

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

**FLÁVIA DE MORAES ITALIANI**

**Efeito do íon ferro na prevenção da erosão dentária:  
*estudos in vitro e in situ***

**BAURU**

**2010**



**FLÁVIA DE MORAES ITALIANI**

**Efeito do íon ferro na prevenção da erosão dentária:  
*estudos in vitro e in situ***

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia e Biologia Oral (opção Biologia Oral)  
Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

**BAURU**

**2010**

It1e

Italiani, Flávia de Moraes

Efeito do íon ferro na prevenção da erosão dentária: estudos *in vitro* e *in situ* / Flávia de Moraes Italiani. – Bauru, 2010.

122 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP  
Protocolo nº: 138/2006  
Data: 30/11/2006











## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais, a quem devo tudo, **Edson** e **Regina**, ao meu irmão, **Bruno**, aos meus avós **Clóvis** e **Petronilha** (in memorian), **José** (in memorian) e **Ermelinda** (in memorian), que sempre acreditaram em mim, e que sempre, sempre, fizeram o possível e o impossível para que minha vida fosse leve e livre de qualquer tipo de impedimentos para que eu pudesse fazer o que mais me fizesse feliz, ao **Fábio** e à **Jully**, minha pequena família em Bauru, que foram meus companheiros durante esta jornada e que são os amores da minha vida.*

*A todos vocês minha eterna gratidão.*

*“Se contornei obstáculos, se consegui vitórias e se aqui estou, com certeza, foi porque tenho pais, irmão, avós e namorado maravilhosos, que me deram todo apoio e demonstraram o melhor exemplo de honestidade, trabalho, esforço e um amor incondicional por mim.” Modificado de Thiemi Kato*

*Amo muito todos vocês.*



## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente gostaria de dizer que como fiz Doutorado Direto não tive ainda a oportunidade de agradecer a todos que contribuíram na minha formação tanto pessoal como científica, contudo esse meu capítulo de agradecimentos será um tanto quanto extenso.*

*Pode parecer estranho ter tantas pessoas para lembrar, falar e agradecer, mas é que, às vezes, mesmo aquelas pessoas com quem eu não tenho um contato diário, alguma vez, ou uma determinada hora na minha vida essa pessoa me ajudou. Muitas vezes, a ajuda pode ser uma palavra, um olhar de compreensão, uma idéia, uma opinião, um gesto ou mesmo uma ajuda laboratorial. Com isso, quero dizer que não quero fazer aquele agradecimento de praxe, “Agradeço ao Diretor, ao Prefeito, aos professores, e aos funcionários..... blá, blá, blá”, mas sim, quero que todas as pessoas que forem citadas aqui, saibam que são pessoas realmente importantes para mim, e que realmente me ajudaram e por isso, tenho um carinho muito especial por todas elas.*

*Com um sentimento de muita alegria por ter chegado até aqui, mas com uma sensação de perda muito grande, pois a partir de hoje, após 9 anos, deixarei de ser aluna desta casa, que tanto orgulho trouxe a mim e a minha família, quero agradecer imensamente:*

*A Deus, que além de ter me dado a vida, me proporciona diariamente, que ela seja livre de problemas. Tenho uma família maravilhosa, um excelente namorado, uma cachorrinha linda, alguns amigos muito queridos, e todos os dias, quando acordo, consigo me levantar da cama sozinha. Não tenho falta de apetite nem falta de sono, não tenho dores crônicas nem dores na alma. Além disso, não tenho problemas de relacionamento com as pessoas, e não sofro de “preguicite aguda”. Então, a Ele, eu tenho muito a agradecer.*



Aos meus pais, **Edson e Regina**, que me ensinaram a ser uma pessoa boa e de caráter, e que nunca mediram esforços para satisfazer meus desejos. Sempre com muito trabalho, por vezes com dificuldades, pagaram todos meus estudos sem nunca nada me cobrar ou pressionar. Quando prestei vestibular, eles tinham esperança que eu entrasse numa faculdade próxima a nossa cidade, Itu, e isso realmente aconteceu, passei em Medicina na PUC - São Paulo, cujo campus é em Sorocaba. Minha mãe ficou muito feliz, pois eu ainda moraria perto, quem sabe até, fosse e voltasse todos os dias para casa. Porém quando saiu o resultado da FOB, e eu percebi que eu poderia cursar a faculdade dos meus sonhos – por que algum dia quando eu ainda era criança um dentista me falou que esta era a melhor Faculdade de Odontologia do país -, não hesitei, quis vir para Bauru. Mesmo que essa minha saída de casa não fizesse parte dos planos deles, eles me apoiaram, montaram meu apartamento e como eu ainda não tinha carro, viajavam todos os meses 300 Km somente para me levar fazer compras no supermercado. Quando estava no segundo ano da faculdade, eles já haviam comprado meu equipo e o consultório ficou montado desde então. No entanto quando me formei, resolvi fazer mestrado, e os planos que eles tinham que eu voltaria para Itu, foram por água abaixo. Depois de um ano cursando o Mestrado, cheguei em casa com uma história de que eu queria fazer Doutorado Direto. Eu tinha todo o currículo para fazer a transferência do Mestrado para o Doutorado, porém faltava um item importante: a participação em dois Congressos Internacionais. Vão então, os dois, trabalharem feitos loucos para pagarem duas viagens, uma para os Estados Unidos e uma para a Austrália, para que mais este meu desejo se concretizasse. Pai e mãe, quero dizer a vocês, que na minha vida, tudo sempre saiu como eu havia sonhado, mas isso só foi possível devido todo o esforço de vocês. E agora, finalmente, após 9 anos, chegou a hora, de eu voltar para mais perto de casa. Muito obrigada, amo muito vocês. Espero, num futuro próximo, poder retribuir tudo isso a vocês.



Ao meu irmão, **Bruno**, que sempre suportou o meu gênio difícil e foi um bom irmão e um bom amigo todas as vezes que eu voltava para casa. Sempre me cedia um lugar no seu quarto (quando me mudei para Bauru, trouxe comigo a TV do meu quarto, logo o meu quarto ficou sem, e como eu não gosto de dormir sem TV, quando estou em Itu, vou para o quarto do Bruno), e me deixava assistir o canal de minha preferência.

Aos meus avós, que ensinaram meus pais a serem boas pessoas, e esta lição me foi transmitida. Um agradecimento especial às minhas duas avós, **Ermelinda** (in memorian) e **Petronilha** (in memorian), que cuidaram de mim durante a infância, para que meus pais pudessem trabalhar tranquilos para poderem me proporcionar uma boa formação.

Aos meus familiares, tios e primos, em especial, à tia **Maria** e ao meu primo **Giancarlo**. A primeira porque sempre vibrou com minhas vitórias, e o segundo, porque foi como um irmão enquanto eu ainda não tinha um.

Ao **Fábio**, meu namorado e futuro marido, que iniciou sua jornada na FOB exatamente no mesmo dia que eu, pois fomos colegas de turma, da XL. Com o Fábio eu aprendi muitas lições, mas certamente a mais importante foi sobre perseverança, ele me mostrou que na vida podemos conseguir tudo aquilo que quisermos, bastando para isso sermos perseverantes, e nunca, nunca, por maior que sejam as adversidades, desistir. Juntos, decidimos cursar o Mestrado, ele na prótese e eu na Biologia Oral, para aumentar nossas oportunidades futuras. E agora que estamos acabando essa jornada, cada um na sua área, sairemos da FOB do mesmo jeito que entramos: JUNTOS. Penso que nosso relacionamento é do tipo simbiótico, pois apesar de sermos diferentes, sinto que ambos somos beneficiados e que, essa associação é obrigatória para a nossa sobrevivência. Somos mais que namorados, somos amigos, somos parceiros, companheiros, e como ele sempre diz, acima de tudo somos sócios. Sócios não somente nos negócios, o que seremos também, pois ambos somos dentistas, mas sócios nas escolhas, nos pensamentos, no desejo de chegar ao mesmo lugar e principalmente, sócios na vida. Fábio, muito obrigada por todos estes anos de parceria, amizade, amor e compreensão. Te amo muito e espero sermos felizes para sempre.





Aos meus futuros sogros, **Sra. Maria e Sr. Jorge Shiratori**, e ao meu cunhado, **Hideki**, que sempre apoiaram minha decisão de estender a minha jornada na Faculdade de Odontologia.

Às minhas cachorrinhas, **Katita** (in memorian) e **Jully**. A primeira me ensinou a ser ainda mais responsável, pois era eu quem tinha que dar banho, comida, limpar o cocô... A segunda deveria se chamar Vida, minha Vida. Ela é minha companheira, me segue por todos os lugares, até mesmo debaixo do chuveiro ela é capaz de entrar para ficar perto da mamãe. A Jully fez e faz com que meus dias em Bauru fossem mais divertidos, mais leves, menos solitários, pois sempre que eu chego em casa, ela está lá me esperando toda feliz e cheia de amor para dar. É um amor incondicional que sentimos uma pela outra.

À minha grande amiga de infância, a **Juliana**, por dividir comigo todos os momentos de alegria e principalmente, por me amparar, naqueles que foram um pouco mais doídos. Ela sempre esteve presente em todas as horas.

Às minhas amigas de colégio, **Bárbara, Anália, Paula e Melina**, que compartilharam além de horas de estudos, os medos e as angústias do vestibular, e os conflitos e a alegria de viver da adolescência.

Aos meus amigos de graduação, que fizeram os meus 4 primeiros anos em Bauru, serem mais agradáveis, e em especial, à **Kátia**, à **Isabela**, à **Letícia** e à **Karin**, que foram minhas melhores amigas e companheiras durante este período.

“Tão importante quanto o amor-romance ou amor-paixão é o amor-amigo. O amor-AMIGO é aquele que nos apóia quando perdemos um amor-paixão, é aquele que nos ouve com paciência de mãe e que nos acompanha por toda a vida” (Copiei da Carol Magalhães, mas não sei se o texto é dela ou tem algum outro autor).



Àqueles amigos que são somente extra FOB: à **Sandra Nadim** e à sua família (**Marco, Renata, Sr. Jorge e Sra. Irene**), que me deram a oportunidade de ter uma família fora da FOB, o que é muito difícil para as pessoas que vêm para Bauru para estudar, como é o meu caso, pois a Faculdade de Odontologia de Bauru nos faz tão filhos dela que mal sentimos a necessidade de conviver com pessoas que estão fora dessa casa. Mas conhecer a vida extra muro é muito importante, o papo é outro, as pessoas têm outras preocupações, que não são as mesmas que as nossas que vivemos aqui nessa redoma de vidros; à **Cíntia**, que sempre com doçura, mas muita bravura, luta contra as pedras que encontramos no caminho; à **Aida**, que me mostrou o quanto uma mulher pode ser forte; à **Elaine**, que é uma fofa; e à **Raquel**, que além de uma pessoa com um caráter muito sólido é a secretária mais eficiente que eu já conheci.

Aos meus colegas da Bioquímica, tanto aos da velha guarda, **Tati Furlani, Claudinha, Juliano, Alininha, Flávia Iano, Flávia Levy, Thiemi, Rejane, Elide Caroselli, Fabiano Vilhena, Heloísa, Maria Heloísa, Juliane, Pity, Eduardo (Noel), Tati Salles, Estér, Wandinha, Mileni, Angélica Hannas, Vanessa Cardoso, Kelly Olímpio**, como os da nova guarda, **Cláudia (Claudineide), Priscila (estagiária), Camila Buzalaf, Lúvia Comar, Taísa, Bruna, Cíntia, Senda e Alessandra**. Muitos destes, os mais antigos, hoje nem estão mais no laboratório, mas a nossa amizade não se prende a localização geográfica e se perdurará por muitos e muitos anos.

Um agradecimento especial à **Cláudia**, que me ajudou a cortar e polir muitos e muitos dentes para este trabalho.

À **Pity**, que confiou a mim grande parte do seu projeto de Doutorado, quando eu era ainda aluna de Iniciação Científica, e isso foi de grande valia para o meu amadurecimento científico.



Àqueles amigos, que além de serem *intra FOB*, foram também *extra FOB*: à **Claudinha**, que se tornou uma pessoa muito importante para mim em Bauru, temos uma identificação muito grande, tenho uma enorme admiração por ela e por sua família (**Mônica**, **Clara** e **Sra. Regina**). Ela é daquelas amigas que eu posso contar para tudo mesmo; à **Tati Furlani**, minha companheira de padaria e uma pessoa que me faz rir muito, além de ter me ensinado que quando trabalhamos ao som de onomatopéias, o trabalho fica menos cansativo; à **Flávia Levy**, sempre louca e muito engraçada, mas muito amiga; à **Flávia Iano**, sempre disposta a ouvir meus problemas de pesquisa e as baboseiras que eu falo sobre festa de casamento; à **Alininha**, sempre pronta para me ajudar com problemas de informática; ao **Juliano**, que sempre tem uma opinião formada sobre qualquer assunto, e suas opiniões são sempre muito pertinentes; e a **Thiemi**, que está sempre pronta para o grito de “mãos a obra”. Ela é a pessoa mais antecipada que eu já conheci, tudo dela já está pronto desde ontem. Inclusive os esquemas deste trabalho, foi ela, juntamente com o seu namorado, e também meu amigo *extra FOB*, que fizeram todos eles a toque de caixa. O **Davison** fez os desenhos que ficaram maravilhosos e a **Thiemi** montou todos os esquemas. Ficaram perfeitos! Muito obrigada a vocês dois.

Aos funcionários da Bioquímica: à **Thelma**, que sempre teve uma palavra amiga e que sempre me emprestou os protocolos de reações; ao **Ovídio**, sempre muitíssimo solícito, não houve uma vez que um pedido meu não fosse atendido, além disso, sempre se preocupou com a minha ergonomia, sempre me chamou a atenção para endireitar as costas e para apoiar os pés de forma adequada. Muitas vezes, eu estava apanhando para fazer algo e ele logo vinha com uma solução mais simples (mesmo sem pedir!); e à **Larissa**, que sempre foi muito prestativa para me ajudar nas leituras de flúor e era mais uma que me emprestava seus ouvidos para as baboseiras de casamento. Muito obrigada a vocês três, vocês facilitaram meus trabalhos e ainda fizeram com que eu me sentisse em casa. Quando um de vocês não está no laboratório parece que algo está faltando.



Aos professores da Bioquímica: à **Profa. Ana Carolina** que sempre está disposta a me ajudar e a sanar minhas dúvidas; ao **Prof. Rodrigo**, que sempre está com as portas abertas tanto para uma troca de idéias quanto para ajudar a resolver algum problema; e à **Profa. Marília**, minha orientadora, que eu vou deixar pra falar depois...

Aos **Prof. Flávio** e **Prof. Carlos**, da Farmacologia, que sempre me salvaram de alguma dúvida desesperadora. É muito bom ter vocês por perto!

Aos professores e funcionários da Prótese, em especial aos professores **Gerson Bonfante**, **Lucimar** e **Salvador**, que foram meus orientadores na clínica e que realmente me ensinaram a fazer prótese.

Um agradecimento especial aos professores **Flávio** e **Gerson** que foram meus grandes mestres durante a graduação.

Aos professores da Endodontia, **Prof. Brandão**, **Prof. Ivaldo**, **Prof. Norberti** e **Prof. Bramante**, todos me orientaram na clínica e com cada um eu aprendi algo diferente da especialidade. Como se esquecer de como se faz a correta spatulação de um cimento após aulas e aulas do **Prof. Brandão**? Meio milímetro é muito importante para a endodontia! Não posso me eximir de agradecer em especial, ao **Prof. Norberti**, que como presidente da FUNBEO, conseguiu uma verba para pagar as taxas de embarque da viagem que eu fiz para a Austrália (era uma daquelas viagens para eu conseguir mudar para o doutorado direto), e isso foi de grande valia, pois foi uma viagem cara e que meus pais tiveram que pagar tudo sozinhos. Mas mais que isso, este departamento está sempre de portas abertas para os alunos. Sempre fui muitíssimo bem recebida tanto pelos professores quanto pelos adoráveis funcionários, **Dona Neide** e **Edimauro**, que nunca mediram esforços para me ajudar. O **Edimauro** começou me ajudando desde quando eu estava no segundo ano da faculdade, pois já fazia iniciação científica na Bioquímica e era ele quem nos ajudava a cortar os dentes. Agora no doutorado, me ajudou muitíssimo fazendo as microscopias eletrônicas deste trabalho, e com ele não tem tempo ruim, marcou está marcado e se precisar repetir alguma coisa não tem problema.





Aos professores e funcionários da Dentística, **Prof. Rafael**, **Prof. Eduardo Franco**, **Prof. Pereira**, **Prof. Ricardo Marins** (atual professor do departamento de prótese), **Profa. Maria Teresa**, **Profa. Fidela** e **Prof. Mondelli**, que foram meus orientadores na clínica e me ensinaram as bases da odontologia clínica, **Sr. Dito**, **Nelson** e **Rita**, sempre dispostos a me ajudar. Um agradecimento especial ao **Prof. Rafael**, que nos emprestou seu rugosímetro para que nosso trabalho pudesse ser realizado.

Aos professores e funcionárias da Periodontia, **Prof. Euloir**, **Profa. Adriana**, **Profa. Malu**, **Prof. Sebastião**, **Edilaine** e **Ivânia**, que conseguiam manter um clima leve na clínica de periodontia. Tenho que fazer um agradecimento especial ao **Prof. Sebastião**, que sempre me socorre de algumas dúvidas clínicas.

Aos professores e funcionários do departamento de Materiais Dentários, **Prof. César** e **Prof. Paulo**, **Alcides** e **Sandra**, que sempre deixaram as portas do laboratório abertas e eu precisei entrar muitas vezes...

Aos professores da Odontopediatria e da Saúde Coletiva, **Profa. Salete**, **Prof. Cidinha**, **Prof. Rui**, **Prof. Eduardo**, **Prof. Lauris**, **Prof. Arsênio** e **Profa. Sílvia**, que muito me ensinaram sobre prevenção, ética e direitos e deveres do cirurgião-dentista. Nunca me esquecerei das aulas engraçadas e cheias de exemplos reais e conselhos importantíssimos do **Prof. Arsênio**. Nunca me esquecerei também do domínio que a **Profa. Salete** tem sobre uma criança. Um especial agradecimento ao **Prof. Lauris** que sempre nos ajudou com as estatísticas dos trabalhos.

Aos professores das disciplinas básicas: **Prof. Gerson**, **Prof. Rumio** e **Prof. Dagoberto**, da Histologia; **Prof. Consolaro**, **Prof. Taveira**, **Profa. Denise** e **Profa. Vanessa**, da Patologia; **Prof. Flávio**, **Prof. Carlos**, **Prof. Alceu** e **Profa. Inge**, da Farmaco e da Fisiologia; **Prof. Jesus**, **Prof. Tom**, **Prof. Navarro** e **Prof. Toledo**, da Anatomia. E aos professores das disciplinas de Cirurgia e Estomatologia, **Prof. Eduardo Sant'Ana** e **Prof. Osny**, **Prof. Damante** e **Profas. Ana Lúcia** e **Isabel**, que despertaram em mim a curiosidade pela Biologia Oral.



Às funcionárias da Cirurgia, **Josi**, e da Estomato, **Fernanda**, que sempre arranjam um horário para encaixar os pacientes que precisam passar pela FOB.

Um agradecimento especial ao **Prof. Eduardo Sant'Ana** e ao **Prof. Acácio**, que durante minha estada em Bauru, uma das minhas avós caiu e fraturou a mandíbula, e ambos ajudaram minha família fazendo o atendimento dela prontamente.

Outro agradecimento especial aos **Profs. Damante, Isabel e Ana Lúcia**, que sempre quando vejo algo estranho numa radiografia desço correndo para pedir opiniões, e eles são sempre muito generosos e solícitos.

A todos os **professores** do curso de pós graduação que participaram diretamente do meu aprendizado.

Às secretárias do departamento de Ciências Biológicas, **Vera, Dalva e Cisira** (in memorian), que facilitam muito o nosso trabalho com a papelada.

Às funcionárias da pós graduação, **Meg, Letícia, Geani e Graciane**, sempre dispostas a sanar nossas dúvidas.

Às funcionárias da Biblioteca, **Maristela e Rita**, sempre com muita simpatia nos ajudam com os Comitês de Ética e com as papeladas da FAPESP.

À **FAPESP**, por todos os apoios de Iniciação Científica e por mais este durante o Doutorado Direto que possibilitou o desenvolvimento do meu trabalho, bem como o meu aprimoramento científico.

Aos voluntários que participaram dessa pesquisa, **Aline, Cláudia, Elaine, Heloísa, Juliano, Mel, Priscila, Taísa e Thiemi**. Muito obrigada, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.



*À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do seu Diretor, José Carlos Pereira, pela oportunidade em realizar o curso de Graduação e Doutorado Direto nesta casa, que tanto me orgulha e que eu tanto amo. Uma vez durante uma defesa de Doutorado ouvi uma declaração de amor à FOB, e me senti profundamente emocionada, pois aquelas palavras faziam jus a meus sentimentos e dizia mais ou menos assim: “Amo cada escada, cada parede, cada funcionário, cada professor, cada pessoa que faz parte dessa casa. Amo está casa como se fosse minha...”. Meu sentimento pela FOB é exatamente este, amei a FOB antes mesmo de entrar aqui, pois sabia que era a melhor Faculdade de Odontologia do Brasil, e hoje, saindo da FOB, com uma sensação de perda indescritível, posso dizer que o meu amor por esta casa é muitíssimo maior do que quando entrei, pois hoje conheço a verdadeira Instituição e as verdadeiras pessoas que fazem a FOB ser a potência que ela é. A bandeira da FOB levarei para sempre por onde quer que eu ande, defenderei o nome da FOB com unhas e dentes, porque se alguém falar mal da FOB é como se estivesse falando mal da minha família. Em Bauru, a FOB, é a minha casa, pois foi por ela que eu me mudei para cá e cá permaneço até hoje, vai ser muito difícil deixar esta casa que me deu tantas alegrias, me trouxe tantos amigos, tantos mestres e um namorado maravilhoso. Mas a missão da FOB foi cumprida, me formou como cirurgiã-dentista e doutora em Biologia Oral, e isso nunca será perdido, nunca será esquecido e nunca será desfeito. MUITÍSSIMO OBRIGADA.*



À **Prof. Marília**, que durante meus nove anos em Bauru foi minha Orientadora. Minha admiração pela Marília começou nos primeiros dias de aula, pois era uma mulher muito jovem, linda, inteligente, muito capaz e já tinha que dar conta dos trigêmeos e do marido. É muito difícil quem conhece a Marília e não se apaixona por ela de cara. Enfim, comecei fazendo estágio no laboratório no final do primeiro ano de graduação. No segundo ano, iniciamos um projeto de Iniciação Científica um pouco pesado para um aluno ainda do segundo ano, era uma técnica nova no laboratório, penamos um pouco, mas aprendemos e tudo deu certo. Aprendi muito durante este período. Assim que terminamos este projeto, que fazia parte de uma tese de Doutorado, iniciamos outro até que eu concluísse o curso de Graduação. A Marília sempre soube que eu queria fazer Mestrado, mas bem no meu ano algumas regras da FOB mudaram, e alunos que ainda cursavam graduação não poderiam prestar a prova para começar o curso de Mestrado no início do ano seguinte. Eu fiquei muito chateada, mas fazer o que? Como já tinha ganhado o equipo do consultório no segundo ano de faculdade achei melhor montar o consultório e depois voltaria para fazer pós graduação. Começamos montar o consultório e para minha surpresa aconteceu o inesperado: um dia, no shopping de Bauru, encontrei a Marília que me falou que sobraram vagas na Biologia Oral e a prova para o ingresso no Mestrado da mesma seria reaberto, e me convidou para prestar a prova, mas é claro que eu teria que estudar muito. Tudo deu certo, estudei bastante e passei na prova e começamos a dura e longa jornada do Mestrado. No meio do caminho, pensamos em mudar o curso para Doutorado Direto pelo fato de eu ter o currículo necessário e porque eu queria terminar logo o curso, pois afinal de contas o meu consultório estava montado e eu não podia trabalhar nele. Foi um engano só, pois para ser transferido para Doutorado Direto o seu projeto de pesquisa tem que ser bem grande, e isso faz com que você fique na faculdade o mesmo tempo que ficaria fazendo mestrado e doutorado. Enfim, como vocês verão o meu projeto ficou bastante extenso, mas tudo bem, pois aproveitei cada segundo aqui em Bauru na companhia de grandes amigos e de grandes mestres. Tendo a Marília como orientadora, mesmo quando alguma coisa dava errado nas minhas pesquisas, eu não perdia as esperanças, porque eu sabia que se eu não conseguisse resolver, minha orientadora conseguiria, pois apesar da pouca idade, ela é muito experiente. Além disso, a Marília é uma pessoa muito amiga e sempre me ajudou muito durante essa longa jornada. Tenho muito orgulho de ter tido somente a sra. como orientadora, pois isso significa que nossa parceria deu certo, e que uma pessoa tão importante no mundo científico como a sra, gostou de mim. Aprendi muito ao seu lado e se sei alguma coisa sobre pesquisa, sobre Excel, sobre ser crítica ao ler um artigo, foi porque a sra. me ensinou. Serei eternamente grata pelas oportunidades que me ofereceu, pelos novos horizontes que me mostrou e pela sua amizade. **MUITÍSSIMO OBRIGADA.**





---

*“A gente tropeça sempre nas pedras pequenas, porque as grandes a gente logo enxerga”*

Provérbio Japonês

*“A firmeza de propósitos consiste em mesmo sem ter muita esperança ter a determinação necessária para transformar a situação”*

F. Scott Fitz Gerald

*“Um sonho é apenas um sonho.*

*Uma meta é um sonho com um plano e um prazo para atingí-lo”*

Harvey Mackay

*“Mire na lua, pois se errar ainda estará entre as estrelas!...”*

autor desconhecido

*“Aproveite bem as pequenas coisas; algum dia você vai saber que elas eram grandes”*

Robert Brault



## RESUMO

Este projeto teve como objetivos investigar o efeito do íon ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), associado ou não ao íon flúor ( $\text{F}^-$ ), na redução da erosão do esmalte e da dentina bovinos, bem como desenvolver e avaliar um dentifrício enriquecido com  $\text{Fe}^{+2}$  para a prevenção da erosão associada à abrasão. Foram realizados 4 subprojetos: (1) Determinação do efeito protetor de concentrações crescentes do  $\text{Fe}^{+2}$  (0 a 120 mmol/L) associadas ou não ao  $\text{F}^-$  (0 a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), contra a dissolução do pó de esmalte bovino *in vitro*; (2) Avaliação, *in vitro*, do efeito protetor do  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L contra a dissolução mineral da superfície do esmalte bovino; (3) Desenvolvimento e avaliação, *in vitro*, de dentifrícios fluoretados enriquecidos com diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$ , visando à prevenção da perda mineral do esmalte bovino; (4) Avaliação, *in situ*, do efeito inibidor do dentifrício acrescido de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  na desmineralização do esmalte e dentina bovinos sadios ou previamente erodidos. As variáveis de resposta utilizadas foram a quantificação da perda de fósforo (colorimetria) e o desgaste (perfilometria,  $\mu\text{m}$ ) para os subprojetos 1 e 2, e 3 e 4, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ). Para o Subprojeto (1), a ANOVA a 2 critérios e o teste de Bonferroni revelaram que soluções contendo  $\text{Fe}^{+2}$  a 1,25, 2,5, 5,0, 10, 15 e 30 mmol/L reduziram significativamente a dissolução do pó de esmalte bovino em 18, 18, 23, 35, 35 e 55%, respectivamente, em comparação ao controle (sem  $\text{Fe}^{+2}$ ). Na presença de  $\text{F}^-$ , o efeito do  $\text{Fe}^{+2}$  na inibição da dissolução do esmalte foi reduzido, não havendo efeito sinérgico entre estes íons nas condições testadas. No Subprojeto (2), a ANOVA a 2 critérios e o teste de Bonferroni, mostraram uma redução significativa na desmineralização da superfície do esmalte bovino em torno de 30 a 40%, quando se utilizou solução de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L. No Subprojeto (3), a ANOVA revelou diferença significativa entre os grupos (Placebo, 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{F}^-$ , Crest<sup>®</sup>,  $\text{Fe}^{+2}$  1,0 mg/g,  $\text{Fe}^{+2}$  2,5 mg/g,  $\text{Fe}^{+2}$  5,0 mg/g,  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) +  $\text{Fe}^{+2}$  1,0 mg/g,  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) +  $\text{Fe}^{+2}$  2,5 mg/g e  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) +  $\text{Fe}^{+2}$  5,0 mg/g) ( $F=4,734$ ,  $p < 0,0001$ ). O menor desgaste ( $0,48 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ) foi apresentado pelo grupo em que foi utilizado o dentifrício contendo 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$  e 5 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ . No Subprojeto (4), para o esmalte hígido a ANOVA a 2 critérios revelou uma diferença significativa entre os dentifrícios, ( $F=21,72$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não entre as condições (só erosão, erosão + “slurry”, erosão + abrasão) ( $F=1,20$ ,  $p=0,32$ ) e nem para a interação entre ambos ( $F = 1,04$ ,  $p=0,41$ ). O teste de Bonferroni revelou que os blocos que receberam o dentifrício contendo  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  apresentaram valores de desgaste significativamente menores quando comparados aos blocos submetidos aos demais dentifrícios, os quais não diferiram significativamente entre si. Para a dentina hígida, o esmalte previamente erodido e a dentina previamente erodida, o mesmo padrão foi seguido, apesar destes dois últimos terem apresentado valores de desgaste maiores que aqueles observados para os blocos hígidos.

**Palavras-chave:** Ferro. Erosão Dentária. Abrasão Dentária.



## ABSTRACT

### Effect of iron on the prevention of tooth wear: in vitro and in situ studies

The aims of this study were to investigate the effect of iron ( $\text{Fe}^{+2}$ ) associated or not to fluoride ( $\text{F}^-$ ) on the reduction of bovine enamel and dentin erosion, as well as to develop and evaluate a dentifrice containing  $\text{Fe}^{+2}$  to prevent erosion associated to abrasion. Four subprojects were done: (1) In vitro determination of the protective effect of increasing  $\text{Fe}^{+2}$  concentrations (0 to 120 mmol/L) associated or not to  $\text{F}^-$  (0 to 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against the dissolution of powdered enamel; (2) In vitro evaluation of the protective effect of 10 mmol/L  $\text{Fe}^{+2}$  against the mineral dissolution of superficial bovine enamel; (3) Development and in vitro evaluation of fluoridated dentifrices containing different  $\text{Fe}^{+2}$  concentrations in order to prevent the mineral loss of bovine enamel; and (4) In situ evaluation of the effect of a dentifrice containing  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{F}^-$  on the demineralization of sound or previously eroded bovine enamel and dentin. The response variables were quantification of phosphate loss (colorimetry) and tooth wear (perfilometry,  $\mu\text{m}$ ) for the subprojects 1 and 2, and 3 and 4, respectively. Data were submitted to statistical analyses ( $p < 0.05$ ). In subproject (1), two-way ANOVA and Bonferroni's test revealed that solutions containing 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 and 30.0 mmol/L  $\text{Fe}^{+2}$  significantly reduced the dissolution of powdered enamel at 18, 18, 23, 35, 35 and 55%, respectively, in comparison to control (without  $\text{Fe}^{+2}$ ). In the presence of  $\text{F}^-$ , the effect of  $\text{Fe}^{+2}$  on the dissolution of enamel was reduced and no synergistic effect between these ions was observed in the tested conditions. In Subproject (2), two-way ANOVA and Bonferroni's test showed a significant reduction on surface demineralization of bovine enamel (around 30-40%), when the solution containing  $\text{Fe}^{+2}$  at 10 mmol/L was used. In Subproject (3), ANOVA revealed a significant difference among the groups (Placebo, 1,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  F, Crest<sup>®</sup>, 1.0 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ , 2.5 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ , 5.0 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{F}^-$  (1, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 1,0 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 2,5 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{F}^-$  (1,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 5,0 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ ) ( $F=4,734$ ,  $p<0,0001$ ). The lowest wear ( $0.48\pm 0.24$   $\mu\text{m}$ ) was observed when the dentifrice containing F + Fe was used. In Subproject (4), for sound enamel, two-way ANOVA revealed a significant difference among the dentifrices, ( $F=21.72$ ,  $p<0.0001$ ), but not among the conditions (erosion only, erosion + "slurry", erosion + abrasion) ( $F=1.20$ ,  $p=0.32$ ) or for the interaction of both ( $F = 1.04$ ,  $p=0.41$ ). The Bonferroni's test revealed that the blocks which received the dentifrice containing  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{F}^-$  presented significantly lesser wear when compared to the blocks submitted to the other dentifrices, which did not differ significantly among each other. As for sound dentin as well as for previously eroded enamel and dentin, the same pattern was obtained but the latter two presented wear values higher than those seen for the sound blocks.

**Key words:** Iron. Tooth erosion. Tooth abrasion.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 1 .....	55
<b>Figura 2 -</b>	Corte transversal, separando a coroa da raiz .....	58
<b>Figura 3 -</b>	Corte longitudinal, separando as faces mesial e distal do fragmento .....	58
<b>Figura 4 -</b>	Fragmento de dente bovino. Face vestibular livre de esmalte de unha e o restante, coberto com o mesmo .....	58
<b>Figura 5 -</b>	Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 2 .....	59
<b>Figuras 6 e 7 -</b>	Dispositivo para simulação de escovação com acoplamento de escova elétrica.....	63
<b>Figuras 8 e 9 -</b>	Cabeça da escova elétrica modelo Cross Action e cabeça da escova com as cerdas posteriores cortadas, respectivamente .....	63
<b>Figura 10 -</b>	Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 3 .....	64
<b>Figura 11 -</b>	Esquema ilustrativo da alocação dos blocos nos dispositivos acrílico. Os blocos destacados em verde só foram submetidos à erosão, aqueles destacados em amarelo foram submetidos à erosão e gotejamento do “slurry” de dentífrico, enquanto que os destacados em azul foram submetidos à erosão e abrasão com “slurry” do dentífrico. EH – esmalte hígido; EE - esmalte previamente erodido; DH – dentina hígida; DE – dentina previamente erodida .....	67
<b>Figura 12 -</b>	Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 4 .....	69
<b>Figura 13 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na ausência de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	75







- Figura 14 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,125 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 ...75
- Figura 15 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,250 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 ...76
- Figura 16 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,500 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 ...76
- Figura 17 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 1,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 ...77
- Figura 18 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 2,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 ...77
- Figura 19 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 4,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3....78
- Figura 20 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na ausência de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3 .81
- Figura 21 -** Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,125 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). n=3.....81





<b>Figura 22 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,250 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	82
<b>Figura 23 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,500 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	82
<b>Figura 24 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 1,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	83
<b>Figura 25 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 2,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	83
<b>Figura 26 -</b>	Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 4,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). $n=3$ .....	84
<b>Figura 27 -</b>	Efeito de 10 mmol/L $Fe^{+2}$ na habilidade do ácido acético 10 mmol/L em desmineralizar superfícies hígidas de esmalte dentário bovino. A perda mineral no frasco 4 contendo $Fe^{+2}$ , e nos frascos experimentais subsequentes, é significativamente reduzida em aproximadamente 30-40% em relação ao frasco 1. As barras indicam o erro-padrão. $n=6$ .....	85
<b>Figura 28 -</b>	Desgaste médio ( $\pm EP$ ) sofrido pelos blocos de esmalte após desafios erosivos ou erosivos e abrasivos, utilizando dentifrícios com diferentes concentrações de $Fe^{+2}$ , associado ou não ao $F^-$ . Tratamentos seguidos por letras diferentes diferiram significativamente (ANOVA após transformação logarítmica, $p < 0,05$ ) .....	87



<b>Figura 29 -</b>	Esmalte Hígido. Tratamento: Crest <sup>®</sup> . Condição: ER + GOTA. Lado direito controle .....	94
<b>Figura 30 -</b>	Dentina Hígida. Tratamento Crest <sup>®</sup> . Condição: ER + GOTA. Lado esquerdo controle .....	94
<b>Figura 31 -</b>	Esmalte Hígido. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + Gota. Lado direito controle .....	94
<b>Figura 32 -</b>	Dentina Hígida. Tratamento Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + Gota. Lado esquerdo controle .....	94
<b>Figura 33 -</b>	Esmalte Previamente Erodido. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + Gota. Lado direito controle.....	94
<b>Figura 34 -</b>	Dentina Previamente Erodida. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + Gota. Lado direito controle.....	94
<b>Figura 35 -</b>	Esmalte Hígido. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + ABRA. Lado direito controle .....	95
<b>Figura 36 -</b>	Dentina Hígida. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + ABRA. Lado direito controle .....	95
<b>Figura 37 -</b>	Esmalte Previamente Erodido. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + ABR. Lado direito controle .....	95
<b>Figura 38 -</b>	Dentina Previamente Erodida. Tratamento: Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup> . Condição: ER + ABR. Lado direito controle .....	95
<b>Figura 39 -</b>	Manchamento extrínseco do dente.....	96
<b>Figura 40 -</b>	Dentes livres de manchas após profilaxia convencional .....	96





## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBBAROW (1925)..... 57
- Quadro 2** - Quantidade de P ( $\mu\text{g}$ ) liberada a partir do pó de esmalte em função das concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  adicionados ao meio de reação (ácido acético 10 mmol/L) ..... 74
- Quadro 3** - Quantidade de P ( $\mu\text{g}$ ) liberada a partir do pó de esmalte em função das concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  adicionado ao meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L) ..... 80



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de esmalte hígidos, submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições ..... 90
- Tabela 2** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de dentina hígidos, submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições ..... 91
- Tabela 3** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de esmalte previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup> durante 10 minutos e submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições ..... 92
- Tabela 4** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de dentina previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup> durante 10 minutos e submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições ..... 93



## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	por cento
<	menor
dP	desvio padrão
g	gramas
<i>In situ/ex vivo</i> (latim)	em sítio, no local (no caso, cavidade bucal)
<i>In vitro</i> (latim)	em laboratório
<i>In vivo</i> (latim)	no ser humano
L	litro
M	molar
mL	mililitros
μL	microlitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mm <sup>2</sup>	milímetro quadrado
°C	graus centígrados
p	nível de significância, probabilidade
pH	potencial hidrogeniônico
μg/mL	parte por milhão
rpm	rotações por minuto
μm	micrometro
SMH	<i>Surface Microhardness</i>
ERO	erosão
mmol/L	milimol por litro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
4.1	SUBPROJETO 1: DETERMINAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $FE^{+2}$ ASSOCIADAS OU NÃO À PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $F^{-}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO DO PÓ DE ESMALTE BOVINO <i>IN VITRO</i>	53
4.1.1	<b>Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte bovino</b>	<b>53</b>
4.1.2	<b>Delineamento experimental</b>	<b>54</b>
4.1.3	<b>Determinação do fósforo liberado pelo esmalte em pó</b>	<b>56</b>
4.1.4	<b>Análise estatística</b>	<b>57</b>
4.2	SUBPROJETO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE $FE^{+2}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO MINERAL DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE BOVINO	58
4.2.1	<b>Obtenção e corte dos fragmentos de esmalte bovino</b>	<b>58</b>
4.2.2	<b>Delineamento experimental</b>	<b>59</b>
4.2.3	<b>Análise estatística</b>	<b>60</b>
4.3	SUBPROJETO 3: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS ENRIQUECIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $FE^{+2}$ , VISANDO À PREVENÇÃO DA PERDA MINERAL DO ESMALTE BOVINOS	60
4.3.1	<b>Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte bovino</b>	<b>61</b>
4.3.2	<b>Avaliação da microdureza inicial dos fragmentos</b>	<b>62</b>
4.3.3	<b>Delineamento Experimental</b>	<b>62</b>
4.3.4	<b>Análise estatística</b>	<b>65</b>
4.4	SUBPROJETO 4: ANÁLISE DO EFEITO INIBIDOR DO DENTIFRÍCIO ACRESCIDO DE $FE^{+2}$ E $F^{-}$ NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA BOVINOS <i>IN SITU</i>	65





4.4.1	<b>Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte e dentina bovinos</b>	65
4.4.2	<b>Avaliação da microdureza inicial dos fragmentos</b>	66
4.4.3	<b>Delineamento experimental</b>	66
4.4.4	<b>Análise estatística</b>	69
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	71
5.1	SUBPROJETO 1: DETERMINAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $Fe^{+2}$ ASSOCIADAS OU NÃO À PRESENÇA DE $F^{-}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO DO PÓ DE ESMALTE BOVINO <i>IN VITRO</i>	73
5.2	SUBPROJETO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE $Fe^{+2}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO MINERAL DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE BOVINO	85
5.3	SUBPROJETO 3: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS ENRIQUECIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $Fe^{+2}$ , VISANDO À PREVENÇÃO DA PERDA MINERAL DO ESMALTE BOVINO	86
5.4	SUBPROJETO 4: ANÁLISE DO EFEITO INIBIDOR DO DENTIFRÍCIO ACRESCIDO DE $Fe^{+2}$ E $F^{-}$ NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA BOVINOS <i>IN SITU</i>	89
6	<b>CONCLUSÕES</b>	97
	<b>REFERÊNCIAS</b>	101
	<b>ANEXOS</b>	109



# *1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA*

---



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o íon ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) é muito importante para a prevenção de anemia (SZARFARC; STEFANINI; LENER, 1995; LYNCH, 2005) e de acordo com estudos conduzidos *in vitro* (WEISS et al., 1985, TORELL, 1988, DEVULAPALLE; MOOSER, 2001; BUZALAF et al., 2006), *in situ* (PECHARKI et al., 2005; MARTINHON et al., 2006) e *in vivo*, tanto em humanos (OPPERMANN; RÖLLA, 1980), como em animais (ROSALEN; PEARSON; BOWEN, 1996; MIGUEL; BOWEN; PEARSON, 1997 a, b, c), este íon também pode ter efeito benéfico contra a cárie dentária, embora o seu mecanismo de ação não esteja completamente esclarecido.

Nas últimas décadas, foi constatada uma redução na incidência de cárie nos países desenvolvidos. Consequentemente, os indivíduos mantêm seus dentes por mais tempo na boca, o que, associado a mudanças nos hábitos alimentares, leva a um maior risco para desenvolver outros tipos de lesões, como erosão dentária (JÄRVINEN; RYTÖMAA; HEINONEN, 1991). Em razão disto, em adição aos estudos avaliando o efeito do  $\text{Fe}^{+2}$  em relação à cárie dentária, estudos que avaliam o comportamento do mineral dentário submetido a desafios ácidos em um sistema abiótico, simulando mais a situação de erosão que de cárie dentária, foram surgindo. Brookes et al. (2004), utilizaram o  $\text{FeSO}_4$  a 10 mmol/L e observaram que este composto inibiu em 51% a dissolução da hidroxiapatita sintética, enquanto que uma solução a 1,24 mmol/L apresentou uma inibição de 10%. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Buzalaf et al. (2006), onde foi encontrada uma inibição na desmineralização do pó de esmalte bovino de 40 e 13%, respectivamente, para as concentrações de  $\text{FeSO}_4$  de 10 mmol/L e 1,25 mmol/L, respectivamente. A inibição máxima (em torno de 50%) da dissolução foi encontrada para a dose de 15 mmol/L, não havendo uma inibição adicional pelo incremento da dose até 120 mmol/L.

Em 2007, Sales-Peres et al., avaliaram o efeito de um bochecho com solução de sulfato ferroso a 10 mmol/L na redução do desgaste e perda de dureza superficial em blocos de esmalte e dentina submetidos a desafio erosivo e abrasivo *in situ/ex vivo*. A solução contendo  $\text{Fe}^{+2}$  reduziu significativamente a perda de dureza

superficial em esmalte e o desgaste em dentina, sugerindo o seu uso na prevenção da erosão dentária, associada ou não à abrasão.

Entretanto, pensando-se do ponto de vista clínico, a realização de um bochecho após desafio erosivo parece ser inviável, por adicionar um passo (bochecho). Desta maneira, seria interessante o  $\text{Fe}^{+2}$  diretamente ao refrigerante, para reduzir seu potencial erosivo. Isto foi testado inicialmente *in vitro*. No trabalho de Kato, Sales-Peres e Buzalaf (2007), a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L à Coca-Cola<sup>®</sup> foi capaz de reduzir significativamente a erosão dentária em blocos de esmalte bovino. Diante deste resultado positivo, delineou-se um trabalho *in situ* onde foi observado que a adição de  $\text{FeSO}_4$  a 10 mmol/L à Coca-Cola<sup>®</sup> reduziu significativamente seu potencial erosivo tanto em esmalte quanto em dentina bovinos (KATO, 2007). Entretanto, a adição de  $\text{FeSO}_4$  à Coca-Cola<sup>®</sup> não é viável, devido a problemas toxicológicos, bem como à possibilidade de induzir manchamento dentário, além do sabor metálico. Assim sendo, poder-se-ia pensar na potencialização do efeito do  $\text{Fe}^{+2}$ , utilizando-o em conjunto com algum outro íon, de forma que uma concentração menor de  $\text{Fe}^{+2}$  poderia ser utilizada para se obter bons resultados na inibição da desmineralização do esmalte. O íon de escolha para associação ao  $\text{Fe}^{+2}$  seria o  $\text{F}^-$ , por já ter seus efeitos benéficos bem conhecidos (BUZALAF, 2008).

Em adição, sendo o  $\text{Fe}^{+2}$  comprovadamente eficaz na redução da dissolução do esmalte e dentina, poderia ser utilizado como veículo para sua aplicação um dentífrico, uma vez que se trata de um produto amplamente utilizado na vida cotidiana e a grande maioria dos dentífricos, comercializados no Brasil e em outros países, são fluoretados. Além disso, o efeito abrasivo da escovação teria a vantagem de induzir um menor manchamento extrínseco do dente, devido à possível remoção dos pigmentos já durante o momento da escovação.

## *2 REVISÃO DE LITERATURA*

---





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Emilson e Krasse (1972), a adição de sais de ferro na água de beber ou na dieta, ou sua aplicação tópica foram efetivos na redução de cárie dentária em hamsters.

Glass et al. (1973), estudaram a prevalência de cárie dentária em relação à água de beber com traços de metais. Concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mo}^{+2}$  e  $\text{V}^{+2}$  foram maiores na comunidade que apresentava menor índice de cárie, enquanto concentrações de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  foram maiores na comunidade que apresentava maior índice de cárie.

Torell e Gerdin (1977), propôs que a aplicação tópica de uma solução fluoretada contendo íons  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  poderia ser mais efetiva na redução de cáries que somente uma solução de NaF.

Bundy, Butler e Hochman (1980), investigaram o efeito das propriedades bacteriostáticas de 16 metais puros em relação aos *Streptococcus mutans*, *in vitro*. Os metais testados foram:  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mo}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{V}^{+2}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$ ,  $\text{W}^{+2}$ ,  $\text{Au}^{+3}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ta}^{+5}$ ,  $\text{Nb}^{+5}$ ,  $\text{Ti}^{+4}$ ,  $\text{Zr}^{+4}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+}$  e  $\text{Cr}^{+3}$ . Os metais  $\text{Co}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  foram os que apresentaram melhor efeito inibitório do crescimento bacteriano, seguidos pelo  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Ti}^{+4}$ ,  $\text{V}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+2}$ . Os outros metais testados não apresentaram nenhuma tendência a inibir o crescimento dos *Streptococcus mutans*.

Oppermann e Rolla (1980) avaliaram o efeito de alguns cátions polivalentes na acidogenicidade da placa dentária *in vivo*, e constataram que enxaguatórios bucais contendo 20 mmol/L de  $\text{SnF}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{FeCl}_3$  inibiram a atividade metabólica da placa dentária por longos períodos.

Segundo Petersson e Derand (1981), soluções contendo NaF e  $\text{SnF}_2$  são as mais utilizadas em aplicação tópica de flúor. Porém, combinações de flúor com outros elementos químicos têm mostrado propriedades cariostáticas. Assim sendo, os autores compararam o efeito de uma nova solução contendo  $\text{F}^-$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Al}^{+3}$  com o verniz fluoretado (Duraphat), no desenvolvimento de lesões iniciais de cárie. Porém, o efeito positivo destes elementos utilizados não foi demonstrado neste estudo. Os resultados mostraram que o verniz fluoretado foi superior em retardar o

desenvolvimento de lesões iniciais de cárie quando comparado com a solução testada.

Weiss et al. (1985), avaliaram o efeito do cloreto de ferro durante um desafio ácido em esmalte dentário humano, *in vitro*. Para isso, fatias de dentes foram cobertas com esmalte de unha, deixando uma janela numa das superfícies para exposição ao meio ácido. O sal de ferro foi utilizado como um complemento ao gel ácido (6% hidrocelulose e 0,1 M ácido láctico) ou como pré-tratamento das superfícies de esmalte antes da aplicação do gel puro (forma de solução). Foram realizadas radiografias antes e após a exposição do esmalte ao meio ácido. Os resultados mostraram um aumento na radiopacidade nos fragmentos que foram incubados com o gel contendo o sal de ferro na concentração de 2%. Já nos fragmentos que foram tratados com a solução contendo o cloreto de ferro previamente ao ataque ácido, a radiopacidade diminuiu, mas não foi estatisticamente significativo em relação ao controle. Os autores concluíram que o esmalte tratado topicamente com o sal de ferro foi menos dissolvido pelo gel ácido. E isto é refletido numa maior densidade óptica das amostras incubadas com ácido contendo ferro no meio.

Torell (1988) estudou o efeito do íon ferro na possibilidade da prevenção da cárie dentária e concluiu que quando o mesmo é utilizado na cavidade bucal, mesmo em pequenas concentrações, leva a uma precipitação dos íons na superfície de esmalte como uma película fina ácido-resistente contendo cristais de óxido de ferro hidratados. Em adição, por adsorção de íons cálcio e fosfato da saliva, este composto com íons de ferro parece ser capaz de nuclear a formação da apatita, mediando uma substituição de minerais, os quais são dissolvidos pelos ácidos no processo carioso.

Okasaki, Takahashi e Kimura (1986), avaliaram o comportamento da cristalização e solubilidade da hidroxiapatita fluoretada contendo ferro. Para isso, hidroxiapatita contendo íons de ferro e flúor foi sintetizada a 80° C e pH 7,4, utilizando  $FeCl_2 \times nH_2O$  como fonte de ferro. Os autores observaram que as apatitas fluoretadas contendo íon ferro foram menos cristalizadas que as que não continham o íon metálico. Em contraste a este comportamento inibidor da cristalização, a solubilidade das apatitas fluoretadas contendo o metal foi menor do que as apatitas livres do mesmo.

Niedzielska, Struzak-Wysokinska e Wujec (1990), analisaram a correlação entre os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  em dentes decíduos cariados e não cariados. Os resultados demonstraram que os dentes decíduos cariados apresentam concentrações menores de  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  quando comparados a dentes decíduos sem cárie.

Duggal, Chawla e Curzon (1991) estudaram a correlação entre alguns elementos químicos presentes na saliva e a experiência de cárie dentária em crianças. Os autores verificaram que existe uma forte correlação, inversamente proporcional, entre os elementos  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  e a experiência de carie. No entanto, a concentração dos elementos  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  na saliva, não apresentou nenhuma correlação consistente com a experiência de cárie dentária.

Rosalen, Pearson e Bowen (1996) avaliaram os efeitos de combinações de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  incorporados à sacarose por co-cristalização no desenvolvimento de caries em ratos dessalivados e na formação de ácidos pelas bactérias presentes na boca dos animais. Noventa e seis ratos foram divididos em oito grupos e receberam os seguintes tratamentos: (1) sacarose pura, (2)  $\text{F}^-$  (8  $\mu\text{g/mL}$ ) co-cristalizado com sacarose, (3)  $\text{Fe}^{+2}$  (88  $\mu\text{g/mL}$ ) co-cristalizado com sacarose, (4)  $\text{Cu}^{+2}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ) co-cristalizado com sacarose, (5)  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{F}^-$  co-cristalizado com sacarose, (6)  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose, (7)  $\text{F}^-$  +  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose, (8)  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  +  $\text{F}^-$  co-cristalizado com sacarose. Os resultados mostraram menor índice de cárie no grupo 8 ( $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  +  $\text{F}^-$ ), mas não foi significativamente diferente dos grupos contendo  $\text{Cu}^{+2}$  (4, 5 e 6). O número de *Streptococcus sobrinus* encontrado nos grupos que receberam  $\text{Cu}^{+2}$  (4),  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  (6),  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{F}^-$  (5),  $\text{F}^-$  +  $\text{Fe}^{+2}$  (7) e  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  +  $\text{F}^-$  (8), foi menor que no grupo controle. Ácido láctico foi encontrado em menores concentrações nos grupos  $\text{Fe}^{+2}$  (3),  $\text{Cu}^{+2}$  (4),  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{F}^-$  (5),  $\text{Cu}^{+2}$  +  $\text{Fe}^{+2}$  (6) e  $\text{F}^-$  e  $\text{Fe}^{+2}$  (7) quando comparado aos outros grupos. Os autores concluíram então que as combinações de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  co-cristalizado com o açúcar devem ter um efeito adicional em reduzir o potencial cariogênico do carboidrato, por afetar a produção de ácido láctico e reduzir a colonização bacteriana.

Segundo Miguel, Bowen e Pearson (1997), a inclusão de 88  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  (na forma de  $\text{FeSO}_4$ ) co-cristalizado com sacarose mostrou reduzir a incidência de cárie em mais de 30% quando ratos são alimentados 17 vezes ao dia em

intervalos de uma hora. Diante disso, os autores determinaram a influência do número de exposições diárias ao  $\text{Fe}^{+2}$  em ratos dessalivados. Para isso, os animais receberam alimentação essencial por gavagem gástrica e receberam 17 doses de sacarose diariamente. No grupo A, 6 refeições contendo 88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose; no grupo B, 3 refeições contendo 88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose; no grupo C, 2 refeições contendo 88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose, e no grupo D, o  $\text{Fe}^{+2}$  não foi adicionado a sacarose nenhuma vez. O estudo teve duração de 3 semanas. Os resultados mostraram que os grupos que receberam  $\text{Fe}^{+2}$  apresentaram menos cáries que o grupo controle. Os escores de cárie em superfície lisa e em sulcos (entre parênteses) foram: grupo A 60,8 (39,4); grupo B 72,4 (41,3); grupo C 73,1 (41,3), e grupo D 92,9 (49,2). Deste modo, apenas 2 exposições do  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose têm efeito significativo no desenvolvimento da cárie dentária. Os autores concluíram que o  $\text{Fe}^{+2}$  é um notável agente cariostático, e que dois grandes problemas de saúde pública, a anemia e a cárie dentária, poderiam ser amenizadas com a adição do mesmo à sacarose.

Miguel, Bowen e Pearson (1997) desenvolveram um estudo para investigar a relação entre experiência de cárie e a concentração do  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado à sacarose na alimentação de ratos submetidos a um severo desafio cariogênico. A influência do  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose combinado com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$  na água de beber também foi investigada num estudo adicional. Setenta e dois animais foram divididos em 2 grandes grupos: dessalivados e intactos. Dentro de cada um destes grupos, os animais foram divididos em 4 subgrupos: 3 receberam  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose (350, 175 e 88  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}^{+2}$ ) e 1 grupo recebeu apenas sacarose (controle). Os resultados revelaram que a maior quantidade de cárie foi encontrada nos ratos dessalivados e que receberam somente sacarose. Houve uma relação dose-resposta entre a quantidade de íon  $\text{Fe}^{+2}$  adicionada à sacarose e a redução na incidência de cáries. Animais que receberam 88 e 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}^{+2}$  na sacarose apresentaram 35 e 64%, respectivamente, menos cárie quando comparados ao grupo controle. Em relação à água contendo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{F}^-$ , quando combinada com o íon  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado com sacarose reduziu a prevalência de cáries. Sendo assim, a combinação entre a utilização de sacarose

contendo  $\text{Fe}^{+2}$  co-cristalizado e água de beber contendo  $\text{F}^-$  apresentou melhores resultados que os tratamentos isolados.

Miguel, Bowen e Pearson (1997) compararam o efeito do sulfato ferroso e do glicerofosfato férrico co-cristalizados com sacarose na incidência de cárie dentária em ratos. Quarenta e oito ratos dessalivados receberam nutrição essencial por gavagem gástrica e 17 vezes ao dia, foram alimentados com sacarose associada ou não a íons  $\text{Fe}^{+2}$ , com intervalos de 1 hora. Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo (1) controle, somente sacarose; grupo (2), sacarose + sulfato ferroso ( $88 \mu\text{g}/\text{mL Fe}^{+2}$ ); grupo (3), sacarose + glicerofosfato férrico ( $88 \mu\text{g}/\text{mL Fe}^{+2+}$ ); grupo (4) sacarose + glicerofosfato de cálcio ( $73,2 \mu\text{g}/\text{mL P}$ , equivalente à concentração de P do grupo 3). Os resultados demonstraram que ambos os íons, férrico e ferroso, apresentaram redução na incidência de cáries. Em adição, o glicerofosfato férrico não induz o manchamento extrínseco do dente. A atividade acidogênica da placa nos animais que receberam íons ferro tendeu a ser menor que nos animais do grupo controle.

Na tentativa de explicar o mecanismo de ação do  $\text{Fe}^{+2}$  sobre o metabolismo bacteriano, Devulapalle e Mooser (2001) demonstraram, *in vitro*, que 6 mmol/L de sulfato ferroso poderia inibir totalmente a atividade da glicosiltransferase purificada da cultura de *S. sobrinus*, sendo esta enzima de fundamental importância no processo cariioso. Os autores sugeriram o uso tópico do sulfato ferroso para a inibição da produção de polissacarídeos extracelulares pelas bactérias do biofilme dentário. No entanto, um estudo mais recente (MARTINHON et al., 2006) não verificaram redução na concentração de carboidratos alcali-solúveis no biofilme *in situ*, quando se aplicaram 15 mmol/L de sulfato ferroso. Todavia, observou-se uma redução de perda mineral, em superfície e em profundidade no esmalte.

Nos países em desenvolvimento, a expectativa de vida da população vem aumentando nos últimos anos. Concomitantemente a isto, a incidência da cárie dentária tem diminuído progressivamente (PETERSSON; BRATTHALL, 1996; BASTOS et al., 2005). Dessa forma, os dentes estão ficando por mais tempo na boca dos indivíduos, ficando vulneráveis a outros tipos de lesões, tal como a erosão dentária (LUSSI et al., 2006). Esta lesão pode ser definida como processo químico no qual ocorre perda de estrutura dentária causada por ácidos de origem intrínseca

ou extrínseca (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL, 2005), sem o envolvimento de bactérias (WATSON; TULLOCH, 1985; ZIPKIN; McCLURE, 1949).

A etiologia da erosão dentária é multifatorial. Dentre os fatores mais importantes destacam-se os químicos, os biológicos, os comportamentais, o tempo, a educação e o nível sócio econômico (diagrama proposto por LUSI e modificado por MAGALHÃES et al., 2009).

Os fatores químicos relacionados à erosão dentária são o pH, o pK, a capacidade tampão, o tipo de ácido presente, a presença de agentes quelantes e a presença ou não de cálcio, flúor e fósforo da solução (diagrama proposto por LUSI modificado por MAGALHÃES et al., 2009). Refrigerantes, bebidas esportivas, sucos de frutas, chás de frutas e vinagres contém ácidos em suas composições (ácido cítrico, fosfórico e acético), e apresentam pH menor que 4,5 (LUSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

A saliva, a película adquirida, o biofilme dentário, a estrutura dentária e a saúde geral dos indivíduos são fatores biológicos relacionados à erosão. Segundo Hall et al., 1999 e Meurman e Frank, 1991, devido à capacidade tampão da saliva, sua ação remineralizadora e sua habilidade em formar uma película protetora, a saliva tem importante papel em minimizar o desgaste do esmalte e dentina devido a desafios erosivos e abrasivos. A saliva também é responsável pela formação da película adquirida, a qual é uma barreira física, e protege as superfícies dentárias do contato direto com os ácidos, reduzindo a dissolução da hidroxiapatita (HANNIG; BALZ, 2001; HANNIG et al., 2004). O mesmo ocorre com o biofilme dentário, que também atua como uma barreira física, protegendo os dentes da erosão dentária (HONÓRIO et al., 2008). Com relação à saúde geral dos indivíduos, pode-se destacar os que apresentam condições de xerostomia, que acomete irradiados na região de cabeça e pescoço, pessoas com Síndrome de Sjögren ou que fazem uso de medicações que inibem o fluxo salivar. O fluxo salivar reduzido diminui o pH e a capacidade tampão da saliva (MEYER-LUECKEL; KIELBASSA, 2002).

Os fatores de risco comportamentais ou de estilo de vida para erosão dentária estão relacionados aos hábitos alimentares, a forma de consumo das bebidas, ao consumo de drogas e medicamentos, as medidas de higiene oral, ao tipo de trabalho e atividades esportivas e a distúrbios gastro esofágicos (MAGALHÃES et al., 2009).

Devido a mudanças no estilo de vida, mudanças nos hábitos alimentares também vêm ocorrendo. Neste último caso, destacam-se um aumento no consumo de comidas e bebidas ácidas (TEN CATE; IMFELD, 1996), como refrigerantes, bebidas esportivas, sucos de frutas e chás de frutas (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004), que muitas vezes são ingeridos na própria garrafa, prolongando o contato dos dentes com a solução ácida, aumentando o desafio erosivo (BASSIOUNY; YANG, 2005). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) relatou um aumento de 490% no consumo de refrigerantes, de 1995 a 2003 (IBGE, 2004).

Em adição aos ácidos da dieta, pessoas que consomem drogas, álcool, medicamentos ou que são adeptos da dieta lacto vegetariana, podem ter um risco aumentado de sofrer erosão dentária (LUSSI et al., 2006).

Medidas de higiene oral também podem influenciar a progressão da erosão, uma vez que superfícies dentárias que foram expostas a ácidos ficam amolecidas e vulneráveis a forças mecânicas como a abrasão, a qual tem pequeno ou nenhum efeito sob tecidos hígidos (DAVIS; WINTER, 1980; ATTIN et al., 2000). Assim, o momento de escovar os dentes após um ataque ácido, o tipo de escova dentária e o dentífrico utilizado podem influenciar na progressão da lesão (HOOPER et al., 2003).

Um trabalho realizado por Attin et al. 2001, mostrou que a resistência do esmalte e da dentina à abrasão diminuiu após a erosão, porém melhorou com o aumento do tempo de remineralização. No entanto, mesmo após um período de 60 minutos de remineralização o desgaste do esmalte foi significativamente maior quando comparado ao grupo que foi somente erodido, mas não abrasionado. O mesmo foi observado por Rios et al. (2006) que constataram que a saliva estimulada pela goma de mascar após um desafio erosivo ou erosivo e abrasivo reduz o desgaste dentário. Os autores observaram um decréscimo no desgaste para o grupo que foi somente erodido, seguido do grupo que foi erodido e abrasionado 60 minutos após o desafio erosivo e por último, o grupo que foi abrasionado imediatamente após o desafio erosivo. Assim, para pacientes que apresentam risco ao desgaste dentário é recomendado aguardar, no mínimo, de 30 a 60 minutos para realizar a escovação dentária após um desafio erosivo.

No momento da escovação, o desgaste que acomete o esmalte e a dentina erodidos é dependente do tipo de escova (manual ou elétrica), da força que

é utilizada e do tipo de dentífrico utilizado (HOOPER et al., 2003; WIEGAND; KOWING; ATTIN, 2007). A perda de tecido duro aumenta à medida que a força aplicada à escova, no momento da escovação, aumenta. (WIEGAND; KOWING; ATTIN, 2007). Além disso, a abrasão causada pela escovação é principalmente influenciada pelo dentífrico utilizado. A abrasividade do dentífrico é determinada pelo tamanho e quantidade de abrasivo utilizado, pelo pH, pela capacidade tampão e pela concentração de flúor. Geralmente, a perda de esmalte e dentina aumenta com o aumento da abrasividade do dentífrico utilizado (HOOPER et al., 2003; WIEGAND et al., 2008). Em adição, dentífricos fluoretados podem reduzir a desmineralização erosiva e a abrasão dos tecidos erodidos (MAGALHÃES et al., 2007 e 2008). Assim, pacientes que apresentam lesões erosivas devem utilizar dentífricos fluoretados e com baixa abrasividade para seus cuidados de higiene oral (MAGALHÃES et al., 2009).

A abrasão do esmalte amolecido aumenta consideravelmente a perda de tecido duro (DAVIS; WINTER, 1980; ATTIN et al., 2001). Portanto, os danos causados pela erosão podem ser acelerados quando ocorre em combinação com a atrição e abrasão (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL, 2005). O maior fator do desgaste dentário está na interação entre erosão causada por ácidos endógenos ou exógenos, provenientes da dieta, e forças abrasivas intraorais (SALES-PERES et al., 2007).

Segundo Zero (2007), a origem de ácidos extrínsecos envolvidos na erosão dentária pode estar relacionada a fatores ambientais, como por exemplo, trabalhadores expostos a fumaças e gases em fábricas de bateria, explosivos, galvanização, sem a devida proteção (máscaras respiratórias) ou esportistas que entram em contato direto com a água de piscinas com baixo pH devido a manutenção inadequada.

Em adição ao tipo de alimento e bebida consumido, a frequência e o tempo de consumo dos mesmos também são fatores de risco à erosão dentária (ZERO, 2007). Clinicamente, o período de tempo em que os dentes são banhados por ácidos é mais importante que o volume da bebida ácida consumida (WEST; HUGHES; ADDY, 2000; EISENBURGER; ADDY, 2001). Sabe-se que bebidas carbonatadas são frequentemente mantidas na boca até que as bolhas se dissipem, fazendo com que essas bebidas tenham um contato com os dentes muito maior do



que bebidas não carbonatadas. Além disso, a habilidade das bebidas de se aderirem ao esmalte está baseada em suas propriedades termodinâmicas (IRELAND; MCGUINNESS; SHERRIFF, 1995). Ainda segundo Zero (2007), o total de ácido titulável das substâncias é mais importante que o pH das mesmas, porque desta forma é que se pode determinar a real quantidade de H<sup>+</sup> disponível para interagir com a superfície do dente, e quanto maior a quantidade de H<sup>+</sup> disponível, maior é o risco da ocorrência da erosão dentária.

Além dos ácidos causadores da erosão dentária de origem extrínseca, têm-se os ácidos de origem intrínseca, provenientes de diversas desordens gastrointestinais, como refluxo gastro-esofágico (LAZARCHIK; FRAZIER, 2009) e alimentares, como anorexia e bulimia, que expõem a dentição a frequentes contatos com ácidos gástricos, que também podem levar à erosão. (TEN CATE; IMFELD; 1996; BARTLETT, 2006.).

Investigações epidemiológicas têm revelado um aumento na prevalência de erosão dentária nos últimos anos em todas as idades de pacientes (BARTLETT; SMITH, 1998).

Um trabalho realizado por Lussi et al. (1991), verificou que 7,7% de jovens (26 a 30 anos), e 13,2% de adultos (46 a 50 anos) apresentaram ao menos uma superfície dentária bucal afetada por erosão com envolvimento de dentina. Na oclusal dos dentes, pelo menos uma lesão severa foi observada em 29,9% dos jovens e 42,6% dos adultos.

No Brasil, Rios et al., 2007, avaliaram a prevalência de desgaste em dentes decíduos de crianças de 6 anos de idade e verificaram que 34,8% das crianças apresentavam desgaste nos incisivos, 78,1%, nos caninos e 40,7% nos molares. Analisando as respostas a um questionário de fatores etiológicos para desgaste dentário, que foi aplicado aos pais das crianças, os autores consideraram que o desgaste nos caninos apresentou correlação com a presença de bruxismo, e que o desgaste nos incisivos apresentou correlação com o hábito de segurar o refrigerante na boca antes de engolir. No entanto, os autores concluíram que os achados indicam que o desgaste nos incisivos poderia ser considerado fisiológico para esta idade.

Sales-Peres et al., 2008, avaliaram a prevalência de desgaste dentário em 295 adolescentes brasileiros com 12 anos de idade. No total, 24.780 superfícies dentárias foram avaliadas, sendo que 73,10% não apresentaram nenhum desgaste, 24,10%, apresentaram lesões incipientes e 2,46% lesões moderadas. Lesões severas não foram detectadas. A prevalência de desgaste dentário foi de 26,90%, sendo 53,22% em incisivos, 50,51% em caninos, 10,17% em pré molares e 10,85% em molares. Além disso, a prevalência de desgaste em diferentes níveis foi similar em meninos e meninas.

Desta forma, conclui-se que a erosão não se trata de uma lesão rara. Em adição, sendo a perda de estrutura dentária irreversível, medidas preventivas para erosão dentária devem ser instauradas.

Protocolos utilizando ferro também têm sido testados em situações que simulam desafios erosivos. Neste sentido, Brookes et al. (2004), utilizaram o  $\text{FeSO}_4$  a 10 mmol/L e observaram que este composto inibiu em 51% a dissolução da hidroxiapatita sintética por ácido acético a 10 mmol/L, enquanto que uma solução contendo 1,24 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  apresentou uma inibição de 10%. Este grupo de pesquisa havia publicado anteriormente um trabalho de pesquisa, mostrando o efeito do cobre na inibição da desmineralização do esmalte humano (BROOKES et al., 2003). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Buzalaf et al. (2006), onde foi encontrada uma inibição na desmineralização do pó de esmalte bovino de 40 e 13%, respectivamente, para as concentrações de  $\text{FeSO}_4$  de 10 mmol/L e 1,25 mmol/L, respectivamente. A inibição máxima (em torno de 50%) da dissolução foi encontrada para a dose de 15 mmol/L, não havendo uma inibição adicional pelo incremento da dose até 120 mmol/L.

Em 2007, Sales-Peres et al., avaliaram o efeito de um bochecho com solução de  $\text{FeSO}_4$  a 10 mmol/L na redução do desgaste e perda de dureza superficial em blocos de esmalte e dentina submetidos a desafio erosivo e abrasivo *in situ/ex vivo*. Durante duas fases experimentais de 5 dias cada, 10 voluntários utilizaram um dispositivo intraoral palatino com 12 espécimes, sendo 6 de esmalte e seis de dentina, alocados em 3 fileiras horizontais (4 espécimes cada). Em uma das fases, os voluntários imergiram o dispositivo na Coca-Cola<sup>®</sup> por 5 minutos, 4 vezes ao dia, e imediatamente após a imersão no refrigerante nenhum tratamento era realizado em uma das fileiras, a outra fileira foi escovada após 1 minuto usando um

dentifrício fluoretado e o dispositivo foi recolocado na boca. Após 30 min, a última fileira também foi escovada. Na outra fase, os mesmos procedimentos foram repetidos, porém após a imersão do dispositivo no refrigerante, os voluntários realizaram um bochecho com a solução contendo 10 mmol/L de  $\text{Fe}^{+2}$ . A solução testada reduziu significativamente a perda de dureza superficial em esmalte e o desgaste em dentina.

Num estudo feito por Kato et al. (2007), avaliou-se o efeito de várias concentrações (1,25, 2,5, 5, 10, 15, 30 e 60 mmol/L) de  $\text{FeSO}_4$  na dissolução do pó de esmalte bovino quando adicionado a duas bebidas carbonatadas, Sprite Zero<sup>®</sup> e Coca-Cola<sup>®</sup>. Os resultados mostraram uma redução de 11 e 17% quando o  $\text{FeSO}_4$  foi adicionado à Coca-Cola<sup>®</sup> em concentrações de 30 e 60 mmol/L, respectivamente. No entanto, para a Sprite Zero<sup>®</sup>, concentrações de  $\text{FeSO}_4$  acima de 10 mmol/L não apresentaram efeito significativo, enquanto concentrações ainda maiores aumentaram a dissolução do pó de esmalte. Sendo assim, o tipo do ácido presente nestas bebidas parece modular o efeito do  $\text{FeSO}_4$  em inibir a dissolução do pó de esmalte bovino. O mesmo grupo de pesquisadores também avaliou o efeito de 10 mmol/L de  $\text{Fe}^{+2}$  adicionado ao refrigerante (Coca-Cola<sup>®</sup>) na desmineralização de blocos de esmalte bovino, e encontrou redução significativa em relação ao desgaste dentário (0,9  $\mu\text{m}$ ) quando comparado ao grupo controle (1,6  $\mu\text{m}$ ) Kato et al. (2007). Diante destes resultados, o grupo realizou um trabalho *in situ* no qual foi observado que a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L à Coca-Cola<sup>®</sup> reduziu significativamente seu potencial erosivo tanto em esmalte quanto em dentina bovinos (KATO, 2007), sendo o efeito protetor mais pronunciado em dentina.

O efeito do  $\text{Fe}^{+2}$  também foi avaliado por Kato et al. (2009) quando adicionado a um verniz. Para isso, blocos de esmalte bovinos foram cobertos com uma fina camada do verniz experimental contendo 10 mmol/L de  $\text{Fe}^{+2}$ , o qual foi removido após 6 horas, e então as amostras foram submetidas a seis ciclos de des-re (Coca-Cola<sup>®</sup> 10 min e 1 hora saliva artificial). Os resultados revelaram que o desgaste dentário foi significativamente menor no grupo do verniz experimental (0,45  $\mu\text{m}$ ) quando comparado ao verniz fluoretado (2,7% F, 0,55  $\mu\text{m}$ ), ao verniz placebo - (0,99  $\mu\text{m}$ ) e ao grupo sem tratamento (1,01  $\mu\text{m}$ ).

A partir desta revisão de literatura fica evidente que o íon ferro tem ação benéfica na inibição da desmineralização dentária, seja ela de natureza cariogênica

ou erosiva. Como a prevalência de erosão dentária tem aumentado nos últimos anos, e um grande contribuinte para isto é o consumo crescente de bebidas ácidas, é muito importante o estudo de medidas preventivas capazes de reduzir o efeito erosivo destas bebidas. Uma vez que quando adicionado às bebidas o ferro pode causar manchamento dentário e modificar o sabor da bebida, além dos problemas toxicológicos, seria interessante testar sua utilização em associação a outros íons com potencial preventivo de desmineralização já reconhecido na literatura, como é o caso do flúor, o que permitiria o emprego de doses ainda menores de  $Fe^{+2}$ . Em adição, o dentifrício parece ser um veículo atraente para a aplicação de ferro, uma vez que eventuais manchas decorrentes da aplicação poderiam ser removidas durante a escovação.

### *3 PROPOSIÇÃO*

---



### 3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos gerais:

1. Investigar o efeito do  $\text{Fe}^{+2}$ , associado ou não ao  $\text{F}^-$ , na redução da desmineralização do esmalte dentário bovino;
2. Desenvolver e avaliar um dentifrício enriquecido com  $\text{Fe}^{+2}$  para utilização na prevenção da erosão associada à abrasão.

A fim de se atingir estes objetivos, foram realizados quatro subprojetos, que tiveram os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar o efeito protetor de concentrações crescentes do  $\text{Fe}^{+2}$  associadas ou não à presença de concentrações crescentes de  $\text{F}^-$  contra a dissolução do pó de esmalte bovino *in vitro*;
2. Avaliar o efeito protetor do  $\text{Fe}^{+2}$  contra a dissolução mineral da superfície do esmalte bovino *in vitro*;
3. Desenvolver e avaliar, *in vitro*, dentifrícios fluoretados enriquecidos com diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$ , visando à prevenção da perda mineral do esmalte bovinos;
4. Avaliar, *in situ*, o efeito inibidor do dentifrício acrescido de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  na desmineralização do esmalte e dentina bovinos sadios ou previamente erodidos.





## *4 MATERIAL E MÉTODOS*

---



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SUBPROJETO 1: DETERMINAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $Fe^{+2}$ ASSOCIADAS OU NÃO À PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $F^{-}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO DO PÓ DE ESMALTE BOVINO *IN VITRO*

#### 4.1.1 Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte bovino

Para a realização do estudo, utilizaram-se aproximadamente 100 incisivos bovinos, que foram previamente extraídos (Frigorífico Vangélio Mondelli / Bauru - SP) e vieram armazenados em recipientes contendo solução de timol a 0,1%. Os dentes foram selecionados a fim de se eliminar os que apresentassem rachaduras e hipoplasias. A superfície do esmalte foi limpa com escova de Robinson, em baixa rotação (Kavo do Brasil S.A. Indústria e Comércio - Joinville, Brasil) com a mistura de pedra pomes fina e água deionizada. Os dentes foram enxaguados com água deionizada e nela armazenados até o momento do corte.

Para a obtenção dos blocos de esmalte bovino, as coroas foram fixadas pela face palatina com godiva de baixa fusão (Kerr) em placas quadradas de resina acrílica com dimensões de 4 cm x 4 cm x 1 cm. Esta placa de resina foi posteriormente acoplada a uma cortadeira elétrica ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) na qual, utilizando-se dois discos diamantados dupla face (High Concentration Diamond. Wafering Blade – 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm/ Extec Corp.-USA/Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mmol/L de espessura e orifício central de 1,3 cm confeccionado previamente sob encomenda em uma tornearia) entre os discos, foram realizados um corte no sentido méso-distal e um no sentido cérvico-incisal.

Os blocos de dentes bovinos foram submetidos ao polimento da dentina, até restar somente o esmalte. Para isso, os blocos foram fixados em discos de acrílico com cera pegajosa (KOTA) e então, sofreram desgaste na superfície de dentina com lixa d'água de carbetto de silício de granulação 320 numa lixadeira

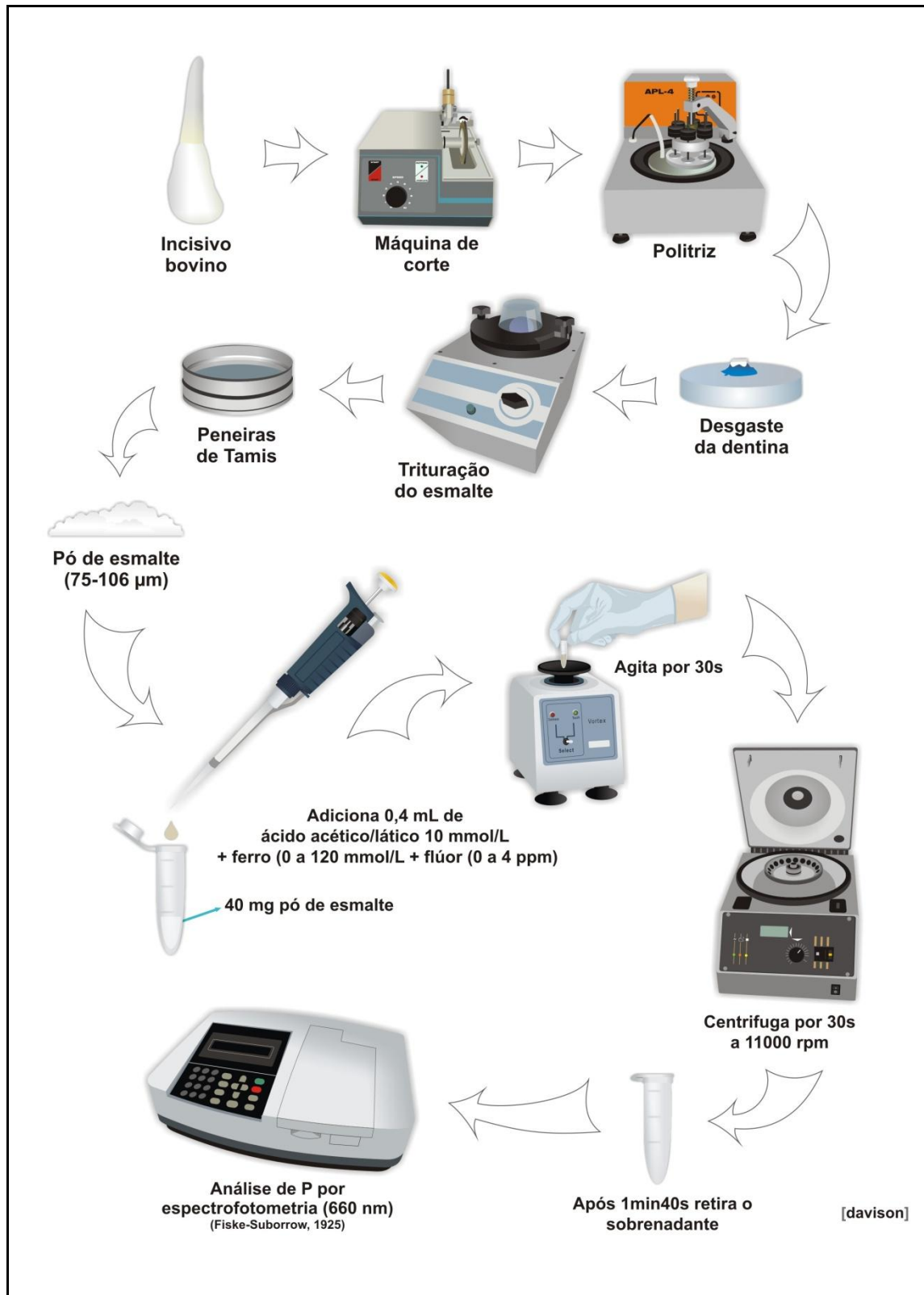
elétrica com sistema de polimento múltiplo, automático para seis corpos de prova (APL-4/AROTEC-Cotia, São Paulo) até que o fragmento permanecesse totalmente isento de remanescentes de dentina. Os fragmentos de esmalte foram mantidos secos à temperatura ambiente e armazenados em frascos plásticos.

A partir destes fragmentos de esmalte foi produzido esmalte em pó, a partir da moagem dos fragmentos em equipamento tipo gral e pistilo (KM1, MLW, Hergerstellt, Alemanha). A moagem foi executada até que se obtivessem fragmentos menores que 106  $\mu\text{m}$ . Estes fragmentos foram selecionados através de passagem por uma peneira de Tamis (Bertel, Caieiras, Brasil), com uma malha que permitia a passagem de partículas menores que 106  $\mu\text{m}$ . Para se padronizar o tamanho das partículas, após a passagem pela peneira acima descrita, o pó obtido foi levado a outra peneira de Tamis (Bertel, Caieiras, Brasil) que permitia a passagem de partículas menores que 75  $\mu\text{m}$ . O pó de esmalte que não passou por esta peneira, e, portanto, contendo partículas entre 75 e 106  $\mu\text{m}$  de diâmetro, foi usado no estudo.

#### **4.1.2 Delineamento experimental**

Seguindo um modelo abiótico, proposto por BROOKES et al. (2003), no tempo 0, 0,4 mL de ácido acético 10 mmol/L contendo ou não ferro ou flúor foram adicionados a 40 mg de esmalte em pó (1 mg de esmalte em pó/ 10  $\mu\text{L}$  de ácido acético) e agitado por 30 segundos (em triplicata). A amostra foi imediatamente centrifugada por 30 segundos a 11000 rpm e o sobrenadante removido após 1 minuto e 40 segundos. Este procedimento foi repetido com ácido acético a 10 mmol/L contendo concentrações crescentes de ferro (1,25, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 ou 120 mmol/L) associadas ou não à presença de flúor em concentrações crescentes (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 ou 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( Figura 1).

Os mesmos procedimentos descritos acima foram também realizados utilizando-se o ácido láctico a 10 mmol/L, por ser este o ácido mais encontrado durante o metabolismo de açúcares na placa bacteriana.



**Figura 1** - Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 1

### 4.1.3 Determinação do fósforo liberado pelo esmalte em pó

O fósforo liberado no sobrenadante foi determinado colorimetricamente em triplicata, pelo método de Fiske e Subarrow (1925), utilizando-se um espectrofotômetro digital (Cary 50).

Para o preparo das amostras e dos padrões empregaram-se os seguintes reagentes:

1- Reativo Redutor

- Ácido alfa amino naftol sulfônico (AANS): 0,2 g
- Sulfeto de sódio: 1,2 g
- Dissulfito de sódio: 1,2 g

A mistura acima foi triturada em gral e armazenada em frasco escuro. Na hora da análise, cada 0,025 g da mistura foi dissolvida em 1,0 mL de água deionizada.

2- Ácido Molibdico

- Molibdato de amônio: 6,25 g
- Ácido sulfúrico concentrado: 27,0 mL

3- Padrão contendo 3 mg% P (a partir de fosfato de potássio)

A reação foi feita de acordo com o quadro 1.

**Quadro 1** - Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBBAROW (1925)

	Blanck	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Amostra
Água deionizada	2,300 mL	2,275 mL	2,250 mL	2,200 mL	2,100 mL	1,900 mL	1,500 mL	2,200 mL
Padrão P 3 mg%	-	0,025 mL	0,050 mL	0,100 mL	0,200 mL	0,400 mL	0,800 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	-	0,100 mL
Ácido molibdico	0,500 mL em todos, agitar e esperar 10 minutos							
Reativo Redutor	0,200 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler a amostra							
A 660 nm								
µg P	0	0,75	1,5	3,0	6,0	12,0	24,0	

Inicialmente, foi colocada água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos no quadro 1. A seguir foram colocados, em triplicatas, os padrões de P ou as amostras. Então foi colocado 0,5 mL de ácido molibdico em todos os tubos, feita agitação e esperaram-se 10 minutos. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição de 0,2 mL de reativo redutor. Após 20 minutos da colocação do reativo redutor, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (Cary 50) a 660 nm de absorvância.

#### 4.1.4 Análise estatística

O software GraphPad Prism 4 versão 4.0 for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA) foi utilizado. Os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios (concentração de  $\text{Fe}^{+2}$  e concentração de  $\text{F}^-$ ), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações individuais. Foram realizados testes separados para os experimentos realizados com ácido acético e ácido láctico.

O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4.2 SUBPROJETO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE $Fe^{+2}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO MINERAL DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE BOVINO

### 4.2.1 Obtenção e corte dos fragmentos de esmalte bovino

Os dentes foram fixados em uma placa de resina acrílica com dimensões de 4 cm x 4 cm x 1 cm, pela face palatina, com godiva de baixa fusão. A placa foi acoplada a uma cortadeira elétrica (ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e, utilizando-se um disco diamantado dupla face (High Concentration Diamond. Wafering Blade - 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm Extec Corp.-USA/Ref: 12205), os incisivos foram cortados. Um corte transversal foi feito para realizar a separação da coroa e raiz (figura 2) e um corte longitudinal, no sentido vestibulo-lingual, no longo eixo da coroa, foi realizado para separar as metades mesial e distal do dente (figura 3).

A superfície natural do esmalte da face vestibular foi deixada exposta e o restante do fragmento foi coberto com esmalte de unha (Risque, Niasi, Taboão da Serra, Brasil), seguindo modelo proposto por Brookes, 2004 (figura 4).



**Figura 2** - Corte transversal, separando a coroa da raiz



**Figura 3** - Corte longitudinal, separando as faces mesial e distal do fragmento

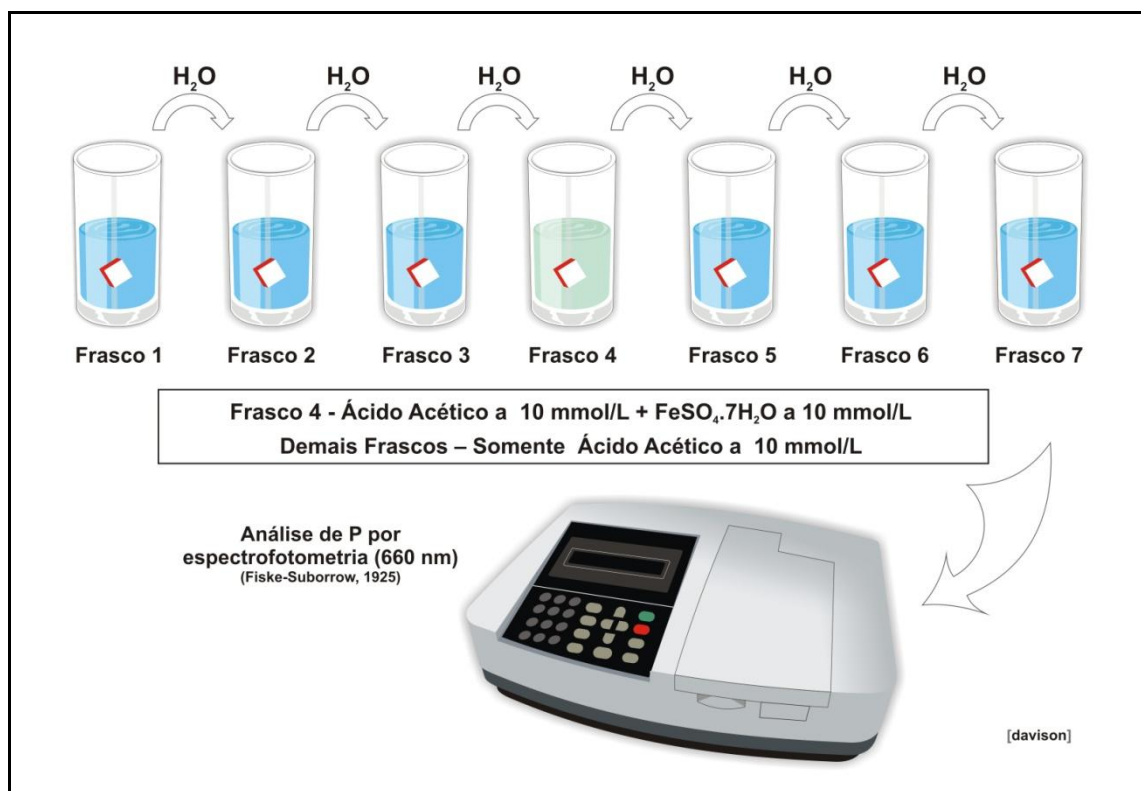


**Figura 4** - Fragmento de dente bovino. Face vestibular livre de esmalte de unha e o restante, coberto com o mesmo



#### 4.2.2 Delineamento experimental

Uma série de 7 tubos plásticos foi preparada para cada fragmento, num total de 84 frascos ( $n=6$ ), cada um contendo 2 mL de ácido acético a 10 mmol/L pH 3,2. No frasco 4, ao ácido acético foi adicionado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  numa concentração de 10 mmol/L. Um dos fragmentos foi colocado no frasco 1 e agitado por 1 minuto. Foi então removido e lavado em água corrente deionizada, sendo o excesso de água retirado com papel toalha absorvente. Este procedimento repetiu-se na medida em que os dentes foram serialmente expostos ao conteúdo dos frascos 2 até 7. O mesmo aconteceu para os outros cinco fragmentos. Como controle, o outro fragmento obtido do mesmo incisivo bovino foi similarmente exposto a uma série nova de 7 frascos contendo apenas ácido acético a 10 mmol/L (figura 5). Em sequência, para se determinar a quantidade de esmalte dissolvido durante cada exposição no conteúdo de cada frasco foi analisado o fósforo, em triplicata, pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subarrow (1925), já descrito acima (item 4.1.3).



**Figura 5** - Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 2

### 4.2.3 Análise estatística

O software GraphPad Prism 4 versão 4.0 for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA) foi utilizado. Os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios (grupos (experimental e controle) e frascos (1 a 7)), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações individuais.

O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4.3 SUBPROJETO 3: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS ENRIQUECIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $Fe^{+2}$ , VISANDO À PREVENÇÃO DA PERDA MINERAL DO ESMALTE BOVINOS

A fim de se obter uma fórmula com boa estabilidade de cor, textura e sabor, aproximadamente 16 fórmulas piloto de dentifrícios foram desenvolvidas em nosso laboratório (dados não mostrados). Muitas dificuldades foram enfrentadas, uma vez que não se obtinha estabilidade, principalmente em relação à textura do mesmo.

A composição básica da fórmula que foi utilizada incluiu: sacarina sódica, cocoamidopropilbetaína, lauril sulfato de sódio, sílica, carboximetilcelulose, sorbitol, glicerina bi-destilada, goma xantana, metilparabeno, propilparabeno, polietilenoglicol, essência de menta, corante e água. A concentração de  $Fe^{+2}$  presente nos dentifrícios variou de 0, 1,0 mg/g, 2,5 mg/g ou 5,0 mg/g, combinado ao não ao  $F^{-}$  (como NaF), que variou, de 0 ou 1100  $\mu\text{g/mL}$ .

Para se determinar a melhor dose de  $Fe^{+2}$  e de  $F^{-}$  que deveria ser incorporada ao dentifrício para se prevenir a perda mineral do esmalte, foi realizado um estudo *in vitro* com diferentes concentrações desses íons.

### 4.3.1 Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte bovino

Para a realização do estudo, utilizaram-se 200 incisivos bovinos. Os dentes foram previamente extraídos (Frigorífico Vangélio Mondelli / Bauru - SP) e vieram armazenados em recipientes contendo solução de timol a 0,1%. A superfície do esmalte foi limpa com escova Robinson, em baixa rotação (Kavo do Brasil S.A. Indústria e Comércio - Joinvile, Brasil) com a mistura de pedra pomes fina e água deionizada. Os dentes foram enxaguados com água deionizada e nela armazenados até o momento do corte.

Para realização dos cortes dentários, o protocolo seguido foi o mesmo descrito no item 4.1.1. Posteriormente, os blocos de esmalte sofreram desgaste na superfície de dentina por causa da curvatura interna da câmara pulpar. A superfície de dentina foi desgastada na politriz com lixa d'água de carbeto de silício de granulação 320 até que permanecesse totalmente plana para que fosse acomodada nos discos de acrílico. A espessura final do bloco de esmalte permaneceu em torno de 2 a 2,5 mm. Depois de planificada a dentina, os fragmentos foram levados à lavadora ultra-sônica (UNIC, USC 750, USA) com 1.700 mL de água deionizada, por 2 minutos (em torno de 16 blocos por vez). Utilizou-se papel toalha para secagem dos blocos e estes foram descolados e refixados em blocos de resina com cera pegajosa para escultura de prótese fixa (KOTA), agora com a superfície de esmalte voltada para cima.

Os fragmentos de esmalte foram submetidos a um processo de polimento das superfícies de esmalte, objetivando planificá-las e regularizá-las. Para este procedimento foi utilizada a mesma lixadeira elétrica usada para o desgaste da dentina e uma sequência de lixas de granulação 320, 600, 800 e 1200, por 30 segundos cada, e com banhos intermediários em lavadora ultra-sônica após o uso de cada lixa.

Após o polimento com as lixas, os blocos de esmalte foram polidos com feltro de papel (BUEHLER POLISHING CLOW, Texmet 1000 with adhesive backing for 8" wheel) durante 2 minutos com solução diamantada à base de água de 1  $\mu\text{m}$  (BUEHLER, n. 40-6530). Os blocos de esmalte foram novamente lavados com água deionizada um a um. Após este procedimento, os blocos de esmalte já estavam prontos para se avaliar a microdureza. Os blocos lixados e polidos foram

armazenados em recipientes plásticos fechados, juntamente com gaze embebida em água deionizada, à temperatura de 4° C, na câmara fria.

#### 4.3.2 Avaliação da microdureza inicial dos fragmentos

Para as análises das microdurezas de esmalte, utilizou-se o microdurômetro SHIMADZU MICRO HARDNESS TESTER HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop (KHN), com carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA). Foram feitas 5 endentações equidistantes 100 µm entre si no centro dos blocos de esmalte antes dos tratamentos, com a finalidade apenas de selecionar os mesmos.

#### 4.3.3 Delineamento Experimental

Foram utilizados 200 blocos de esmalte bovino (4 x 4 mmol/L), selecionados pela microdureza de superfície (SMH inicial), 10% acima e 10% abaixo da média da microdureza dos blocos, protegidos em metade da superfície com esmalte de unha (Risque, Niasi, Taboão da Serra, Brasil) e distribuídos em 10 grupos de acordo com o tipo de dentifrício usado: (A) Crest® (1.100 µg/mL F<sup>-</sup>, NaF, controle positivo, n=20), (B) Formulado com F<sup>-</sup> (1.100 µg/mL, NaF) (n=20); (C) Formulado com 1,0 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (D) Formulado com 2,5 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (E) Formulado com 5,0 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (F) Formulado com F<sup>-</sup> (1.100 µg/mL, NaF) + 1,0 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (G) Formulado com F<sup>-</sup> (1.100 µg/mL, NaF) + 2,5 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (H) Formulado com F<sup>-</sup> (1.100 µg/mL, NaF) + 5,0 mg/g Fe<sup>+2</sup> (n=20); (I) Placebo (sem F<sup>-</sup> e sem Fe<sup>+2</sup>); (J) Sem escovação (controle negativo, n=20). Todos os dentifrícios formulados possuíam a mesma composição, exceto pela presença ou não de F<sup>-</sup> e diferentes concentrações de Fe<sup>+2</sup>.

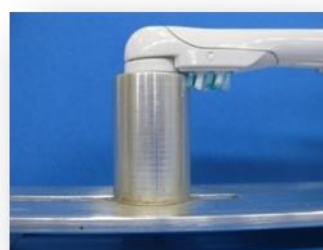
Todos os blocos permaneceram durante 2 h em saliva humana para a formação da película adquirida. Após este período, foram submetidos a 5 ciclos de desmineralização (Coca-cola®, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil, 10

mL/bloco, 5 minutos), lavagem em água deionizada (20 segundos), escovação na máquina (30 segundos), nova lavagem em água deionizada (20 segundos) e remineralização em saliva artificial por 55 minutos.

Para a realização dos testes de abrasão, foi utilizada uma máquina para simulação de escovação (figuras 6 e 7). Neste equipamento foi acoplada uma escova elétrica da marca Oral-B®, Cross Action™ Power, Procter & Gamble, Cuajimalp, México (1 cabeça/20 blocos do mesmo grupo). Cada cabeça teve suas cerdas posteriores cortadas para que não ficassem em contato com o anel do dispositivo (figuras 8 e 9).



**Figura 6**



**Figura 7**

**Figuras 6 e 7** - Dispositivo para simulação de escovação com acoplamento de escova elétrica



**Figura 8**



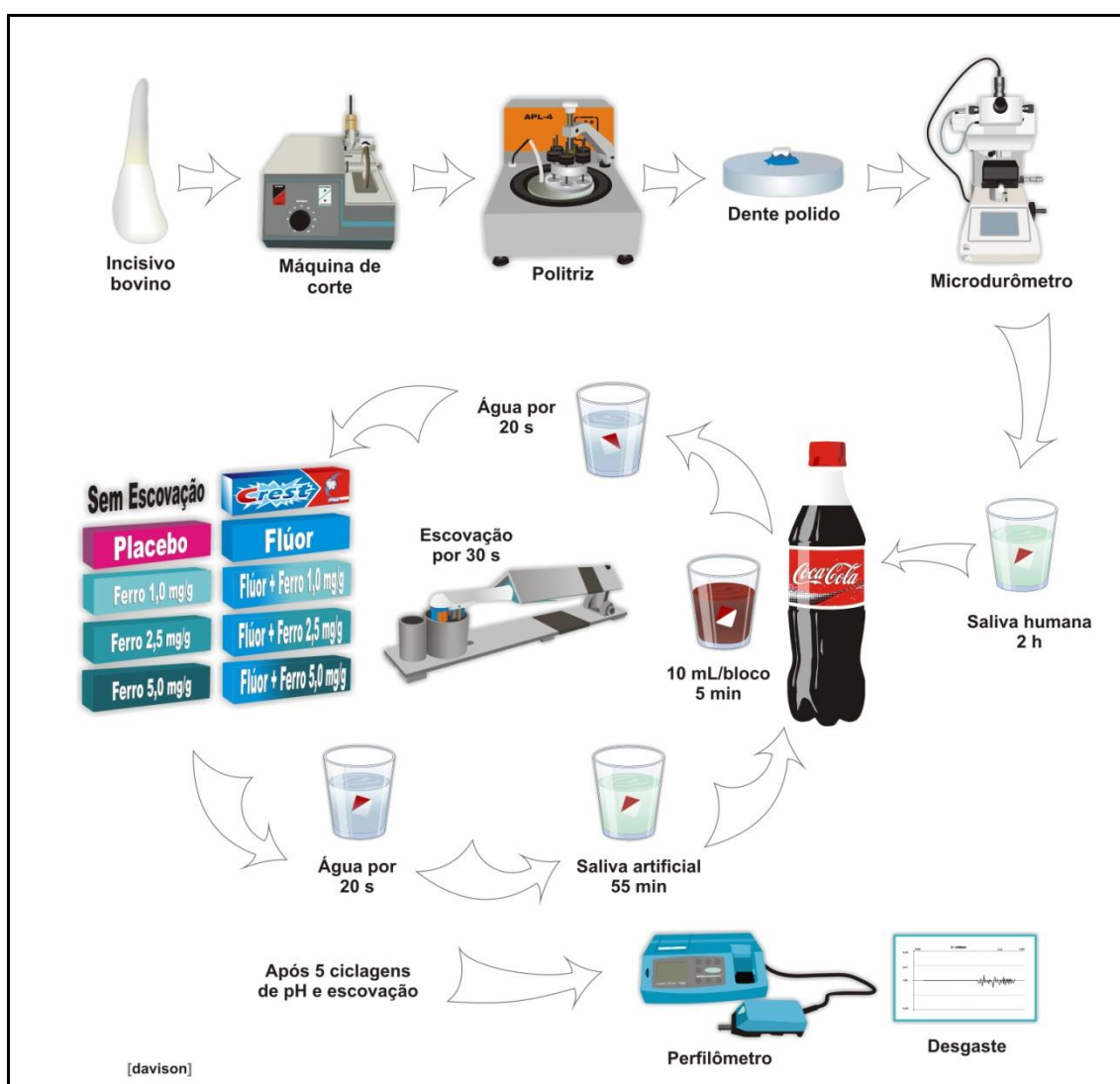
**Figura 9**

**Figuras 8 e 9** - Cabeça da escova elétrica modelo Cross Action e cabeça da escova com as cerdas posteriores cortadas, respectivamente

A carga aplicada em cada bloco de esmalte foi de 200 g, aproximadamente 1,96 newtons (WIEGAND et al., 2007), e o experimento foi realizado à temperatura ambiente. Em cada ciclo, 1,5 mL da solução do dentífrico foi injetado com pipeta volumétrica sobre cada espécime, sendo 0,5 mL a cada 10

segundos. A solução de dentífrício foi preparada na proporção 1 parte de dentífrício/ 3 partes de água deionizada em peso.

Um intervalo de 55 minutos foi mantido entre os ciclos. Neste período, os blocos permaneceram na saliva artificial. Ao final dos 5 ciclos, também houve permanência em saliva artificial por 55 minutos. O desgaste da superfície de esmalte foi mensurado da parte hígida (protegida) para a erodida/abrasionada, através de um perfilômetro (HomMel Tester T 1000, HoMmelwerke, Schwenningen, Alemanha) (figura 10).



**Figura 10** - Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 3

#### 4.3.4 Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad InStat versão 2 para Windows (GraphPad software, San Diego, Ca, EUA). Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, mas não foram homogêneos, foi feita transformação logarítmica para posterior aplicação de ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### 4.4 SUBPROJETO 4: ANÁLISE DO EFEITO INIBIDOR DO DENTIFRÍCIO ACRESCIDO DE $Fe^{+2}$ E $F^{-}$ NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA BOVINOS *IN SITU*

##### 4.4.1 Obtenção, corte e polimento dos fragmentos de esmalte e dentina bovinos

Para este estudo, foram utilizados 240 blocos de esmalte e 240 blocos de dentina bovinos.

A obtenção e o corte dos fragmentos de esmalte bovino seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.1.1. O polimento dos fragmentos de esmalte seguiu o protocolo descrito no item 4.3.1.

Para os fragmentos de dentina, os procedimentos de obtenção, corte e polimento da dentina interna foram semelhantes aos procedimentos descritos nos itens 4.1.1 e 4.3.1. Após a planificação da dentina interna, os fragmentos foram lavados em lavadora ultra-sônica e secos com papel toalha. Os fragmentos foram, então, descolados e refixados em blocos de resina com cera pegajosa agora com a superfície de esmalte voltada para cima. Este esmalte da superfície dos blocos foi todo removido através do desgaste com a lixa d'água de granulação 320 na politriz. Quando não havia mais remanescente de esmalte dentário, a dentina sofreu um processo de polimento. Para este procedimento, foi utilizada a politriz e a mesma sequência de lixas utilizadas para o polimento do esmalte (granulação 600, 800 e

1200 por 30 segundos cada e com banhos intermediários em lavadora ultra-sônica após o uso de cada lixa).

Após o polimento com as lixas, os blocos de dentina foram polidos com feltro de papel (BUEHLER POLISHING CLOW,) durante 2 minutos com solução diamantada à base de água de 1  $\mu\text{m}$  (BUEHLER, n. 40-6530). Os blocos de dentina foram novamente lavados com água deionizada um a um. Após este procedimento, os blocos de dentina apresentavam aspecto vítreo e já estavam prontos para serem utilizados no experimento. Os blocos de dentina foram armazenados em recipientes plásticos fechados à temperatura de 4° C, na câmara fria, totalmente cobertos com água deionizada, a fim de se evitar o ressecamento dos blocos e colapamento das fibras colágenas.

#### **4.4.2 Avaliação da microdureza inicial dos fragmentos**

Para as análises das microdurezas de esmalte, o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2 foi realizado.

A avaliação da microdureza não foi realizada nos fragmentos de dentina, uma vez que a dureza nestes blocos é bastante sujeita a variações em função do grau de hidratação do tecido, que tem influência direta no grau de colapamento das fibrilas colágenas (ATTIN et al., 2006).

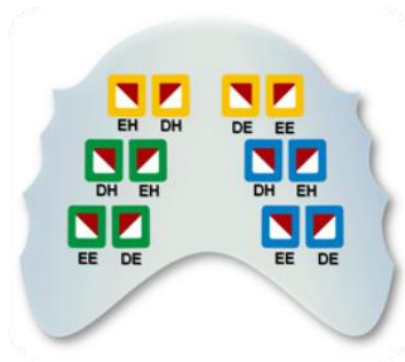
#### **4.4.3 Delineamento experimental**

Após a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – SP (Anexo A), foram selecionados dez voluntários, na faixa etária de 18 a 32 anos, sem distinção em relação ao gênero, participaram deste estudo cruzado e cego, realizado *in situ* em 4 fases de 5 dias, separadas por um intervalo de 10 dias. Em 3 fases foram utilizados dentifrícios com a mesma formulação básica, mas com a seguinte composição: (grupo 1) sem  $\text{F}^-$  e sem  $\text{Fe}^{+2}$  (placebo); (grupo 2) com 1100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{F}^-$  (como NaF); (grupo 3) com 1100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{F}^-$  + 5 mg/g  $\text{Fe}^{+2}$ . Na outra fase (grupo 4) foi utilizado o dentifrício Crest,



contendo 1100 µg/mL F<sup>-</sup> (como NaF) (padrão ouro). Durante o período de intervalo, os voluntários utilizaram dentifrício placebo.

Os voluntários utilizaram dispositivos acrílicos intrabucais palatinos contendo 12 blocos dentários provenientes de incisivos bovinos, sendo 6 de esmalte (três hígidos e três previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup>, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil, por 10 minutos) e 6 de dentina (três hígidos e três previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup> por 10 minutos). Os blocos foram alocados em 2 fileiras de três pares de blocos cada. Cada dois pares, ou um quarteto, continham 1 bloco de esmalte e 1 de dentina hígidos e 1 bloco de esmalte e 1 de dentina previamente erodidos. Cada quarteto recebeu um tratamento diferente. Num quarteto só foi realizada erosão (grupo controle - verde), no outro foram realizados erosão e gotejamento do “slurry” do dentifrício correspondente àquela fase, por 30 segundos (grupo ER + GOTA - amarelo), e no último, erosão e abrasão com “slurry” do dentifrício correspondente àquela fase, por 30 segundos (grupo ER + ABR - azul) (figura 11). A escovação foi realizada de forma manual, com escova extra-macia (Bitufo Class 28, Bitufo, Itupeva, Brasil).



**Figura 11** - Esquema ilustrativo da alocação dos blocos nos dispositivos acrílico. Os blocos destacados em verde só foram submetidos à erosão, aqueles destacados em amarelo foram submetidos à erosão e gotejamento do “slurry” de dentifrício, enquanto que os destacados em azul foram submetidos à erosão e abrasão com “slurry” do dentifrício. EH – esmalte hígido; EE - esmalte previamente erodido; DH – dentina hígida; DE – dentina previamente erodida.

Cada voluntário recebeu, em cada fase, uma Lista de Instruções ao Voluntário (Anexo D), 5 garrafas de Coca-Cola<sup>®</sup>, copo de vidro demarcado no nível de 150 mL, 1 escova de dentes Bitufo<sup>®</sup> (Bitufo Class 28, Bitufo, Itupeva, Brasil), 1 fio dental sem flúor (Colgate<sup>®</sup>, São Bernardo do Campo, Brasil), 1 caixinha de aparelho, gaze e o dentífrico correspondente a fase. No período de descanso, o voluntário utilizou dentífrico placebo.

O dispositivo foi instalado na noite anterior ao início do estudo, após a última higiene e antes do voluntário dormir. Os mesmos foram orientados a não fazer desafio erosivo nem abrasivo nos blocos durante as primeiras 12 horas da fase intra-oral para a formação da película adquirida.

Após este período, os voluntários realizaram 4 vezes por dia o desafio erosivo: imersão do aparelho dentro de um copo com Coca-Cola<sup>®</sup> (150 mL) por 5 minutos, remoção do dispositivo do copo, lavagem do dispositivo com água corrente. Destas, 2 vezes, além do desafio erosivo, o voluntário deveria gotejar o “slurry” (1 gota) no setor amarelo (ER + GOTA) e deixar agir por 30 segundos e em seguida lavar o dispositivo e, no setor azul (ER + ABR), o voluntário deveria gotejar o “slurry” (1 gota) e realizar o desafio abrasivo por meio da escovação por 30 segundos (MAGALHÃES et al., 2009).

O mesmo dentífrico utilizado no preparo do “slurry” foi utilizado para realizar a higiene oral (protocolo semelhante ao de MAGALHÃES et al., 2007).

Durante o uso, os voluntários foram instruídos a utilizarem o dispositivo durante 20 horas diárias. As outras 4 horas deveriam ser utilizadas para as principais refeições (café da manhã, almoço, jantar e ceia), ocasião em que o dispositivo deveria ser retirado da boca e permanecer envolto por gaze embebida em água de abastecimento.

Além disso, entre cada desafio erosivo, o voluntário deveria aguardar, no mínimo, 2 horas, para que houvesse tempo de ocorrer o processo de remineralização pela saliva.

Após o experimento, os blocos foram avaliados quanto ao desgaste dentário através da perfilometria. A Figura 12 ilustra o delineamento experimental descrito.

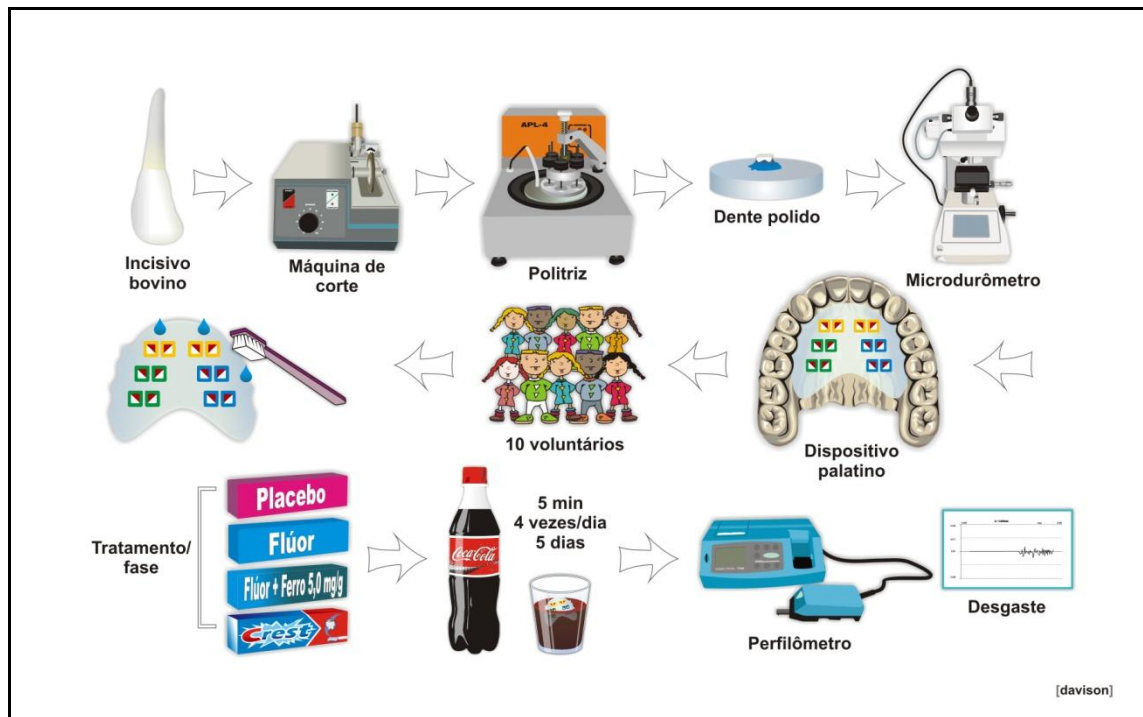


Figura 12 - Ilustração esquemática do delineamento experimental do Subprojeto 4

#### 4.4.4 Análise estatística

O software GraphPad Prism 4 versão 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi usado. Inicialmente foram cheçadas a normalidade e a homogeneidade dos dados. Estando estes critérios satisfeitos, os dados de esmalte hígido ou previamente erodido, bem como dentina hígida ou previamente erodida foram analisados separadamente por ANOVA a 2 critérios (tipo de dentifrício e condição) de medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.



## *5 RESULTADOS E DISCUSSÃO*

---



---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

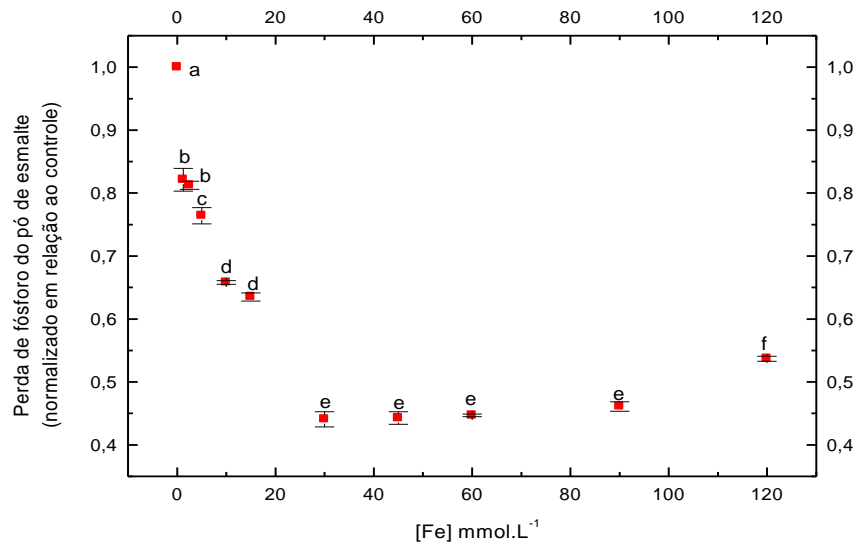
### 5.1 SUBPROJETO 1: DETERMINAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE $Fe^{+2}$ ASSOCIADAS OU NÃO À PRESENÇA DE $F^{-}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO DO PÓ DE ESMALTE BOVINO *IN VITRO*

O efeito do  $Fe^{+2}$  associado ou não ao  $F^{-}$  na proteção contra a desmineralização do pó de esmalte bovino pelo ácido acético foi investigado usando-se concentrações crescentes destes íons. Isto permitiu a obtenção de uma curva dose-resposta do efeito protetor do  $Fe^{+2}$  associado ao  $F^{-}$  para que fosse definida a concentração de ambos a ser usado no Subprojeto 2. Para o ácido acético, os resultados da quantidade de P ( $\pm$  DP) liberado a partir do pó de esmalte estão mostrados no quadro 2, e os resultados da perda de P a partir do pó de esmalte normalizada em relação ao controle (sem  $Fe^{+2}$ ) estão mostrados nas figuras 13 a 19.

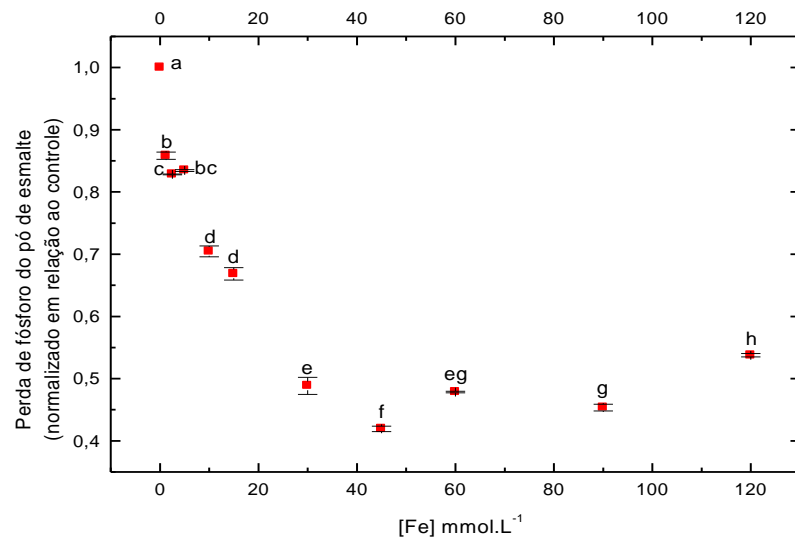
**Quadro 2** - Quantidade de P ( $\mu\text{g}$ ), média( $\pm\text{DP}$ ), liberada a partir do pó de esmalte em função das concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  adicionados ao meio de reação (ácido acético 10 mmol/L), n=3

Concentração de $\text{F}^-$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração de $\text{Fe}^{+2}$ (mmol/L)										
	0	1,25	2,5	5	10	15	30	45	60	90	120
0	8,242 ( $\pm 0,004$ )	6,770 ( $\pm 0,226$ )	6,693 ( $\pm 0,108$ )	6,296 ( $\pm 0,149$ )	5,423 ( $\pm 0,057$ )	5,223 ( $\pm 0,065$ )	3,632 (0,153)	3,649 ( $\pm 0,148$ )	3,685 ( $\pm 0,038$ )	3,801 ( $\pm 0,100$ )	4,457 ( $\pm 0,038$ )
0,125	8,139 ( $\pm 0,083$ )	6,984 ( $\pm 0,049$ )	6,742 ( $\pm 0,074$ )	6,792 ( $\pm 0,050$ )	5,736 ( $\pm 0,100$ )	5,439 ( $\pm 0,175$ )	3,975 ( $\pm 0,192$ )	3,414 ( $\pm 0,064$ )	3,892 ( $\pm 0,043$ )	3,694 ( $\pm 0,043$ )	4,373 ( $\pm 0,026$ )
0,25	8,075 ( $\pm 0,207$ )	7,158 ( $\pm 0,109$ )	6,635 ( $\pm 0,137$ )	6,618 ( $\pm 0,043$ )	5,793 ( $\pm 0,093$ )	5,917 ( $\pm 0,051$ )	3,853 ( $\pm 0,172$ )	3,607 ( $\pm 0,050$ )	3,809 ( $\pm 0,071$ )	4,015 ( $\pm 0,025$ )	4,681 ( $\pm 0,038$ )
0,5	8,060 ( $\pm 0,047$ )	7,134 ( $\pm 0,217$ )	6,751 ( $\pm 0,087$ )	6,676 ( $\pm 0,063$ )	5,958 ( $\pm 0,182$ )	5,678 ( $\pm 0,131$ )	3,787 ( $\pm 0,038$ )	3,657 ( $\pm 0,051$ )	3,652 ( $\pm 0,075$ )	3,916 ( $\pm 0,025$ )	4,473 ( $\pm 0,090$ )
1,0	7,988 ( $\pm 0,086$ )	7,047 ( $\pm 0,110$ )	6,833 ( $\pm 0,241$ )	6,858 ( $\pm 0,234$ )	5,596 ( $\pm 0,127$ )	5,760 ( $\pm 0,062$ )	3,852 ( $\pm 0,085$ )	3,523 ( $\pm 0,064$ )	3,941 ( $\pm 0,128$ )	3,875 ( $\pm 0,087$ )	4,299 ( $\pm 0,025$ )
2,0	7,893 ( $\pm 0,041$ )	7,126 ( $\pm 0,055$ )	6,486 ( $\pm 0,189$ )	6,734 ( $\pm 0,038$ )	5,513 ( $\pm 0,051$ )	5,917 ( $\pm 0,100$ )	4,106 ( $\pm 0,160$ )	3,422 ( $\pm 0,058$ )	4,015 ( $\pm 0,113$ )	3,842 ( $\pm 0,089$ )	4,382 ( $\pm 0,194$ )
4,0	7,253 ( $\pm 0,179$ )	7,126 ( $\pm 0,162$ )	6,585 ( $\pm 0,087$ )	6,610 ( $\pm 0,080$ )	5,752 ( $\pm 0,128$ )	6,238 ( $\pm 0,094$ )	4,065 ( $\pm 0,014$ )	3,557 ( $\pm 0,050$ )	3,504 ( $\pm 0,015$ )	3,999 ( $\pm 0,062$ )	4,265 ( $\pm 0,063$ )

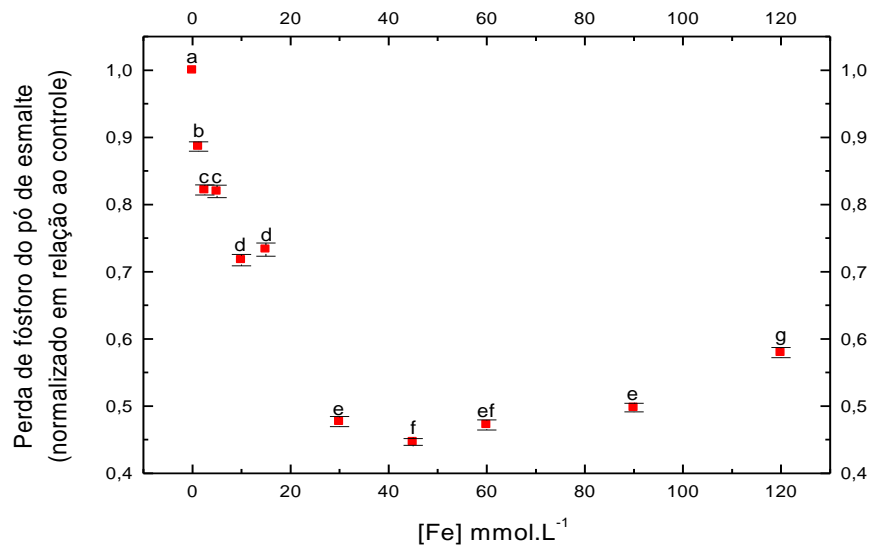




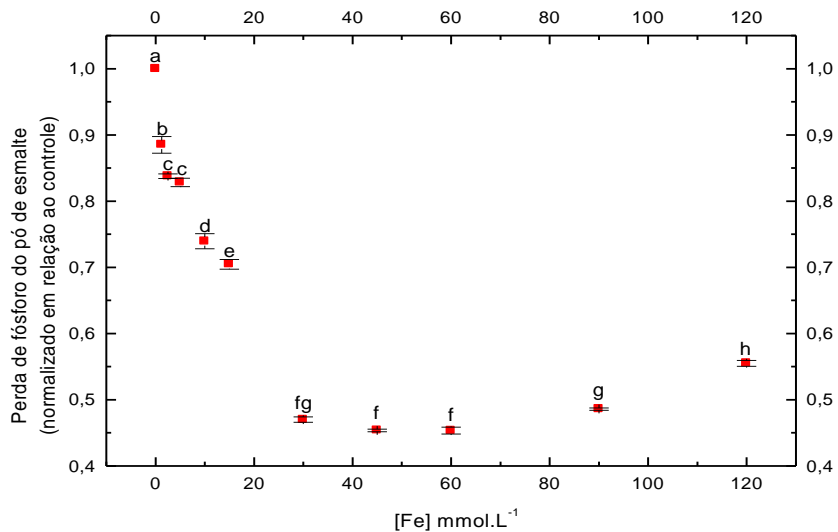
**Figura 13** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na ausência de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



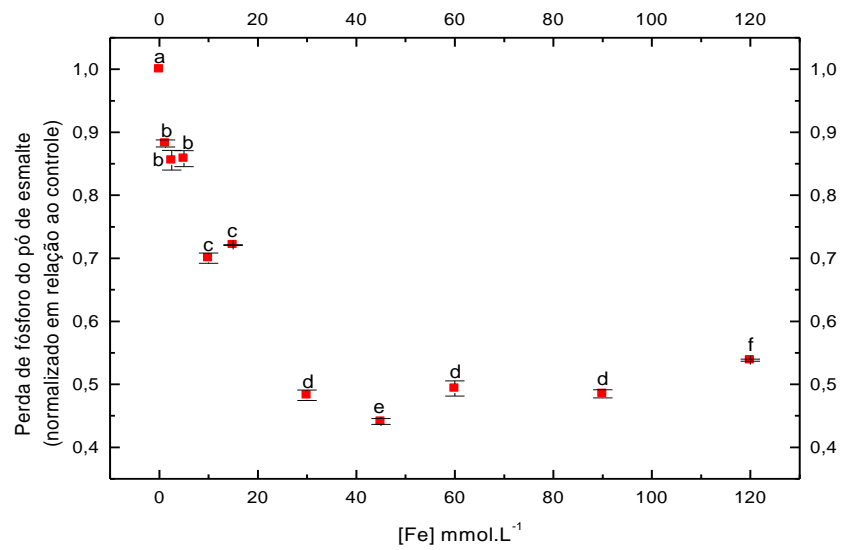
**Figura 14** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,125 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



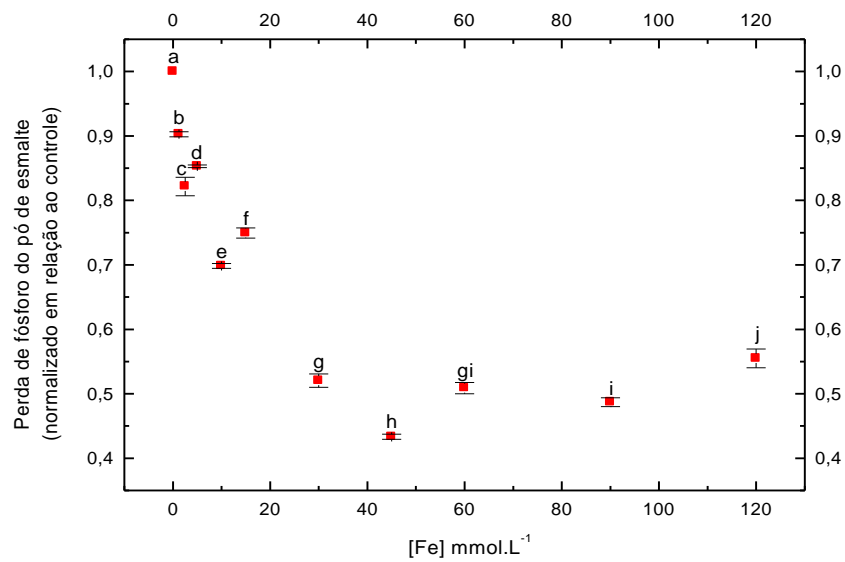
**Figura 15** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,250 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



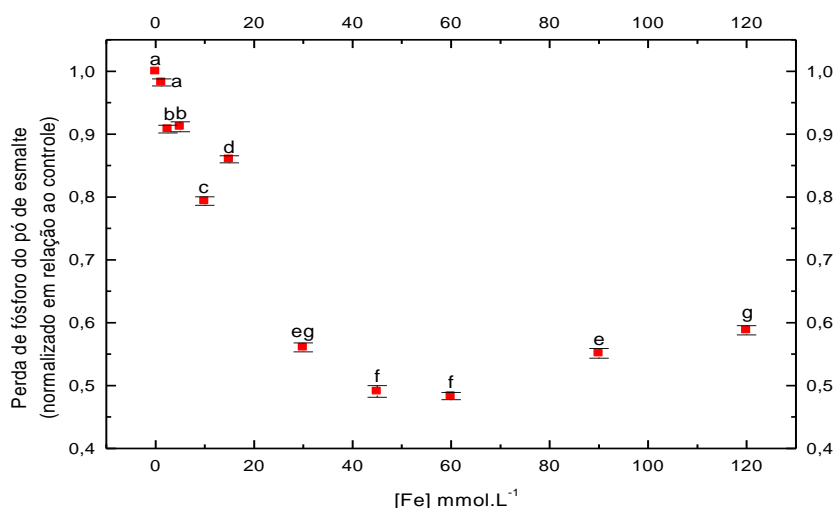
**Figura 16** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,500 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



**Figura 17** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 1,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



**Figura 18** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 2,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



**Figura 19** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 4,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido acético 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$

Para o ácido acético, a ANOVA a 2 critérios revelou uma diferença significativa entre as concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  ( $F = 4334$ ,  $p < 0,0001$ ) e entre as concentrações de  $\text{F}^-$  ( $F = 12,31$ ,  $p < 0,0001$ ), havendo interação significativa entre estes dois critérios ( $F = 9,274$ ,  $p < 0,0001$ ). Em geral, foi observada uma relação dose-resposta na perda de P com o aumento da concentração de  $\text{Fe}^{+2}$  no meio de reação até 30 mmol/L Fe. A partir de 30 mmol/L, o aumento na concentração de  $\text{Fe}^{+2}$  não provocou uma redução adicional na perda de P. Com relação à presença de  $\text{F}^-$  no meio de reação, foi observado que na presença do mesmo houve um aumento na perda de P quando comparado com a mesma concentração de  $\text{Fe}^{+2}$ , na ausência de  $\text{F}^-$ . Em geral, quanto maior a concentração de  $\text{F}^-$  adicionada ao meio de reação, pior foi o resultado, ou seja, maior a perda de P.

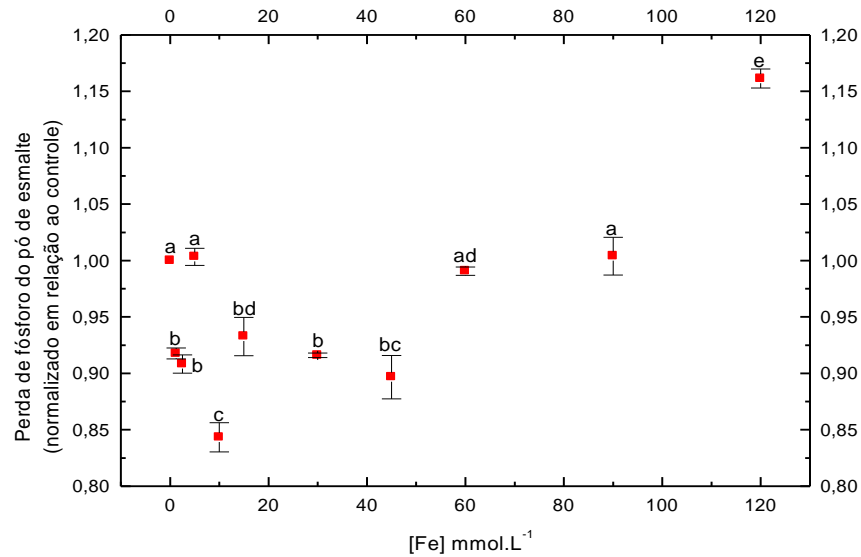
Na ausência de  $\text{F}^-$ , houve uma inibição da dissolução do pó de esmalte progressiva em função do aumento de  $\text{Fe}^{+2}$  adicionado ao meio de reação, sendo observado um efeito dose-resposta. As menores concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  empregadas (1,25 e 2,50 mmol/L) provocaram uma redução na dissolução da ordem de 18%. A concentração de  $\text{Fe}^{+2}$  de 5 mmol/L inibiu a dissolução em aproximadamente 23%. As concentrações de 10 mmol/L e 15 mmol/L reduziram a dissolução em aproximadamente 35%, não havendo diferença significativa entre elas. A maior inibição na perda mineral do pó de esmalte (em torno de 55%) foi obtida para as

concentrações de 30, 45, 60 e 90 mmol/L, sem diferença significativa entre elas. Entretanto, para a concentração de 120 mmol/L, a inibição foi reduzida significativamente em relação às concentrações anteriores, tendo sido de 45%. Em face dos resultados obtidos no presente experimento, optou-se por usar, no experimento seguinte, Subprojeto 2, a concentração de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L, pois foi a concentração mais baixa que apresentou redução expressiva na perda de fósforo em relação ao controle e para as concentrações maiores, apesar de ter havido um incremento na inibição da dissolução, seu uso não é viável clinicamente, uma vez que o emprego de soluções muito concentradas pode levar ao manchamento extrínseco do esmalte, além de possuir um sabor muito desagradável.

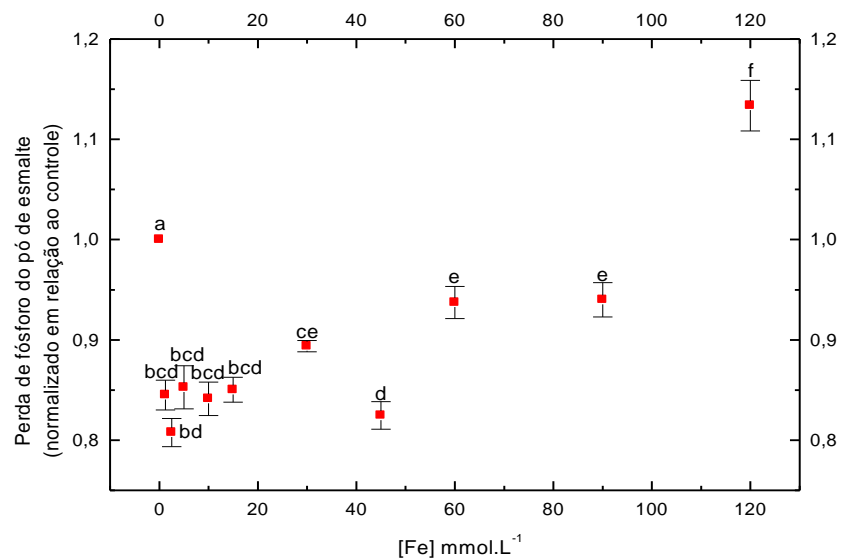
O mesmo experimento do efeito do ferro associado ou não ao flúor contra a dissolução do pó de esmalte bovino foi feito também utilizando o ácido láctico, por ser o ácido encontrado na cavidade oral em maior quantidade. Para o ácido láctico, os resultados da quantidade de P ( $\pm$  DP) liberado a partir do pó de esmalte estão mostrados no quadro 3, e os resultados da perda de P a partir do pó de esmalte normalizada em relação ao controle (sem  $\text{Fe}^{+2}$ ) estão mostrados nas figuras 20 a 26.

**Quadro 3** - Quantidade de P ( $\mu\text{g}$ ) liberada a partir do pó de esmalte em função das concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  e F<sup>-</sup> adicionado ao meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L)

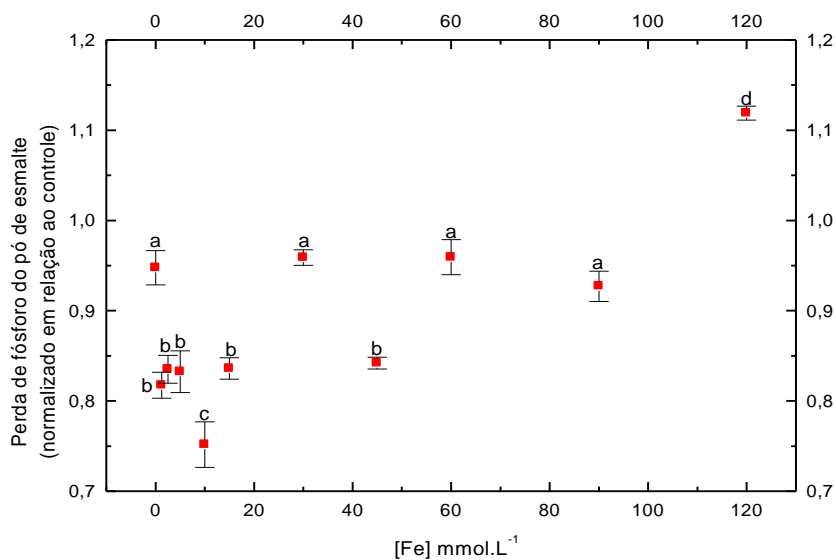
Concentração de F <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração de $\text{Fe}^{+2}$ (mmol/L)										
	0	1,25	2,5	5	10	15	30	45	60	90	120
0	6,814 ( $\pm 0,076$ )	6,255 ( $\pm 0,052$ )	6,189 ( $\pm 0,161$ )	6,838 ( $\pm 0,074$ )	5,748 ( $\pm 0,186$ )	6,356 ( $\pm 0,264$ )	6,241 (0,049)	6,108 ( $\pm 0,175$ )	6,750 ( $\pm 0,049$ )	6,843 ( $\pm 0,123$ )	7,912 ( $\pm 0,014$ )
0,125	7,546 ( $\pm 0,275$ )	6,371 ( $\pm 0,043$ )	6,090 ( $\pm 0,087$ )	6,428 ( $\pm 0,086$ )	6,346 ( $\pm 0,113$ )	6,414 ( $\pm 0,154$ )	6,743 ( $\pm 0,233$ )	6,219 ( $\pm 0,049$ )	7,067 ( $\pm 0,063$ )	7,088 ( $\pm 0,051$ )	8,548 ( $\pm 0,051$ )
0,25	7,147 ( $\pm 0,250$ )	6,164 ( $\pm 0,038$ )	6,296 ( $\pm 0,074$ )	6,272 ( $\pm 0,074$ )	5,666 ( $\pm 0,173$ )	6,307 ( $\pm 0,182$ )	7,237 ( $\pm 0,272$ )	6,354 ( $\pm 0,312$ )	7,233 ( $\pm 0,024$ )	6,990 ( $\pm 0,037$ )	8,442 ( $\pm 0,241$ )
0,5	6,947 ( $\pm 0,125$ )	6,304 ( $\pm 0,062$ )	6,263 ( $\pm 0,125$ )	6,985 ( $\pm 0,320$ )	6,108 ( $\pm 0,075$ )	5,681 ( $\pm 0,014$ )	7,097 ( $\pm 0,266$ )	6,393 ( $\pm 0,135$ )	7,178 ( $\pm 0,049$ )	7,814 ( $\pm 0,028$ )	8,687 ( $\pm 0,073$ )
1,0	7,330 ( $\pm 0,166$ )	6,329 ( $\pm 0,094$ )	6,222 ( $\pm 0,138$ )	6,043 ( $\pm 0,200$ )	5,862 ( $\pm 0,014$ )	6,900 ( $\pm 0,951$ )	7,361 ( $\pm 0,189$ )	6,544 ( $\pm 0,071$ )	8,271 ( $\pm 0,194$ )	7,749 ( $\pm 0,086$ )	8,475 ( $\pm 0,014$ )
2,0	6,956 ( $\pm 0,088$ )	6,362 ( $\pm 0,159$ )	6,519 ( $\pm 0,025$ )	6,043 ( $\pm 0,051$ )	6,272 ( $\pm 0,074$ )	6,323 ( $\pm 0,087$ )	7,097 ( $\pm 0,051$ )	6,639 ( $\pm 0,190$ )	7,289 ( $\pm 0,060$ )	7,920 ( $\pm 0,014$ )	8,760 ( $\pm 0,024$ )
4,0	7,064 ( $\pm 0,298$ )	6,503 ( $\pm 0,112$ )	6,321 ( $\pm 0,074$ )	6,133 ( $\pm 0,185$ )	6,346 ( $\pm 0,420$ )	6,941 ( $\pm 0,114$ )	7,780 ( $\pm 0,346$ )	6,465 ( $\pm 0,122$ )	7,471 ( $\pm 0,071$ )	7,691 ( $\pm 0,037$ )	8,205 ( $\pm 0,014$ )



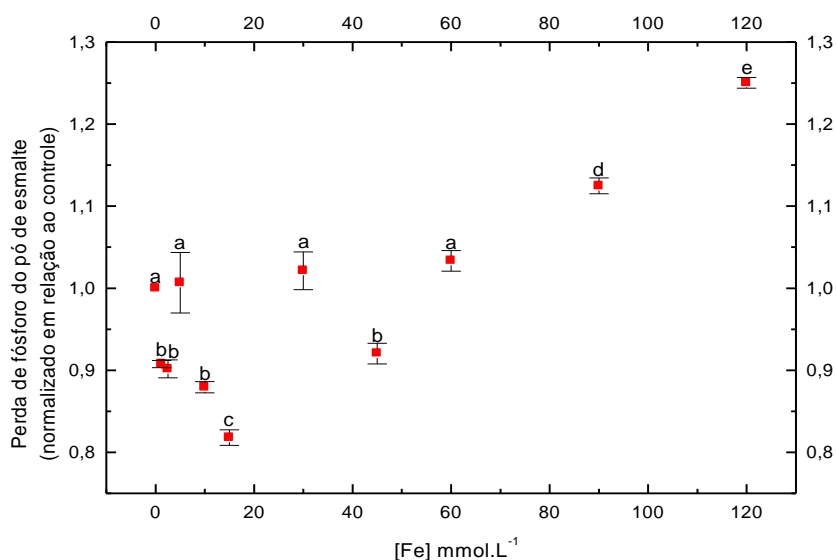
**Figura 20** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na ausência de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



**Figura 21** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,125 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$

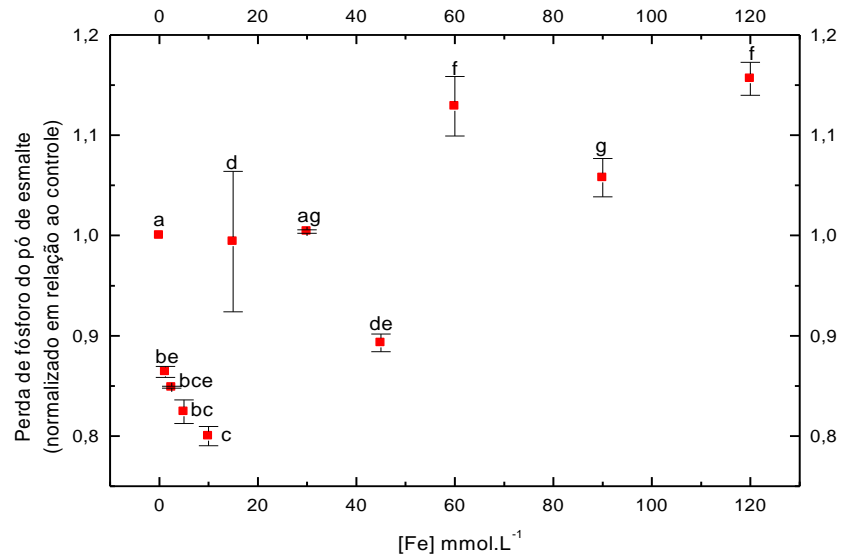


**Figura 22** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,250 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$

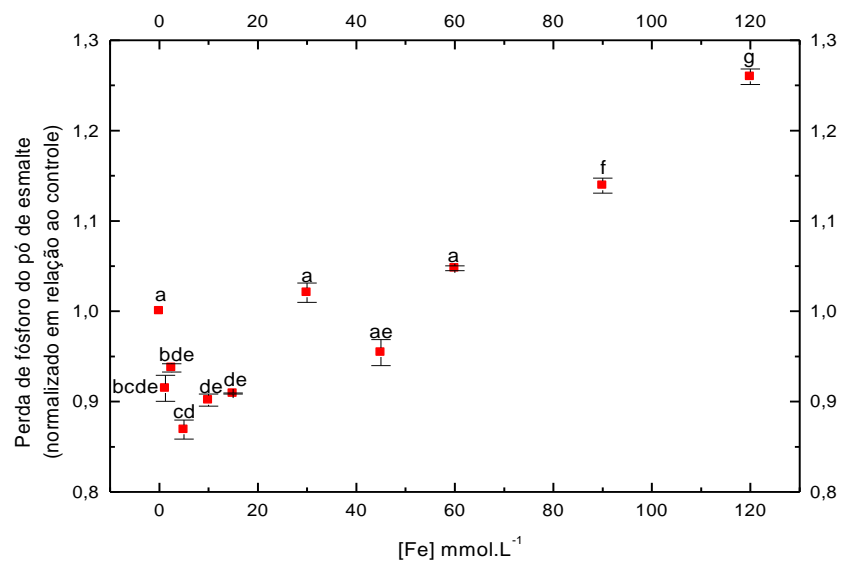


**Figura 23** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 0,500 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$

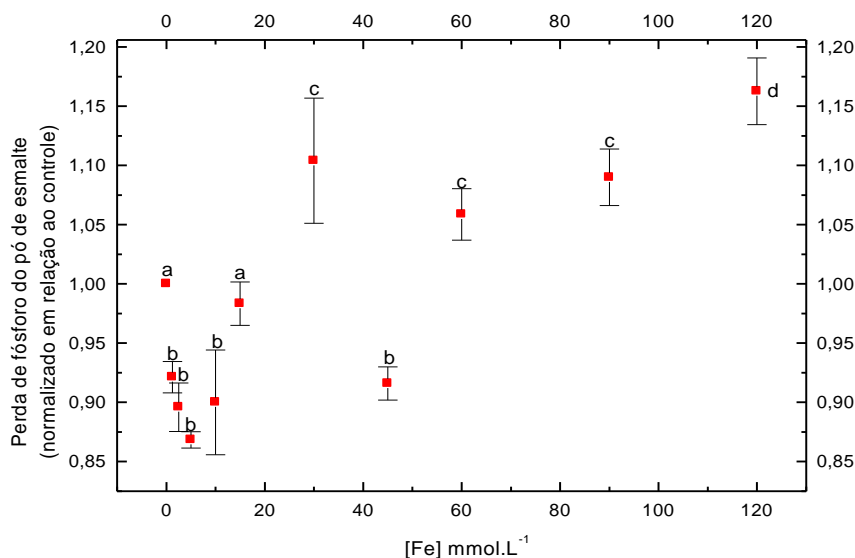




**Figura 24** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 1,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



**Figura 25** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 2,000 µg/mL de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$



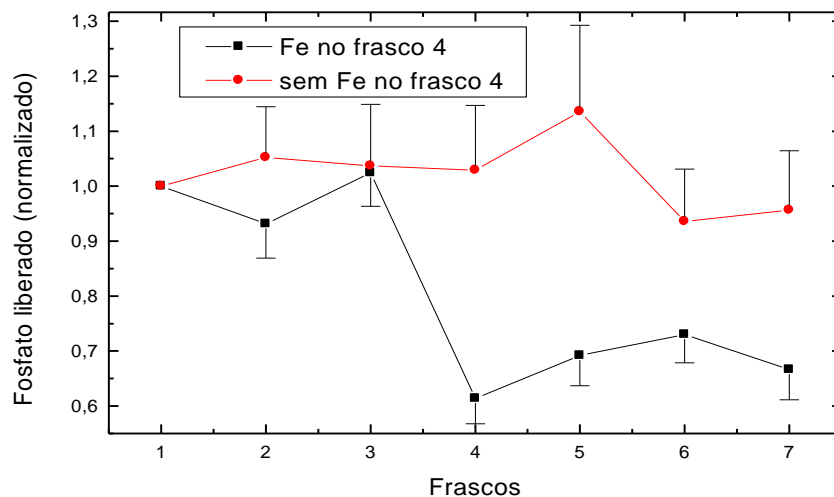
**Figura 26** - Perda de P do pó de esmalte normalizada em relação ao controle na presença de 4,000  $\mu\text{g/mL}$  de F no meio de reação (ácido láctico 10 mmol/L). Valores seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni,  $p < 0,05$ ).  $n=3$

A ANOVA a 2 critérios revelou diferença significativa entre as concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  ( $F = 308,7$ ,  $p < 0,0001$ ) e entre as concentrações de  $\text{F}^-$  ( $F = 24,75$ ,  $p < 0,0001$ ), havendo uma interação significativa entre estes 2 critérios ( $F = 8,693$ ,  $p < 0,0001$ ). Neste caso, as maiores inibições (em torno de 20% apenas) da perda de P a partir do pó de esmalte ocorreram para as concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  no meio de 2,5 a 15 mmol/L, dependendo das concentrações de  $\text{F}^-$  presentes. Entretanto, para concentrações de P maiores, a inibição foi bem menor, chegando a provocar uma maior perda de P quando comparado ao controle. Isto deve ter ocorrido devido a alguma interação entre o ácido láctico e os íons adicionados ao meio de reação. Um artigo recente relata um aumento da solubilidade do  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de ácido láctico, o que poderia aumentar a biodisponibilidade deste íon em cereais (PROULX; REDDY, 2007). Desta maneira, é possível que a presença de ácido láctico no meio de reação tenha tornado o  $\text{Fe}^{2+}$  mais solúvel a partir do  $\text{FeSO}_4$  quando em altas concentrações, e que estas altas concentrações do íon possam exercer um efeito estimulatório da desmineralização do pó de esmalte. Efeito semelhante também foi observado num trabalho recente do nosso grupo de pesquisa quando altas concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$  (30 e 60 mmol/L) foram adicionadas a um refrigerante à base de ácido cítrico (Sprite Zero<sup>®</sup>), o que não ocorreu para um

refrigerante à base de ácido fosfórico (Coca-Cola<sup>®</sup>) (KATO et al., 2007). Deste modo, no presente trabalho, na presença de ácido acético é possível que em altas concentrações de  $\text{FeSO}_4$  boa parte do  $\text{Fe}^{+2}$  tenha se mantido insolúvel, não vindo a exercer efeito estimulatório da desmineralização do esmalte. Em virtude destes resultados, o subprojeto 2 foi realizado utilizando-se solução de ácido acético a 10mmol/L.

## 5.2 SUBPROJETO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE $\text{Fe}^{+2}$ CONTRA A DISSOLUÇÃO MINERAL DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE BOVINO

A Figura 27 mostra os resultados do efeito da presença de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L em inibir a desmineralização de superfícies hígidas de esmalte dentário bovino.



**Figura 27** - Efeito de 10 mmol/L  $\text{Fe}^{+2}$  na habilidade do ácido acético 10 mmol/L em desmineralizar superfícies hígidas de esmalte dentário bovino. A perda mineral no frasco 4 contendo  $\text{Fe}^{+2}$ , e nos frascos experimentais subsequentes, é significativamente reduzida em aproximadamente 30-40% em relação ao frasco 1. As barras indicam o erro-padrão. n=6

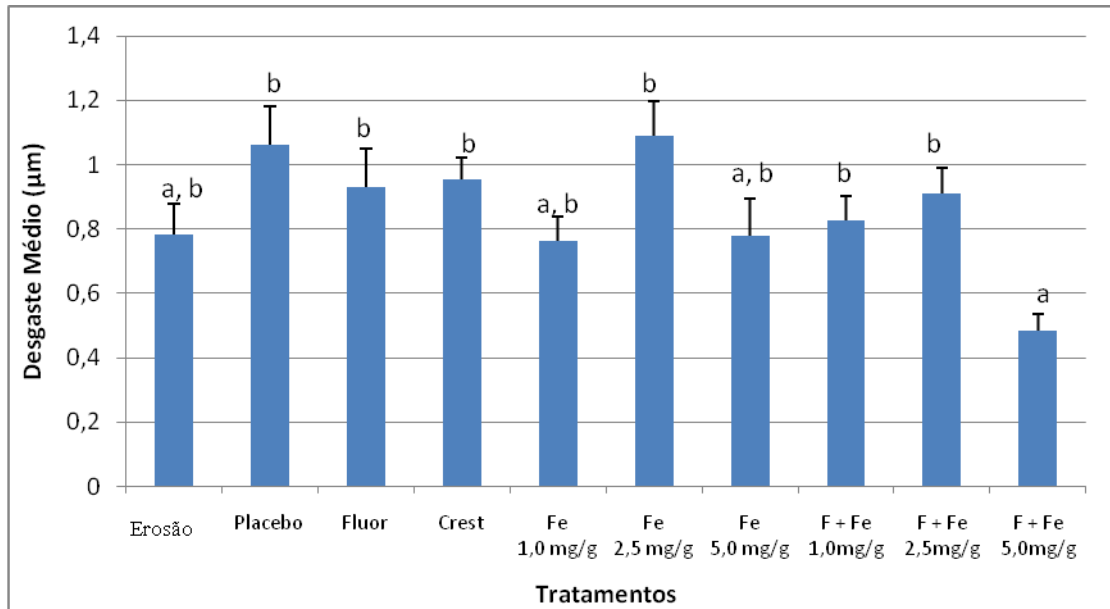
A ANOVA a 2 critérios revelou diferença significativa entre frascos ( $F = 6,252$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não entre a presença ou não de  $\text{Fe}^{+2}$  no meio ( $F = 3,061$ ,  $p = 0,111$ ), havendo interação significativa entre estes critérios ( $F = 3,963$ ,  $p = 0,002$ ).

Para o grupo controle, a desmineralização foi em geral semelhante em todos os frascos. Já para o grupo experimental, a partir do frasco 4, até o frasco 7, houve uma inibição significativa da desmineralização (em torno de 30-40%) quando comparado ao frasco 1. A inibição da desmineralização a partir do frasco 4 manteve-se relativamente estável até o frasco 7, indicando que o efeito conferido pelo  $\text{Fe}^{+2}$  na inibição da desmineralização do esmalte é duradouro. O teste de Bonferroni para comparações individuais entre os grupos mostrou que desde o frasco 4, onde foi adicionado  $\text{Fe}^{+2}$  no grupo experimental, houve uma redução significativa na dissolução do mineral da superfície do esmalte quando comparado com os outros frascos, e esta redução permaneceu até o frasco 7. Já para o grupo controle, isto não ocorreu, conforme era esperado. Para os demais frascos, não houve diferenças significativas. Resultados semelhantes foram obtidos num trabalho recente utilizando o  $\text{Fe}^{+2}$  a 15 mmol/L (BUZALAF et al., 2006). A intenção quando o presente experimento foi delineado era testar neste modelo a associação entre  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$ . Entretanto, como no subprojeto 1 esta associação não revelou bons resultados, o mesmo não foi feito no presente estudo.

### 5.3 SUBPROJETO 3: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS ENRIQUECIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $\text{Fe}^{+2}$ , VISANDO À PREVENÇÃO DA PERDA MINERAL DO ESMALTE BOVINO

Os dados de microdureza inicial estão apresentados no Anexo E. A microdureza média obtida para os blocos de esmalte foi de  $345,5 \pm 34,2$ . Foram selecionados para o estudo os blocos com dureza 10% acima e 10% abaixo da média da microdureza dos blocos.

A Figura 28 mostra o resultado do desgaste médio ( $\pm$ EP) sofrido pelos blocos submetidos ao desafio erosivo e abrasivo com os respectivos dentifrícios testados. Os dados individuais estão apresentados no Anexo F.



**Figura 28** - Desgaste médio ( $\pm$ EP) sofrido pelos blocos de esmalte após desafios erosivos ou erosivos e abrasivos, utilizando dentifrícios com diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{+2}$ , associado ou não ao  $\text{F}^-$ . Tratamentos seguidos por letras diferentes diferiram significativamente (ANOVA após transformação logarítmica,  $p < 0,05$ )

A ANOVA revelou diferença significativa entre os grupos ( $F=4,734$ ,  $p < 0,0001$ ). O menor desgaste ( $0,48 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ) foi apresentado pelo grupo em que foi utilizado o dentifrício contendo  $1100 \mu\text{g/mL F}^-$  e  $5 \text{ mg/g Fe}^{+2}$ , que diferiu significativamente dos grupos placebo,  $\text{F}^-$  ( $1100 \mu\text{g/mL}$ ), Crest,  $\text{Fe}^{+2}$   $2,5 \text{ mg/g}$ ,  $\text{F}^-$  ( $1100 \mu\text{g/mL}$ ) +  $\text{Fe}^{+2}$   $1,0 \text{ mg/g}$  e  $\text{F}^-$  ( $1100 \mu\text{g/mL}$ ) +  $\text{Fe}^{+2}$   $2,5 \text{ mg/g}$ , com reduções no desgaste variando entre 48 e 55%. Entre os demais tratamentos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho da literatura em que foram utilizados dentifrícios contendo  $\text{Fe}^{+2}$  para a prevenção da erosão/abrasão dentária. Em vários trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo, o  $\text{Fe}^{+2}$  foi utilizado para prevenção de erosão e erosão/abrasão, mas em diferentes veículos. No trabalho de Sales-Peres et al. (2007), a realização de bochechos com solução de  $\text{FeSO}_4$  a  $10 \text{ mmol/L}$  após desafios erosivos reduziu significativamente a erosão e erosão/abrasão de blocos de esmalte e dentina bovina *in situ*. Entretanto, pensando-se no ponto de vista clínico, a realização de um bochecho após desafio erosivo pode ser inviável, por adicionar um passo (bochecho). Desta maneira, pensou-se em adicionar o  $\text{Fe}^{+2}$  diretamente ao refrigerante, para reduzir seu potencial erosivo. Isto foi testado inicialmente *in vitro*. No trabalho de Kato et al. (2007), a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  a

10 mmol/L à Coca-Cola® foi capaz de reduzir significativamente a erosão dentária em blocos de esmalte bovino. Diante deste resultado positivo, delineou-se um trabalho *in situ* onde foi observado que a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L à Coca-Cola® reduziu significativamente seu potencial erosivo tanto em esmalte quanto em dentina bovinos (KATO, 2007). Entretanto, a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  à Coca-Cola® não é viável, devido a problemas toxicológicos, bem como à possibilidade de induzir manchamento dentário, além do gosto metálico. Sendo o  $\text{Fe}^{+2}$  comprovadamente eficaz na redução da dissolução do esmalte e dentina, pensou-se então em incorporá-lo a um dentífrico, que teria a vantagem de induzir um menor manchamento, devido à possível remoção dos pigmentos já durante o momento da escovação dentária. Além disto, os dentífricos já são amplamente utilizados na vida cotidiana. Como hoje a grande maioria dos dentífricos comercializados no Brasil, bem como em outros países, são fluoretados, e a adição de flúor ao dentífrico tem contribuído significativamente para a redução da prevalência de cáries em todo o mundo (BRATTHAL; HANSEL-PETERSON; SUNDBERG, 1996), pensou-se em testar o  $\text{Fe}^{+2}$  isoladamente, bem como o  $\text{Fe}^{+2}$  associado ao  $\text{F}^-$ , a despeito de esta associação não ter dado bons resultados quando estes íons foram adicionados em solução. Como pode ser observado na Figura 28, esta estratégia foi bastante efetiva *in vitro*, levando a uma redução no desgaste dos blocos de esmalte da ordem de 50% quando comparada aos tratamentos com dentífrico placebo, contendo  $\text{F}^-$  apenas e ao próprio controle positivo (Crest®). De fato, o uso de dentífricos fluoretados (Crest®, 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$ ) na prevenção da erosão/abrasão tem efeito limitado, com reduções da ordem de 20% apenas, tanto para esmalte (MAGALHÃES et al., 2007) quanto para dentina (MAGALHÃES et al., 2008) *in situ*. Os presentes dados *in vitro* não indicam efeito preventivo para o  $\text{F}^-$  acrescentado isoladamente ao dentífrico, já que não houve diferenças significativas entre os grupos de dentífricos placebo, contendo 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$  e Crest® (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$ , controle positivo). Entretanto, um trabalho recente encontrou um efeito preventivo significativo do dentífrico contendo 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{F}^-$  na redução da erosão do esmalte dentário bovino (KATO et al., 2010), mas vale destacar que o protocolo utilizado foi erosivo apenas, sem realização de escovação. Já no presente estudo, a adição de  $\text{Fe}^{+2}$  isoladamente aos dentífricos levou a um efeito protetor, mas ainda sem significância estatística em relação aos dentífricos fluoretados apenas. Curiosamente, não foi observada uma relação dose-resposta para o  $\text{Fe}^{+2}$  isoladamente, já que na concentração de 2,5

mg/g, o desgaste foi maior que nas concentrações de 1 e 5 mg/g, embora não tenham havido diferenças significativas entre estes grupos. Também para a combinação de  $F^-$  e  $Fe^{+2}$ , na dose de 2,5 mg/g de  $Fe^{+2}$ , o desgaste foi maior que para as demais doses. Aparentemente não há uma explicação para os achados observados na dose intermediária de  $Fe^{+2}$  (2,5 mg/g), que foram consistentes independentemente da associação ao  $F^-$  ou não. Entretanto, quando da associação da dose de 5 mg/g  $Fe^{+2}$  com o  $F^-$ , como já mencionado acima, obteve-se um grande efeito preventivo do desgaste erosivo-abrasivo. Em virtude destes achados, no subprojeto 4 este foi o dentifrício testado.

#### 5.4 SUBPROJETO 4: ANÁLISE DO EFEITO INIBIDOR DO DENTIFRÍCIO ACRESCIDO DE $Fe^{+2}$ E $F^-$ NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA BOVINOS *IN SITU*

Os dados de microdureza inicial estão apresentados no Anexo G. A microdureza média obtida para os blocos de esmalte foi de  $338,6 \pm 36,9$ . Foram selecionados para o estudo os blocos com dureza 10% acima e 10% abaixo da média da microdureza dos blocos.

O presente subprojeto foi delineado de forma a simular, no mesmo dispositivo *in situ*, 3 condições diferentes: a presença residual dos agentes ativos ( $F^-$  ou  $Fe^{+2} + F^-$ ) na cavidade bucal (representada pela condição erosão), o contato direto dos mesmos agentes com as superfícies dentárias (representado pela condição erosão + gota), e ainda o contato direto destes agentes com os dentes, aliado à força mecânica da escovação (representado pela condição erosão + abrasão). Em adição, foram testados ainda dois diferentes substratos dentários (esmalte e dentina), hígidos ou já previamente erodidos. A fim de facilitar a análise dos dados, cada tipo de substrato (esmalte ou dentina, hígido ou previamente erodido) foi submetido a uma análise de variância a dois critérios (tipo de dentifrício e tipo de condição). Os dados individuais de desgaste sofrido pelos blocos de esmalte e dentina sadios ou previamente erodido estão apresentados no Anexo H.

A tabela 1 mostra os valores médios e os erros-padrão observados para os blocos de esmalte hígidos, submetidos aos diferentes tipos de dentifrícios e condições.

**Tabela 1** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de esmalte hígidos, submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições

Condição	Dentifrícios			
	Placebo	Crest	1100 $\mu$ g/mL de F <sup>-</sup>	Fe <sup>+2</sup> + F <sup>-</sup>
EROSÃO	2,396 $\pm$ 0,375 <sup>a</sup>	2,246 $\pm$ 0,286 <sup>a</sup>	2,080 $\pm$ 0,244 <sup>a</sup>	1,063 $\pm$ 0,088 <sup>b</sup>
ER + GOTA	1,899 $\pm$ 0,165 <sup>a</sup>	1,941 $\pm$ 0,243 <sup>a</sup>	2,290 $\pm$ 0,147 <sup>a</sup>	0,912 $\pm$ 0,177 <sup>b</sup>
ER + ABRA	2,773 $\pm$ 0,588 <sup>a</sup>	2,705 $\pm$ 0,457 <sup>a</sup>	2,791 $\pm$ 0,533 <sup>a</sup>	0,835 $\pm$ 0,183 <sup>b</sup>

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os dentifrícios (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ). Fe<sup>+2</sup> + F<sup>-</sup>: 5 mgFe/g e 1100  $\mu$ g/mL F<sup>-</sup>. Não houve diferença significativa entre as condições experimentais.

A ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas revelou uma diferença significativa entre os dentifrícios, ( $F=21,72$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não entre as condições ( $F=1,20$ ,  $p=0,32$ ) e nem para a interação entre ambos ( $F = 1,04$ ,  $p=0,41$ ). O teste de Bonferroni revelou que os blocos que receberam o dentifrício contendo Fe<sup>+2</sup> e F<sup>-</sup> apresentaram valores de desgaste significativamente menores quando comparados aos blocos submetidos aos demais dentifrícios, os quais não diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). Vale ressaltar que trabalhos prévios relataram que a escovação com dentifrício fluoretado é capaz de reduzir o desgaste do esmalte submetido a desafios erosivos (MAGALHÃES et al., 2007), o que não foi observado no presente trabalho. Esta diferença poderia ser devida ao tipo de substrato dentário utilizado, já que no estudo de Magalhães et al. (2007), foi utilizado esmalte humano, enquanto que no presente estudo foi empregado esmalte bovino. Entretanto, em concordância com o presente trabalho, tem-se relatado que o flúor residual (aquele que fica diluído na saliva após a escovação) não tem efeito na redução do desgaste do esmalte submetido à erosão (MAGALHÃES et al., 2008). Um importante ponto a ser destacado é que, diferentemente dos dentifrícios fluoretados, o dentifrício contendo Fe<sup>+2</sup> associado ao F<sup>-</sup> teve um efeito residual na redução do desgaste dos blocos de esmalte, diferentemente do efeito do flúor presente isoladamente nos dentifrícios.



A tabela 2 mostra os mesmos dados para a dentina hígida.

**Tabela 2** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu$ m) para os blocos de dentina hígidos, submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições

Condição	Dentifrícios			
	Placebo	Crest	1100 $\mu$ g/mL de $F^-$	$Fe^{+2} + F^-$
EROSÃO	2,018 $\pm$ 0,255 <sup>a</sup>	1,450 $\pm$ 0,143 <sup>ab</sup>	1,409 $\pm$ 0,179 <sup>b</sup>	1,613 $\pm$ 0,161 <sup>ab</sup>
ER + GOTA	1,771 $\pm$ 0,225 <sup>a</sup>	1,539 $\pm$ 0,167 <sup>ab</sup>	1,613 $\pm$ 0,177 <sup>ab</sup>	1,170 $\pm$ 0,131 <sup>b</sup>
ER + ABRA	1,718 $\pm$ 0,130 <sup>ab</sup>	1,795 $\pm$ 0,189 <sup>ab</sup>	1,570 $\pm$ 0,176 <sup>bc</sup>	1,045 $\pm$ 0,150 <sup>c</sup>

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os dentifrícios (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ).  $Fe^{+2} + F^-$ : 5 mgFe/g e 1100  $\mu$ g/mL  $F^-$ . Não houve diferença significativa entre as condições experimentais.

A ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas revelou uma diferença significativa entre os dentifrícios, ( $F=5,73$ ,  $p=0,001$ ), mas não entre as condições ( $F=0,29$ ,  $p=0,754$ ) e nem para a interação entre ambos ( $F = 1,79$ ,  $p=0,118$ ). Os valores mais altos de desgaste foram observados para o grupo placebo, que não diferiu significativamente dos grupos que receberam dentifrício Crest<sup>®</sup> e contendo 1100  $\mu$ g/mL  $F^-$  (exceto para a condição erosão apenas). Os valores menores de desgaste foram observados para o grupo que recebeu dentifrício contendo  $Fe^{+2}$  e  $F^-$ , que diferiu significativamente do grupo que recebeu dentifrício placebo (exceto para a condição ER) e do grupo que recebeu dentifrício Crest<sup>®</sup> na condição ER + ABR ( $p < 0,05$ ). Nas demais situações, as diferenças não foram significativas. Vale ressaltar aqui que para este substrato dentário na condição erosão apenas, o único dentifrício capaz de reduzir significativamente o desgaste quando comparado ao placebo foi aquele contendo 1100  $\mu$ g/mL  $F^-$ , que, nesta condição, apresentou menor desgaste quando comparado aos demais dentifrícios, inclusive o dentifrício contendo  $Fe^{+2}$  e  $F^-$ . Isto sugere que para a dentina hígida, o efeito residual do  $Fe^{+2}$  presente na cavidade bucal é pequeno, enquanto que o  $F^-$  pode ter um efeito residual melhor.

Os blocos previamente erodidos em geral apresentaram valores de desgaste maiores que aqueles observados para os blocos hígidos. Para o esmalte (Tabela 3), à semelhança do relatado para os substratos anteriormente descritos, a ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas revelou uma diferença significativa entre

os dentifrícios, ( $F=24,62$ ,  $p<0,0001$ ), mas não entre as condições ( $F=3,08$ ,  $p=0,062$ ) e nem para a interação entre ambos ( $F = 0,39$ ,  $p=0,878$ ). Nas comparações individuais, o perfil foi o mesmo observado para o esmalte hígido, ou seja, os blocos que receberam o dentifrício contendo  $Fe^{+2}$  e  $F^-$  apresentaram valores de desgaste significativamente menores quando comparados aos blocos submetidos aos demais dentifrícios, os quais não diferiram significativamente entre si ( $p<0,05$ ).

**Tabela 3** - Valores médios de desgaste ( $\pm EP$ ,  $\mu m$ ) para os blocos de esmalte previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup> durante 10 minutos e submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições

Condição	Dentifrícios			
	Placebo	Crest	1100 $\mu g/mL$ de $F^-$	$Fe^{+2} + F^-$
EROSÃO	3,145 $\pm$ 0,323 <sup>a</sup>	2,580 $\pm$ 0,283 <sup>a</sup>	2,775 $\pm$ 0,114 <sup>a</sup>	1,444 $\pm$ 0,251 <sup>b</sup>
ER + GOTA	3,128 $\pm$ 0,465 <sup>a</sup>	2,412 $\pm$ 0,409 <sup>a</sup>	2,882 $\pm$ 0,162 <sup>a</sup>	0,912 $\pm$ 0,168 <sup>b</sup>
ER + ABRA	3,555 $\pm$ 0,289 <sup>a</sup>	3,298 $\pm$ 0,378 <sup>a</sup>	3,137 $\pm$ 0,416 <sup>a</sup>	1,479 $\pm$ 0,224 <sup>b</sup>

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os dentifrícios (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas,  $p<0,05$ ).  $Fe^{+2} + F^-$ : 5 mgFe/g e 1100  $\mu g/mL$   $F^-$ . Não houve diferença significativa entre as condições experimentais.

Também para os blocos de dentina previamente erodidos (Tabela 4), a ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas revelou uma diferença significativa entre os dentifrícios, ( $F=7,00$ ,  $p=0,0003$ ), mas não entre as condições ( $F=0,26$ ,  $p=0,775$ ) e nem para a interação entre ambos ( $F=0,66$ ,  $p=0,680$ ). Os valores mais altos de desgaste foram observados para o grupo placebo, que não diferiu significativamente dos grupos que receberam Crest<sup>®</sup> e dentifrício contendo 100  $\mu g/mL$   $F^-$ . Os menores desgastes foram observados para os blocos tratados com dentifrício contendo  $Fe^{+2}$  e  $F^-$ , que diferiram significativamente dos blocos tratados com dentifrício placebo (nas condições ER + GOTA e ER + AB) e daqueles tratados com Crest<sup>®</sup> e dentifrício contendo  $F^-$  (ambos na condição ER + GOTA apenas) ( $p<0,05$ ). Nas demais situações, as diferenças não foram significativas. Um aspecto relevante é que no caso da dentina previamente erodida, o efeito residual do dentifrício contendo  $Fe^{+2}$ , diferentemente do observado para a dentina hígida, levou a um menor desgaste quando comparado com os dentifrícios fluoretados apenas, embora não tenha havido diferença significativa. Isto pode ser devido ao fato de que a

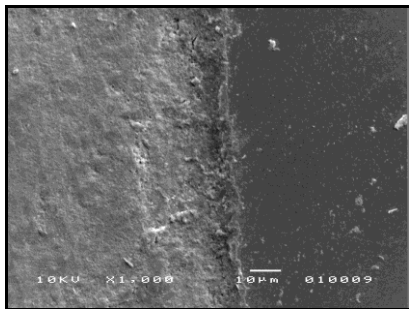
desmineralização prévia pode ter exposto fibras colágenas e facilitado a interação do  $\text{Fe}^{+2}$  com as mesmas. Tem sido relatado recentemente que o  $\text{Fe}^{+2}$  é capaz de inibir as metaloproteinases de matriz -2 e -9 presentes e isto pode ser responsável por seu efeito protetor contra a perda erosiva de estrutura neste substrato (KATO, 2010).

**Tabela 4** - Valores médios de desgaste ( $\pm$ EP,  $\mu\text{m}$ ) para os blocos de dentina previamente erodidos por imersão em Coca-Cola<sup>®</sup> durante 10 minutos e submetidos à erosão *in situ/ex vivo* e a tratamento com dentifrícios em diferentes condições

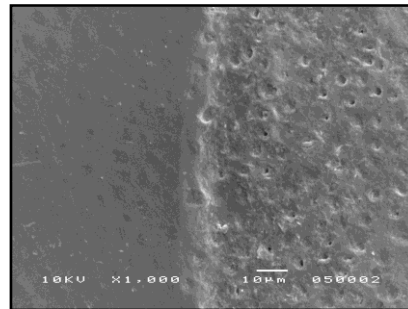
Condição	Dentifrícios			
	Placebo	Crest	1100 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{F}^-$	$\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$
EROSÃO	1,794 $\pm$ 0,187 <sup>a</sup>	1,765 $\pm$ 0,200 <sup>a</sup>	1,425 $\pm$ 0,229 <sup>a</sup>	1,261 $\pm$ 0,187 <sup>a</sup>
ER + GOTA	1,837 $\pm$ 0,294 <sup>a</sup>	1,681 $\pm$ 0,167 <sup>a</sup>	1,697 $\pm$ 0,235 <sup>a</sup>	0,930 $\pm$ 0,116 <sup>b</sup>
ER + ABRA	1,846 $\pm$ 0,275 <sup>a</sup>	1,442 $\pm$ 0,199 <sup>ab</sup>	1,365 $\pm$ 0,112 <sup>ab</sup>	1,160 $\pm$ 0,142 <sup>b</sup>

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os dentifrícios (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ).  $\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$ : 5 mgFe/g e 1100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{F}^-$ . Não houve diferença significativa entre as condições experimentais.

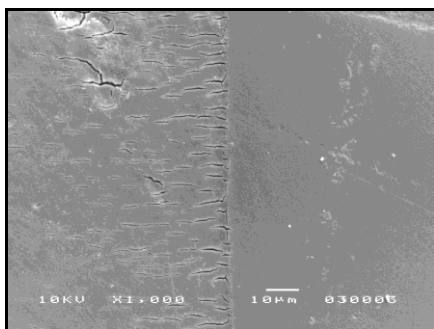
As figuras 29 a 38 ilustram microscopias eletrônicas de varredura das superfícies dentárias submetidas aos tratamentos. No caso do dentifrício contendo  $\text{Fe}^{+2}$ , as imagens são sugestivas de deposição de uma camada sobre as superfícies dentárias, tanto em esmalte quanto em dentina, inclusive com obliteração dos túbulos dentinários.



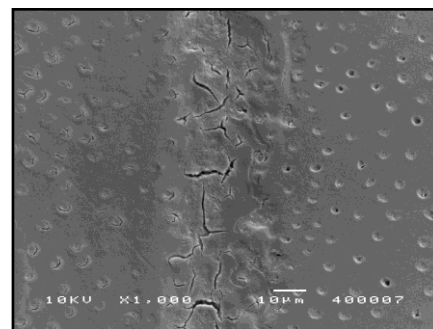
**Figura 29** - Esmalte Hígido. Tratamento: Crest®. Condição: ER + GOTA. Lado direito controle



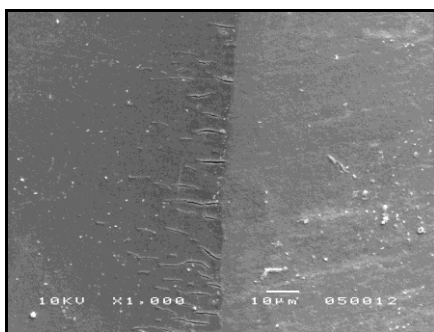
**Figura 30** - Dentina Hígida. Tratamento Crest®. Condição: ER + GOTA. Lado esquerdo controle



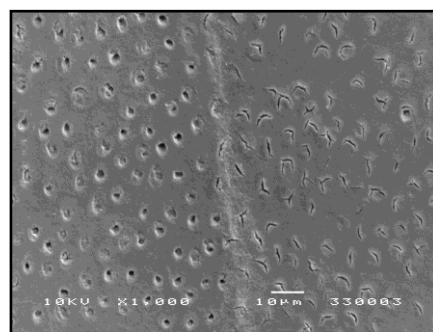
**Figura 31** - Esmalte Hígido. Tratamento: Fe<sup>+2</sup> + F<sup>-</sup>. Condição: ER + Gota. Lado direito controle



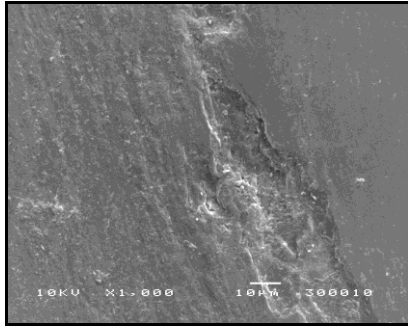
**Figura 32** - Dentina Hígida. Tratamento Fe<sup>+2</sup> + F<sup>-</sup>. Condição: ER + Gota. Lado esquerdo controle



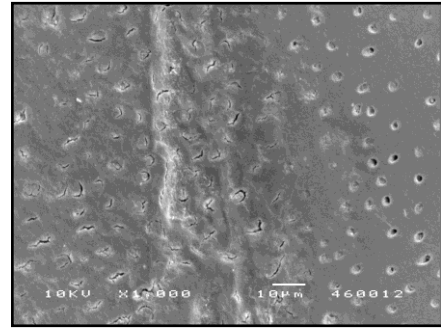
**Figura 33** - Esmalte Previamente Erodido. Tratamento: Fe<sup>+2</sup> + F<sup>-</sup>. Condição: ER + Gota. Lado direito controle



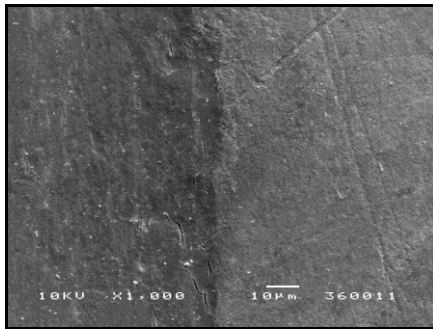
**Figura 34** - Dentina Previamente Erodida. Tratamento: Fe<sup>+2</sup> + F<sup>-</sup>. Condição: ER + Gota. Lado direito controle



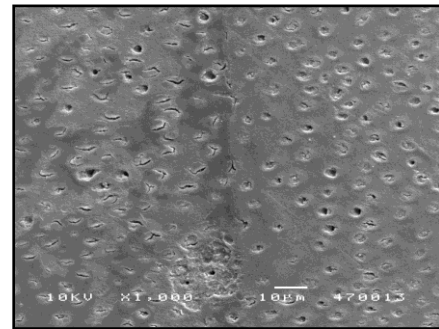
**Figura 35** - Esmalte Hígido. Tratamento:  $\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$ . Condição: ER + ABRA. Lado direito controle



**Figura 36** - Dentina Hígida. Tratamento:  $\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$ . Condição: ER + ABRA. Lado direito controle



**Figura 37** - Esmalte Previamente Erodido. Tratamento:  $\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$ . Condição: ER + ABR. Lado direito controle



**Figura 38** - Dentina Previamente Erodida. Tratamento:  $\text{Fe}^{+2} + \text{F}^-$ . Condição: ER + ABR. Lado direito controle

Quando os dados são analisados em conjunto, observa-se que para todos os tipos de substratos não houve diferença significativa entre as condições testadas. Seria esperado que houvesse um maior desgaste quando a erosão fosse associada à abrasão no caso do esmalte. De fato, foi observado um pequeno aumento no desgaste dos blocos de esmalte quando a erosão foi associada à abrasão para os dentifrícios placebo e fluoretados, embora não tenha havido diferença significativa entre as condições. Entretanto, quando o dentifrício contendo  $\text{Fe}^{+2}$  foi utilizado, tal aumento não foi visto. Isto sugere que o  $\text{Fe}^{+2}$  possa ter um efeito mecânico, depositando-se sobre o esmalte e protegendo-o tanto da desmineralização química quanto da perda mecânica de substrato. Isto pode ser corroborado pela observação das microscopias eletrônicas de varredura das superfícies dentárias expostas aos tratamentos (Figuras 31 a 38). Os voluntários foram instruídos a escovarem os blocos por 30 segundos, com escova extramacia. É sabido que a dureza das cerdas das escovas é de pouca importância para a abrasão de tecidos dentários erodidos,

mas a abrasividade do dentífrico tem uma grande influência (WIEGAND et al., 2008). A abrasividade do dentífrico é determinada pelo tamanho e quantidade das partículas abrasivas, pH, capacidade tampão e concentração de flúor do dentífrico. Geralmente, a perda de esmalte e dentina aumenta com o aumento da abrasividade (determinada pelos valores de REA, abrasividade relativa em esmalte e RDA, abrasividade relativa em dentina) (HOOPER et al., 2003). A abrasividade dos dentífricos utilizados no presente estudo não foi medida, mas pelo fato de os dentífricos experimentais terem a consistência de gel e em função dos resultados obtidos, é de se esperar que seja baixa. Quando se pensa na dentina, é sabido que a escovação não é capaz de afetar a camada orgânica desmineralizada e não há diferença no desgaste entre superfícies submetidas apenas à abrasão ou à erosão e abrasão em conjunto (GANSS et al., 2007), de forma que a ausência de diferença entre as condições experimentais já era esperada.

Em conclusão, observa-se que o  $Fe^{+2}$  tem um efeito protetor contra a desmineralização erosiva e erosiva/abrasiva tanto para o esmalte quanto para a dentina, e que a utilização de dentífrico como veículo de aplicação pode ser viável como agente preventivo para pacientes de alto risco à erosão dentária. Entretanto, o dentífrico contendo  $Fe^{+2}$  na concentração testada apresenta um gosto metálico, que pode não ser bem tolerado por alguns pacientes. Em relação à possibilidade de manchamento dentário, no período em que o estudo foi realizado apenas dois voluntários apresentaram um moderado escurecimento nas proximais dos dentes (Figura 39), que foi removido após uma profilaxia convencional (Figura 40) em um dos casos, e noutro caso pelo uso continuado do dentífrico comum.



**Figura 39** - Manchamento extrínseco do dente



**Figura 40** - Dentes livres de manchas após profilaxia convencional

## *6 CONCLUSÕES*

---





## 6 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, pôde-se concluir que:

- As soluções contendo  $\text{Fe}^{+2}$  reduziram a dissolução do pó de esmalte bovino de maneira dose-dependente. No entanto, a presença de  $\text{F}^-$  nas soluções reduziu o efeito do  $\text{Fe}^{+2}$  na inibição da dissolução do esmalte, não havendo efeito sinérgico entre estes íons nas condições testadas;
- A solução de  $\text{Fe}^{+2}$  a 10 mmol/L reduziu a desmineralização da superfície do esmalte bovino;
- Dentre os dentifrícios contendo  $\text{Fe}^{+2}$  e/ou  $\text{F}^-$  testados, aquele contendo  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $\text{Fe}^{+2}$  (5,0 mg/g) foi o que levou ao menor desgaste dos blocos de esmalte e dentina submetidos a desafios erosivo e abrasivo, tanto *in vitro* quanto *in situ*.

Em síntese, os dados do presente trabalho sugerem que a adição simultânea de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{F}^-$  a dentifrícios pode ser uma boa estratégia para se prevenir a erosão associada à abrasão em pacientes de risco a estas lesões dentárias.



## *REFERÊNCIAS*

---



---

**REFERÊNCIAS**

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.

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

Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003;48(11):753-9.

Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Res.* 2004;38(1):62-6.

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

Bartlett DW. Intrinsic Causes of Erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:119-39.

Bartlett DW, Smith BG. Etiology and management of tooth wear: the association of drugs and medicaments. *Drugs Today.* 1998;34(3):231-9.

Bassiouny MA, Yang J. Influence of drinking patterns of carbonated beverages on dental erosion. *Gen Dent.* 2005;53(3):205-10.

Bastos RS, Olympio KP, Bijella VT, Buzalaf MA, de Magalhães Bastos JR. Trends in dental caries prevalence in 12-year-old schoolchildren between 1976 and 2001 in Bauru, Brazil. *Public Health.* 2005;119(4):269-75.

Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):416-22.

Brookes SJ, et al. Copper ions inhibit the desmineralization of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):25-30.

Brookes SJ, et al. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralisation [abstract 132]. *Caries Res.* 2004;38(4):401.

Bundy KJ, Butler MF, Hochman RF. An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. *J Biomed Mater Res.* 1980;14(5):653-63.

Buzalaf MAR, de Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CC, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dentária enamel in vitro. Arch Oral Biol. 2006;51(10):844-8.

Buzalaf MAR. Fluoretos e Saúde Bucal. 1ª Ed. São Paulo: Santos; 2008.

Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. Br Dent J. 1980;148(11-12):253-6.

Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dentária caries. J Dent Res. 2001;80(2):466-69.

Duggal MS, Chawla HS, Curzon ME. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. Arch Oral Biol. 1991;36(12):881-4.

Eisenburger M, Addy M. Evaluation of pH and erosion time on demineralisation. Clin Oral Investig. 2001;5(2):108-11.

Emilson CG, Krasse B. The effect of iron salts on experimental dental caries in the hamster. Arch Oral Biol. 1972;17(10):1439-43.

Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem. 1925;66:375-400.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2007;115(5):390-6.

Glass RL, Rothman KJ, Espinal F, Vélez H, Smith NJ. The prevalence of human dental caries and water-borne trace metals. Arch Oral Biol. 1973;18(9):1099-104.

Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. J Dent. 1999;27(5):333-9.

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

Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2004;49(11):903-10.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Buzalaf MA, Machado MA. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an in situ/ex vivo study. Caries Res. 2008;42(6):454-9.

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.

Hughes JA, et al. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink 3: final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent.* 1999;27(5):345-50.

Hughes JA, et al. Further modification to soft drinks to minimize erosion. *Caries Res.* 2002;36(1):70-4.

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

Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M. An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res.* 1995;29(6):470-6.

Jarvinen VK, Rytomaa II, Heinonen OP. Risk factors in dentária erosion. *J Dent Res.* 1991;70(6):742-7.

Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *J Dent.* 2009;37(3):233-6.

Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR. Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion in vitro. *Caries Res.* In press 2010.

Kato MT, Leite AL, Hannas A, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, et al. Effect of iron on MMP inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res.* In press 2010.

Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol.* 2007;52(7):614-7.

Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol.* 2007;52(11):1109-11.

Kato, MT. Avaliação in vitro e in situ do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Lazarchik DA, Frazier KB. Dental erosion and acid reflux disease: an overview. *Gen Dent.* 2009;57(2):151-6.

Lobene RR. Effect of dentifrices on tooth stains with controlled brushing. *J Am Dent Ass.* 1968;77:849-55.

Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent.* 2006;19(6):319-25.

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

Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P. Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991;19(5):286-90.

Lynch SR. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(2):336-46.

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.

Magalhães AC, Rios D, Martinhon CCR, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. The influence of residual salivary fluoride from dentifrice on enamel erosion: an in situ study. *Braz Oral Res.* 2008;22(1): 67-71.

Magalhães AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. *Caries Res.* 2008;42(2):112-6.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009;37(12):994-8.

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

Martinhon CCR, Italiani Fde M, Padilha Pde M, Bijella MF, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dentária biofilm formed "in situ". *Arch Oral Biol.* 2006;51(6):471-5.

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

Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Use of saliva substitutes in patients with xerostomia. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2002;112(10):1037-58.

Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res.* 1997;31(3):238-43.



- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dentária caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol.* 1997;42(5):377-83.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Res.* 1997;31(3):244-8.
- Niedzielska K, Struzak-Wysokińska M, Wujec Z. Analysis of correlations between the content of various elements in hard tissues of milk teeth with and without caries. *Czas Stomatol.* 1990;43(6):316-22.
- Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite and fluoridated apatites. *J Dent Res.* 1985;64(Suppl Issue):301.
- Okazaki M, Takahashi J, Kimura H. Crystallinity and solubility behavior of iron-containing fluoridated hydroxyapatites. *J Biomed Mater Res.* 1986;20(7):879-86.
- Oppermann RV, Rolla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Caries Res.* 1980;14(6):422-7.
- Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005;39(2):123-9.
- Petersson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4 ( Pt 2)):436-43.
- Petersson LG, Derand T. Development of artificial carious lesions in enamel after F-varnish (Duraphat) and F-Fe-Al-solution treatment. *Swed Dent J.* 1981;5(5-6):219-23.
- Proulx AK, Reddy MB. Fermentation and lactic acid addition enhance iron bioavailability of maize. *J Agric Food Chem.* 2007;55(7):2749-54.
- Rios D, Honório HM, Magalhães 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.
- Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Buzalaf MA, Lauris JR, Machado MA. The prevalence of deciduous tooth wear in six-year-old children and its relationship with potential explanatory factors. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(3):167-71.
- Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol.* 1996;41(11):1003-10.

- Sales-Peres HCS, Pessan JP, Buzalaf MAR. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol*; 2007;52(2):128-32.
- Sales-Peres SHC, Goya S, de Araújo JJ, Sales-Peres A, Lauris JR, Buzalaf MA. Prevalence of dental wear among 12-year-old Brazilian adolescents using a modification of the tooth wear index. *Public Health*. 2008;122(9):942-8.
- ShIPLEY S, Taylor K, Mitchell W. Identifying causes of dental erosion. *Gen Dent*. 2005;53(1):73-5.
- Szarfarc SC, Stefanini MLR, Lerner BR. Nutritional anemia in Brazil. *Cad Nutr*. 1995;9:5-24.
- Ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2(Pt2)):241-4.
- Torell P, Gerdin PO. Fortnightly fluoride rinsing combined with topical painting of fluoride solutions containing Al-, Fe-, and Mn-ions. *Scand J Dent Res*. 1977;85(1):38-40.
- Torell P. Iron and dentária caries. *Swed Dent J*. 1988;12(3):113-24.
- Watson IB, Tulloch EN. Clinical assessment of cases of tooth surface loss. *Br Dent J*. 1985;159(5):144-8.
- Weiss G, Stabholz A, Markitziu A, Meyer I, Brayer L, Gedalia I. The effect of iron on in vitro decalcification oh human tooth enamel. *J Oral Rehabil*. 1985;12:91-3.
- West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil*. 2000;27(10):875-80.
- Wiegand A, Köwing L, Attin T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. *Arch Oral Biol*. 2007;52(11):1043-7.
- Wiegand A, Schwerzmann M, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Ziebolz D, et al. Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel - an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2008;66(4):231-5.
- Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2(Pt2)):162-77.
- Zipkin I, McClure FJ. Salivary citrate and dental erosion; procedure for determining citric acid in saliva; dental erosion and citric acid in saliva. *J Dent Res*. 1949;28(6):613-26.

*ANEXOS*

---



## ANEXO A

## OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73  
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

*Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356*  
e-mail: [mferrari@fob.usp.br](mailto:mferrari@fob.usp.br)

**Proc. CEP nº 138/2006**

Bauru, 9 de abril de 2010.

Senhora Professora,

Informamos que após análise por este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, a alteração do título do projeto de pesquisa "Utilização do ferro para prevenção da perda mineral da estrutura dentária: estudos in vitro, in situ e clínico" de autoria de Flávia de Moraes Italiani, sob sua orientação, para "EFEITO DO ÍON FERRO NA PREVENÇÃO DA EROSAO DENTÁRIA: ESTUDOS IN VITRO E IN SITU" foi **aprovado** considerando que não houve modificação em sua metodologia.

Lembramos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta  
Coordenadora

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

---

---

## ANEXO B

### CARTA DE INFORMAÇÕES AO SUJEITO DA PESQUISA

Nome do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

#### 1 – Título do trabalho

Utilização do ferro para prevenção da perda mineral da estrutura dentária: estudos *in vitro*, *in situ* e clínico

#### 2 – Objetivo

O íon ferro é muito importante para a prevenção de anemia, e de acordo com alguns estudos, ele também pode ter efeito protetor contra a cárie e a erosão dentária. Logo, este projeto tem como objetivo geral desenvolver um creme dental enriquecido com ferro na tentativa de combater a erosão dentária.

#### 3 – Procedimentos da Fase Experimental

Para a realização do estudo, você utilizará um aparelho de acrílico removível no céu da boca, contendo fragmentos de dentes bovinos previamente higienizados, durante 4 períodos de 5 dias cada. Entre cada período haverá um intervalo de 10 dias. Durante esses 4 períodos, 4 diferentes pastas de dente serão testadas (2 delas contendo flúor, 1 contendo ferro e flúor e uma sem ferro e sem flúor). Nos períodos do experimento, o aparelho deverá permanecer em sua boca 20 horas por dia, podendo removê-lo apenas durante as refeições. Após as refeições você deverá realizar sua higiene oral com escova, pasta e fio dental fornecidos pelos pesquisadores e recolocar o aparelho na boca.

Quatro vezes por dia você deverá mergulhar o aparelho dentro de um copo com Coca-Cola<sup>®</sup> por 5 minutos, removê-lo do copo, lavá-lo água corrente. Destas quatro vezes, apenas duas vezes, além de mergulhar o aparelho na Coca-Cola<sup>®</sup>, você deverá gotejar uma solução (fornecida pelo pesquisador) numa determinada área do aparelho e deixar agir por 30 segundos e em seguida lavar. Em outra área, que será determinada, você deverá gotejar essa mesma solução e escovar os fragmentos por 30 segundos. Após isso, o aparelho deverá ser recolocado na boca.

#### 4 - Benefícios

O desenvolvimento do projeto poderá trazer a população-alvo o benefício de minimizar a perda da estrutura dentária causada pela erosão.

#### 5 - Riscos

Este estudo não contém **riscos** à saúde dos sujeitos da pesquisa, uma vez que íon ferro será utilizado numa concentração bem abaixo da concentração tóxica, porém existe a possibilidade de alteração de cor dos seus dentes, pois uma das pastas contem ferro. No entanto, essa mancha que está apenas aderida ao esmalte dentário (extrínseca), poderá ser removida com uma simples profilaxia profissional.

Qualquer dúvida ou problema acerca dos procedimentos, contactar a autora do trabalho **Flávia de Moraes Italiani pelo telefone (14) 8801-9522 ou (11) 7614-5058.**

Você tem total liberdade de desistir do experimento a qualquer hora, e poderá ficar tranquilo quanto ao sigilo da pesquisa.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356."

---

---

**ANEXO C****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) \_\_\_\_\_, portador(a) da cédula de identidade número \_\_\_\_\_, após leitura minuciosa do **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

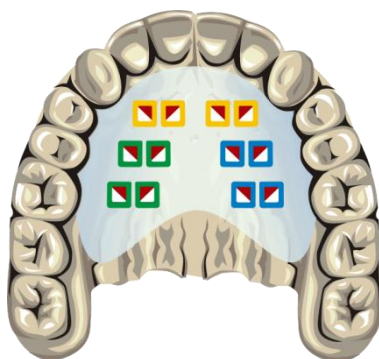
\_\_\_\_\_  
Assinatura do Sujeito da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Flávia Italiani  
Autora

## ANEXO D

### INSTRUÇÕES DE USO

- 1) Você deverá utilizar apenas a pasta de dente e o fio dental fornecidos pelo pesquisador. Não utilizar nenhum tipo de enxaguatório bucal.
- 2) Durma com o aparelho na noite anterior do início da pesquisa;
- 3) Você deverá permanecer com o aparelho na boca 20 h ao dia. O mesmo só deve ser removido para as refeições (1 hora para cada refeição – 4 refeições)
- 4) 4 vezes ao dia você escovará seus dentes com a pasta fornecida e em seguida deverá imergir o aparelho por exatos 5 minutos na Coca-Cola® (colocar o refrigerante até a marcação estabelecida no copo);
- 5) Destas 4 vezes, apenas em 2, você deverá realizar o seguinte protocolo:



- a) Gotear 1 gota da solução fornecida em cada um dos blocos do setor amarelo. Aguardar 30 segundos e lavar em água corrente. Tomar muito cuidado para que a solução não escoe para outros blocos;
- b) Gotear 1 gota da solução fornecida em cada um dos blocos do setor azul e escová-los com movimentos de vai-e-vem por 30 segundos. Lavar em água corrente e voltar o aparelho à boca.

Qualquer dúvida ou problema entrar em contato imediatamente pelos telefones:  
(11) 7614-5058 ou (14) 8801-9522



## ANEXO E

## Resultados da microdureza inicial dos 290 blocos de esmalte do Subprojeto 3

Bloco	SMH	Bloco	SMH	Bloco	SMH
Bloco 1	385	Bloco 101	324	Bloco 201	321
Bloco 2	362	Bloco 102	308	Bloco 202	385
Bloco 3	336	Bloco 103	367	Bloco 203	353
Bloco 4	418	Bloco 104	383	Bloco 204	320
Bloco 5	356	Bloco 105	368	Bloco 205	341
Bloco 6	311	Bloco 106	355	Bloco 206	332
Bloco 7	349	Bloco 107	315	Bloco 207	336
Bloco 8	388	Bloco 108	359	Bloco 208	324
Bloco 9	407	Bloco 109	354	Bloco 209	377
Bloco 10	354	Bloco 110	400	Bloco 210	343
Bloco 11	352	Bloco 111	376	Bloco 211	384
Bloco 12	361	Bloco 112	340	Bloco 212	288
Bloco 13	425	Bloco 113	300	Bloco 213	340
Bloco 14	393	Bloco 114	371	Bloco 214	292
Bloco 15	359	Bloco 115	334	Bloco 215	328
Bloco 16	371	Bloco 116	430	Bloco 216	352
Bloco 17	340	Bloco 117	355	Bloco 217	323
Bloco 18	403	Bloco 118	423	Bloco 218	320
Bloco 19	279	Bloco 119	346	Bloco 219	350
Bloco 20	273	Bloco 120	298	Bloco 220	281
Bloco 21	342	Bloco 121	372	Bloco 221	226
Bloco 22	428	Bloco 122	343	Bloco 222	352
Bloco 23	337	Bloco 123	348	Bloco 223	340
Bloco 24	327	Bloco 124	324	Bloco 224	377
Bloco 25	329	Bloco 125	354	Bloco 225	381
Bloco 26	341	Bloco 126	325	Bloco 226	335
Bloco 27	390	Bloco 127	350	Bloco 227	376
Bloco 28	350	Bloco 128	357	Bloco 228	358
Bloco 29	396	Bloco 129	286	Bloco 229	357
Bloco 30	359	Bloco 130	345	Bloco 230	372
Bloco 31	309	Bloco 131	309	Bloco 231	292
Bloco 32	357	Bloco 132	316	Bloco 232	345
Bloco 33	343	Bloco 133	311	Bloco 233	355
Bloco 34	343	Bloco 134	359	Bloco 234	291
Bloco 35	370	Bloco 135	348	Bloco 235	365
Bloco 36	353	Bloco 136	362	Bloco 236	336
Bloco 37	362	Bloco 137	353	Bloco 237	352
Bloco 38	373	Bloco 138	359	Bloco 238	375
Bloco 39	356	Bloco 139	341	Bloco 239	327
Bloco 40	338	Bloco 140	371	Bloco 240	310
Bloco 41	330	Bloco 141	298	Bloco 241	356
Bloco 42	316	Bloco 142	290	Bloco 242	327
Bloco 43	409	Bloco 143	339	Bloco 243	383
Bloco 44	365	Bloco 144	323	Bloco 244	306
Bloco 45	356	Bloco 145	358	Bloco 245	318
Bloco 46	433	Bloco 146	342	Bloco 246	334
Bloco 47	359	Bloco 147	348	Bloco 247	339

<b>Bloco 48</b>	332	<b>Bloco 148</b>	339	<b>Bloco 248</b>	358
<b>Bloco 49</b>	404	<b>Bloco 149</b>	332	<b>Bloco 249</b>	383
<b>Bloco 50</b>	334	<b>Bloco 150</b>	390	<b>Bloco 250</b>	336
<b>Bloco 51</b>	390	<b>Bloco 151</b>	338	<b>Bloco 251</b>	327
<b>Bloco 52</b>	337	<b>Bloco 152</b>	338	<b>Bloco 252</b>	301
<b>Bloco 53</b>	362	<b>Bloco 153</b>	313	<b>Bloco 253</b>	301
<b>Bloco 54</b>	407	<b>Bloco 154</b>	302	<b>Bloco 254</b>	388
<b>Bloco 55</b>	349	<b>Bloco 155</b>	314	<b>Bloco 255</b>	319
<b>Bloco 56</b>	315	<b>Bloco 156</b>	306	<b>Bloco 256</b>	374
<b>Bloco 57</b>	370	<b>Bloco 157</b>	358	<b>Bloco 257</b>	393
<b>Bloco 58</b>	387	<b>Bloco 158</b>	327	<b>Bloco 258</b>	326
<b>Bloco 59</b>	383	<b>Bloco 159</b>	306	<b>Bloco 259</b>	411
<b>Bloco 60</b>	324	<b>Bloco 160</b>	346	<b>Bloco 260</b>	278
<b>Bloco 61</b>	379	<b>Bloco 161</b>	344	<b>Bloco 261</b>	351
<b>Bloco 62</b>	362	<b>Bloco 162</b>	319	<b>Bloco 262</b>	307
<b>Bloco 63</b>	333	<b>Bloco 163</b>	343	<b>Bloco 263</b>	311
<b>Bloco 64</b>	327	<b>Bloco 164</b>	365	<b>Bloco 264</b>	349
<b>Bloco 65</b>	332	<b>Bloco 165</b>	326	<b>Bloco 265</b>	288
<b>Bloco 66</b>	396	<b>Bloco 166</b>	311	<b>Bloco 266</b>	303
<b>Bloco 67</b>	383	<b>Bloco 167</b>	275	<b>Bloco 267</b>	271
<b>Bloco 68</b>	326	<b>Bloco 168</b>	374	<b>Bloco 268</b>	369
<b>Bloco 69</b>	342	<b>Bloco 169</b>	345	<b>Bloco 269</b>	414
<b>Bloco 70</b>	386	<b>Bloco 170</b>	367	<b>Bloco 270</b>	348
<b>Bloco 71</b>	322	<b>Bloco 171</b>	331	<b>Bloco 271</b>	383
<b>Bloco 72</b>	349	<b>Bloco 172</b>	384	<b>Bloco 272</b>	295
<b>Bloco 73</b>	300	<b>Bloco 173</b>	363	<b>Bloco 273</b>	358
<b>Bloco 74</b>	368	<b>Bloco 174</b>	388	<b>Bloco 274</b>	361
<b>Bloco 75</b>	403	<b>Bloco 175</b>	284	<b>Bloco 275</b>	378
<b>Bloco 76</b>	378	<b>Bloco 176</b>	326	<b>Bloco 276</b>	284
<b>Bloco 77</b>	382	<b>Bloco 177</b>	325	<b>Bloco 277</b>	325
<b>Bloco 78</b>	365	<b>Bloco 178</b>	289	<b>Bloco 278</b>	316
<b>Bloco 79</b>	342	<b>Bloco 179</b>	361	<b>Bloco 279</b>	304
<b>Bloco 80</b>	343	<b>Bloco 180</b>	234	<b>Bloco 280</b>	372
<b>Bloco 81</b>	403	<b>Bloco 181</b>	334	<b>Bloco 281</b>	386
<b>Bloco 82</b>	330	<b>Bloco 182</b>	324	<b>Bloco 282</b>	323
<b>Bloco 83</b>	360	<b>Bloco 183</b>	316	<b>Bloco 283</b>	334
<b>Bloco 84</b>	374	<b>Bloco 184</b>	363	<b>Bloco 284</b>	341
<b>Bloco 85</b>	358	<b>Bloco 185</b>	380	<b>Bloco 285</b>	336
<b>Bloco 86</b>	353	<b>Bloco 186</b>	328	<b>Bloco 286</b>	347
<b>Bloco 87</b>	342	<b>Bloco 187</b>	341	<b>Bloco 287</b>	321
<b>Bloco 88</b>	367	<b>Bloco 188</b>	355	<b>Bloco 288</b>	339
<b>Bloco 89</b>	368	<b>Bloco 189</b>	362	<b>Bloco 289</b>	337
<b>Bloco 90</b>	369	<b>Bloco 190</b>	396	<b>Bloco 290</b>	365
<b>Bloco 91</b>	373	<b>Bloco 191</b>	318		
<b>Bloco 92</b>	355	<b>Bloco 192</b>	285	<b>Média</b>	<b>345,5</b>
<b>Bloco 93</b>	383	<b>Bloco 193</b>	398	<b>DP</b>	<b>±34,2</b>
<b>Bloco 94</b>	297	<b>Bloco 194</b>	304		
<b>Bloco 95</b>	321	<b>Bloco 195</b>	314		
<b>Bloco 96</b>	315	<b>Bloco 196</b>	393		
<b>Bloco 97</b>	340	<b>Bloco 197</b>	304		
<b>Bloco 98</b>	400	<b>Bloco 198</b>	286		
<b>Bloco 99</b>	367	<b>Bloco 199</b>	265		
<b>Bloco 100</b>	341	<b>Bloco 200</b>	317		

## ANEXO F

Média do desgaste ( $\mu\text{m}$ ) sofrido pelos blocos de esmalte submetidos ao desafio erosivo e abrasivo com os dentifrícios testados contendo ou não  $\text{F}^-$  (1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{Fe}^{+2}$  (1 a 5  $\text{mg}/\text{g}$ ) ou associação de ambos

Blocos	Só erosão (controle)	Placebo	1100 $\mu\text{g}/\text{mL F}^-$	Crest <sup>®</sup> 1100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\text{Fe}^{+2}$ 1,0 $\text{mg}/\text{g}$	$\text{Fe}^{+2}$ 2,5 $\text{mg}/\text{g}$	$\text{Fe}^{+2}$ 5,0 $\text{mg}/\text{g}$	$\text{F}^- + \text{Fe}^{+2}$ 1,0	$\text{F}^- + \text{Fe}^{+2}$ 2,5	$\text{F}^- + \text{Fe}^{+2}$ 5,0
1	1,15	1,16	0,80	0,71	0,26	0,97	0,30	1,33	0,74	0,49
2	1,17	1,96	0,50	0,61	1,25	0,55	1,77	0,91	0,62	0,43
3	0,67	1,10	0,55	1,47	0,38	0,64	0,53	0,92	0,39	0,31
4	0,78	0,43	0,58	1,20	0,41	1,46	0,38	0,61	1,00	0,59
5	1,00	1,02	0,58	1,24	0,85	0,66	1,16	0,50	0,49	0,58
6	0,63	0,59	1,96	0,91	0,80	0,74	0,26	0,46	1,27	0,61
7	0,34	0,79	0,97	0,78	0,69	1,27	0,44	0,51	0,75	0,45
8	0,77	1,91	0,41	0,70	0,92	1,00	0,46	0,50	0,97	0,25
9	1,00	1,59	2,42	0,74	0,76	0,53	0,72	0,49	0,87	0,27
10	1,70	1,06	0,85	1,33	0,79	1,52	0,45	0,80	0,91	0,47
11	0,16	0,38	1,22	0,84	1,01	1,93	1,30	1,07	0,97	0,45
12	0,62	1,00	1,65	1,50	0,31	0,70	0,28	0,34	1,39	0,20
13	0,36	0,83	0,93	0,66	0,76	1,06	1,10	0,78	1,60	0,74
14	0,78	1,11	0,93	0,43	1,07	0,77	1,91	1,45	0,91	0,54
15	1,04	0,54	0,77	1,27	0,45	1,91	0,78	1,25	0,33	0,13
16	0,78	0,57	0,68	0,91	0,56	1,09	0,22	0,89	0,89	0,21
17	0,32	1,91	1,31	1,13	0,84	1,09	1,07	0,82	1,53	0,38
18	1,74	1,32	0,57	0,62	0,71	1,51	0,41	0,67	0,91	0,98
19	0,40	0,31	0,53	0,96	1,64	0,48	1,43	1,21	1,06	1,00
20	0,23	1,67	0,36	1,04	*	1,93	0,60	1,08	0,63	0,58
<b>Média<math>\pm</math></b>	0,78 <sup>ab</sup>	1,06 <sup>b</sup>	0,93 <sup>b</sup>	0,95 <sup>b</sup>	0,76 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>b</sup>	0,78 <sup>ab</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>
<b>DP</b>	$\pm 0,44$	$\pm 0,53$	$\pm 0,54$	$\pm 0,31$	$\pm 0,34$	$\pm 0,48$	$\pm 0,52$	$\pm 0,32$	$\pm 0,34$	$\pm 0,24$

\*Amostra perdida

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## ANEXO G

## Resultados da microdureza inicial dos 342 blocos de esmalte do Subprojeto 4

Bloco	SMH	Bloco	SMH	Bloco	SMH
Bloco 1	343	Bloco 116	349	Bloco 231	368
Bloco 2	292	Bloco 117	341	Bloco 232	345
Bloco 3	371	Bloco 118	350	Bloco 233	377
Bloco 4	296	Bloco 119	323	Bloco 234	424
Bloco 5	344	Bloco 120	374	Bloco 235	355
Bloco 6	346	Bloco 121	420	Bloco 236	337
Bloco 7	312	Bloco 122	295	Bloco 237	324
Bloco 8	394	Bloco 123	398	Bloco 238	364
Bloco 9	368	Bloco 124	368	Bloco 239	342
Bloco 10	401	Bloco 125	308	Bloco 240	345
Bloco 11	294	Bloco 126	377	Bloco 241	341
Bloco 12	355	Bloco 127	309	Bloco 242	339
Bloco 13	382	Bloco 128	336	Bloco 243	371
Bloco 14	323	Bloco 129	362	Bloco 244	356
Bloco 15	346	Bloco 130	337	Bloco 245	373
Bloco 16	292	Bloco 131	328	Bloco 246	415
Bloco 17	351	Bloco 132	414	Bloco 247	388
Bloco 18	289	Bloco 133	333	Bloco 248	248
Bloco 19	340	Bloco 134	354	Bloco 249	272
Bloco 20	405	Bloco 135	332	Bloco 250	254
Bloco 21	406	Bloco 136	356	Bloco 251	339
Bloco 22	330	Bloco 137	336	Bloco 252	229
Bloco 23	329	Bloco 138	352	Bloco 253	338
Bloco 24	332	Bloco 139	333	Bloco 254	306
Bloco 25	292	Bloco 140	338	Bloco 255	335
Bloco 26	275	Bloco 141	344	Bloco 256	325
Bloco 27	358	Bloco 142	416	Bloco 257	316
Bloco 28	323	Bloco 143	384	Bloco 258	332
Bloco 29	309	Bloco 144	287	Bloco 259	333
Bloco 30	314	Bloco 145	400	Bloco 260	299
Bloco 31	344	Bloco 146	306	Bloco 261	296
Bloco 32	366	Bloco 147	354	Bloco 262	339
Bloco 33	385	Bloco 148	366	Bloco 263	292
Bloco 34	294	Bloco 149	379	Bloco 264	348
Bloco 35	300	Bloco 150	396	Bloco 265	303
Bloco 36	346	Bloco 151	301	Bloco 266	357
Bloco 37	300	Bloco 152	388	Bloco 267	326
Bloco 38	288	Bloco 153	337	Bloco 268	286
Bloco 39	325	Bloco 154	392	Bloco 269	355
Bloco 40	396	Bloco 155	346	Bloco 270	277
Bloco 41	332	Bloco 156	352	Bloco 271	306
Bloco 42	342	Bloco 157	330	Bloco 272	280
Bloco 43	347	Bloco 158	356	Bloco 273	315
Bloco 44	350	Bloco 159	297	Bloco 274	254
Bloco 45	328	Bloco 160	354	Bloco 275	356

<b>Bloco 46</b>	342	<b>Bloco 161</b>	283	<b>Bloco 276</b>	353
<b>Bloco 47</b>	302	<b>Bloco 162</b>	291	<b>Bloco 277</b>	367
<b>Bloco 48</b>	368	<b>Bloco 163</b>	306	<b>Bloco 278</b>	347
<b>Bloco 49</b>	364	<b>Bloco 164</b>	411	<b>Bloco 279</b>	317
<b>Bloco 50</b>	353	<b>Bloco 165</b>	329	<b>Bloco 280</b>	335
<b>Bloco 51</b>	354	<b>Bloco 166</b>	366	<b>Bloco 281</b>	302
<b>Bloco 52</b>	318	<b>Bloco 167</b>	413	<b>Bloco 282</b>	380
<b>Bloco 53</b>	274	<b>Bloco 168</b>	431	<b>Bloco 283</b>	312
<b>Bloco 54</b>	327	<b>Bloco 169</b>	324	<b>Bloco 284</b>	343
<b>Bloco 55</b>	437	<b>Bloco 170</b>	310	<b>Bloco 285</b>	395
<b>Bloco 56</b>	307	<b>Bloco 171</b>	359	<b>Bloco 286</b>	306
<b>Bloco 57</b>	361	<b>Bloco 172</b>	329	<b>Bloco 287</b>	392
<b>Bloco 58</b>	377	<b>Bloco 173</b>	342	<b>Bloco 288</b>	368
<b>Bloco 59</b>	270	<b>Bloco 174</b>	273	<b>Bloco 289</b>	308
<b>Bloco 60</b>	314	<b>Bloco 175</b>	343	<b>Bloco 290</b>	355
<b>Bloco 61</b>	268	<b>Bloco 176</b>	275	<b>Bloco 291</b>	283
<b>Bloco 62</b>	289	<b>Bloco 177</b>	377	<b>Bloco 292</b>	360
<b>Bloco 63</b>	359	<b>Bloco 178</b>	331	<b>Bloco 293</b>	308
<b>Bloco 64</b>	394	<b>Bloco 179</b>	405	<b>Bloco 294</b>	330
<b>Bloco 65</b>	345	<b>Bloco 180</b>	312	<b>Bloco 295</b>	331
<b>Bloco 66</b>	301	<b>Bloco 181</b>	383	<b>Bloco 296</b>	304
<b>Bloco 67</b>	362	<b>Bloco 182</b>	372	<b>Bloco 297</b>	346
<b>Bloco 68</b>	321	<b>Bloco 183</b>	300	<b>Bloco 298</b>	321
<b>Bloco 69</b>	274	<b>Bloco 184</b>	311	<b>Bloco 299</b>	352
<b>Bloco 70</b>	282	<b>Bloco 185</b>	299	<b>Bloco 300</b>	325
<b>Bloco 71</b>	394	<b>Bloco 186</b>	377	<b>Bloco 301</b>	306
<b>Bloco 72</b>	366	<b>Bloco 187</b>	388	<b>Bloco 302</b>	308
<b>Bloco 73</b>	270	<b>Bloco 188</b>	377	<b>Bloco 303</b>	304
<b>Bloco 74</b>	246	<b>Bloco 189</b>	343	<b>Bloco 304</b>	362
<b>Bloco 75</b>	397	<b>Bloco 190</b>	341	<b>Bloco 305</b>	319
<b>Bloco 76</b>	273	<b>Bloco 191</b>	419	<b>Bloco 306</b>	321
<b>Bloco 77</b>	355	<b>Bloco 192</b>	432	<b>Bloco 307</b>	319
<b>Bloco 78</b>	325	<b>Bloco 193</b>	304	<b>Bloco 308</b>	345
<b>Bloco 79</b>	352	<b>Bloco 194</b>	289	<b>Bloco 309</b>	320
<b>Bloco 80</b>	320	<b>Bloco 195</b>	402	<b>Bloco 310</b>	321
<b>Bloco 81</b>	383	<b>Bloco 196</b>	338	<b>Bloco 311</b>	290
<b>Bloco 82</b>	372	<b>Bloco 197</b>	358	<b>Bloco 312</b>	344
<b>Bloco 83</b>	389	<b>Bloco 198</b>	356	<b>Bloco 313</b>	353
<b>Bloco 84</b>	284	<b>Bloco 199</b>	386	<b>Bloco 314</b>	353
<b>Bloco 85</b>	342	<b>Bloco 200</b>	345	<b>Bloco 315</b>	352
<b>Bloco 86</b>	342	<b>Bloco 201</b>	360	<b>Bloco 316</b>	354
<b>Bloco 87</b>	304	<b>Bloco 202</b>	347	<b>Bloco 317</b>	352
<b>Bloco 88</b>	353	<b>Bloco 203</b>	328	<b>Bloco 318</b>	305
<b>Bloco 89</b>	297	<b>Bloco 204</b>	326	<b>Bloco 319</b>	318
<b>Bloco 90</b>	355	<b>Bloco 205</b>	330	<b>Bloco 320</b>	325
<b>Bloco 91</b>	313	<b>Bloco 206</b>	398	<b>Bloco 321</b>	319
<b>Bloco 92</b>	365	<b>Bloco 207</b>	376	<b>Bloco 322</b>	339
<b>Bloco 93</b>	313	<b>Bloco 208</b>	310	<b>Bloco 323</b>	319
<b>Bloco 94</b>	351	<b>Bloco 209</b>	387	<b>Bloco 324</b>	332
<b>Bloco 95</b>	351	<b>Bloco 210</b>	351	<b>Bloco 325</b>	378
<b>Bloco 96</b>	330	<b>Bloco 211</b>	341	<b>Bloco 326</b>	317
<b>Bloco 97</b>	355	<b>Bloco 212</b>	336	<b>Bloco 327</b>	305
<b>Bloco 98</b>	332	<b>Bloco 213</b>	339	<b>Bloco 328</b>	312

---

<b>Bloco 99</b>	379	<b>Bloco 214</b>	359	<b>Bloco 329</b>	361
<b>Bloco 100</b>	382	<b>Bloco 215</b>	352	<b>Bloco 330</b>	332
<b>Bloco 101</b>	398	<b>Bloco 216</b>	354	<b>Bloco 331</b>	271
<b>Bloco 102</b>	319	<b>Bloco 217</b>	306	<b>Bloco 332</b>	312
<b>Bloco 103</b>	324	<b>Bloco 218</b>	374	<b>Bloco 333</b>	351
<b>Bloco 104</b>	338	<b>Bloco 219</b>	362	<b>Bloco 334</b>	304
<b>Bloco 105</b>	336	<b>Bloco 220</b>	359	<b>Bloco 335</b>	286
<b>Bloco 106</b>	324	<b>Bloco 221</b>	383	<b>Bloco 336</b>	283
<b>Bloco 107</b>	351	<b>Bloco 222</b>	350	<b>Bloco 337</b>	307
<b>Bloco 108</b>	275	<b>Bloco 223</b>	337	<b>Bloco 338</b>	285
<b>Bloco 109</b>	354	<b>Bloco 224</b>	319	<b>Bloco 339</b>	326
<b>Bloco 110</b>	321	<b>Bloco 225</b>	336	<b>Bloco 340</b>	319
<b>Bloco 111</b>	350	<b>Bloco 226</b>	419	<b>Bloco 341</b>	316
<b>Bloco 112</b>	340	<b>Bloco 227</b>	426	<b>Bloco 342</b>	304
<b>Bloco 113</b>	397	<b>Bloco 228</b>	371		
<b>Bloco 114</b>	355	<b>Bloco 229</b>	360	<b>Média</b>	<b>338,65</b>
<b>Bloco 115</b>	330	<b>Bloco 230</b>	342	<b>DP</b>	<b>± 36,91</b>

---

## ANEXO H

## Dentifrício: Placebo formulado

## Só Erosão

	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 5	Vol 6	Vol 7	Vol 8	Vol 9	Vol 10	Média	DP
EH	0,609	1,913	3,744	1,660	1,800	2,217	4,665	1,492	0,723	3,347	2,217	1,313
DH	3,395	1,797	0,921	2,519	0,916	2,01774	2,974	1,923	1,491	2,225	2,018	0,807
EPE	2,142	2,217	3,303	1,577	3,049	3,14474	4,257	5,024	3,092	3,641	3,145	1,021
DPE	2,129	1,629	2,799	2,160	0,606	1,79389	1,492	1,331	1,829	2,170	1,794	0,591

## Er + Gota

EH	2,067	2,337	0,482	1,594	0,894	1,65689	1,585	1,335	3,126	1,492	1,657	0,737
DH	1,023	2,892	2,594	0,990	0,650	1,65937	2,450	0,876	1,425	2,033	1,659	0,796
EPE	2,170	1,951	3,145	3,568	4,374	3,1277	5,982	1,266	1,498	4,196	3,128	1,470
DPE	1,581	2,307	1,968	0,776	1,379	1,83722	3,166	0,934	0,934	3,491	1,837	0,929

## Er + Abr

EH	1,307	2,461	1,444	2,892	0,678	2,77252	3,535	1,619	3,803	7,214	2,773	1,859
DH	1,567	2,135	1,370	1,677	1,176	1,64152	1,468	0,950	1,798	2,631	1,642	0,478
EPE	3,340	2,287	1,766	3,320	4,949	3,37596	3,518	3,376	2,585	5,243	3,376	1,074
DPE	1,680	1,899	1,237	1,132	1,701	1,84637	2,649	0,909	1,508	3,902	1,846	0,869

## Dentifrício: Crest

## Só Erosão

	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 5	Vol 6	Vol 7	Vol 8	Vol 9	Vol 10	Média	DP
EH	1,920	1,362	3,415	3,651	2,775	1,567	2,546	4,127	0,730	4,092	2,619	1,198
DH	1,903	1,462	2,114	0,721	0,765	1,554	1,845	1,418	1,324	1,391	1,450	0,451
EPE	2,758	4,175	2,895	2,409	1,253	1,715	2,991	3,188	2,971	1,442	2,580	0,895
DPE	1,810	0,765	1,598	2,615	2,272	0,862	1,540	2,147	1,547	2,491	1,765	0,632

## Er + Gota

EH	3,374	1,226	4,054	1,998	1,424	0,801	3,217	1,729	3,196	3,278	2,430	1,118
DH	2,584	1,895	2,013	1,722	0,373	1,135	1,157	1,843	2,135	1,574	1,643	0,622
EPE	3,518	1,044	3,265	4,403	1,342	2,734	2,505	0,675	3,539	1,094	2,412	1,294
DPE	1,759	1,890	1,859	2,132	1,115	0,689	1,372	2,074	1,458	2,464	1,681	0,527

## Er + Abr

EH	2,991	1,085	1,947	2,892	0,893	3,090	2,813	4,162	1,543	5,638	2,706	1,447
DH	1,418	1,098	1,937	2,560	0,954	1,622	2,662	2,236	2,040	3,051	1,958	0,690
EPE	0,477	2,030	4,161	4,127	5,038	4,401	3,580	5,438	3,970	3,637	3,686	1,452
DPE	0,317	1,173	2,029	2,071	0,819	0,817	1,601	2,105	1,574	1,911	1,442	0,629

**Dentifrício: 1100 µg/mL formulado****Só Erosão**

	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 5	Vol 6	Vol 7	Vol 8	Vol 9	Vol 10	Média	DP
<b>EH</b>	1,845	1,882	2,067	5,846	1,998	1,711	3,052	0,955	1,523	3,686	2,456	1,418
<b>DH</b>	1,311	1,557	1,362	3,737	1,030	2,053	2,464	0,353	1,143	4,500	1,951	1,288
<b>EPE</b>	3,073	2,567	2,878	6,147	3,135	3,354	2,779	2,471	2,101	2,616	3,112	1,126
<b>DPE</b>	2,382	0,752	0,738	4,264	1,605	1,865	2,608	1,153	0,346	1,377	1,709	1,153

**Er + Gota**

<b>EH</b>	3,016	2,170	1,503	4,155	1,957	2,751	3,135	2,790	1,841	4,196	2,751	0,921
<b>DH</b>	2,302	1,157	1,418	3,340	1,237	1,998	2,813	0,925	1,633	3,216	2,004	0,879
<b>EPE</b>	1,691	2,861	5,154	8,693	2,710	5,519	3,244	3,162	3,717	4,703	4,145	1,989
<b>DPE</b>	1,280	1,646	1,044	4,291	1,256	2,197	3,025	1,211	1,400	3,099	2,045	1,086

**Er + Abr**

<b>EH</b>	2,850	1,352	1,113	2,697	1,318	4,874	5,736	3,956	2,156	6,887	3,294	2,003
<b>DH</b>	1,995	1,679	1,725	3,518	1,152	0,735	2,724	1,783	1,153	1,180	1,764	0,831
<b>EPE</b>	1,995	2,440	2,926	3,683	2,139	4,322	1,239	4,812	3,675	5,811	3,304	1,418
<b>DPE</b>	1,377	0,796	1,537	3,956	1,217	0,974	3,710	1,235	2,016	1,770	1,859	1,101

**Dentifrício: Ferro 5,0 mg/g + 1100 µg/mL formulado****Só Erosão**

	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 5	Vol 6	Vol 7	Vol 8	Vol 9	Vol 10	Média	DP
<b>EH</b>	0,811	1,140	1,063	1,372	0,928	0,560	1,373	1,331	0,808	1,239	1,063	0,279
<b>DH</b>	1,691	1,383	1,613	2,669	1,489	2,235	1,656	0,973	1,108	1,312	1,613	0,509
<b>EPE</b>	1,743	0,759	1,444	2,132	3,135	1,879	0,620	0,828	1,099	0,798	1,444	0,794
<b>DPE</b>	1,224	1,814	1,474	1,078	0,869	3,388	2,616	0,652	0,818	0,803	1,474	0,896

**Er + Gota**

<b>EH</b>	1,177	0,151	0,912	1,540	1,784	0,977	0,031	0,760	1,225	0,561	0,912	0,560
<b>DH</b>	1,542	1,602	1,170	1,790	1,242	0,807	1,249	0,514	1,113	0,670	1,170	0,413
<b>EPE</b>	0,824	0,480	0,912	1,947	1,817	0,562	0,537	0,750	0,732	0,555	0,912	0,531
<b>DPE</b>	0,877	0,791	0,930	1,153	0,750	1,112	0,311	0,786	1,746	0,844	0,930	0,367

**Er + Abr**

<b>EH</b>	1,050	0,253	0,835	2,036	1,311	1,186	0,183	0,424	0,695	0,377	0,835	0,577
<b>DH</b>	1,273	1,876	1,045	1,602	1,109	0,342	0,559	1,191	0,768	0,683	1,045	0,473
<b>EPE</b>	2,554	0,986	1,698	3,675	2,847	0,640	0,982	1,184	1,332	1,087	1,698	0,993
<b>DPE</b>	0,763	1,889	1,160	1,776	1,391	0,391	0,934	0,992	1,274	1,033	1,160	0,450