houve diferença entre os agentes na presença ou ausência de NaF ($p=0,47$). A Tabela 3 mostra os valores de média e desvio padrão dos tensoativos e resultado do teste de Dunnett.

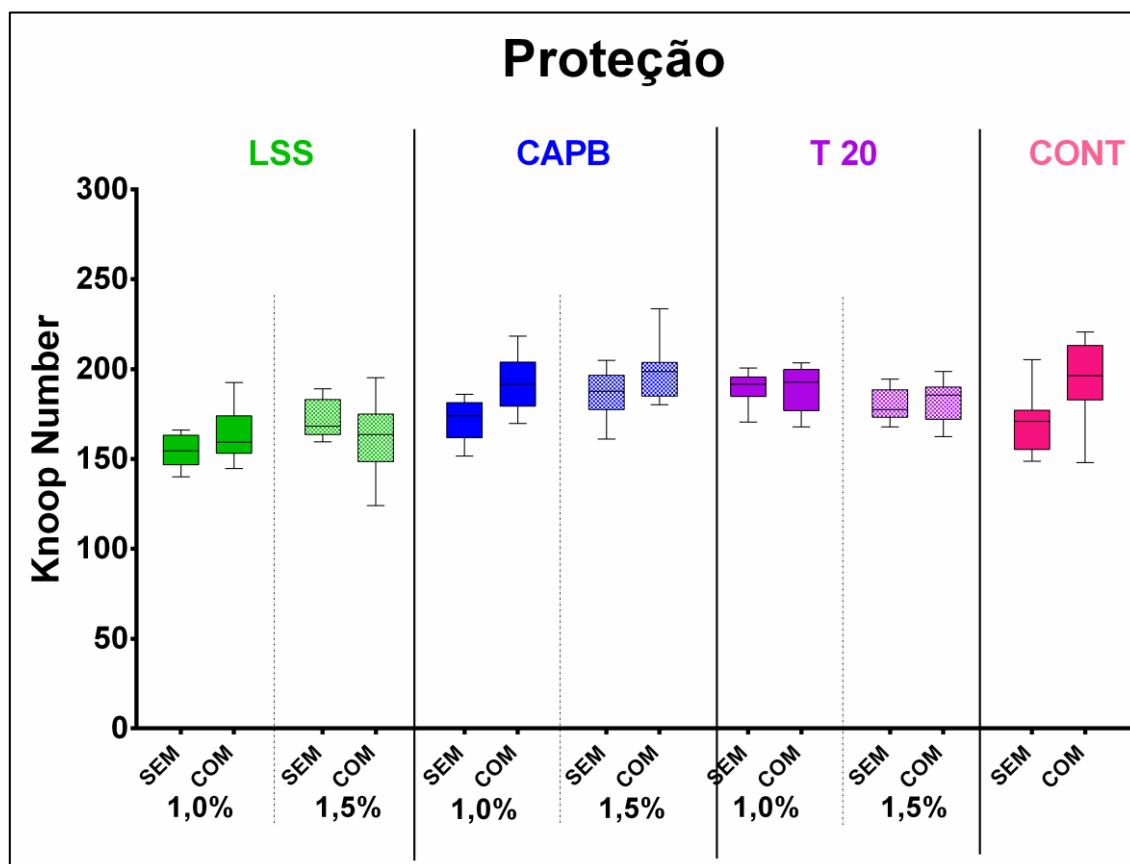
Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de dureza KN3 (remineralização) para todos os grupos testados e resultado do teste de Dunnett

Remineralização		Sem NaF		Com NaF	
LSS	1,0%	232,8 ($\pm 12,6$)	Aa	245,0 ($\pm 18,2$)	Aa
	1,5%	241,6 ($\pm 21,0$)	Aa	241,1 ($\pm 20,9$)	Aa
CAPB	1,0%	262,1 ($\pm 17,4$)	Ba	247,8 ($\pm 15,8$)	Aa
	1,5%	259,1 ($\pm 27,5$)	Ba	259,0 ($\pm 23,3$)	Aa
T20	1,0%	252,1 ($\pm 17,4$)	Aa	244,1 ($\pm 21,2$)	Aa
	1,5%	238,6 ($\pm 16,2$)	Aa	244,7 ($\pm 13,7$)	Aa
CONTROLE	/	236,1 ($\pm 15,4$)	Aa	255,9 ($\pm 15,5$)	Aa

* Letras maiúsculas mostram diferença nas colunas entre os tensoativos e o grupo controle (Teste de Dunnett). Letras minúsculas mostram diferença nas linhas (presença de fluoreto de sódio).

Os valores de dureza média e desvio padrão após o segundo desafio ácido (KN4 - proteção) também se apresentaram dentro da condição de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov $p=0,200$ e Pearson $p=0,864$); evidenciando a proteção dos agentes frente a novos desafios erosivos (KN4), e estão apresentados no gráfico da Figura 23.

Figura 23 - Gráfico boxplot dos valores de dureza após o segundo ácido (KN4)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliação do efeito da concentração pós segundo desafio erosivo (KN4 – proteção), os dados de dureza foram submetidos ao teste T-Student. Observou-se que a concentração dos tensoativos influenciou no efeito protetor quando estes foram utilizados sem fluoreto de sódio ($p < 0,05$) (Tabela 4). Houve ainda redução da dureza para o LSS e CAPB na menor concentração (1%) comparado a concentração de 1,5% enquanto o T20 obteve maiores valores quando utilizado na menor concentração. Nos grupos onde houve associação do tensoativo com fluoreto de sódio, ambas as concentrações apresentaram resultados similares ($p > 0,05$) de acordo com o teste T-Student.

A avaliação dos tensoativos e da presença da NaF foi feita por meio de teste ANOVA dois fatores, o qual revelou diferença entre os tensoativos ($p < 0,0001$) e entre o fator presença de NaF ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas adotado também foi o Dunnett para ambos os controles (tensoativos sem NaF comparados

com água, e tensoativos associados ao NaF comparados ao grupo água + NaF). Observou-se que o CAPB a 1,5% e o T20 em ambas concentrações apresentaram valores de dureza maior que o controle negativo (água). Já o LSS em ambas concentrações e o T20 a 1,5% associados ao NaF apresentaram valores menores que o controle positivo (água + NaF).

Ainda, com relação à presença do NaF, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que houve diferença entre o grupo controle negativo e o positivo, e também entre o CAPB a 1% (com e sem NaF). A Tabela 4 mostra os valores de média e desvio padrão dos tensoativos e resultado dos testes estatísticos.

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de dureza KN4 (proteção) para todos os grupos testados, e resultado dos testes de Dunnett e Bonferroni

Proteção		Sem NaF			Com NaF		
LSS	1,0%	154,1	($\pm 8,7$) ¥	Aa	163,0	($\pm 13,7$)	Ba
	1,5%	171,9	($\pm 10,7$)	Aa	162,2	($\pm 19,1$)	Ba
CAPB	1,0%	171,3	($\pm 11,3$) ¥	Aa	191,3	($\pm 14,5$)	Ab
	1,5%	187,9	($\pm 14,2$)	Ba	199,2	($\pm 15,9$)	Aa
T20	1,0%	188,8	($\pm 11,3$) ¥	Ba	189,1	($\pm 12,3$)	Aa
	1,5%	180,0	($\pm 8,4$)	Ba	182,2	($\pm 11,6$)	Ba
CONTROLE	/	163,6	($\pm 9,1$)	Aa	200,5	($\pm 12,6$)	Ab

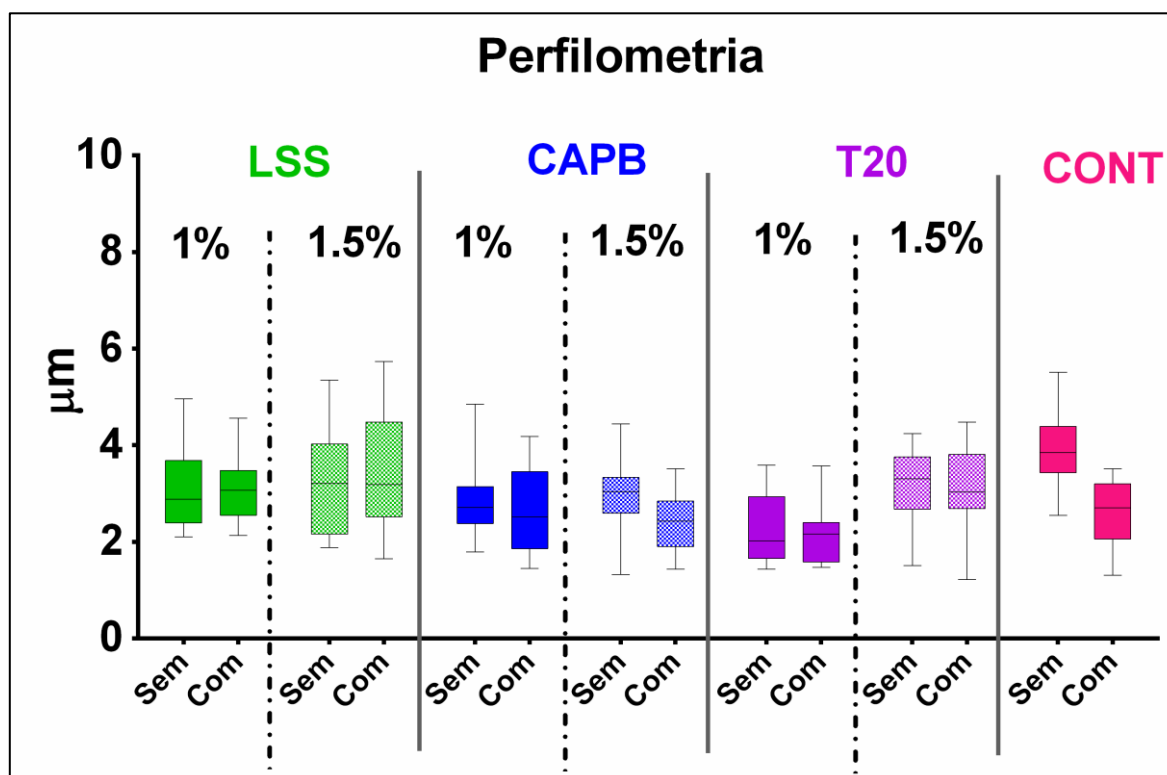
* Letras maiúsculas mostram diferença nas colunas entre os tensoativos e o grupo controle (Teste de Dunnett). Letras minúsculas mostram diferença nas linhas (presença de NaF – teste de Bonferroni). O símbolo ¥ mostra diferença entre as concentrações (teste T-Student) nos grupos sem NaF.

5.4. Análise da perfilometria

Para avaliação da influência dos agentes tensoativos na progressão da erosão foi realizado o teste de perfilometria após cinco dias de ciclo erosivo, conforme descrito na metodologia.

Os dados de perda de esmalte se apresentaram dentro da condição de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov $p=0,20$ e Pearson $p=0,065$). Os valores de dureza média e desvio padrão estão apresentados no gráfico da Figura 24.

Figura 24 - Gráfico boxplot dos valores de perda de estrutura após 5 dias de ciclo erosivo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para análise do efeito da concentração dos agentes também foi realizado o teste T-Student comparando todos os agentes, com e sem NaF, na concentração 1,0% com 1,5%. Houve diferença entre as concentrações testadas apenas para o T20 com e sem NaF, o qual apresentou menores valores de perda quando utilizado a 1%.

Com relação ao efeito dos tensoativos na perda de estrutura e no efeito protetor do NaF, a avaliação foi feita por meio de teste ANOVA dois fatores (tensoativo e presença de NaF) o qual revelou diferença entre os tensoativos ($p=0,019$) e entre o fator presença de NaF ($p<0,0001$).

O teste de comparações múltiplas adotado também foi o Dunnett como realizado para microdureza: tensoativos sem NaF comparados com água, e tensoativos associados ao NaF comparados ao grupo água + NaF. Para os grupos sem NaF, observou-se que o CAPB em ambas concentrações e o T20 a 1% apresentaram menor perda que a água.

Já para os grupos com NaF, não houve diferença entre os tensoativos e o controle positivo. Para avaliação do efeito do efeito protetor do NaF, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Sidak, o qual revelou que apenas o grupo controle positivo (água +NaF) apresentou menores valores de perda comparado ao grupo controle negativo (água). A Tabela 5 mostra os valores de média e desvio padrão dos tensoativos e resultado do teste de Dunnett e de Sidak.

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos valores de perfilometria para todos os grupos testados, e resultado dos testes de Dunnett e Sidak

Perda (μm)		Sem NaF		Com NaF	
LSS	1,0%	3,12 ($\pm 0,87$)	Aa	3,13 ($\pm 0,68$)	Aa
	1,5%	3,22 ($\pm 1,04$)	Aa	3,40 ($\pm 1,17$)	Aa
CAPB	1,0%	2,91 ($\pm 0,82$)	Ba	2,68 ($\pm 0,91$)	Aa
	1,5%	2,96 ($\pm 0,76$)	Ba	2,37 ($\pm 0,62$)	Aa
T20	1,0%	2,27 ($\pm 0,75$) ¥	Ba	2,12 ($\pm 0,59$)	Aa
	1,5%	3,19 ($\pm 0,79$)	Aa	3,13 ($\pm 0,85$)	Aa
CONTROLE	/	3,86 ($\pm 0,76$)	Aa	2,59 ($\pm 0,66$)	Ab

* Letras maiúsculas mostram diferença nas colunas entre os tensoativos e o grupo controle (Teste de Dunnett). Letras minúsculas mostram diferença nas linhas (presença de fluoreto de sódio – teste de Sidak's). O símbolo ¥ revela diferença encontrada pelo teste T-Student entre as concentrações testadas para o tensoativo.

5.5. Análise de Flúor

Para avaliação da influência dos tensoativos na adsorção de flúor na superfície do esmalte, foi realizada a mensuração do flúor solúvel em KOH (*loosely bound fluoride*). Os dados encontrados se encontraram fora da condição de normalidade (Kolmogorov-Smirnov $p < 0,0001$).

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$) seguido pelo teste de Dunn's para comparação com o grupo controle (água+NaF). Observou-se diferença estatística entre todos os tensoativos, com

exceção do T20 1,5%. A Tabela 6 mostra as médias e desvio padrão para todos os grupos e o resultado do teste de Dunn.

Tabela 6 – Média e desvio padrão do flúor adsorvido ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) no esmalte, e resultado do teste de Dunn

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$		Com NaF	
LSS + NaF	1,0%	0,247 ($\pm 0,354$)	A
	1,5%	0,858 ($\pm 0,104$)	A
CAPB + NaF	1,0%	0,647 ($\pm 0,448$)	A
	1,5%	0,926 ($\pm 0,179$)	A
T20 + NaF	1,0%	0,705 ($\pm 0,431$)	A
	1,5%	0,941 ($\pm 0,126$)	B
CONTROLE (água + NaF)	/	1,597 ($\pm 0,253$)	B

*Letras maiúsculas mostram diferença entre os tensoativos com o grupo controle.

6 DISCUSSÃO

6.1 Energia de superfície e formação de película adquirida

Os dados de goniometria permitiram negar a primeira hipótese nula, uma vez que a energia de superfície do esmalte foi alterada após a aplicação dos tensoativos independente da concentração (LSS e CAPB). Todos os tensoativos testados foram utilizados em concentrações maiores que a concentração micelar crítica (CMC) (Quadro 1). A CMC é a concentração máxima que os tensoativos podem ser usados sem que suas moléculas se reorganizem em micelas (Daltin, 2011; Bergstrom, 2015). Quando utilizados em concentração superior à CMC, suas moléculas não encontram superfícies livres para se ligarem e começam a se unir, formando estruturas esféricas ou cilíndricas. Quando em solução aquosa, a conformação dessas micelas tende a ser de um núcleo composto pelas cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas (tais cadeias se voltam para o centro, repelidas pela água) e o exterior formado pela cabeça polar da molécula (Bruce et al., 2002; Chun et al., 2015) (no caso do LSS, a cabeça é formada pelos íons sulfato, do CAPB pelos íons de nitrogênio, e do T20 pelo óxido de etileno).

Um estudo prévio mostrou que as micelas do LSS, por exemplo, apresentam uma superfície externa muito rugosa e com a tendência de expor cadeias de hidrocarbonetos no seu exterior. Contudo, devido ao menor número de íons sulfato presentes, ainda apresentam hidrofília e permitem a entrada de moléculas de água no seu interior (Chun et al., 2015). Assim, o aumento da molhabilidade da superfície do esmalte apresentado pelo LSS pode ser justificado pela presença de ligações dessas micelas com a hidroxiapatita. De fato, trabalhos mostram que o LSS tem alta afinidade pela hidroxiapatita, formando ligações entre o radical sulfato com os sítios de cálcio do esmalte (Barkvoll et al., 1988a; 1988b; Jones et al., 2014). Uma análise complementar qualitativa dos espectros do LSS foi realizada (dados não apresentados) com intuito de verificar a ocorrência de ligação entre o sulfato com o cálcio (pico 1280 cm^{-1}) (Barkvoll et al., 1988a), no entanto não houve o aparecimento de picos nessa região. Trabalhos futuros devem considerar a obtenção de espectros

também após o tratamento, previamente à formação da película, a fim de verificar a possível interação entre os agentes e o esmalte.

Com relação ao CAPB, quando em solução aquosa, possui a capacidade de reduzir a tensão superficial (Staszak et al., 2015). Corroborando, os dados de goniometria deste estudo indicam um aumento da molhabilidade do esmalte, e, portanto, aumento de sua energia de superfície, quando tratado com este agente. Ambas concentrações testadas do CAPB foram muito acima de sua CMC (Quadro 1), indicando a formação de micelas. Tendo sido utilizado em pH natural levemente ácido (Quadro 1) supõe-se a formação de micelas com características catiônicas e, portanto, com íons N^+ quaternários reativos. A possível interação eletrostática desses íons com o fosfato da hidroxiapatita (carga negativa) explica o aumento da hidrofília da superfície do esmalte, no entanto tentativas de identificar a presença dessas ligações foram realizadas pela análise dos espectros das amostras tratadas com esse agente, e não foram encontrados picos ou bandas sugestivas dessas ligações. Ainda, embora seja o agente da classe anfotérica mais comum, e um dos mais utilizados pela sua característica de baixa irritabilidade da mucosa (Rantanen et al., 2002; Staszak et al., 2015), estudos relacionando suas características com a hidroxiapatita não foram encontrados. Geralmente os estudos apresentam este tensoativo associado a outro composto, sendo estes empregados mais frequentemente como cotensoativos em formulações mais complexas (Róžańska, 2015).

Por último, com relação ao T20, seu comportamento micelar em solução aquosa indica uma estrutura com as cadeias de hidrocarbonetos voltadas para o centro (parte hidrófoba) e superfície externa composta pelas cabeças de etileno (parte hidrófila) (Kerwin, 2008). Os dados de goniometria mostraram que este agente não apresentou capacidade de alterar a energia de superfície do esmalte, sendo similar ao grupo controle (água). Embora a extensa busca da literatura não tenha retornado resultados sobre a interação desse agente com a hidroxiapatita, não pode se descartar sua deposição sobre a superfície do esmalte, devido ao seu alto peso molecular.

Com relação à formação da película adquirida, os resultados do presente estudo foram inconclusivos. Embora os resultados numéricos tenham mostrado um aumento da absorbância para todos os grupos (valores maiores que zero), e que poderia indicar formação de película adquirida semelhante entre eles (teste Kruskal-

Wallis $p>0.05$), verificou-se a presença de água nas amostras (Figura 21). A coincidência da banda OH^- com as bandas da amida I e II não permitiram a diferenciação entre proteínas e água, e, portanto, não se pode concluir que o aumento da absorbância observado é de fato pela presença de proteínas.

Estudos prévios quantificaram a formação de filme salivar em materiais protéticos (Imai, Tamaki, 1999) e cristais de hidroxiapatita (Elangovan et al., 2007), no entanto os autores não relataram se houve o tratamento na superfície das amostras para eliminação da água. Existem evidências de que a presença do LSS causa retardo na formação da película (Rykke et al., 1990), pela competição dos íons Na^+ com proteínas salivares, evitando a formação de ligações cruzadas entre as proteínas e delas com o esmalte, levando, assim, à formação de um filme salivar mais fino (Veeregowda et al., 2011). Os resultados desse estudo, no entanto, não indicaram presença de ligações do Na^+ ou do SO_4^{4-} com a superfície do esmalte, conforme previamente discutido.

Assim, estudos complementares devem ser realizados a fim de esclarecer o efeito dos tensoativos testados na adsorção de proteínas salivares no esmalte dental.

6.2 Erosão do esmalte

Como tensoativos são agentes comumente encontrados em produtos de higiene oral de uso contínuo (Salager, 2002); e, sendo o processo erosivo distinto em duas etapas: amolecimento do esmalte (*softening*), seguido de perda estrutural (Ganss et al., 2014), buscou-se um modelo de estudo *in vitro* que mimetizasse situações cotidianas (West et al., 2011). O modelo adotado contou com aplicação diária dos tensoativos duas vezes (totalizando 4 minutos), 6 desafios erosivos (totalizando 30 minutos) e formação de película adquirida 4 vezes entre eles por 2 horas (totalizando 8 horas). O modelo foi repetido por 5 dias a fim de promover efeito deletério mensurável no esmalte, e aumentar a compreensão dos resultados frente a desafios erosivos de longa duração (Barbour et al., 2011).

Na erosão inicial, foi testado duas condições distintas: remineralização e proteção. Na primeira, buscou-se avaliar a capacidade das soluções testadas,

associadas ao NaF, em promover a remineralização do *softening* (formado após a primeira imersão no ácido e caracterizado pela redução da dureza – KN2). Estudos prévios indicam que imersões em soluções com fluoretos levam à remineralização da estrutura dental amolecida (Amaechi, Higham, 2001; Ganss et al., 2001). Já a segunda condição (proteção) buscou avaliar se as soluções testadas foram capazes de manter a remineralização e/ou dificultar o aprofundamento do *softening* pela formação de precipitados que impedem o contato direto do ácido com o tecido amolecido (Petzold, 2001).

O ensaio de microdureza mostrou que as concentrações dos agentes testadas (1,0% e 1,5%), associados ao NaF, não influenciou no seu efeito remineralizador. No entanto, na condição de proteção dos tratamentos frente a novos desafios erosivos, os resultados de dureza mostraram que a concentração dos agentes foi significativa apenas quando o NaF não foi utilizado. Esta ausência de diferença entre as concentrações na presença do NaF indica que o efeito que o tensoativo exerce sobre o fluoreto não é dependente da concentração, mas sim da presença do próprio tensoativo. De fato, na condição de proteção do esmalte, o LSS e o CAPB a 1% apresentaram redução da dureza comparado à concentração de 1,5%, enquanto que o T20 apresentou comportamento contrário, com maiores valores de dureza quando utilizado na concentração mais baixa. Na perfilometria, essa condição se manteve, com o T20 apresentando menor perda quando utilizado na menor concentração.

Os dados de dureza após os tratamentos indicaram que os tensoativos não alteraram o efeito remineralizante do NaF, no entanto, os dados de dureza após o segundo desafio erosivo, mostraram que a presença dos tensoativos alterou o efeito protetor do fluoreto frente a novos desafios de desmineralização. O LSS, por exemplo, quando associado ao NaF, em ambas concentrações, promoveu redução dos valores da dureza na situação de proteção. Se tratando de um agente aniônico, a competição das micelas aniônicas com o fluoreto pelos sítios de cálcio pode explicar a redução da proteção do fluoreto de sódio. Os dados de flúor adsorvido na superfície do esmalte mostram que o LSS em ambas concentrações promoveu menor deposição de fluoreto do que o grupo controle. Corroborando, Barkvold et al. (1988b) mostram que o esmalte tratado com LSS apresentou menor deposição de fluoreto de sódio, e ainda, que a presença do tensoativo aumentou a solubilidade do fluoreto de cálcio formado. Como a formação de precipitados de fluoreto de cálcio sobre a superfície do esmalte é o

principal responsável pela proteção do fluoreto de sódio em situações erosivas (Petzold, 2001; Lussi et al., 2004; Magalhaes et al., 2009a), a interação dos tensoativos com o NaF é de fundamental importância. Acredita-se que os precipitados de CaF_2 formados na superfície do esmalte funcionariam como uma barreira de adição mineral a ser dissolvida em situações erosivas (Ganss et al., 2001; Larsen, Richards, 2002). No entanto a baixa concentração utilizada (275 ppm) pode não ter sido suficiente para formação dos precipitados globulares de CaF_2 , mas sim levado à deposição do fluoreto sobre a superfície da hidroxiapatita (Scaramucci et al., 2013). Ainda, evidências sugerem que a precipitação de CaF_2 ocorre predominantemente em baixo pH (Hellwig, Lussi, 2006), no entanto a concentração da solução de LSS foi utilizada em pH natural básico (10,5) como descrito no Quadro 1, e que também pode ter influenciado na ação do fluoreto de sódio. Mesmo ocorrendo diminuição da proteção e da deposição do NaF pela presença do LSS, os dados de perfilometria indicaram que tal associação não promoveu maior perda estrutural que o grupo controle positivo (NaF). Assim, embora o tensoativo exerça algum efeito deletério na proteção do fluoreto de sódio e possível redução da adsorção do flúor sobre a superfície, este efeito não se mantém em desafios erosivos sucessivos.

Estudos prévios indicam que o LSS possui grande afinidade pela hidroxiapatita (Barkvoll et al., 1988a; 1988b; Rykke et al., 1990), mesmo quando aplicado após a existência de biofilmes salivares, podendo assim atuar como barreira de proteção frente a ataques erosivos (Jones et al., 2014). No entanto, os resultados de microdureza do presente estudo não mostraram proteção desse agente em nenhuma concentração testada (valores similares ao grupo controle negativo), na erosão inicial. Os dados de perfilometria também indicaram resultado de perda similar entre o LSS e o grupo controle negativo, de forma que, ainda que tal barreira protetora se forme pela ligação do tensoativo com o esmalte, ela não é suficientemente eficiente para evitar sua desmineralização. Estudos de Jones et al. (2013, 2014) indicam que derivados aniônicos do lauril (lauril fosfato de sódio e lauril fosfato de potássio) possuem um comportamento protetor no esmalte promissor, sendo superiores ao LSS.

Com relação a interação do LSS com a película adquirida, Rykke et al. (1990) discutem sobre o retardo na formação da película promovido pelo LSS, enquanto Veeregowda et al. (2011) relatam a formação de um filme mais fino e com menor

capacidade de proteção contra desmineralização. Discute-se ainda que além da capacidade do LSS de se ligar a proteínas formadoras da película e evitar sua adsorção sobre superfícies orais, ele também é capaz de se ligar ao filme salivar e removê-lo da superfície do esmalte (Ash et al., 2014). Os resultados similares de dureza e de perfilometria entre os grupos do LSS e o grupo controle, indicam que não houve interferência do tensoativo na formação da película, uma vez que se este interferisse em sua formação, deveria promover um maior efeito deletério ao esmalte.

Com relação ao CAPB, a comparação dos agentes com o grupo controle negativo mostrou que ele foi capaz de proteger o esmalte contra a erosão inicial apenas quando utilizado na maior concentração (1,5%). Os resultados de perfilometria mostraram que o CAPB foi capaz de proteger o esmalte por si só, promovendo menor perda estrutural que o grupo controle negativo (água) e ainda não alterou a proteção do NaF, sendo similar ao grupo controle positivo (água + NaF). Os dados de flúor adsorvido mostram redução do fluoreto na superfície do esmalte quando este agente foi utilizado, reforçando a hipótese de ele por si só teria um efeito protetor. Os resultados encontrados pelo CAPB indicam uma possível interação com o esmalte, levando a formação de uma barreira que impede o contato direto do ácido com a superfície, promovendo assim sua proteção. Tal indicação de possível interação química do CAPB com a hidroxiapatita também foi evidenciada pelo ensaio de goniometria, e podem ocorrer entre as micelas catiônicas (Róžańska, 2015; Staszak et al., 2015) e os sítios aniônicos do esmalte, tais como o fosfato. Mesmo após extensas buscas na literatura, não se encontrou estudos avaliando a interação do CAPB com o esmalte ou a hidroxiapatita, de forma que a formação dessa barreira citada se trata de especulação, e estudos futuros são necessários para comprovar sua formação real. Os resultados promissores encontrados neste estudo para o CAPB indicam que este pode ser um agente promissor para formulações com finalidades antierosivas. Sua baixa toxicidade na mucosa oral foi demonstrada previamente (Rantanen et al., 2002), sendo utilizado em formulações de escolha em pacientes que possuem intolerância e irritabilidade ao LSS.

Com relação ao T20, os dados de proteção contra erosão inicial, encontrados no ensaio de dureza mostraram que este agente foi capaz de proteger o esmalte por si só em ambas concentrações testadas. No entanto sua interação com o NaF diminuiu os valores de dureza quando utilizado na maior concentração (1,5%). Já os

dados de perfilometria indicam que o efeito protetor promovido por este tensoativo só prevalece quando a menor concentração é utilizada, e sua associação ao NaF não influenciou seu efeito protetor, nem o efeito protetor do NaF. Apesar de extensos esforços, não foi encontrado na literatura estudos mostrando a interação desse agente com o esmalte. Pode-se especular que o T20 possivelmente funcionou como uma barreira de proteção do esmalte frente ao novo desafio erosivo. Seu alto peso molecular e formação de micelas pode indicar capacidade de adsorção sobre a superfície, mesmo sem promoção de ligações eletrostáticas que alterariam a energia de superfície.

Diante dos resultados discutidos pode-se negar a terceira, quarta e quinta hipóteses nulas, uma vez que a concentração dos tensoativos afetou a sua proteção, sua interação com o NaF e a formação de película adquirida durante o desenvolvimento do processo erosivo.

Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de quantificar a interação química entre os tensoativos testados e a hidroxiapatita do esmalte, bem como se o efeito protetor encontrado também prevalece sobre a dentina, e em situações clínicas, por meio de estudos *in situ*. Sendo agentes comumente utilizados em dentifrícios, estudo envolvendo abrasão também devem ser considerados no futuro.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as hipóteses testadas, conclui-se que:

- a) O LSS e o CAPB em ambas concentrações aumentaram a molhabilidade da superfície do esmalte, enquanto o T20 não promoveu alteração;
- b) Os tensoativos parecem não influenciar na formação de película adquirida, mas outros estudos específicos devem ser realizados;
- c) Os tensoativos, independente da concentração, não influenciam o potencial de remineralização do fluoreto de sódio, no entanto, o LSS nas duas concentrações e o T20 a 1,5% reduziram o seu efeito protetor contra a erosão inicial;
- d) O CAPB em ambas concentrações e o T20 a 1% reduziram o desgaste erosivo, e a associação deles com o NaF não promoveu alteração na perda de estrutura;
- e) Todos os agentes promoveram a redução da adsorção de flúor na superfície do esmalte (exceção para o T20 1,5%)

REFERENCIAS*

Addy M, Shellis RP. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:17-31. doi: 10.1159/000093348.

Agar N, Freeman S. Cheilitis caused by contact allergy to cocamidopropyl betaine in '2-in-1 toothpaste and mouthwash'. *Australas J Dermatol.* 2005;46(1):15-7. doi: 10.1111/j.1440-0960.2005.00129.x.

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

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res.* 1999;78(12):1821-8.

Amaral CM, Miranda ME, Correa DS, Silva EM. Sodium fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate cream plus sodium fluoride efficacy in preventing enamel erosion in a simulated oral environment study model. *Indian J Dent Res.* 2014;25(4):464-9. doi: 10.4103/0970-9290.142536.

Anido-Anido A, Amore R, Lewgoy HR, Anauate-Netto C, Silva TM, Gonçalves SEP. Comparative study of the bond strength to human and bovine dentin in three different depths. *Braz Dent Sci.* 2012;15(2):doi: <http://dx.doi.org/10.14295/bds.2012.v15i2.786>.

Ash A, Mulholland F, Burnett GR, Wilde PJ. Structural and compositional changes in the salivary pellicle induced upon exposure to SDS and STP. *Biofouling.* 2014;30(10):1183-97. doi: 10.1080/08927014.2014.977268.

Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:152-72. doi: 10.1159/000093361.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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. doi: 10.1007/s00784-009-0253-9.

Attin T, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. *Caries Res*. 2000;34(1):48-52. doi: 16569.

Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. *Caries Res*. 2001;35(3):216-22. doi: 47459.

Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1997;42(3):243-50. doi: 10.1016/0003-9969(06)00073-2.

Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. *J Dent*. 2007;35(10):773-7. doi: 10.1016/j.jdent.2007.07.007.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:123-42. doi: 10.1159/000360355.

Barbour ME, Lussi A. Erosion in relation to nutrition and the environment. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:143-54. doi: 10.1159/000359941.

Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:24-32. doi: 10.1159/000325917.

Barkvoll P, Embery G, Rolla G. Studies on the interaction between sodium lauryl sulfate and hydroxyapatite using Fourier transformed infrared spectroscopy. *J Biol Buccale*. 1988a;16(2):75-9.

Barkvoll P, Rolla G, Lagerlof F. Effect of sodium lauryl sulfate on the deposition of alkali-soluble fluoride on enamel in vitro. *Caries Res*. 1988b;22(3):139-44.

Barreto BCF. Avaliação comparativa da resistência a flexão, módulo flexural e rigidez das dentinas humana e bovina [dissertação]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2009.

Bartlett D. The implication of laboratory research on tooth wear and erosion. *Oral Dis.* 2005;11(1):3-6. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01063.x.

Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:119-39. doi: 10.1159/000093359.

Bergstrom LM. Explaining the growth behavior of surfactant micelles. *J Colloid Interface Sci.* 2015;15(440):109-18. doi: 10.1016/j.jcis.2014.10.054.

Borges AB, Scaramucci T, Lippert F, Zero DT, Hara AT. Erosion protection by calcium lactate/sodium fluoride rinses under different salivary flows in vitro. *Caries Res.* 2014;48(3):193-9. doi: 10.1159/000355611.

Borges AB, Torres CR, de Souza PA, Caneppele TM, Santos LF, Magalhaes AC. Bleaching gels containing calcium and fluoride: effect on enamel erosion susceptibility. *Int J Dent.* 2012;2012:347848. doi: 10.1155/2012/347848.

Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *J Dent.* 2013;41(5):428-35. doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.011.

Bruce CD, Berkowitz ML, Perera L, Forbes MDE. Molecular Dynamics Simulation of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Water: Micellas Structural Characteristics and Counterion Distribution. *J Phys Chem.* 2002;106(15):3788-93.

Busscher HJ, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Poortinga AT, van der Mei HC. Influence of oral detergents and chlorhexidine on soft-layer electrokinetic parameters of the acquired enamel pellicle. *Caries Res.* 2003;37(6):431-6. doi: 73395.

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

Buzalaf MA, Magalhaes AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:244-52. doi: 10.1159/000360557.

Caetano Junior PC, Strixino JF, Raniero L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Res Biomed Eng.* 2015;31(2):116-24.

Caneppele TM, Jeronymo RD, Di Nicolo R, de Araujo MA, Soares LE. In Vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Braz Dent J*. 2012;23(4):373-8.

Carvalho TS, Baumann T, Lussi A. In vitro salivary pellicles from adults and children have different protective effects against erosion. *Clin Oral Investig*. 2016;20(8):1973-9. doi: 10.1007/s00784-015-1703-1.

Caslavska V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol*. 1975;20(5-6):333-9.

Castanho GM, Marques MM, Marques JB, Camargo MA, De Cara AA. Micromorphological and hardness analyses of human and bovine sclerotic dentin: a comparative study. *Braz Oral Res*. 2011;25(3):274-9. doi: S1806-83242011000300014.

Cheab Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res*. 2011;45(2):107-12. doi: 10.1159/000324803.

Chun BJ, Choi JI, Jang SS. Molecular dynamics simulation study of sodium dodecyl sulfate micelle: Water penetration and sodium dodecyl sulfate dissociation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2015;474:36-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.002>.

Comar LP, Salomão PMA, Souza BM, Magalhaes AC. Dental Erosion: an overview on definition, prevalence, diagnosis and therapy. *Braz Dent S*. 2013;16(1):6-17.

Daltin D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. In: Daltin D. Introdução e primeiros conceitos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda; 2011. p. 1-44.

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, et al. Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *J Dent*. 2015a;43(5):583-8. doi: 10.1016/j.jdent.2015.02.001.

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MC, et al. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. *J Dent*. 2015b;43(12):1470-5. doi: 10.1016/j.jdent.2015.10.009.

Duke SA, Forward GC. The conditions occurring in vivo when brushing with toothpastes. *Br Dent J*. 1982;152(2):52-4.

Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res.* 2008;28(5):299-303. doi: 10.1016/j.nutres.2008.03.001.

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. doi: 47458.

Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M. Ultrasonication as a method to study enamel demineralisation during acid erosion. *Caries Res.* 2000;34(4):289-94. doi: 16604.

Elangovan S, Margolis HC, Oppenheim FG, Beniash E. Conformational changes in salivary proline-rich protein 1 upon adsorption to calcium phosphate crystals. *Langmuir.* 2007;23(22):11200-5. doi: 10.1021/la7013978.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76. doi: 10.1159/000093351.

Fisher WS, Gambogi JR, Joziak TM, Tavss AE, inventores; Colgate-Palmolive Company, empresa. Dual component dentifrice composition for fluoridating teeth patent. US5723107 A. 1998 Mar 03.

Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GA, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004;49(11):919-22. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.05.006

Gallagher W. FTIR analysis of protein structure [Internet] [acesso em 2015 Jan 30] Disponível em: http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf.

Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:9-16. doi: 10.1159/000093344.

Ganss C. Is erosive tooth wear an oral disease? *Monogr Oral Sci.* 2014;25:6-21. doi: 10.1159/000359931.

Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001;35(5):325-30. doi: 47470.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:32-43. doi: 10.1159/000093349.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:22-31. doi: 10.1159/000359935.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:99-107. doi: 10.1159/000359939.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42(1):2-7. doi: 10.1159/000111743.

Ganss C, Schulze K, Schlueter N. Toothpaste and erosion. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:88-99. doi: 10.1159/000350475.

Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 Pt 2):207-14.

Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):2-13. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00180.x.

Hannig M. The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J.* 2002;52:417-23.

Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 1999;3(2):88-95.

Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1999;33(5):372-9. doi: 16536.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res.* 2001;35(2):142-8. doi: 47446.

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 Investig.* 2003;7(3):158-61. doi: 10.1007/s00784-003-0219-2.

Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res*. 2006a;85(7):612-6.

Hara AT, Lippert F, Zero DT. Interplay between Experimental Dental Pellicles and Stannous-Containing Toothpaste on Dental Erosion-Abrasion. *Caries Res*. 2013;47(4):325-9. doi: 10.1159/000347051.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci*. 2006b;20:88-99. doi: 10.1159/000093355.

Hellwig E, Lussi A. Oral hygiene products and acidic medicines. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:112-8. doi: 10.1159/000093358.

Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M. Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin Periodontol*. 2003;30(9):802-8.

Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5(6):1714-28. doi: 10.1002/pmic.200401037.

Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:60-8. doi: 10.1159/000325947.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:230-43. doi: 10.1159/000360555.

Imai Y, Tamaki Y. Measurement of adsorption of salivary proteins onto soft denture lining materials. *J Prosthet Dent*. 1999;82(3):348-51.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:44-65. doi: 10.1159/000093350.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:55-73. doi: 10.1159/000360973.

Jager DH, Vieira AM, Ligtenberg AJ, Bronkhorst E, Huysmans MC, Vissink A. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res*. 2011;45(6):532-7. doi: 10.1159/000331938.

Jager DH, Vissink A, Timmer CJ, Bronkhorst E, Vieira AM, Huysmans MC. Reduction of erosion by protein-containing toothpastes. *Caries Res.* 2013;47(2):135-40. doi: 10.1159/000344016.

Joiner A. The Cleaning of Teeth. In: Johansson, I, Semasundaran P. Handbook for cleaning/decontamination of surfaces. Amsterdam: Elsevier; 2007.

Joiner A, Schafer F, Naeeni MM, Gupta AK, Zero DT. Remineralisation effect of a dual-phase calcium silicate/phosphate gel combined with calcium silicate/phosphate toothpaste on acid-challenged enamel in situ. *J Dent.* 2014;42 Suppl 1:S53-9. doi: 10.1016/S0300-5712(14)50008-5.

Jones SB, Barbour ME, Shellis RP, Rees GD. Interactions between dodecyl phosphates and hydroxyapatite or tooth enamel: relevance to inhibition of dental erosion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;117:193-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.024.

Jones SB, Rees GD, Shellis RP, Barbour ME. The effect of monoalkyl phosphates and fluoride on dissolution of hydroxyapatite, and interactions with saliva. *Caries Res.* 2013;47(5):355-63. doi: 10.1159/000348594.

Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2924-35. doi: 10.1002/jps.21190.

Kitchens M, Owens BM. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high energy drinks, and bottled water on the in vitro erosion characteristics of dental enamel. *J Clin Pediatr Dent.* 2007;31(3):153-9.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res.* 2006;40(2):148-53. doi: 10.1159/000091062.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res.* 1990;69 (Spec No):575-80; discussion 634-6.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res.* 2002;36(1):75-80. doi: 57595.

Laurance-Young P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJ, et al. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical

behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *J Dent*. 2011;39(4):266-72. doi: 10.1016/j.jdent.2011.01.008.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res*. 2000;14:22-8.

Li H, Zou Y, Ding G. Dietary factors associated with dental erosion: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(8):e42626. doi: 10.1371/journal.pone.0042626.

Lubarsky GV, D'Sa RA, Deb S, Meenan BJ, Lemoine P. The role of enamel proteins in protecting mature human enamel against acidic environments: a double layer force spectroscopy study. *Biointerphases*. 2012;7(1-4):14. doi: 10.1007/s13758-011-0014-6.

Lussi A. Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:1-8. doi: 10.1159/000093343.

Lussi A, Bossen A, Hoschele C, Beyeler B, Megert B, Meier C, et al. Effects of enamel abrasion, salivary pellicle, and measurement angle on the optical assessment of dental erosion. *J Biomed Opt*. 2012;17(9):97009-1. doi: 10.1117/1.JBO.17.9.097009.

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:1-15. doi: 10.1159/000360380.

Lussi A, Hellwig E. Erosive potential of oral care products. *Caries Res*. 2001;35 Suppl 1:52-6. doi: 49111.

Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and preventive measures. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:190-9. doi: 10.1159/000093363.

Lussi A, Jaeggi T. Chemical factors. *Monogr Oral Sci*. 2006a;20:77-87. doi: 10.1159/000093353.

Lussi A, Jaeggi T. The erosive potential of various oral care products compared to foodstuffs and beverages. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2001;111(3):274-81.

Lussi A, Jaeggi T. Occupation and sports. *Monogr Oral Sci*. 2006b;20:106-11. doi: 10.1159/000093357.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44. doi: 10.1159/000074360.

Lussi A, Jaggi T, Scharer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12. doi: 10.1159/000325915.

Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2007;41(1):77-9. doi: 10.1159/000096110.

Magalhaes AC, Rios D, Honorio HM, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on the erosion of permanent and deciduous human enamel: an in situ/ex vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2009a;17(1):56-60.

Magalhães AC, Wiegand A, Buzalaf MA. Use of dentifrices to prevent erosive tooth wear: harmful or helpful? *Braz Oral Res.* 2014;28 Spec No 1:1-6.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:158-70. doi: 10.1159/000325167.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Honorio HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009b;17(2):75-86.

Margaritis V, Mamai-Homata E, Koletsi-Kounari H. Novel methods of balancing covariates for the assessment of dental erosion: a contribution to validation of a synthetic scoring system for erosive wear. *J Dent.* 2011;39(5):361-7. doi: 10.1016/j.jdent.2011.02.007.

Martins C, Castro GF, Siqueira MF, Xiao Y, Yamaguti PM, Siqueira WL. Effect of dialyzed saliva on human enamel demineralization. *Caries Res.* 2013;47(1):56-62. doi: 10.1159/000343574.

Masson N, Domingues RR, Cury JA, Paes Leme AF. Acidulated Phosphate Fluoride Application Changes the Protein Composition of Human Acquired Enamel Pellicle. *Caries Res.* 2013;47(3):251-8. doi: 10.1159/000346280.

Masters J, Pilch S, Sullivan R, inventors; Colgate-Palmolive Company, empresa. Anti-erosion toothpaste composition. CA2780349 C. 2010 Dez 17.

Maupome G, Diez-de-Bonilla J, Torres-Villasenor G, Andrade-Delgado LC, Castano VM. In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in a cola drink. *Caries Res.* 1998;32(2):148-53.

Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1991;25(1):1-6.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 Pt 2):199-206.

Mikkonen JJ, Raittila J, Rieppo L, Lappalainen R, Kullaa AM, Myllymaa S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Photoacoustic Spectroscopy for Saliva Analysis. *Appl Spectrosc.* 2016; 70(9):1502-10. doi: 10.1177/0003702816654149.

Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, et al. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. *Caries Res.* 2014;48(1):57-62. doi: 10.1159/000352042.

Moezizadeh M, Alimi A. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste and sodium fluoride mouthwash on the prevention of dentine erosion: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2014;17(3):244-9. doi: 10.4103/0972-0707.131787.

Moore C, Addy M. Wear of dentine in vitro by toothpaste abrasives and detergents alone and combined. *J Clin Periodontol.* 2005;32(12):1242-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00857.x.

Moore C, Addy M, Moran J. Toothpaste detergents: a potential source of oral soft tissue damage? *Int J Dent Hyg.* 2008;6(3):193-8. doi: 10.1111/j.1601-5037.2008.00307.x.

Morge S, Adamczak E, Linden LA. Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. *Arch Oral Biol.* 1989;34(8):669-74.

Moron BM, Miyazaki SS, Ito N, Wiegand A, Vilhena F, Buzalaf MA, et al. Impact of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on tooth erosion/abrasion in vitro. *Aust Dent J.* 2013;58(1):106-11. doi: 10.1111/adj.12016.

Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res.* 2003;37(3):225-31. doi: 70449.

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.

Nihei T, Omoto N, Ohashi K, Kondo Y, Yoshino N, Teranaka T. Effect of enamel surface modification by novel aqueous phosphate-type fluoride surfactants. *Dent Mater J.* 2013;32(1):83-7.

Ogeda TL. (Instituto de Química, Universidade de São Paulo). Experimento proposto: ângulos de contato [Internet]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo [acesso em 2016 Jul 30]; 2010. Disponível em: http://www2.iq.usp.br/pos-graduacao/images/documentos_pae/1sem2010/fisico_quimica/thais.pdf

Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res.* 2001;35 Suppl 1:45-51. doi: 49110.

Rantanen I, Nicander I, Jutila K, Ollmar S, Tenovuo J, Soderling E. Betaine reduces the irritating effect of sodium lauryl sulfate on human oral mucosa in vivo. *Acta Odontol Scand.* 2002;60(5):306-10.

Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SR. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent.* 2004;6(2):117-21.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2006;40(3):218-23. doi: 10.1159/000092229.

Róžańska S. Rheology of wormlike micelles in mixed solutions of cocoamidopropyl betaine and sodium dodecylbenzenesulfonate. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015;482:394-402. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.045>.

Rugg-Gunn A, Banoczy J. Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use. *Acta Med Acad.* 2013;42(2):168-78. doi: 10.5644/ama2006-124.84.

Rykke M, Rolla G, Sonju T. Effect of sodium lauryl sulfate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res*. 1990;98(2):135-43.

Salager J-L. Surfactants - types and uses. In: Salager J-L. FIRP Booklet #300A. [Internet] Venezuela: Laboratório FIRP [acesso em 2015 Jan 30]; 2002. Disponível em: <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>

Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Frank NE, Hara AT. Sodium fluoride effect on erosion-abrasion under hyposalivatory simulating conditions. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1457-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.06.004.

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. doi: 10.1016/j.jdent.2011.09.004.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000;45(5):355-61. doi: S0003-9969(00)00006-6 [pii].

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. doi: 10.1159/000326819.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? *Adv Dent Res*. 2012;24(2):68-71. doi: 10.1177/0022034512449836.

Schlueter N, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Ganss C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2010;68(3):180-4. doi: 10.3109/00016350903555395.

Schmidt-Nielsen B. The solubility of tooth substance in relation to the composition of saliva. *Acta Odontol Scand*. 1946;72:1-13.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:32-45. doi: 10.1159/000359936.

Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:163-79. doi: 10.1159/000359943.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:69-77. doi: 10.1159/000325971.

Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One.* 2012a;7(8):e42204. doi: 10.1371/journal.pone.0042204.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012b;91(12):1110-8. doi: 10.1177/0022034512462578.

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res.* 2007;6(6):2152-60. doi: 10.1021/pr060580k.

Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995;53(6):358-62.

Soares CJ, Barbosa LM, Santana FR, Soares PB, Mota AS, Silva GR. Fracture strength of composite fixed partial denture using bovine teeth as a substitute for human teeth with or without fiber-reinforcement. *Braz Dent J.* 2010;21(3):235-40. doi: S0103-64402010000300011 [pii].

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 1994;28(4):227-32.

Staszak K, Wieczorek D, Michocka K. Effect of Sodium Chloride on the Surface and Wetting Properties of Aqueous Solutions of Cocamidopropyl Betaine. *J Surfactants Deterg.* 2015;18(2):321-8. doi: 10.1007/s11743-014-1644-8.

Strand R, inventor. The Procter and Gamble Company, empresa. Oral care compositions which comprises stannous and potassium salts patent. EP2338464 A2. 2010 Jul 19.

Sullivan R, Rege A, Corby P, Klaczany G, Allen K, Hershkowitz D, et al. Evaluation of a dentifrice containing 8% arginine, calcium carbonate, and sodium monofluorophosphate to repair acid-softened enamel using an intra-oral remineralization model. *J Clin Dent.* 2014;25(1 Spec No A):A14-9.

Svendsen IE, Arnebrant T, Lindh L. Validation of mechanically-assisted sodium dodecyl-sulphate elution as a technique to remove pellicle protein components from human enamel. *Biofouling*. 2008;24(4):227-33. doi: 10.1080/08927010802018277.

Taube F, Ylmen R, Shchukarev A, Nietzsche S, Noren JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent*. 2010;38(1):72-81. doi: 10.1016/j.jdent.2009.09.006.

ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2 Pt 2):241-4.

Torres CP, Chinelatti MA, Gomes-Silva JM, Rizoli FA, Oliveira MA, Palma-Dibb RG, et al. Surface and subsurface erosion of primary enamel by acid beverages over time. *Braz Dent J*. 2010;21(4):337-45.

Torres CR, Rosa PC, Ferreira NS, Borges AB. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on microhardness of enamel carious lesions. *Oper Dent*. 2012;37(4):363-9. doi: 10.2341/11-070-L.

Turssi CP, Messias DC, Hara AT, Hughes N, Garcia-Godoy F. Brushing abrasion of dentin: effect of diluent and dilution rate of toothpaste. *Am J Dent*. 2010;23(5):247-50.

van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, Geertsema-Doornbusch GI, Busscher HJ. Surface thermodynamic homeostasis of salivary conditioning films through polar-apolar layering. *Clin Oral Investig*. 2012;16(1):109-15. doi: 10.1007/s00784-011-0514-2.

van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, et al. Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(6):434-8.

Veeregowda DH, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Influence of fluoride-detergent combinations on the visco-elasticity of adsorbed salivary protein films. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(1):21-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00798.x.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2014;59(6):631-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.002.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and

adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;1):CD007868. doi: 10.1002/14651858.CD007868.pub2.

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. doi: 10.1159/000325945.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res.* 2006;40(3):213-7. doi: 10.1159/000092228.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:53-9. doi: 10.1159/000325946.

Wiegand A, Schlueter N. The role of oral hygiene: does toothbrushing harm? *Monogr Oral Sci.* 2014;25:215-9. doi: 10.1159/000360379.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011;53(3):273-82. doi: JST.JSTAGE/josnurd/53.273 [pii].

Yilmaz Z, Basbag B, Buzoglu HD, Gumusderelioglu M. Effect of low-surface-tension EDTA solutions on the wettability of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(1):109-14. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.08.008.

Young A, Tenuta LM. Initial erosion models. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:33-42. doi: 10.1159/000325943.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res.* 1976;55(4):664-70.

Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1978;57(11-12):1036-42.

Zero DT. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health.* 2006;16(6 Suppl1):S9. doi: 10.1186/1472-6831-6-S1-S9.

Zero DT, Lussi A. Behavioral factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:100-5. doi: 10.1159/000093356.

Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, Siqueira WL. Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):920-34. doi: 10.3390/ijms14010920.

APÊNDICE A - Teste de reprodutibilidade e confiabilidade do perfilômetro

Para análise de perda estrutural deste estudo foram realizados testes de precisão e reprodutibilidade do método no perfilômetro de contato (MaxSurf XT 20, Mahr-Göttingen, Alemanha). O equipamento foi montado sobre uma mesa com redução de vibração e equipado com um dispositivo fabricado sob medida, que permite o reposicionamento das amostras para medidas sucessivas. A leitura dos perfis foi realizada com uma ponta de 2 μm com contato.

Determinação da vibração (background noise)

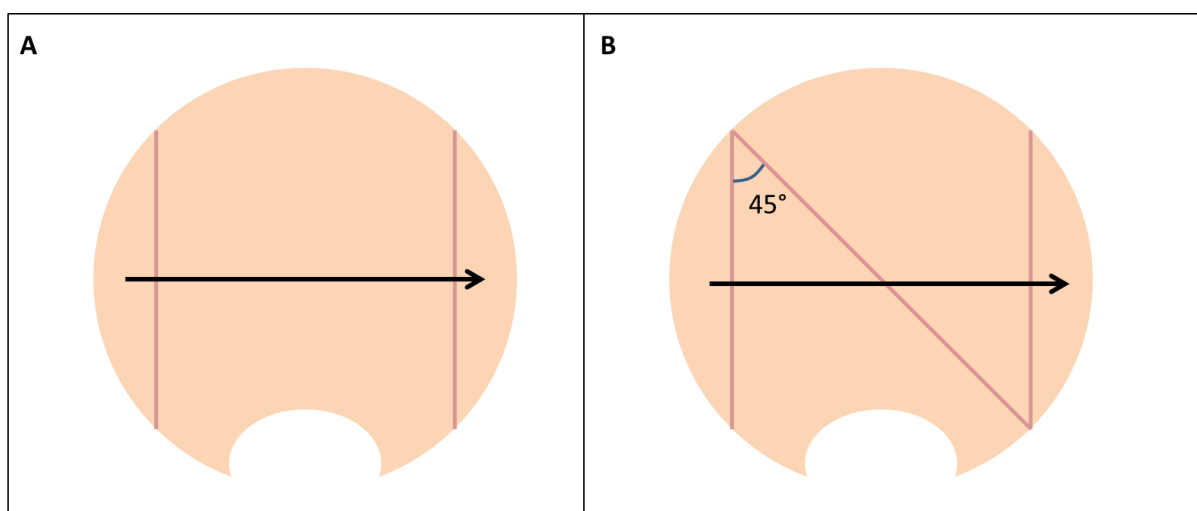
Para determinação da vibração do aparelho foram realizadas 5 leituras consecutivas de aproximadamente 20 segundos com a ponta de contato estacionada (sem apalpe) permitindo que o deslocamento vertical da mesma fosse detectado de acordo com as vibrações e ruídos do laboratório (Ra e Rz). Seguindo o guia para análises bioanalíticas descrito por Attin et al. (2009), o limite mínimo de mensuração do aparelho deve ser a média mais três vezes o desvio-padrão. Após a quinta mensuração, obteve-se uma média de 0,0068 e desvio-padrão de 0,0005 para o parâmetro Ra, e média de 0,0459 e desvio-padrão de 0,0033 para o parâmetro Rz. Portanto, seguindo a fórmula proposta, o deslocamento mínimo detectado pelo aparelho utilizado neste trabalho foi de 0,008 μm para Ra e 0,056 μm para Rz. Valores menores que estes devem ser considerados abaixo do limite de detecção.

Confecção das amostras

A determinação da reprodutibilidade das leituras e reposicionamentos das amostras medidas pelo perfilômetro foi obtida a partir de 8 amostras de resina composta confeccionadas com a matriz de silicone utilizada no experimento principal. As amostras foram polidas, sob refrigeração com água, com lixas de carbeto de silício de granulação #600/1200 por 15 segundos, seguidas por granulação #1200/2400 e #2400/4000 durante 60 segundos e 120 segundos, respectivamente.

Utilizando o dispositivo pré-fabricado mostrado na Figura 15, dois riscos laterais e paralelos entre si foram feitos em quatro amostras a fim de criar duas ranhuras para facilitar o reposicionamento dos perfis após as medidas. A Figura 25A ilustra essas ranhuras em vermelho. Nas outras quatro amostras, além das ranhuras laterais, uma outra ranhura foi produzida cruzando os riscos laterais em 45 graus, conforme mostra a Figura 25B.

Figura 25 – Esquema de ranhuras confeccionada nas amostras



Legenda: a) ranhuras laterais em vermelho na amostra de resina; b) ranhuras laterais e oblíqua em 45 graus na amostra de resina. As setas pretas indicam o sentido de leitura dos perfis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Teste de reprodutibilidade das medidas

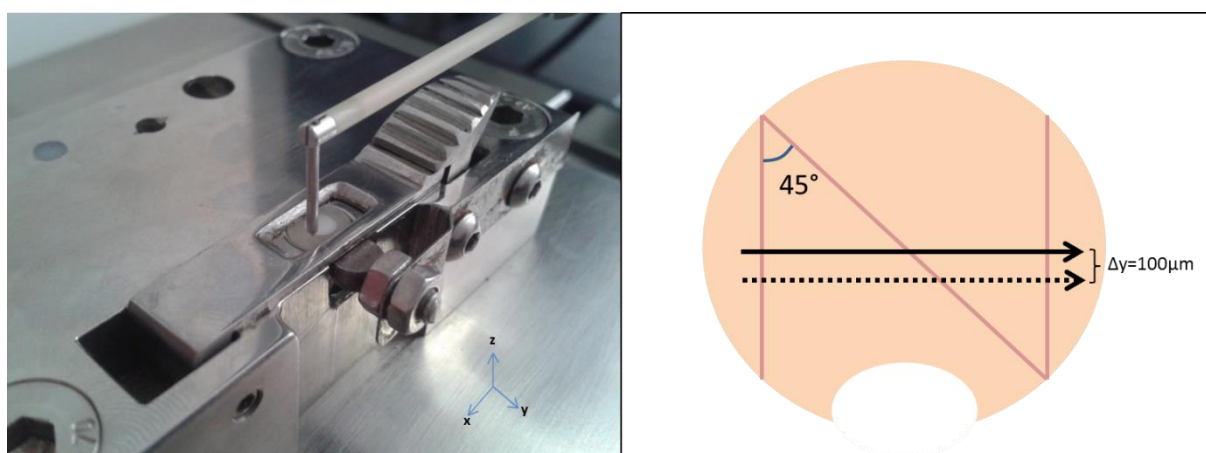
Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade das medidas obtidas pelo perfilômetro, foi obtido o perfil inicial das quatro amostras com apenas dois riscos laterais. Após a obtenção do perfil inicial no centro da amostra, cinco medidas consecutivas foram feitas sem remover a amostra do dispositivo de reposicionamento. A reprodutibilidade das medidas foi obtida calculando a diferença de altura (diferença vertical) entre cada um dos cinco perfis medidos com o perfil inicial. Ou seja, os perfis foram sobrepostos e a altura resultante da diferença entre eles determinou a sua diferença vertical.

O desvio-padrão calculado a partir das cinco medidas repetidas na mesma amostra foi usado como forma de comparação da reprodutibilidade das mensurações. Portanto, quanto menor o desvio-padrão entre as diversas medições, maior a reprodutibilidade e mais confiável o método. A média do desvio-padrão das medidas foi de $0,034 \mu\text{m}$ ($\pm 0,001$). Isso significa que o aparelho utilizado apresenta uma sensibilidade de leitura média de 34 nanômetros, sem considerar o reposicionamento das amostras.

Teste de reposicionamento das amostras

Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do reposicionamento das amostras no perfilômetro, foram utilizadas as quatro amostras com os dois riscos laterais e o risco oblíquo (Figura 25B). Após a obtenção do perfil inicial das amostras, a ponta de contato foi movimentada em $100 \mu\text{m}$ no eixo y do equipamento e um novo perfil obtido (Figura 26). As amostras foram removidas do dispositivo do aparelho e recolocadas para novas obtenções dos perfis. Este processo foi repetido cinco vezes para cada amostra.

Figura 26- Posicionamento e esquema de leituras das amostras no perfilômetro

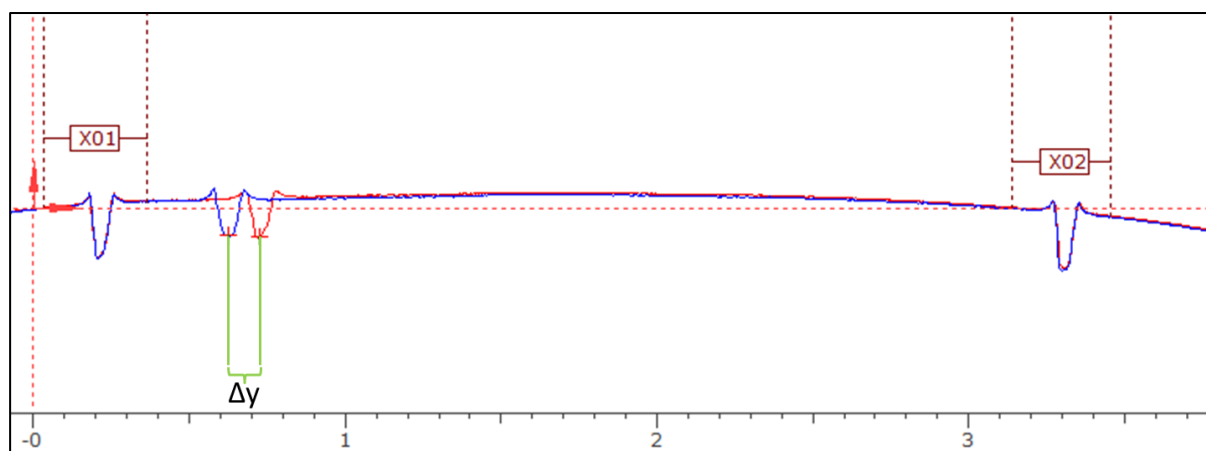


Legenda: A foto da esquerda ilustra os três eixos do equipamento e a foto da direita mostra um esquema das leituras com $100 \mu\text{m}$ de distância quando o equipamento era movido no eixo y (Δy).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A determinação da precisão do movimento do aparelho no eixo y se faz necessária quando vários perfis são obtidos na mesma amostra, garantindo que as leituras sejam equidistantes entre si. A ranhura em 45 graus nas amostras permitiu que a movimentação da ponta do aparelho em 100 μm no eixo y produzisse um intervalo entre os dois picos (Δy) de também 100 μm , como ilustrado na Figura 27.

Figura 27 – Sobreposição dos perfis inicial e final



Legenda: Perfil inicial (vermelho) e Perfil final (azul) mostrando que a movimentação em 100 μm da ponta de contato deveria resultar em uma distância de 100 μm entre os dois picos (Δy) formados pela ranhura em 45 graus.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A confiabilidade e reprodutibilidade do reposicionamento também foram averiguadas pelo cálculo do desvio-padrão. Após a obtenção do desvio-padrão entre as cinco medidas repetidas na mesma amostra, calculou-se a média deles e o valor encontrado foi de 4,475 μm . Isso significa que o dispositivo utilizado para reposicionamento da amostra apresenta um “erro” de aproximadamente 5 μm , de forma que em leituras repetidas em uma mesma amostra, os perfis consecutivos podem estar deslocados em 5 μm do perfil inicial. Pode-se considerar este valor como muito baixo, visto que a distância utilizada para a leitura dos perfis neste estudo foi de 250 μm .

Teste de confiabilidade do método para desgaste erosivo em esmalte e dentina

Amostras de esmalte e dentina (n=4) foram cortadas, embutidas em resina acrílica e polidas de acordo com o método previamente descrito. O perfil inicial de todas foi mensurado no perfilômetro da mesma forma anteriormente descrita. No centro de cada amostra foram medidos cinco perfis iniciais (Pi1, Pi2, Pi3, Pi4, Pi5), removendo e recolocando as amostras no dispositivo (reposicionamento) entre cada leitura.

A fim de provocar o desgaste erosivo, todas as amostras foram imersas em Sprite Zero® (1 hora para dentina e 4 horas para esmalte) e lavadas em água deionizada na sequência. Após o desafio erosivo, as amostras foram reposicionadas no dispositivo do equipamento e novas leituras foram realizadas. Foram realizadas cinco leituras de perfis (Pf) em cada amostra e cada uma foi também reposicionada cinco vezes no aparelho. Dessa forma o Pi1 foi comparado com o Pf1.1, Pf1.2, Pf1.3, Pf1.4 e Pf1.5; o Pi2 foi comparado com o Pf2.1, Pf2.2, Pf2.3, Pf2.4 e Pf2.5, e assim por diante.

A reprodutibilidade da leitura foi determinada pela média do desvio-padrão das cinco leituras de cada amostra. Para dentina o valor encontrado foi de 0,338 μm e para esmalte de 0,153 μm . Isso significa que a sensibilidade de detecção de perda do aparelho (profundidade de leitura) varia para cada substrato e valores de perda menores que 338 nanômetros para dentina e 153 nanômetros para esmalte devem ser considerados abaixo do nível de detecção do equipamento, e, portanto, não devem ser consideradas, ou seja, não diferentes de zero.

ANEXO A - Certificado Comitê de Ética e Pesquisa com Animais

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9086
Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br / tango@fosjc.unesp.br

**CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais**

São José dos Campos, 29 de maio de 2013

Ofício nº 06/2013/CEP/a

Prezada Senhora

Esclarecemos que não há necessidade do projeto intitulado **"Influência de diferentes agentes surfactantes no efeito protetor da película no desenvolvimento da erosão dental"** de sua responsabilidade ser analisado por este Comitê, porque a pesquisa em tela não envolve a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei "Arouca".

Atenciosamente,

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

Profa. Dra.ALESSANDRA BÜLHER BORGES
Depart.de Odontologia Restauradora
Do Instituto de Ciência e Tecnologia – Campus de
São José dos Campos - UNESP

ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AGENTES SURFACTANTES NO EFEITO PROTETOR DA PELÍCULA NO DESENVOLVIMENTO DA EROÇÃO DENTAL

Pesquisador: Alessandra Buhler Borges

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17375113.1.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 367.946

Data da Relatoria: 13/08/2013

Apresentação do Projeto:

Adequado

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação da influência de diferentes agentes surfactantes em relação ao efeito protetor da película adquirida no desenvolvimento da erosão dental e sua influência na relação existente entre o esmalte e o flúor

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta de saliva é um procedimento simples, indolor e sem riscos aos voluntários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os dados foram adequados conforme solicitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE apresentado é adequado, uma vez que informa aos voluntários a ausência de risco e a que se destina a saliva.

Recomendações:

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 367.946

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequação realizada

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da relatora

SAO JOSE DOS CAMPOS, 22 de Agosto de 2013

Assinador por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Alessandra Bühler Borges, Professora Assistente Doutora do Departamento de Odontologia Restauradora da UNESP - Campus de São José dos Campos - Faculdade de Odontologia, à Av. Eng.º Francisco José Longo, 777 – São José dos Campos - SP, telefone para contato nº 012-3947-9051, vou coordenar a pesquisa: *“Influência de diferentes agentes tensoativos no efeito protetor da película no desenvolvimento da erosão dental”*.

O objetivo desse trabalho será comparar diferentes tipos de detergentes usados em pastas dentais com relação à erosão dental. A hipótese em investigação será a de que o tipo e a concentração do detergente não alteram o efeito protetor da película adquirida e a liberação de flúor, com relação à erosão do esmalte dental. A realização do presente estudo envolve o uso de saliva humana para simulação da condição bucal em estudos laboratoriais. Serão coletados cerca de 50 ml de saliva, em tubos plásticos estéreis, no período da manhã, na Faculdade de Odontologia da UNESP por membros da equipe do projeto. O procedimento é simples, indolor e sem envolvimento de riscos aos voluntários.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9006, e comunique-se com Carlos Guedes. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido devidamente esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

São José dos Campos, ____ de _____ de 20__.

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos

R.G. _____

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador