



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

**“Avaliação *in vitro* e *in situ*
do efeito dos íons ferro na
erosão da superfície dentária
bovina e humana”**

Melissa Thiemi Kato

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Saúde Coletiva

BAURU
2007

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

**“Avaliação *in vitro* e *in situ* do efeito dos
íons ferro na erosão da superfície dentária
bovina e humana”**

Melissa Thiemi Kato

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Odontologia,
área de Saúde Coletiva

Orientadora: *Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf*

BAURU
2007

Kato, Melissa Thiemi

K156a Avaliação *in vitro* e *in situ* do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana. – Bauru, 2007.
176p.; il.; tabs.; 30cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB:

Projeto de pesquisa aprovado em 14 de dezembro de 2004

Nº de Protocolo: 130/2004

Dados Curriculares

Melissa Thiemi Kato

Nascimento	27de abril de 1978
Naturalidade	Bauru – SP
Filiação	Jorge Jouji Kato Cleide Elisabete Possinholo Kato
1999 – 2002	Curso de graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
2000 – 2001	Bolsista de Iniciação Científica, com auxílio PIBIC/CNPq (Proc. 523431/95-3) sob orientação do Prof. Dr. João Adolfo Caldas Navarro.
2001 – 2002	Bolsista de Iniciação Científica, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 01/00250-0) sob orientação do Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti
2003 – 2004	Curso de especialização em Odontologia em Saúde Coletiva pelo Hospital de Reabilitação em Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo
2005 – 2007	Curso de pós-graduação em nível de mestrado em Odontologia em Saúde Coletiva - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidde de São Paulo

- 2005 – 2007** Bolsista de Mestrado, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 04/12632-2) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
- 2005 – 2007** Representante discente na Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
- Associações** CRO/SP – Conselho Regional de Odontologia / São Paulo
- SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

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

F. Scott Fitz Gerald

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade.”

Victor Hugo

Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha família,
a quem eu devo tudo.*

*Aos meus pais queridos,
Jorge Kato e Cleide Kato,*

*Se contornei obstáculos, se consegui vitórias e se aqui estou,
com certeza, foi porque tenho pais maravilhosos, que me dão
todo apoio e demonstram o melhor exemplo de honestidade,
trabalho, esforço e um amor incondicional por mim.
Minha eterna gratidão. Amo vocês!*

*Aos meus irmãos,
Helder e Mirella,*

*Não poderia me eximir de dizer que, em algumas páginas,
vocês lá estão. Se existem pessoas com quem eu posso contar,
posso dizer com certeza, que são meus irmãos. Desculpem-me
pelas inúmeras ausências. Se ainda não lhes disse, aqui fica
registrado por escrito:*

*Amo muito vocês dois
e obrigada por existirem!*

Agradecimentos Especiais

A *Deus*, pois sempre que precisei, foi na fé que eu me agarrei e o Senhor nunca me desamparou.

À professora *Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf*,

Quando eu entrei no mestrado, a melhor notícia que eu tive foi que seria minha orientadora. Eu chorava de tanta felicidade! Esforcei-me ao máximo para que ao final dessa trajetória, como sua orientada, restassem em você, boas lembranças minhas. Serei eternamente grata pelas oportunidades que me ofereceu.

À professora *Dra. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres*,

Uma grande amiga, incentivadora e que sempre depositou em mim toda confiança. Obrigada por me mostrar que eu não deveria fraquejar por causa das minhas decepções. Se hoje estou finalizando mais esta etapa da minha vida, foi porque incentivou-me a pelo menos tentar.

Obrigada pela amizade e apoio.

Ao professor *Dr. Arsenio Sales Peres*,

Mais do que o professor de orientação profissional, foi o guia da minha escolha pela Saúde Coletiva. Obrigada por ter me dado esperança quando eu mais precisei.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, pela oportunidade em realizar o curso de Mestrado. Desde pequena passava em frente da faculdade e dizia: um dia estudarei aqui! Mal sabia que eu já era “USPiana”. A FOB é minha segunda casa. Por onde eu passar, sempre levantarei a bandeira da USP, pois eu amo esta instituição!

Aos professores do Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Dr. Arsenio Sales Peres, Dr. José Roberto de Magalhães Bastos, Dr. José Roberto Pereira Lauris, Dra. Nilce Emy Tomita, Dra. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres** pelo empenho, dedicação e satisfação ao transmitirem seus conhecimentos.

A todos os **professores do curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP que participaram diretamente do meu aprendizado. Obrigada pelos ensinamentos

Aos funcionários da Saúde Coletiva: **Marta, Tia Helena, Rosa, Sílvia**. Sempre solidários. Obrigada pelo acolhimento e pela alegria que me receberam no departamento, desde que cheguei.

Aos funcionários da Bioquímica: **Ovídio, Thelma e Flávia**, sempre dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Aos funcionários do Laboratório de Materiais Dentários: **Alcides e Sandrinha**, sempre muito receptivos.

Aos **funcionários da biblioteca da FOB- USP**, pela prontidão, desde minha chegada à pós-graduação, orientação bibliográfica e apoio na normatização da dissertação.

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários que participaram dessa pesquisa, **Agnes, Aline, Cláudia, Davison, Flávia, Heitor, Juliana, Mirella, Tatiana e Vivian**. Muito obrigada pela cooperação, desprendimento, dedicação e pela grande responsabilidade que demonstraram com a participação de vocês, pois sem vocês não seria possível o desenvolvimento da pesquisa.

À doutoranda e amiga **Flávia Italiani**, por toda ajuda desde a elaboração do projeto da dissertação, fato que nos tornou grandes amigas. Obrigada pela paciência, amizade e pelo convívio tão agradável!

Claudinha, Juliana e Tatiana, amizade nascida durante o mestrado. Obrigada por sempre ouvirem meus desabaços. A amizade de vocês, eu levarei pra sempre comigo. Eu adoro vocês!

Ao **Juliano Pessan**, por ter me indicado à Profa. Marília na escolha da sua orientação. Com certeza, você foi primordial no meu ingresso à pós-graduação. Obrigada pelo carinho!

À **Ana Carolina Magalhães**, por ser sempre solista em atender minhas dúvidas e por me emprestar várias das ilustrações que estão presentes nesta dissertação.

Aos amigos **Pity, Daniela Rios e Heitor Honório, Renato e Anuradha**, por sanarem minhas dúvidas durante as etapas laboratoriais.

À **Andréa Gutierrez, Luiz Guilherme Vaz e Marina Garcia**, por me permitir aprender quando tentava lhes ensinar.

Aos amigos do laboratório: **Aline, Flávia Levy, Heloísa, Maria Heloísa, Rejane**, pelo convívio tão agradável.

Aos colegas do mestrado em Saúde Coletiva, **Agnes, Fernando, Gustavo, Henrique, Ismar, Juliana, Ricardo, Rute, Sérgio, Suzana e Tatiana**. Vou sentir falta das risadas, trabalhos, apresentações e das nossas aulas.

Às amigas, solidárias sempre, cada uma a seu modo, **Aline, Claudinha, Cacau, Etiene, Flavinha, Fernanda, Ferzinha, Juliana, Tatiana**. Sei que posso contar com vocês. Muito obrigada!

Ao meu anjo, **Dav**, não tenho nem palavras para expressar o quanto o seu amor incondicional é importante pra mim. Adorei a capa da minha dissertação. Obrigada pelo carinho, dedicação, apoio. Jamais me esquecerei de tudo o que você faz por mim!

Ao **Prof. Dr. João Adolfo Caldas Navarro**, por ser meu primeiro orientador, apresentando-me à vida científica.

Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, pelo incentivo e orientação científica durante a graduação. Nosso trabalho daquela época tem gerado frutos que eu colho até hoje.

À **FAPESP**, por mais este indispensável apoio financeiro que possibilitou o meu aprimoramento acadêmico e também o desenvolvimento deste trabalho.

Àqueles que não mencionei, mas, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho e com meu desenvolvimento científico e pessoal, meu mais sincero agradecimento. Tenho certeza de que tudo valeu a pena.

Muito obrigada!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xxxi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1 Definição e etiologia da erosão dentária	09
2.2 Estudos de prevalência da erosão dentária	10
2.3 Efeito erosivo de bebidas sobre a superfície dentária.....	14
2.4 Estudos <i>in vitro</i> da erosão dentária	18
2.5 Estudos <i>in situ</i> da erosão dentária	20
2.6 Ação da saliva e da película adquirida	24
2.7 Métodos preventivos da erosão dentária	29
2.8 Veículos preventivos da erosão dentária	33
2.8.1 Dentifrícios	33
2.8.2 Gel.	34
2.8.3 Vernizes	35
2.9 Efeito de íons metálicos na desmineralização	36
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Subprojeto 1: Determinação da concentração de ferro capaz de inibir a desmineralização do pó de esmalte bovino provocada por dois tipos de refrigerante.	49

4.1.1 Delineamento experimental do subprojeto 1.....	49
4.1.2 Escolha do refrigerante	50
4.1.3 Seleção e corte dos dentes bovinos	50
4.1.4 Polimento dos blocos de dente bovino	52
4.1.5 Obtenção do pó de esmalte	52
4.1.6 Preparo das bebidas com diferentes concentrações de ferro	53
4.1.6.1 Realização do estudo piloto do subprojeto 1: Efeito da adição de ferro em bebida carbonatada ou descarbonatada sobre a desmineralização de pó de esmalte bovino	55
4.1.7 Determinação do fósforo liberado pelo esmalte em pó	59
4.1.8 Análise estatística	61
4.2 Subprojeto 2: Análise do efeito do ferro na redução da erosão do esmalte dentário bovino submetido a regimes de des e remineralização.	61
4.2.1 Delineamento Experimental	61
4.2.2 Amostra	62
4.2.3 Obtenção dos espécimes	62
4.2.3.1 Seleção e corte dos dentes bovinos	62
4.2.3.2 Planificação e polimento dos blocos de dente bovino.....	63
4.2.3.3 Seleção dos blocos de dente bovino	65
4.2.4 Etapa experimental	65
4.2.5 Avaliação do pH, capacidade tampão e concentração de fosfato e flúor na bebida	67
4.2.6 Análise de desgaste	68
4.2.7 Avaliação da microdureza de superfície inicial e final	70
4.2.8 Análise estatística	72

4.3 Subprojeto 3: Efeito do ferro na inibição da erosão do esmalte e dentina dentária humana provocada por um refrigerante <i>in situ</i>.	72
4.3.1 Delineamento experimental.....	72
4.3.2 Preparação dos espécimes	73
4.3.2.1 Seleção e corte dos dentes humanos	73
4.3.2.2 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina	73
4.3.3 Planificação e polimento dos blocos de esmalte e dentina humana	75
4.3.4 Padronização e seleção dos blocos de esmalte e dentina após planificação e polimento	76
4.3.5 Seleção dos voluntários	77
4.3.6 Preparação do dispositivo palatino	77
4.3.7 Instruções aos voluntários	78
4.3.8 Avaliação <i>in situ</i> - Fase intraoral	80
4.3.9 Análise de desgaste e perda de microdureza de superfície	80
4.3.10 Análise estatística	81
5 RESULTADOS	83
5.1 Estudo piloto do subprojeto 1.....	85
5.2 Subprojeto 1.....	86
5.3 Subprojeto 2	88
5.3.1 Avaliação do pH, capacidade tampão e concentração de fosfato e flúor na bebida.....	88
5.3.2 Perfilometria.....	89
5.3.3 Microdureza superficial.....	89
5.4 Subprojeto 3	90
5.4.1 Perfilometria do esmalte.....	90
5.4.2 Microdureza superficial do esmalte.....	91

5.4.3 Perfilometria da dentina.....	93
5.4.4 Microdureza superficial da dentina.....	93
6 DISCUSSÕES	95
7 CONCLUSÕES	111
ANEXOS	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
ABSTRACT	173

Lista de Figuras

Figura 1 -	Esquema ilustrando o delineamento experimental do subprojeto 1.....	50
Figura 2 -	Máquina de corte.....	51
Figura 3 -	Dente bovino.....	51
Figura 4 -	Corte da face vestibular, mostrando a obtenção de blocos de dente.....	51
Figura 5 -	Politriz para desgaste da dentina.....	52
Figura 6 -	Desgaste da dentina até obter apenas esmalte.....	52
Figura 7 -	Equipamento tipo gral e pistilo para obtenção do pó de esmalte.....	53
Figura 8 -	Peneira de Tamis.....	53
Figura 9 -	Esquema do delineamento experimental do estudo piloto do subprojeto 1.....	56
Figura 10 -	Obtenção de um bloco da porção plana do dente bovino....	63
Figura 11 -	Planificação da dentina.....	64
Figura 12 -	Planificação e polimento dos blocos de esmalte na politriz.	64
Figura 13 -	Frasco plástico, contendo Coca-Cola® para imersão do bloco de esmalte.....	65
Figura 14 -	Mesa agitadora.....	65
Figura 15 -	Perfilômetro.....	68
Figura 16 -	Ponta apalpadora realizando a leitura de desgaste.....	68
Figura 17 -	Sentido da leitura para quantificação do desgaste (do lado controle para o lado experimental).....	69
Figura 18 -	Ilustração esquemática, mostrando o desgaste dos espécimes testados. (A) início da leitura feita pelo perfilômetro, (B) final da leitura feita pelo rugosímetro e (d) desgaste ocasionado (μm).....	69

Figura 19 - Microdurômetro acoplado ao computador.....	71
Figura 20 - Penetração da ponta tipo Knoop para obtenção da endentação.....	71
Figura 21 - Imagem de uma endentação feita para avaliação da microdureza no bloco de esmalte.....	71
Figura 22 - Fixação do terceiro molar.....	74
Figura 23 - Corte cervical, do qual eram obtidos os fragmentos de esmalte	74
Figura 24 - Dispositivo palatino, contendo os espécimes de esmalte (em vermelho) e dentina (em azul).....	78
Figura 25 - Kit entregue ao voluntário para realização da etapa experimental.....	79
Figura 26 - Superfície do esmalte bovino antes do processo erosivo (aumento 40 X).....	89
Figura 27 - Superfície do esmalte bovino após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X).....	89
Figura 28 - Superfície do esmalte bovino após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).....	89
Figura 29 - Endentação na superfície do esmalte hígido. Observa-se superfície lisa e o tamanho da endentação (aumento de 40X).....	90
Figura 30 - Endentação na superfície do esmalte após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	90
Figura 31 - Endentação na superfície do esmalte após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	90
Figura 32 - Superfície do esmalte humano antes do processo erosivo (aumento 40 X).....	91
Figura 33 - Superfície do esmalte humano após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X).....	91
Figura 34 - Superfície do esmalte após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).....	91

Figura 35 - Endentação na superfície do esmalte humano hígido. Observa-se superfície lisa e o tamanho da endentação (aumento de 40X).....	92
Figura 36 - Endentação na superfície do esmalte humano após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	92
Figura 37 - Endentação na superfície do esmalte humano após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	92
Figura 38 - Superfície dentina humana antes do processo erosivo (aumento 40 X).....	93
Figura 39 - Superfície da dentina humana após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X).....	93
Figura 40 - Superfície da dentina humana após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).....	93
Figura 41 - Endentação na superfície da dentina humana hígida. Observa-se superfície lisa e o tamanho da endentação (aumento de 40X).....	94
Figura 42 - Endentação na superfície da dentina humana após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	94
Figura 43 - Endentação na superfície da dentina humana após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).....	94

Lista de Tabelas

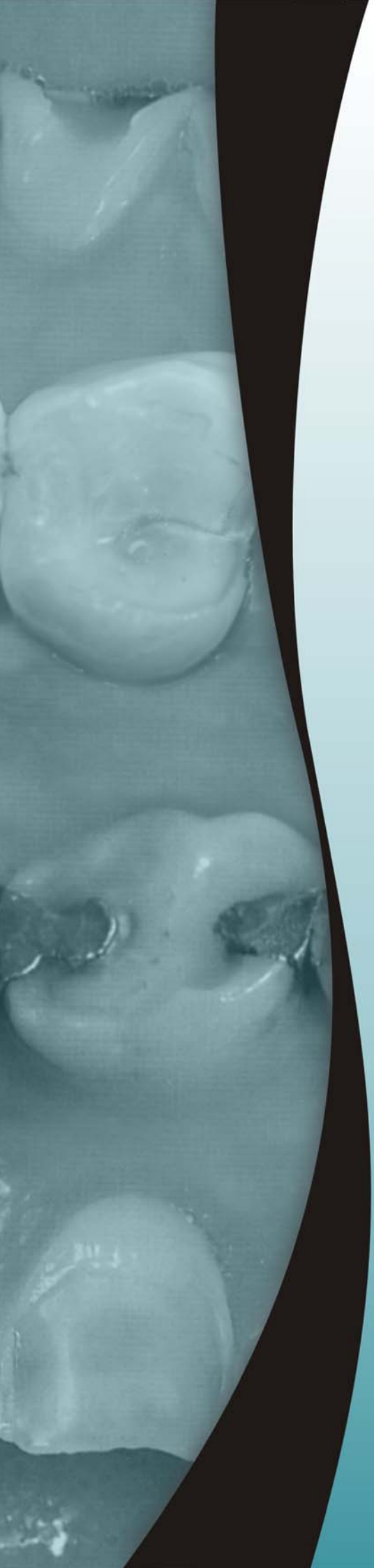
Tabela 1 -	Quantidade média (\pm DP) de fosfato liberado (μ g) do pó de esmalte exposto à Sprite Zero®, contendo ou não carbonato, em função da presença de ferro previamente incubado com o pó de esmalte ou adicionado diretamente à bebida.....	86
Tabela 2 -	Quantidade média de fosfato (μ g) liberado para o meio (\pm DP) e dados normalizados a partir do pó de esmalte dissolvido, em função do aumento da concentração de ferro adicionado à Coca-Cola®.....	87
Tabela 3 -	Quantidade média de fosfato (μ g) liberado para o meio (\pm DP) e dados normalizados a partir do pó de esmalte dissolvido, em função do aumento da concentração de ferro adicionado à Sprite Zero®.....	88
Tabela 4 -	Desgaste e porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) no esmalte e na dentina após erosão pela Coca-Cola®, adicionando ou não ferro a 10 mmol/L à bebida.....	94

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ANOVA	análise de variância
Ca	elemento cálcio, cálcio
Ca ⁺²	íon cálcio
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CaF ₂ -like	fluoreto de cálcio-like (sal de estrutura semelhante ao fluoreto de cálcio)
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	Nitrato de cálcio mono-hidratado
CuSO ₄	sulfato de cobre
dd	dente decíduo
DP	desvio padrão
EP	erro padrão
et al.	e colaboradores
FeSO ₄	sulfato de ferro
FeSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de ferro hepta-hidratado
F	elemento flúor, fúor
F ⁻	íon fluoreto
Fe ²⁺	íon ferro II
Fe ³⁺	íon ferro III
g	grama
h	hora
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	TRIS
<i>in situ</i>	(latim) – em sítio, no local (no caso, a cavidade bucal)
<i>in vitro</i>	(latim) – em laboratório
<i>in vivo</i>	(latim) – no ser humano
<i>in press</i>	(inglês) – em impressão

KCl	cloreto de potássio
KHN	Knoop hardness number (número de dureza Knoop)
KHz	quilo hertz
L	litro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mol/L	mol por litro
mmol/L	milimol por litro
NaF	fluoreto de sódio
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	fosfato de sódio dibásico di-hidratado
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
n	tamanho da amostra
NaOH	hidróxido de sódio
NaF	fluoreto de sódio
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	fosfato de sódio monobásico di-hidratado
nm	nanometro
P	elemento fósforo, fósforo
p	nível de significância
pH	potencial hidrogeniônico
pKa	pH onde 50% do ácido encontra-se na forma dissociada e 50% na forma não dissociada
ppm	partes por milhão
r	coeficiente de correlação
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SnF ₂	fluoreto de estanho

TWI	tooth wear index (índice de desgaste dentário)
μm	micrometro
°C	graus Celsius
®	marca registrada
%	por cento
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
±	mais ou menos
=	igual
%PDS	porcentagem de perda de dureza superficial



Resumo

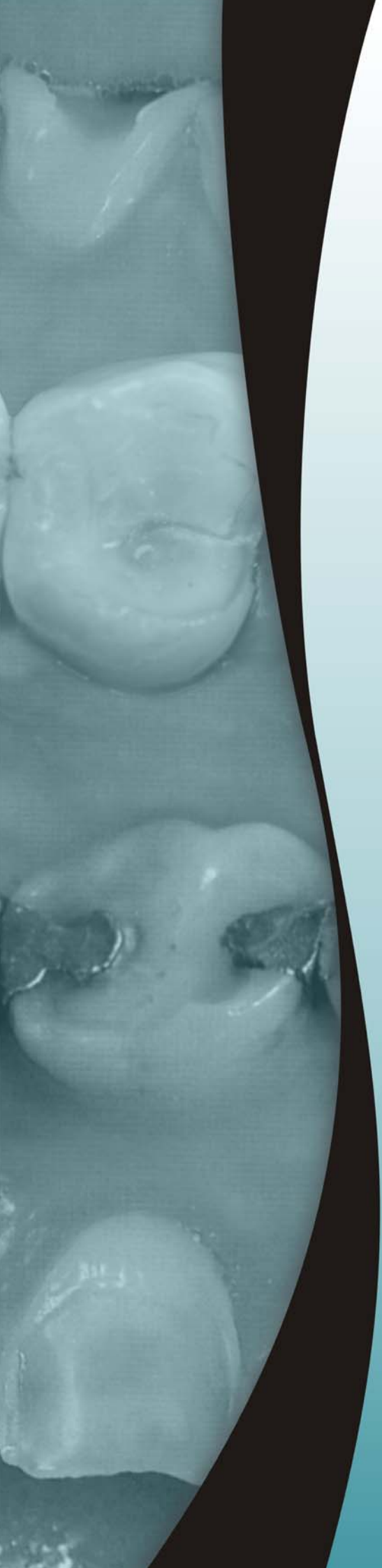
Resumo

Avaliação *in vitro* e *in situ* do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do íon ferro na inibição da erosão de dentes bovino e humano provocada por bebidas ácidas, em estudos *in vitro* e *in situ*. O estudo foi realizado em três etapas. No 1º subprojeto, foi avaliado, *in vitro*, o efeito de concentrações crescentes de ferro na dissolução do pó de esmalte bovino, quando adicionado à Coca-Cola® e à Sprite Zero®. A concentração de ferro, para a qual foi observada inibição de perda de fósforo, foi utilizada nos experimentos seguintes. Para se determinar a quantidade de esmalte dissolvido foi analisado o fósforo por método colorimétrico. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). No 2º subprojeto (*in vitro*), blocos de esmalte bovino foram expostos a 4 ciclos de desmineralização em Coca-Cola®, contendo ou não 10 mmol/L de ferro (experimental e controle, respectivamente). Cada ciclo de desmineralização foi seguido por um ciclo de remineralização em saliva artificial. O 3º subprojeto foi constituído por um estudo *in situ*, cruzado, no qual 10 voluntários utilizaram dispositivos palatinos, contendo 2 blocos de esmalte e 2 de dentina humanos durante 2 fases de 5 dias cada. A diferença entre estas fases foi a adição ou não de ferro a 10 mmol/L ao refrigerante tipo cola, antes da imersão do dispositivo na mesma. Os voluntários imergiram os dispositivos por 5 minutos em 150 mL de Coca-Cola®, contendo ou não ferro, 4 vezes ao dia. O efeito do ferro na inibição da erosão, tanto do 2º como do 3º subprojetos, foi avaliado pela %PDS e análise de desgaste. Os dados foram analisados usando teste *t* ($p < 0,05$). Resultados: Subprojeto 1- quando ferro a 30 e 60 mmol/L foi adicionado à Coca-Cola®, uma redução na dissolução do pó de esmalte foi observada quando comparado ao controle (11 e 17%, respectivamente), enquanto concentrações menores não tiveram nenhum efeito. Com relação à Sprite Zero®, concentrações de ferro acima de 10 mmol/L não tiveram efeito significativo, enquanto concentrações maiores aumentaram significativamente a dissolução do pó de esmalte.

Subprojeto 2- O ferro a 10 mmol/L reduziu significativamente o desgaste, mas aumentou significativamente a %PDS dos blocos de esmalte submetidos à erosão *in vitro* pela Coca-Cola®. Subprojeto 3- Para o esmalte, houve uma redução significativa no desgaste e uma redução não significativa na %PDS, quando o ferro foi utilizado foi diminuída, embora não significativamente. Para a dentina, houve redução significativa no desgaste e aumento significativo na %PDS quando da utilização do ferro. Assim, concluiu-se que o íon ferro pode reduzir a erosão de dentes bovino e humano provocada por bebidas ácidas, sendo esta ação dependente do tipo de ácido presente na bebida.

Palavras-chave: Erosão de dente. Desmineralização. Ferro. Esmalte dentário. Dentina.



Introdução

1 Introdução

Com o decréscimo da prevalência de cárie a partir dos anos 60, a preocupação com a perda dos dentes tem-se voltado para outras causas (FUSHIDA; CURY³⁸, 1999), como o desgaste dentário (ATTIN; ZIRKEL; HELLWIG¹⁴, 1998), sendo a erosão dentária o fator que mais tem sido documentado (MOSS⁹⁹, 1998; SMITH; KNIGHT¹²¹, 1984).

O termo erosão é derivado do latim *erodere*, *erosi*, *erosum*, e designa a destruição da superfície de alguma matéria, usualmente por processos químicos ou eletrolíticos. O termo clínico “erosão dentária” é usado para descrever uma lesão crônica, localizada, caracterizada pela perda de tecido duro por ataque químico ou dissolução da superfície dentária, sem o envolvimento de bactérias. A erosão deve ser diferenciada de outras lesões, tais como abrasão, atrição e abfração (MISTRY; GRENBY⁹⁸, 1993; IMFELD⁶⁵, 1996; TEN CATE; IMFELD¹²⁹, 1996), bem como da cárie dentária, por não haver envolvimento bacteriano na perda do tecido dentário, sendo que dificilmente estes fenômenos ocorrem, simultaneamente, no mesmo sítio (NUNN¹⁰², 1996; IMFELD¹²⁹, 1996; TEN CATE; IMFELD¹²⁹, 1996; MOSS⁹⁹, 1998).

A erosão dentária poderia ser classificada, levando-se em consideração sua etiologia, em extrínseca ou intrínseca (LUSSI⁷⁹, 1996; IMFELD⁶⁵, 1996; TEN CATE; IMFELD¹²⁹, 1996; LINNETT; SEOW⁷⁷, 2001). A erosão extrínseca seria o resultado do efeito de ácidos exógenos, provenientes, por exemplo, dos ácidos contidos nos produtos de higiene bucal, bem como nas formulações medicamentosas, de baixo pH. Tranqüilizantes, anti-histamínicos e anti-eméticos poderiam levar à redução da secreção ou da capacidade tampão da saliva (LUSSI⁷⁹, 1996). Além disso, uma correlação entre desgaste dentário e medicamentos para dor de cabeça foi sustentada por McCracken; O'NEAL⁸⁷, 2000.

A erosão extrínseca poderia ser também derivada do ambiente de trabalho, pelo contato com ácidos industriais ou ácidos presentes na água das piscinas. Outras ocupações profissionais acarretariam à exposição persistente

do indivíduo ao ácido, tais como: pintores, provadores de alimentos ácidos ou vinhos e trabalhadores em fábricas de fertilizantes (IMFELD⁶⁵, 1996; ZERO¹⁴², 1996). O principal fator etiológico extrínseco da erosão dentária seria derivado de ácidos provenientes da dieta, segundo AINE; BAER; MAKI¹, 1993; IMFELD⁶⁵, 1996 e ZERO¹⁴², 1996. A maioria dos alimentos e bebidas de baixo pH (aproximadamente abaixo de 4,5) apresentaria potencial para causar a erosão dentária. Contudo, a concentração de ácido total seria considerada mais importante que o pH, por determinar a quantidade de íons hidrogênio disponíveis para interagir com o esmalte dentário (ZERO¹⁴², 1996). Outros autores, tais como LUSSI; JAEGGI; SCHARER⁸¹, 1993; GUDMUNDSSON et al.⁴⁶, 1995; LUSSI, 1996; ZERO¹⁴², 1996 e LINNETT; SEOW⁷⁷, 2001, também sustentam a afirmação de que o potencial erosivo das bebidas ácidas não estaria exclusivamente dependente do valor do pH, mas seria fortemente influenciado pela concentração de ácido total, pelas propriedades quelantes do ácido, frequência e duração da ingestão e presença de substâncias quelantes de cálcio, tais como o citrato.

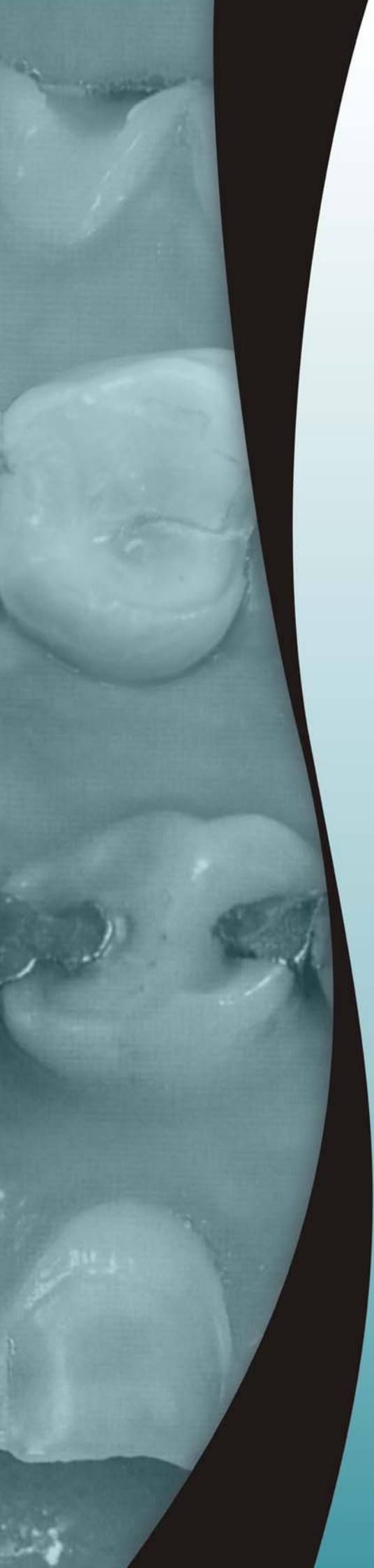
LUSSI; JAEGGI; ZERO⁸², 2004, afirmam que o processo erosivo pode ser dividido em dois estágios. Um inicial, com o amolecimento da superfície envolvida, a qual é parcialmente desmineralizada. Neste estágio do processo, a remineralização é teoricamente possível, com a manutenção do tecido, podendo atuar como um suporte. E em segundo lugar, em estágio mais avançado, o mineral mais externo ao esmalte é totalmente perdido e não existe possibilidade de reparo. Enquanto permanecer a camada amolecida de esmalte mais abaixo da perda de tecido duro, esta poderá ser remineralizada.

A erosão intrínseca seria o resultado da ação de ácidos endógenos provenientes do refluxo gástrico, regurgitação crônica, alcoolismo, gravidez ou distúrbios provenientes do sistema nervoso, tais como anorexia e/ou bulimia (IMFELD⁶⁵, 1996). A erosão dentária de origem intrínseca, segundo SCHEUTZEL¹¹⁷, 1996; MEURMAN; TEN CATE⁹¹, 1996, seria decorrente da atuação crônica do ácido gástrico sobre a superfície dentária por um longo período e de forma regular.

No que se refere à presença de ácidos na cavidade oral, GUDMUNDSSON et al.⁴⁶, 1995, ROBB; SMITH; GEIDRYS-LEEPER¹¹², 1995, afirmaram que a mera presença de ácidos não seria suficiente para causar a erosão dentária, estando essa dependente de variáveis, tais como o fluxo e a capacidade tampão da saliva. A ocorrência da erosão dentária, segundo MOSS⁹⁹, 1998, estaria relacionada à suscetibilidade do indivíduo, sendo assim, variável de pessoa para pessoa. A erosão dentária seria, também, influenciada pela formação da película adquirida derivada de mucinas salivares (IMFELD⁶⁵, 1996).

O consumo excessivo de bebidas e outros produtos de baixo pH vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, em função de novos hábitos dietéticos e estilo de vida da população em geral (JARVINEN; RYTOMAA; HEINONEN⁶⁷, 1991). No Brasil, especificamente, o consumo de refrigerantes aumentou em 490% de 1995 a 2003 (IBGE⁶³, 2004). O baixo pH, o tipo de ácido e outros produtos químicos presentes nas bebidas são fatores que contribuem para a dissolução dos tecidos dentários duros. Assim, a modificação na formulação dos produtos seria uma opção para a prevenção da erosão dentária. Entretanto, não tem sido totalmente explorada, pois poderia modificar o sabor dos alimentos e o pH. A adição de flúor, para aumento da resistência da dentição, exige um controle e monitoramento mais acurado, pelo risco de sobreconsumo, podendo levar à fluorose dentária (GRENBY⁴⁵, 1996). LARSEN⁷³, 2001, relatou que as bebidas ácidas seriam capazes de dissolver, consideravelmente, o flúor adicionado em suas formulações, tornando limitado o seu efeito preventivo sobre a erosão do esmalte. A manipulação do nível de ácido nos produtos, na tentativa de enfraquecimento do seu potencial erosivo, seria uma outra opção, mas poderia acarretar mudança no sabor ou redução da validade do produto, pelas propriedades preservativas dos ácidos. Outra tentativa seria a de incluir avisos mais incisivos nos rótulos dos produtos, promovendo a conscientização dos consumidores a respeito do potencial erosivo dos produtos (GRENBY⁴⁵, 1996).

Estudos têm sugerido que íons metálicos, especialmente o ferro, possuem propriedades anticariogênicas. BROOKES et al.²¹, 2004, utilizaram o FeSO₄ a 10 mmol/L e observaram que este composto inibiu em 51% a dissolução da hidroxiapatita sintética e uma solução a 1,24 mmol/L apresentou uma inibição de 10%. BUZALAF et al.²⁷, 2006, relataram uma inibição na desmineralização do pó de esmalte bovino de 50% para concentrações de FeSO₄ de 15 mmol/L, sendo que concentrações acima disso não tiveram diferença significativa. Neste sentido, a adição de ferro a bebidas carbonatadas poderia ser um importante coadjuvante na redução do seu potencial erosivo.



*Revisão de
Literatura*

2 Revisão de Literatura

Esta revisão da literatura irá abordar os seguintes itens:

- 2.1 Definição e etiologia da erosão dentária
- 2.2 Estudos de prevalência da erosão dentária
- 2.3 Efeito erosivo de bebidas sobre a superfície dentária
- 2.4 Estudos *in vitro* da erosão dentária
- 2.5 Estudos *in situ* da erosão dentária
- 2.6 Ação da saliva e da película adquirida
- 2.7 Métodos preventivos da erosão dentária
- 2.8 Veículos preventivos da erosão dentária
 - 2.8.1 Dentifrícios
 - 2.8.2 Gel
 - 2.8.3 Vernizes
- 2.9 Efeito de íons metálicos na desmineralização

2.1 Definição e etiologia da erosão dentária

Erosão dentária é definida como a perda de substância dentária causada por processos químicos não envolvendo bactérias, sendo provocada por uma variedade de fatores extrínsecos ou intrínsecos, segundo WIEGAND; ATTIN¹⁴⁰, 2003.

Após a Segunda Guerra Mundial, o consumo de refrigerantes e refrescos artificiais industrializados cresceu rapidamente, atingindo, nos dias atuais, quase todos os países do mundo. Estes hábitos dietéticos, bem como, a ingestão excessiva de sucos e frutas cítricas são apontados como as principais causas do aparecimento de lesões de erosão isoladas ou integrantes de uma síndrome conhecida como perimólise (GRANDO et al.⁴², 1995). No Brasil, especificamente, o consumo de refrigerantes aumentou em 490% de 1995 a 2003 (IBGE⁶³, 2004).

Outros autores também definem a erosão como a perda de tecido duro dentário, resultante primariamente de ataque químico não bacteriano, geralmente envolvendo substâncias ácidas (TEN CATE; IMFELD¹²⁹, 1996; IMFELD⁶⁵, 1996). Esse ataque ácido promove perda da superfície e amolecimento da sub-superfície do esmalte, promovendo diminuição na resistência ao desgaste da mesma, tornando-a mais susceptível aos efeitos da atrição e da abrasão mecânica, como ocorre durante a escovação dentária (DAVIS; WINTER²⁸, 1980; ATTIN et al.¹¹, 2001; RIOS et al.¹¹⁰, 2006).

A erosão é um fenômeno multifatorial e pode ser iniciado por fatores intrínsecos (vômitos, regurgitação e refluxos recorrentes), extrínsecos (resultantes da ação de ácidos exógenos, como os contidos em bebidas ácidas, da exposição a contaminantes ácidos do meio ambiente) ou ainda idiopáticos, quando não se conhece a origem do ácido. (FUSHIDA; CURY³⁸, 1999; MAIA; MODESTO⁸⁵, 1996; SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL¹¹⁹, 2005).

MEURMAN; FRANK⁸⁹, 1991, mostraram que ácidos erosivos podem expor estruturas internas de dentina, devido ao alargamento dos túbulos dentinários, podendo haver sintomatologia dolorosa em dentes afetados pela erosão. A desmineralização da dentina, em um primeiro momento, mostra na interface entre dentina inter e peritubular, um esvaziamento e afunilamento dos túbulos. Os túbulos dentinários tornam-se significativamente alargados, o que explica a sensibilidade maior a estímulos externos. Por outro lado, a dentina peritubular é completamente dissolvida e mostra uma estrutura mais porosa (WIEGAND; ATTIN¹⁴⁰, 2003).

2.2 Estudos de prevalência da erosão dentária

A realização de estudos de prevalência e incidência é fundamental para que se possam relacionar as evidências epidemiológicas, uma vez que identificam a presença da lesão em uma amostra capaz de representar uma população (NUNN¹⁰², 1996). Sendo assim, estudos têm sido conduzidos, demonstrando a porcentagem individual afetada pela erosão ou sua prevalência entre vários grupos etários (LUSSI et al.⁸³, 1991; BARTLETT et

al.¹⁷, 1998; MILLWARD et al.⁹⁷, 1994).

Alguns desses estudos são de grande relevância, por identificarem uma amostra representativa da população (NUNN¹⁰², 1996). Porém, torna-se difícil fazer comparações entre eles, devido à utilização de índices diferentes utilizados para os exames (LUSSI et al.⁸³, 1991; MILLWARD et al.⁹⁷, 1994; BARTLETT et al.¹⁷, 1998; DEERY et al.³⁰, 2000; AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH^{2 e 3}, 2001; OGINNI; OLUSILE¹⁰⁵, 2002; HARDING et al.⁵², 2003). Além disso, mensurar o desgaste dentário é muito difícil, sendo que algum desgaste pode ocorrer ao longo da vida, e não há um índice aceito universalmente. SMITH; KNIGHT¹²¹, 1984, idealizaram um índice de desgaste dentário (tooth wear index-TWI), o qual propõem a mensurar os níveis de desgastes individuais e coletivos.

MOSS⁹⁹, 1998; NUNN¹⁰², 1996, e IMFELD⁶⁵, 1996, afirmaram que não há um estudo epidemiológico representativo da prevalência da erosão, talvez pela dificuldade de diagnóstico. Conseqüentemente, faltam trabalhos esclarecedores em seres humanos, correlacionando prevalência com outros fatores causais da erosão, a fim de esclarecer sua complexa etiologia (MOSS⁹⁹, 1998).

LUSSI et al.⁸³, 1991, avaliaram desgaste dentário em 391 indivíduos selecionados de forma aleatória, com idade entre 26 a 30 anos e 45 a 50 anos. A pesquisa mensurou a prevalência e a severidade, sendo que para 26-30 anos o percentual de dentes afetados foi de 30% e para 45-50 anos, 42,6%.

BARDSLEY et al.¹⁶, 2005, investigaram a prevalência de erosão dentária em 2351 crianças de 14 anos do nordeste do Reino Unido e a influência da fluoretação das águas nesta prevalência. 637 (27%) viviam em cidades contendo flúor na água de abastecimento e 1714 (73%) em locais com água fluoretada na água. 53% das crianças tinham dentina exposta, sendo os meninos significativamente mais afetados que as meninas ($p < 0,001$). Nos distritos fluoretados, poucas crianças tinham dentina exposta na superfície vestibular e palatina. A interação da fluoretação e dentes escovados duas vezes por dia resultou em uma redução significativa da erosão (30%). Os

autores concluíram que as crianças residentes em cidades não fluoretadas possuem 1,5 mais chance de ter desgaste dentário comparado com crianças residentes em cidades fluoretadas.

AMIN; AL-OMOUSH; HATTAB⁷, 2001, fizeram um estudo, no qual compararam a presença e a localização da erosão em operários de fábricas de baterias e jazidas de fosfato. Os trabalhadores estavam continuamente expostos a gases como resultado do meio de trabalho. Desta maneira, grande parte dessa amostra foi identificada com erosão na face vestibular dos dentes anteriores superiores. Com isso, pode-se perceber que a erosão também pode estar também associada com a repetição de exposição a meios que abaixam o pH bucal.

Os usuários de drogas têm sido reportados como pacientes com desgastes e erosão dentária. Isso porque a droga aumenta a demanda de trifosfato de adenosina; como resultado, quem usa estas drogas tende a consumir mais carboidratos e bebidas carbonatadas (boca seca). Esta combinação de sintomas e hábitos promove erosão, atrição e cáries. (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL¹¹⁹, 2005).

Alguns pacientes apresentam o “refluxo silencioso” e a erosão pode ser o primeiro sinal desta doença. No caso do refluxo gastroesofágico, é observado freqüentemente erosão na face lingual dos dentes posteriores e anteriores superiores (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL¹¹⁹, 2005).

No caso de pacientes que sofrem de bulimia nervosa, 90% deles vão apresentar erosão dentária. Os sinais podem aparecer na dentição desses pacientes em poucos meses, devido à destruição causada pelo suco gástrico. A aparência clínica mais comum é a erosão severa na face lingual dos dentes anteriores superiores. A superfície oclusal também pode aparecer com facetas de desgastes e altamente polida, num processo de combinação de desgaste químico e mecânico. Geralmente, o ácido gástrico não afeta os dentes inferiores, porque estes são protegidos pela língua (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL¹¹⁹, 2005).

PERES et al.¹⁰⁸, 2005, fizeram um estudo em 499 crianças de 12 anos, em Joacaba, no Brasil, e compararam a prevalência entre meninos e meninas de escolas públicas e particulares. Houve prevalência de 13% de erosão dentária, não sendo significativa a diferença entre os meninos e meninas, porém a erosão foi significativamente mais alta nas crianças da escola privada. A superfície vestibular foi menos afetada que a superfície palatina. A perda de esmalte foi o mais prevalente tipo de erosão dentária (4,86 de 100 incisivos). 63% dos dentes afetados apresentaram mais que a metade de sua superfície afetada. Os autores concluíram que a pequena cidade em que foi feito o estudo parece apresentar prevalência menor de erosão do que outros estudos epidemiológicos de outras partes do mundo.

RIOS et al.¹¹¹, 2007, avaliou a prevalência e fatores etiológicos envolvidos com o desgaste de dentes decíduos. Uma amostra de 356 crianças (6 anos de idade) foi selecionada em Bauru, SP (Brasil). O exame clínico foi realizado por 1 examinador (Kappa=0,87), usando o Índice de Smith-Knight¹²¹ (0-4). Um questionário dirigido aos fatores etiológicos de desgaste dentário foi aplicado aos pais. O desgaste nos incisivos foi diagnosticado em 34,8% das crianças (91,1% G1 e 6,4% G2); 78,1% apresentou desgaste nos caninos (64,7% G1 e 33,1% G2); e 40,7% em molares (89,6% G1 e 9% G2). Nenhuma correlação significativa foi observada entre refluxo gastroesofágico, hábitos de escovação ou consumo de bebidas/refrigerantes de frutas cítricas e a presença de desgaste dentário para todos os grupos de dentes. O desgaste mostrou correlação com a presença de bruxismo para os caninos e com o hábito de segurar a bebida na boca antes de engolir para os incisivos (teste do qui-quadrado, $p < 0,05$). Os resultados indicam que o desgaste dos incisivos podem ser considerados fisiológicos para esta idade. Os autores sugeriam que estudos longitudinais adicionais deveriam ser conduzidos, a fim de mensurar o desgaste em caninos e molares no período próximo à substituição pelos dentes permanentes.

2.3 Efeito erosivo de bebidas sobre a superfície dentária

A ação de bebidas erosivas na superfície dentária foi investigada por MEURMAN; FRANK⁸⁹, 1991, bem como sua extensão nos tecidos dentários. Os autores demonstraram que os ácidos erosivos podem expor estruturas internas de dentina com o alargamento significativo dos túbulos dentinários, o que poderia explicar a sensibilidade dolorosa dos dentes afetados pela erosão. As lesões erosivas mostram um padrão, no qual é detectável uma camada subjacente amolecida observada em muitos estágios precoces de lesão de cárie incipiente (DAVIS; WINTER²⁸, 1980; ATTIN et al.¹¹, 2001; RIOS et al.¹¹⁰, 2006).

Muitas pesquisas têm objetivado investigar a erosão dentária e descobrir qual o efeito das bebidas ácidas sobre o dente, em quais condições isto ocorre e se a saliva tem influência no processo (SMITH; SHAW¹²⁰, 1987; WEST et al.¹³⁷, 1999; WEST; HUGHES; ADDY¹³⁶, 2001). As bebidas mais testadas são sucos, refrigerantes, chás e bebidas esportivas (isotônicos).

GRANDO et al.⁴³, 1996, analisaram a erosão em dentes decíduos extraídos, causada pelo consumo de refrigerantes, sob valores de pH de 2,5, 2,6 e 3,3, em um estudo *in vitro*. Foi feita análise por microscopia eletrônica. Diferentes padrões de perda da estrutura dentária causada pelos refrigerantes, bem como alterações de cor foram observados, levando os autores à conclusão do potencial erosivo destas bebidas sobre a dentição decídua.

A capacidade erosiva dessas bebidas foi analisada por meio da mensuração do pH, capacidade tampão, tipo de ácido, dissociação iônica do ácido e concentração de cálcio, fósforo e flúor presentes (LUSSI; JAEGGI; SCHARER⁸¹, 1993). O pH dessas bebidas varia entre 2,16 e 3,73, isto é, abaixo do pH crítico para a fluorapatita e a hidroxiapatita (DUARTE; COELHO; LESSA³³, 1999; SOBRAL et al.¹²², 2000; BRUNTON, HUSSAIN²³, 2001; BURATTO et al.²⁶, 2002;).

Diferentes autores afirmaram que a erosão dentária associada ao consumo de bebidas, provavelmente resulta da combinação dos ácidos contidos nas formulações. O valor do pH é uma importante variável nas

formulações, mas não é necessariamente o único fator. Baseados nisso, HUGHES et al.⁵⁹, 2000, imergiram durante 10 minutos, 5 espécimes de esmalte humano em cada uma das seguintes soluções: ácido láctico, cítrico ou maleico em diferentes concentrações e pH, e mediram o desgaste pelo perfil. Os resultados demonstraram que tanto o pH, quanto a concentração ácida são relevantes para ocorrência da erosão, quanto menor o pH e maior a concentração ácida, maior foi a erosão produzida. O ácido láctico em baixos valores de pH foi o mais erosivo e o maleico foi o menos erosivo em altos valores de pH. Os autores ainda aumentaram o tempo de imersão para 30 minutos e compararam a ação de soluções de ácido cítrico, clorídrico ou fosfórico. O ácido fosfórico, com valor de pH semelhante ao dos outros ácidos, produziu menor erosão. Sugeriu-se então, que as bebidas tipo cola, que normalmente contém 0,1% de ácido fosfórico, podem ser menos erosivas do que as bebidas à base de ácido cítrico. Além disso, as soluções de ácido cítrico apresentam maior capacidade tampão, o que potencialmente aumenta a taxa de erosão em relação às bebidas de cola (WEST; HUGHES; ADDY¹³⁶, 2001).

LUSSI; JAEGGI; ZERO⁸², 2004, relacionaram o papel das bebidas e alimentos ácidos para o desenvolvimento da erosão dentária e possíveis fatores correlacionados para essa ocorrência. Os fatores foram divididos em químicos, comportamentais e biológicos. Fatores químicos: pH e capacidade tampão dos produtos, tipo de ácido (valores de pKa), adesividade dos produtos à superfície dentária, propriedades quelantes dos produtos, concentração de cálcio, fosfato e flúor. Fatores comportamentais: hábitos alimentares, estilo de vida saudável (dietas ricas em frutas ácidas e vegetais), consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas, hábito de amamentação noturna com bebidas ácidas, práticas de higiene bucal. Fatores biológicos: saliva (fluxo salivar, capacidade tampão, composição), película adquirida (propriedade de difusão e sua espessura), composição e estrutura dentária (conteúdo de flúor nas partículas de fluoridroxiapatita ou CaF_2 – like), anatomia dos tecidos moles em relação ao dente e movimentos fisiológicos dos tecidos moles.

O efeito *in vitro* de bebidas esportivas (isotônicos) na dissolução da hidroxiapatita (esmalte) foi avaliado por MEURMAN et al.⁹⁰, 1990. O estudo foi conduzido em 2 etapas. Na primeira etapa, 13 bebidas comerciais e 2

experimentais (ácido maleico e ácido cítrico) foram avaliadas. Adicionaram-se 5 mg de hidroxiapatita para cada bebida em tubos plásticos. Os tubos foram agitados em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados e a concentração de cálcio foi mensurada por espectrometria de absorção atômica. Na segunda, três bebidas experimentais (1, 2 e 3) foram testadas, tendo a água como controle negativo e Hart Sport[®] como controle positivo. Foram utilizados blocos de esmalte bovino, os quais foram imersos em 50 mL das bebidas por 5, 30 e 120 minutos, sob agitação. Para análise quantitativa, utilizaram-se o perfilômetro e o microdurômetro; para análise qualitativa, o microscópio eletrônico de varredura. O resultado da primeira etapa mostrou que a quantidade de cálcio liberado nas bebidas com ácido maleico foi menor que as com ácido cítrico. Em relação à segunda etapa do experimento, as bebidas 1 (ácido maleico), 3 (sem ácido) e 5 (água) não causaram erosão significativa, apenas a bebida 1 mostrou amolecimento do esmalte aos 30 e 120 minutos, quando comparada ao controle; já na bebida 2 (ácido cítrico), erosão foi detectada em 120 minutos. A bebida que causou maior perda de estrutura dentária foi a Hart Sport[®] (bebida 4). Os autores afirmaram que o tempo de imersão e o tipo de bebida têm efeitos significativos na erosão do esmalte, e que as bebidas preparadas são menos erosivas que as comerciais.

A partir de um modelo *in vitro* (LUSSI; JAEGGI; JAEGGI-SCHARER⁸⁰, 1995) avaliaram-se blocos de esmalte humano, os quais foram imersos em 14 bebidas durante 20 minutos. As bebidas testadas foram suco de maçã, Schweppes[®], Orangina[®] (refrigerante), suco de uva, Isostar Laranja[®] (refrigerante), Rivella[®] (refrigerante), Sinalco[®] (refrigerante), Citrus Light Api[®] (refrigerante), Sprite[®], Fanta Laranja[®], Veltliner[®] (vinho), suco de laranja, Fendant[®] (vinho) e Carlsberg[®] (cerveja). A análise da erosão foi realizada por meio da perda de dureza, pela concentração de fósforo, flúor, capacidade tampão e pH das bebidas. Maior perda de dureza foi encontrada no suco de maçã, seguido pela Schweppes[®], Orangina[®] e suco de uva. Maior concentração de fósforo foi encontrada na cerveja Carlsberg[®] 97,33 mmol/L e menor na Schweppes[®] (0,002 mmol/L). A concentração de flúor variou entre 0,03 ppm (Sinalco[®]) e 0,28 ppm (Carlsberg[®]). Já o pH variou entre 2,47 (Schweppes[®]) e 4,43 (Carlsberg[®]). As bebidas que apresentaram maior

capacidade tampão foram o suco de laranja Schweppes[®], Fanta[®] e suco de maçã. Concluiu-se que as informações químicas das bebidas são de grande relevância para a análise da erosão dentária.

LARSEN; NYVAD⁷⁴, 1999, avaliaram pH, concentração de cálcio, fosfato e flúor e a capacidade tampão de 18 bebidas, comparando com a habilidade destas em dissolver esmalte humano *in vitro*. Dentre as bebidas testadas estavam a Schweppes Indian Tonic[®], Shweppes de Uva seca[®], Fanta Laranja[®], Sprite Light[®], Coca-Cola[®], Pepsi Cola[®], Seven Up[®], Suco de laranja, Suco de laranja com cálcio, Carlsberg Kurvand limão citrus[®], Carlsberg Kurvand[®], Tuborg Blue limão citrus[®], Maarum[®], Apollinaris[®] e água destilada. A habilidade em dissolver o esmalte foi avaliada por meio da imersão de 54 blocos de esmalte humano (3 X 4 mm) em 2 mL das bebidas, sob agitação, durante 24 h ou 1 semana. Após a exposição, os dentes foram seccionados e o grau de erosão foi quantificado por microrradiografia. As bebidas foram divididas em 3 tipos: a-refrigerantes, b- sucos e c- águas minerais. Os refrigerantes apresentaram menor pH, enquanto os sucos, maior capacidade tampão. Já a água teve pH igual ou acima de 5 e baixa capacidade tampão. As bebidas com pH igual ou menor que 4 tiveram um incremento no grau de erosão (houve um aumento na solubilidade da apatita). Exceto para o suco de laranja, a erosão foi inversamente proporcional ao pH. A capacidade tampão dos 2 sucos de laranja com e sem fosfato de cálcio não diferiu. Quanto maior a capacidade tampão da bebida, maior foi seu efeito erosivo. A Coca-Cola[®] apresentou 5,7 mmol/L de fosfato. O flúor foi pouco encontrado nas bebidas, com exceção da água mineral (1,8 ppm). A concentração de cálcio e fósforo presentes nos refrigerantes não foi capaz de prevenir erosão. A intensidade da erosão progrediu da água mineral para os refrigerantes, até chegar aos sucos de laranja.

2.4 Estudos *in vitro* da erosão dentária

LUSSI; JAEGGI; SCHARER⁸¹, 1993, realizaram um estudo *in vitro*, no qual blocos de esmalte humano (6 mm²) foram imersos durante 20 minutos em 5 mL das bebidas, e avaliaram a ação destas sobre a superfície dentária. No grupo 1 testaram-se suco de uva, suco de maçã, suco de laranja, Isostar Fresh[®], Coca-Cola[®] e Lactate[®] por meio de testes de microdureza e permeabilidade ao iodo. No grupo 2, Sprite Light[®], suco de fruta, vinho branco, Perform[®], iogurte e Drinking Whey[®]. Foi utilizado para análise somente o teste de microdureza. O maior grau de diminuição da microdureza foi encontrada na Sprite Light[®], seguido do suco de uva e maçã. O oposto ocorreu nos grupos do iogurte e Drinking Whey[®]. Todos os grupos apresentaram maior permeabilidade ao iodo, principalmente o suco de uva.

A ação erosiva de três bebidas sobre o esmalte decíduo foi avaliada por GRANDO et al.⁴³, 1996. Foram testados Coca-Cola[®], guaraná e suco de limão. Utilizaram-se 108 dentes decíduos que foram divididos em 3 grupos de 36 dentes, os quais foram cortados em blocos e expostos a 20 mL das bebidas em temperatura ambiente sob agitação, durante 15 minutos, 45 minutos e 12 horas. Os espécimes foram analisados por estereomicroscópio (20X) e microscopia eletrônica de varredura. A microscopia mostrou perda irregular de esmalte e alterações de cor e lisura em todos os blocos. No microscópio eletrônico de varredura, a erosão mostrou-se mais agressiva e uniforme com o maior tempo de exposição à bebida. Todas as bebidas mostraram potencial erosivo em dentes decíduos humanos, sendo o suco de limão o mais erosivo e o guaraná, o menos.

MAIA; MODESTO⁸⁵, 1996, avaliaram *in vitro*, a partir da microscopia eletrônica de varredura, 40 blocos desmineralizados (expostos a uma solução desmineralizadora durante 60 horas). Esses espécimes foram subdivididos de acordo com a bebida em que seriam imersos, em 6 blocos hígidos e 6 desmineralizados por grupo (Coca-Cola[®], suco de limão, suco de laranja), sendo que 2 blocos de cada grupo serviram de controle. Após 40 minutos de imersão, as 3 bebidas produziram alterações superficiais no esmalte, sendo o

suco de limão a bebida mais erosiva. Houve uma potencialização na perda de estrutura no grupo previamente desmineralizado.

JOHANSSON et al.⁶⁸, 2001, investigaram *in vitro*, a ação do ácido cítrico em dentes humanos. O estudo foi realizado com 40 dentes decíduos (dd – 20 expostos à água com 1 ppm de flúor e 20 expostos à água com 0,3 ppm de flúor) e 20 dentes permanentes (DP), dos quais obtiveram-se blocos de esmalte que foram polidos e avaliados em relação à microdureza superficial. Para cada grupo (dd e DP), um grupo controle foi armazenado em água nos diferentes tempos de exposição. Os blocos foram imersos em 1 mL de solução de ácido cítrico (pH 2,10), a 37 °C, durante 5 minutos, sob agitação. Em seguida, a microdureza foi mensurada. Houve uma nova imersão por 10 e 15 minutos. Ao final do experimento, realizaram-se testes de microdureza e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de imersão, maior a perda de microdureza. Não houve diferença entre dentes decíduos que foram submetidos, inicialmente, à água com 1 ppm ou 0,3 ppm de flúor. Os dentes decíduos apresentaram menor dureza em relação aos dentes permanente, tanto antes como após o experimento.

WEST; HUGHES; ADDY¹³⁶, 2001, avaliaram o potencial erosivo do ácido cítrico, em diferentes valores de pH, sobre esmalte e dentina, comparando com o ácido hidrocloreídrico e fosfórico. Foram utilizados terceiros molares, dos quais obtiveram-se 5 espécimes de esmalte e de dentina que foram expostos a soluções ácidas (ácido cítrico, ácido fosfórico e hidrocloreídrico) ajustadas com hidróxido de sódio e citrato trissódico. A dentina foi agitada em 500 mL de solução ácida durante 10 minutos e o esmalte durante 30 minutos, a 35 °C. A perda de estrutura dentária foi mensurada pelo perfilômetro. Os resultados demonstraram que o ácido cítrico causou mais erosão nos dois tipos de tecido, especialmente no esmalte, em relação ao fosfórico, devido ao seu efeito quelante e sua alta capacidade tampão. Além disso, o ácido cítrico causou maior dissolução de tecido que o ácido hidrocloreídrico. Em pH acima de 3, houve uma diminuição na erosão em todas as bebidas, exceto para o ácido cítrico.

BURATTO et al.²⁶, 2002, avaliaram o potencial erosivo de 14 bebidas isotônicas. Inicialmente, mensurou-se o pH para selecionar 2 bebidas. Foram então escolhidas as bebidas com pH mais alto (Bebida A – Sport Ade[®], sabor uva, pH 3,38) e pH mais baixo (Bebida B – Gatorade[®], sabor lemon ice, pH 2,92). Em seguida, realizou-se o estudo *in vitro*. Foram utilizados 16 molares decíduos e 10 pré-molares seccionados em blocos, totalizando 52 espécimes distribuídos dentro dos grupos A e B. A imersão nas bebidas ocorreu durante 15 minutos, sob agitação e em temperatura ambiente. Após o experimento, realizaram-se avaliação macroscópica e de microdureza de superfície. Todas as bebidas tinham pH abaixo do crítico e continham ácido cítrico. Após o experimento, os blocos apresentaram perda de brilho superficial e lisura, caracterizando uma desmineralização. A perda de dureza foi de 42,7 a 52,5% para os dentes decíduos e de 42,5 a 46,8% para os dentes permanentes. Os dentes decíduos apresentaram menor dureza, tanto para superfície controle como para a superfície teste em relação aos dentes permanentes. A bebida que apresentou menor pH foi a mais erosiva, mas sem diferença estatística com a outra bebida testada.

SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007, realizaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito erosivo de cinco refrigerantes (Coca-Cola[®], Coca-Cola Light[®], Pepsi Twist[®], Sprite Diet[®] e Guaraná[®]) sobre espécimes de esmalte bovino. Os resultados permitiram afirmar que, entre as variáveis analisadas, o pH parece ser a mais relacionada com o potencial erosivo de bebidas ácidas. Concluiu-se também que a Sprite Diet[®] apresentou maior capacidade tampão e a Coca-Cola[®] o menor pH dentre os refrigerantes analisados, embora não havia diferença significativa no potencial erosivo entre ambos os refrigerantes.

2.5 Estudos *in situ* da erosão dentária

Os modelos *in situ* buscam criar condições definidas dentro da boca e que simulem o fenômeno em estudo (ZERO¹⁴³, 1995). A situação laboratorial altamente controlada da avaliação *in vitro* a respeito do potencial erosivo de bebidas deixa a desejar, além de não considerar o poder da saliva em reverter

ou não o processo. Estes fatores dificultam a extrapolação dos resultados para a condição *in vivo* (RYTOMAA et al.¹¹⁵, 1988; MEURMAN; FRANK⁸⁹, 1991; ZERO¹⁴³, 1995).

O modelo *in situ* tem sido desenvolvido para mensurar uma variedade de fenômenos que ocorrem na boca, incluindo erosão na dentina e no esmalte causada por refrigerantes (WEST et al.¹³⁸, 1998; HUGHES et al.⁵⁷, 1999; WEST et al.¹³⁷, 1999; HUNTER et al.⁶¹, 2000).

Os primeiros estudos *in situ* relacionados à erosão foram de rápida duração e simularam apenas um ataque erosivo. GEDALIA et al.⁴¹, 1991, investigaram *in situ* o efeito remineralizador do leite bovino sobre o esmalte humano previamente erodido por bebida ácida. Os autores relataram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média de dureza inicial e a dureza final após o esmalte remineralizado pelo leite ou saliva. Concluíram que a saliva tem habilidade em remineralizar superfícies de esmalte erodido, No entanto, neste estudo a saliva foi menos eficiente do que o leite.

Tendo em vista que a determinação da ação salivar está relacionada ao seu fluxo e composição, e estas propriedades variam dentro da cavidade oral e entre indivíduos, AMAECHI; HIGHAM⁴, 2001, desenvolveram um estudo *in situ* para avaliar a capacidade de remineralização da saliva no esmalte submetido à erosão, localizado em diferentes locais da boca e em diferentes indivíduos. Os espécimes obtidos, a partir de pré-molares humanos, foram imersos por uma hora em suco de laranja, para provocar erosão. Posteriormente, em cada um dos 10 voluntários, foi fixado um espécime na palatina do incisivo lateral superior direito e outro espécime na lingual do incisivo lateral inferior direito. O grupo controle foi composto por espécimes desmineralizados que permaneceram fora da boca. Durante 28 dias, os voluntários mastigaram chiclete por 20 minutos, quatro vezes ao dia. A perda mineral e a profundidade da lesão, quantificadas, utilizando microrradiografias, foram significativamente menores para o grupo dos espécimes posicionados por palatino ($p < 0,001$) e por lingual ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle e, para o grupo controle os espécimes posicionados por lingual, quando comparado ao grupo posicionado por palatino (0,01). Os autores

observaram que na lesão de erosão havia uma cratera e uma desmineralização subsuperficial do esmalte. Concluíram que a saliva foi capaz de remineralizar a erosão inicial do esmalte e o grau de remineralização variou de acordo com o local intraoral, sendo que esta variação pode ser responsável pela diferença de susceptibilidade à erosão dentro do arco dentário.

LUSSI; JAEGGI; ZERO⁸², 2004, estudaram o pH, a capacidade tampão (pH 5,5 e 7), a concentração de cálcio, fósforo e flúor e o grau de saturação em relação à hidroxiapatita e fluorapatita de 33 diferentes bebidas, 2 alimentos e diferentes substâncias, e avaliaram seu potencial erosivo no esmalte humano. Afirmaram que há evidências que bebidas e alimentos ácidos estejam presentes no desenvolvimento da erosão por causas extrínsecas. Entretanto, o pH sozinho da substância alimentar não é preditor do potencial erosivo como outros fatores modificadores do processo erosivo. A interação entre erosão e abrasão (especialmente as práticas de higiene bucal) pode conduzir a direção da manifestação clínica dessa desordem.

ATTIN et al.⁹, 2004, realizaram um estudo *in situ* para avaliar o período de remineralização e a susceptibilidade ao amolecimento da dentina após a abrasão pela escovação. Onze voluntários utilizaram por 21 dias um dispositivo intraoral, contendo 6 espécimes de dentina (A-F). Os blocos foram desmineralizados duas vezes ao dia fora da boca, por imersão em Sprite Light[®] (pH 2,9) por 90 s. Em seguida, os espécimes foram escovados com intervalos de tempo diferentes: A (imediatamente); B-E foram recolocados na boca e aguardaram um período, sendo B (10 min), C (20 min), D (30 min) e E (60 min). O grupo F não foi escovado (controle). A análise foi realizada por perfilometria (μm). Os valores encontrados foram: A= $23,6 \pm 16,7$; B= $37,9 \pm 29,7$; C= $31,8 \pm 26,5$; D= $18,5 \pm 10,5$; E= $15,3 \pm 11,6$ e F= $12,6 \pm 6,7$. Houve diferença estatisticamente significativa, com aumento da perda de dentina para os grupos A, B e C quando comparados com o controle ($p < 0,05$). Entretanto, entre os períodos de 30 e 60 minutos não houve diferença em relação ao controle. Os autores concluíram que para proteção da dentina, a escovação deve ser postergada para 30 minutos após a ação erosiva.

RIOS et al.¹¹⁰, 2006, realizaram um estudo *in situ* para analisar o efeito erosivo de refrigerante tipo cola no esmalte dentário humano e bovino, associado a diferentes condições de abrasão (escovação imediata/Já ou mediata/1H). Durante dois períodos experimentais cruzados de 7 dias, 9 voluntários utilizaram um dispositivo palatino, contendo 12 espécimes de esmalte (6 humanos e 6 bovinos). No primeiro período, os voluntários imergiram o aparelho no refrigerante e em seguida escovaram com dentífrico fluoretado. No segundo período, repetiram os mesmos procedimentos, mas estimularam o fluxo salivar com chiclete por 30 minutos. Ao final do experimento, o valor do desgaste foi de 2,77 μm para o grupo da erosão e 3,8 μm para o grupo erosão/abrasão. Já em relação à perda de dureza de superfície, o grupo erosão apresentou 91,61% de perda e o grupo erosão/abrasão, 58,77%, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,01$). Concluiu-se que a erosão associada à abrasão proporciona um maior desgaste do esmalte. No entanto, o oposto é verdadeiro para a perda de microdureza.

HONÓRIO⁵⁴, 2006, avaliou o resultado de um ataque erosivo com a presença de biofilme dentário e o efeito da associação entre desafio erosivo e cariogênico sobre o esmalte dentário humano por meio da aferição do desgaste e da porcentagem de perda de microdureza superficial (%PDS). Durante duas fases cruzadas de 14 dias, 11 voluntários utilizaram dispositivos intrabucais palatinos, contendo espécimes de esmalte humano, os quais foram submetidos a tratamentos distintos: (GI) bebida à base de cola, (GII) bebida à base de cola com acúmulo de biofilme dentário, (GIII) bebida à base de cola mais sacarose a 20% com acúmulo de biofilme dentário, (GIV) sacarose a 20% com acúmulo de biofilme dentário. Em GI e GII, os voluntários imergiram o dispositivo palatino em 200 mL da bebida à base de cola por 5 minutos, 3 vezes ao dia. Na outra fase, uma solução de sacarose a 20% foi gotejada 8 vezes ao dia nos espécimes dos GIII e GIV, e apenas metade do dispositivo, com os espécimes correspondentes ao GIII, foi imersa na bebida como mencionado acima. A concentração de flúor no biofilme, o desgaste e a %PDS foram mensurados. Os dados foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey ($p<0,05$). Os valores médios de desgaste (μm) e %PDS foram respectivamente: GI- 4,82^A; 87,45^A;

GII- 0,14^B; 13,47^b; GIII- 0,34^B; 68,87^c; GIV- 0,41^B; 86,12^a. A bebida à base de cola com acúmulo de biofilme dentário (GII) promoveu maior concentração de flúor no biofilme. Os resultados sugerem que a presença de biofilme dentário pode diminuir o ataque ácido de uma bebida erosiva e que a associação entre desafio erosivo e cariogênico produz menores alterações no esmalte (desgaste e %PDS).

2.6 Ação da saliva e da película adquirida

A saliva tem um importante papel na neutralização dos ácidos que provocam erosão, devido à capacidade tampão, ao fluxo salivar (LUSSI; JAEGGI; ZERO⁸², 2004) e a formação da película adquirida (MOSS⁹⁹, 1998).

A saliva tem se mostrado importante no processo de minimizar o desgaste da superfície do esmalte quanto à erosão e abrasão (AMAECHI; HIGHAM⁴, 2001). A capacidade tampão, o cálcio e o fosfato contidos na saliva e depositados na película adquirida podem contribuir, reduzindo a perda de esmalte e seu amolecimento, minimizando o desgaste durante o ato de escovação (HALL et al.⁴⁷, 1999; JAEGGI; LUSSI⁶⁶, 1999; ATTIN et al.¹¹, 2001; HARA et al.⁵¹, 2003).

O papel da película adquirida vem sendo demonstrado em diversos estudos. MEURMAN; FRANK⁸⁹, 1991, utilizaram um modelo *in vitro* para investigar o efeito da película adquirida em relação à erosão dentária. Vinte blocos de esmalte bovino, com metade protegida (controle) foram imersos em uma bebida ácida à base de cola (pH=2,6) por 120 minutos. Previamente, alguns espécimes foram imersos em um *pool* de saliva humana por sete dias para formação da película adquirida. Na amostra total, metade dos espécimes se apresentaram polidos e a outra metade não, e todos foram igualmente divididos entre os grupos com e sem película adquirida. Todos os espécimes foram preparados para análise em MEV. Os espécimes sem película (controle positivo) apresentaram erosão com dissolução generalizada e distinção da margem entre área hígida e erodida. No grupo submetido à saliva, a película foi vista como uma fina camada dispersa, cobrindo parcialmente a superfície. Nos

espécimes onde a película foi removida, observou-se uma erosão maior quando comparada ao controle. O esmalte polido apresentou maior erosão em relação ao esmalte não polido. Neste estudo *in vitro* a película adquirida foi capaz de proteger o esmalte subjacente.

RYTOMAA et al.¹¹⁵, 1988, avaliaram a ação de 11 produtos ácidos em blocos de esmalte bovinos associados à remineralização pela saliva. No 1º experimento, os blocos foram imersos em 50 mL de 11 bebidas (5 blocos por bebida) a 37 °C durante 4 horas. No 2º experimento, outros blocos foram imersos em saliva durante 2 horas a 37 °C e, em seguida foram imersos em 50 mL de 5 produtos do experimento 1 (15 blocos por bebida) durante 15 minutos e posteriormente em 25 mL de saliva com e sem flúor (9 blocos na saliva sem flúor e 9 na saliva com flúor), durante 2 h, sob agitação. A ciclagem bebida/saliva foi conduzida por 1, 2, 3 ou 4 h. Dos 9 blocos, 2 foram retirados após 1, 2, 3 h e 3 blocos após 4 h. Para o experimento 1, a Coca-Cola Diet[®], a Fanta[®] e bebidas do esporte foram as mais erosivas, tanto na análise perfilométrica (desgaste) como no microscópio eletrônico de varredura. No experimento 2, o tempo de exposição à saliva minimizou o grau de erosão e não houve diferença entre os blocos tratados em saliva com ou sem flúor. Em alguns dentes a película foi observada, mas não influenciou na erosão.

FUSHIDA; CURY³⁸ realizaram um estudo, em 1999, com quatro etapas, durante as quais os voluntários utilizaram dispositivo palatino, contendo 4 blocos de esmalte e 4 de dentina e ingeriram Coca-Cola[®] de 1 a 8 vezes/ dia. A erosão provocada na superfície dos blocos e o efeito de reparação pela saliva foram avaliados por meio da análise da microdureza superficial. Os resultados mostraram que houve uma redução de dureza significativa com todas as freqüências de ingestão de Coca-Cola[®]. Por outro lado, embora a saliva tenha aumentado significativamente a dureza do esmalte, a recuperação não foi total, pois a dureza obtida foi menor e significativa em relação à dureza inicial do esmalte.

HARA et al.⁵¹, 2003, avaliaram *in situ* o efeito do tempo de exposição salivar na resistência abrasiva da dentina erodida. Cento e vinte espécimes de dentina, da raiz de dente bovino, foram aleatoriamente distribuídos em 6

grupos (A-F) e posicionados em dispositivos palatinos utilizadas por 10 voluntários, durante 4 dias. No primeiro dia não foram realizados procedimentos de erosão/abrasão, sendo o dispositivo utilizado pelos voluntários para formação da película adquirida. Nos três dias seguintes, o desafio erosivo foi realizado duas vezes ao dia, fora da boca, pela imersão do dispositivo em 50 mL de um refrigerante (Sprite Light®), por 90 segundos. Em seguida, os espécimes do grupo A foram imediatamente escovados manualmente com dentifrício fluoretado (1500 ppm F), realizando 40 movimentos de ir e vir. Os outros grupos foram escovados da mesma forma após os seguintes tempos de remineralização pela saliva: B-20 min; C-40 min; e D-60 min. Os espécimes do grupo E sofreram apenas erosão e o grupo F sofreu apenas abrasão pela escovação. O desgaste da dentina foi avaliado por um perfilômetro. Os grupos A-D não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle E, no entanto, apresentaram maior desgaste quando comparados ao grupo F. Os resultados sugeriram que a exposição à saliva por 60 minutos não reduziu o desgaste da dentina, quando submetida à escovação após erosão.

A erosão causada por ácido cítrico foi avaliada *in vitro*, por NEKRASHESVYCH; STÖSSER¹⁰⁰, 2003, utilizando diferentes métodos. Os autores estudaram ainda, o potencial protetor de uma película adquirida experimentalmente formada (24 horas *in vitro*). Foram utilizados 120 espécimes bovinos, os quais tiveram uma metade imersa em um *pool* de saliva estimulada, para formação da película adquirida. Em seguida 10 blocos com película e 10 sem película foram imersos em 5 mL de ácido cítrico a 0,1% ou 1% por 1,5 ou 10 minutos, formando 12 subgrupos. A microdureza final foi realizada e 1 mL do ácido cítrico, após a imersão dos espécimes, foi utilizado para determinar a quantidade de cálcio por meio de espectroscopia de absorção atômica. Um segundo experimento foi realizado em 20 espécimes, com e sem película adquirida, submetendo-os a 1 minuto de erosão (0,1% ou 1% de ácido cítrico). A perda da dureza foi dependente do tempo e da concentração da solução. A película adquirida inibiu significativamente a perda de microdureza, exceto após 10 minutos de imersão em 1% de ácido cítrico.

No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à liberação de cálcio, entre os espécimes com e sem película adquirida.

O'SULLIVAN; CURZON¹⁰⁴, 2000, investigaram a etiologia da erosão dentária em crianças, correlacionaram o fluxo salivar, capacidade tampão e nível de *Streptococcus mutans* e compararam estes parâmetros com os de crianças com e sem cárie. A amostra foi constituída por 106 crianças, tendo 2 grupos controles, um com cárie e outro sem cárie. A saliva estimulada e não estimulada foi coletada no período da manhã e em seguida, mediu-se o pH e capacidade tampão da mesma. Houve uma grande variação no fluxo salivar estimulado entre os indivíduos do grupo da erosão, justificada em parte pela ampla faixa etária estudada (6 a 16 anos). O pH aumentou com o incremento do fluxo, mas também se apresentou variável. Os resultados demonstraram que quando o pH salivar é menor que 6,5, o indivíduo tem 5 vezes mais chance de apresentar erosão; já quando a capacidade tampão é baixa (pH entre 4,5 e 5,5), a chance é de 2 vezes mais. Em relação aos *S. mutans*, apesar do grupo erosão ter apresentado maiores números em relação ao grupo cárie, isto foi justificado pela presença destes microrganismos na língua e não na placa dentária.

RIOS et al.¹¹⁰, 2006, realizaram avaliação *in situ* do uso de goma de mascar para diminuir o efeito da erosão, associada ou não à abrasão pela escovação. O estudo foi realizado em duas fases de 7 dias (A-sem; B- com chicletes), em que 9 voluntários utilizaram placas palatinas com 12 blocos (n=6 humanos, n=6 bovinos) distribuídos em três diferentes fileiras horizontais, contendo 4 blocos, correspondendo aos grupos: erosão por refrigerante tipo cola (ERO), erosão + abrasão imediata (JÁ) e erosão + abrasão mediata após 1 hora (1H). Em ambas as fases, 4X/dia o aparelho foi imerso na bebida (150 mL) por 5 min. Na fileira ERO nada foi feito, na fileira JÁ realizou-se a escovação imediata com dentifrício fluoretado (15 movimentos). O aparelho foi recolocado na boca, na fase A permaneceu sob a ação do fluxo salivar normal e, na fase B, os voluntários mastigaram chicletes sem sacarose por 30 min. Após 1 h da imersão, em cada fase, foi realizada a escovação mediata (1H). Foram analisados o desgaste (perfilometria) e a % de perda de dureza superficial (%PDS – microdureza superficial). A estimulação salivar pelo

chiclete propiciou % PDS e desgaste significativamente menores em relação ao fluxo salivar normal.

A saliva, além de exercer seu papel protetor, também contribui para a formação da película adquirida, que apresenta função fundamental no desenvolvimento da erosão (RIOS et al.¹¹⁰, 2006). A formação da película adquirida foi associada à concentração de uréia na saliva, sendo que quanto maior a concentração de uréia na saliva, menor a erosão (JOHANSSON et al.⁶⁸, 2002)

A proteção do dente contra a erosão pela película adquirida foi demonstrada *in vitro*, mas a hipótese que a película pode diferenciar quantitativamente o grau de erosão não foi avaliado. AMAECHI et al.⁶, 1999, realizaram um estudo para determinar a espessura da película adquirida dentro dos arcos dentários, analisar a correlação possível desta espessura à distribuição e à severidade da erosão dentro dos arcos, e confirmar o efeito protetor da película frente à erosão dentária. Quarenta blocos de esmalte foram produzidos a partir de 5 incisivos bovinos e distribuídos em cinco voluntários. Cada bloco foi dividido em 2 lados, produzindo um lado controle (protegido) e um experimental. A película formou-se nos blocos experimentais situados em 8 locais intraorais após 1 hora da exposição. Os blocos foram analisados, e a espessura da película foi medida pela microscopia confocal. As lesões erodidas do esmalte foram produzidas do lado experimental, utilizando suco de laranja puro. O grau de erosão foi quantificado pela microrradiografia. A espessura da película variou significativamente dentro dos arcos dentários e entre os indivíduos. Uma correlação inversa ($r = -0,96$, $p < 0,001$) foi observada entre o grau de erosão e a espessura da película. Diferenças significativas na erosão foram observadas entre os blocos com e sem película. Este estudo demonstrou que a espessura da película adquirida varia dentro dos arcos dentais, que pode ser responsável pelo local específico da erosão dentária, e que a película protege os dentes da erosão.

Segundo HARA et al.⁵⁰, 2006, a película adquirida previne a erosão dentária, mas o nível de proteção não é conhecido. Num estudo *in situ*, foi testada a provável proteção da película por duas horas contra diferentes

desafios erosivos pelo suco de laranja. Foi permitida ou não (controle) a formação da película nas superfícies de espécimes de esmalte e dentina, intraoralmente, por 2 horas antes do desafio erosivo de 0, 10, 20 e 30 minutos de duração. Os espécimes de esmalte com película mostraram %PDS significativamente menor, somente depois de 10 minutos de desafio erosivo. Nenhuma proteção foi encontrada para dentina. Concluíram que a aquisição de película adquirida reduziu a erosão dentária, mas este efeito foi limitado para desafios erosivos mais severos nas superfícies de esmalte.

2.7 Métodos preventivos da erosão dentária

Os métodos para prevenir a progressão da erosão dentária, propostos por IMFELD⁶⁵, 1996, incluem diminuição da frequência e severidade do contato com substâncias ácidas, tentativas em aprimorar o fluxo salivar, pela adoção de gomas de mascar sem açúcar, tentativas de enfraquecer a influência abrasiva dos produtos de higiene bucal, enxágüe com água após a ingestão de ácidos e a não escovação subsequente, para evitar o atrito mecânico sobre a superfície dentária, diagnóstico e encaminhamento médico dos pacientes com suspeita de erosão dentária decorrente de distúrbios internos gastrointestinais ou psiquiátricos, tais como bulimia e anorexia. O aumento da ingestão de leite e queijos, para diminuir o potencial erosivo dos ácidos, proposto por TEN CATE; IMFELD¹²⁹, 1996, é sustentado pelos estudos de O'SULLIVAN; CURZON¹⁰⁴, 2000, que verificaram que crianças, as quais apresentavam erosão dentária bebiam leite e água com menos frequência e consumiam bebidas ácidas, frutas e suplementos vitamínicos mais frequentemente.

BARTLETT; SMITH; WILSON¹⁸, 1994, investigaram o uso do flúor como método preventivo da erosão associada à abrasão. Os resultados permitiram concluir que os espécimes submetidos ao dentífrico com flúor apresentaram um desgaste significativamente menor do que os espécimes submetidos ao dentífrico sem flúor.

Como já foi mencionada, a idéia de que a erosão provoca uma perda superficial do esmalte e uma desmineralização subjacente, originou a hipótese de que a abrasão pela escovação poderia desgastar esta superfície alterada até provocar sua remoção. Por esse motivo, tem sido sugerida por alguns autores a postergação da escovação, após o dente ter sofrido processo erosivo.

DAVIS; WINTER²⁸, 1980, realizaram um estudo para quantificar o desgaste do esmalte e da dentina, provocado pela erosão associada à abrasão pela escovação, com água ou dentifício. Concluíram que o esmalte e a dentina foram perdidos pelo ataque ácido e ocorreu uma desmineralização da superfície restante. Quando esta superfície foi escovada, mesmo com água, provocou um desgaste, até que a zona desmineralizada fosse removida.

ATTIN et al.¹⁰, 2000, realizaram um estudo *in vitro*, com o objetivo de avaliar o período de remineralização necessário para restabelecer a resistência do esmalte contra a erosão dentária após desmineralização por refrigerante. Os blocos de esmalte de dentes bovinos foram submetidos a diferentes ciclos de des-remineralização. Foram divididos em 7 grupos, compostos por 12 espécimes, os quais sofreram 10 ciclos de erosão, sendo desmineralizados por 1 minuto em Sprite Light[®]. O grupo I não sofreu remineralização em saliva artificial e já foi escovado por 100 ciclos com dentifício sem flúor. O grupo II teve uma remineralização por 10 minutos em saliva, para depois ser escovado da mesma forma; o grupo III sofreu remineralização por 60 minutos seguido de escovação; o grupo IV foi submetido à remineralização por 240 minutos, seguido de escovação. Já o grupo V sofreu desmineralização e remineralização por 240 minutos sem escovação, o grupo VI foi submetido apenas à desmineralização e o grupo VII apenas à escovação. A menor perda de esmalte foi do grupo VII, a maior foi do grupo I e o esmalte remineralizado por 240 minutos (grupo IV) não diferiu dos grupos erosão e remineralização sem escovação (grupo V) e só erosão (grupo VI). Os autores concluíram que a resistência à abrasão do esmalte erodido aumenta com o tempo de remineralização. No entanto, após 1 hora de remineralização, o desgaste do esmalte erodido ainda estava aumentado.

RIOS et al.¹¹⁰, 2006, realizaram um estudo *in situ*, no qual avaliaram o efeito erosivo de um refrigerante (Coca-Cola®) associado ou não a diferentes condições de abrasão (escovação imediata ou mediata após 1 hora), sobre esmalte humano e bovino. Durante 7 dias, 10 voluntários utilizaram um dispositivo palatino, contendo 12 blocos de esmalte (com metade de sua superfície protegida por esmalte cosmético), aleatoriamente selecionados e distribuídos em três fileiras horizontais, cada uma com 4 blocos (2 bovinos e 2 humanos). Os voluntários imergiram os aparelhos 4x/dia em 150 mL da bebida, durante 5 minutos e em seguida escovam com dentifrício fluoretado 4 blocos de um das fileiras (JÁ) e recolocaram o aparelho. Após 1 hora escovaram mais 4 blocos de outra fileira (1H) e nada fizeram na fileira apenas submetida à erosão (ERO). A análise da alteração do esmalte foi realizada por meio de testes de microdureza superficial (cálculo da % de perda de dureza superficial - %PDS) e perfilometria (desgaste - μm). Os resultados (ANOVA e Tukey) mostraram que a %PDS foi maior para o substrato humano (Hum: 73,54% e Bov: 64,49%, $p < 0,05$) e o desgaste crescente ($p < 0,05$) para as seguintes condições: ERO (88,94%; 6,5 μm), 1h (63,26%; 15,93 μm) e JÁ (54,85%; 17,62 μm). Os resultados sugerem que o esmalte humano é mais resistente à erosão que o esmalte bovino e o desgaste causado pela erosão associada à abrasão pela escovação pode ser diminuído quando esta é postergada.

A hipótese da adição de cálcio a bebidas foi investigada por WEST et al.¹³⁷, 1999. Avaliaram-se 4 bebidas, utilizando modelos *in vitro* e *in situ*, com a finalidade de comprovar se a bebida modificada por adição de cálcio apresentava menor potencial erosivo. As bebidas avaliadas foram: suco de groselha com cálcio (480 ppm de Ca), suco de groselha (20 ppm de Ca), suco de laranja (167 ppm de Ca) e água mineral (29 ppm de Ca). Para avaliação *in situ*, 12 voluntários foram selecionados, os quais utilizaram dispositivo intraoral com espécimes de esmalte, durante o dia e consumiam, 4x/dia, 250 mL de cada bebida em diferentes etapas experimentais. Os espécimes foram removidos para análise perfilométrica depois de 3, 6, 9, 12 e 15 dias após o experimento. O teste *in vitro* foi conduzido de forma semelhante. Os resultados mostraram, para o modelo *in situ*, que o desgaste do tecido aumentou com o tempo de exposição, exceto para água (constante). A groselha foi mais erosiva

que o suco de laranja, com diferença estatística no 6º e 15º dias. Tanto o suco de groselha como o de laranja foram mais erosivos que a bebida modificada em todos os períodos. A bebida modificada diferiu da água apenas no 3º dia. No modelo *in vitro*, o desgaste foi maior que *in situ*, com exceção para água. Em relação às comparações entre bebidas, os resultados foram similares ao modelo *in situ*, com exceção para a bebida modificada, que só não diferiu da água no 3º e 6º dias. A adição de cálcio às bebidas de baixo pH, diminuiu o potencial erosivo das mesmas tanto *in vitro* como *in situ*.

HUGHES et al.⁵⁵, 2002, compararam a erosão produzida por um suco de groselha modificado com adição de cálcio (1,040 mg Ca/L) com suco de groselha padrão (950 mg Ca/L), suco de laranja (controle positivo, 120 mg Ca/L) e água (controle negativo, 9,9 mg Ca/L). Para isso, utilizaram um método *in situ* cruzado, com 4 fases e com a participação de 12 voluntários, os quais utilizaram aparelho palatino com 4 espécimes de esmalte humano permanente, sendo 3 polidos. Noventa e dois blocos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura no 2º e 5º dias e não retornaram ao aparelho, 1 bloco foi avaliado por perfilometria no 2º, 5º e 10º dias) e 1 não polido foi submetido à microscopia. O aparelho foi utilizado durante 10 dias, das 9h às 17 h, período em que os voluntários bebiam 250 mL das bebidas, 4 vezes ao dia, com 1 h de almoço. Durante o período experimental, os voluntários não podiam consumir nada, exceto água, chá e café. Após o 5º dia, no lugar dos 2 blocos removidos para a microscopia, colocou-se 1 bloco novo, o qual foi avaliado por perfilometria. Antes da análise perfilométrica, os blocos foram lavados em ultrassom por 30 segundos. Em relação ao desgaste, a diferença entre bebidas foi relevante após o 5º e o 10º dias ($p < 0,05$). Os 2 sucos de groselha mostraram menor erosão quando comparados ao controle positivo ($p < 0,05$). Apenas ao 10º dia, o suco modificado mostrou maior erosão em relação ao original ($p < 0,05$). Os 2 sucos de groselha não diferiram da água durante o período experimental. Do 5º dia ao 10º dia, o efeito erosivo do suco de laranja aumentou 3 vezes. Os resultados sugerem que o suco de groselha não causa erosão significativa. Estes achados foram contrários aos apresentados no estudo de WEST et al.¹³⁷, 1999.

2.8 Veículos preventivos da erosão dentária

2.8.1 Dentifrícios

Tem-se estudado que o dentifrício fluoretado pode diminuir o desgaste do esmalte em situações de erosão associada à abrasão, segundo BARTLETT; SMITH; WILSON¹⁸, 1994. Os resultados de seus trabalhos mostraram que os espécimes submetidos ao dentifrício com flúor apresentaram um desgaste significativamente menor do que os espécimes submetidos ao dentifrício sem flúor.

O efeito do flúor na progressão da erosão dentária em esmalte e em dentina foi avaliado por um modelo *in situ*, por GANSS et al.³⁹, 2004. No estudo, foram utilizados blocos de esmalte (n=4) e de dentina (n=6), em três tratamentos por um período de cinco dias. Os voluntários utilizaram uma placa palatina, a qual continha os espécimes. Estes eram desmineralizados fora da boca por meio do ácido cítrico (pH=2,3), 6 vezes ao dia por 5 minutos. O flúor no dentifrício (SnF₂/Olaflur, 0,14% F⁻) foi utilizado 3 vezes ao dia por 5 minutos ou dentifrício combinado com bochecho (SnF₂/Olaflur, 0,025% F⁻) por 3 vezes por 5 minutos e gel (NaF/Olaflur, 1,25% F⁻) no primeiro e terceiro dia no lugar do dentifrício (fluoretação intensiva). No grupo controle não foi realizado o uso do flúor. A perda mineral (µm) foi determinada por microradiografia. No esmalte, a perda mineral foi 40,7±15,1 µm no grupo controle, 18,3±12,4 µm após dentifrício fluoretado e 5,0±12,2 µm após fluoretação intensiva. Para dentina, estes valores foram 49,0±15,4 µm, 35,0±15,5 µm e 19,8±12,0 µm, respectivamente. Entre todos os grupos as diferenças foram estatisticamente significativas (p<0,001). Os resultados indicaram que a fluoretação intensiva é eficiente na prevenção da perda mineral em esmalte e em dentina sob condições severas de erosão.

JAEGGI; LUSI⁶⁶, 1999, estudaram diferentes períodos de espera para a realização da escovação, após exposição do esmalte à erosão. Os espécimes obtidos a partir de dentes humanos foram imersos *in vitro* em 20 mL de ácido cítrico, por 3 minutos. Posteriormente foram fixados em uma placa lingual, utilizada durante 0 (escovação imediata), 30 e 60 minutos pelos 7 voluntários. Após estes períodos, os voluntários escovaram os espécimes por

30 segundos com dentifrício, utilizando suas técnicas rotineiras. Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$). Desta forma, foi indicada a postergação da escovação por uma hora, após a ingestão de alimentos ou bebidas ácidas.

MAGALHÃES et al.⁸⁴, 2007, avaliaram o efeito do dentifrício fluoretado no esmalte erodido submetido à abrasão por escovação. Num estudo *in situ* cruzado de 2 fases, 10 voluntários utilizaram dispositivo palatino, contendo 3 blocos de esmalte humano. Dentifrício foi usado para escovação dos dentes dos voluntários e dos espécimes. Nas fases A e B, o dentifrício utilizado tinha a mesma formulação, exceto pela ausência e presença de flúor, respectivamente. Os blocos foram submetidos à erosão pela imersão do dispositivo em Coca-Cola[®] por 5 min, 4 vezes por dia. A %PDS e o desgaste foram significativamente menores para o grupo que utilizou dentifrício fluoretado ($p=0,04$ em ambos). Concluíram que o dentifrício fluoretado teve um efeito protetor na erosão do esmalte submetido à abrasão por escovação.

2.8.2 Gel

O uso de flúor gel foi investigado por JONES et al.⁶⁹, 2002, para avaliar o potencial no controle da erosão dentária de origem endógena. Os resultados demonstraram que a desmineralização do esmalte foi reduzida à medida que se elevou a frequência de aplicações de NaF gel. Entretanto, sua prescrição adequada se relaciona ao custo-benefício, já que o potencial do flúor tópico é capaz de inibir erosão endógena de pequeno grau, embora não tenha ação efetiva nas mais severas.

BUCHALLA et al.²⁴, 2004, mostraram que o flúor seria capaz de reduzir a perda de esmalte dentário quando submetido à erosão e à abrasão/erosão sob severas condições erosivas. E objetivaram determinar a máxima proteção alcançada no esmalte submetido à erosão e a erosão-abrasão, utilizando flúor de alta concentração com e sem adição de flúor no dentifrício. Os autores concluíram que o uso do flúor de alta concentração, na forma de gel, foi capaz de proteger o esmalte da erosão e da erosão-abrasão

significativamente, enquanto o dentifrício fluoretado sozinho promoveu uma pequena proteção.

2.8.3 Vernizes

Um estudo realizado por VIEIRA et al.¹³⁴, 2004, analisou a superfície e a subsuperfície de blocos de esmalte bovino pré-tratados com flúor, após a erosão. A pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do gel de titânio de 1 e 4%, fluoreto de amina 1 e 0,25% e verniz fluoretado na prevenção da erosão dentária. Dois grupos experimentais serviram de controle, um deles com pré-tratamento de verniz fluoretado livre e outro sem pré-tratamento. Foi simulada uma erosão dentária, usando espécimes de esmalte bovino submetido a ciclos alternados de exposição ao ácido cítrico e remineralização em saliva artificial. A perda cumulativa de cálcio e a profundidade de erosão foram proporcionais ao tempo de erosão a que foram submetidos e apresentaram um aumento linear. O grupo tratado com verniz fluoretado apresentou uma perda muito menor em comparação aos demais grupos tratados com flúor. O grupo tratado com flúor livre mostrou uma erosão bem maior quando comparado ao grupo controle. O verniz serviu como uma reserva de flúor que também pode explicar o fato de este grupo apresentar uma menor perda de cálcio do que nos demais grupos. Esta teoria também enfatiza a proteção mecânica do verniz (VIEIRA; RUBEN; HUYSMANS¹³³, 2005; VIEIRA et al.¹³², 2007).

VIEIRA et al.¹³², 2007, avaliaram o efeito *in situ* do verniz de flúor (VF) na prevenção do desgaste provocado pela erosão, bem como da erosão combinada com abrasão por escovação. Onze voluntários usaram por 3 semanas, durante as horas de trabalho, dispositivos contendo espécimes de esmalte humano, sendo 2 controles e 2 VF-tratado. A erosão era realizada fora da boca, 3 vezes por dia (5 min) na Sprite[®]. Ao final de cada dia experimental, um espécime controle e um experimental (C-er+abr e VF-er+abr) eram escovados (5 s) com dentifrício fluoretado. Os outros espécimes remanescentes (C-er e VF-er) não eram escovados. Os resultados indicaram que o verniz de flúor foi efetivo na redução do desgaste erosivo, sendo que os

grupos VF-er and VF-er+abr mostraram perda de volume significativamente menor que o grupo C-er ($p < 0,001$ e $p = 0,005$, respectivamente) e para o grupo C-er+abr ($p < 0,001$ e $p = 0,002$, respectivamente).

2.9 Efeito de íons metálicos na desmineralização

Resultados de estudos conduzidos em humanos e animais têm mostrado que íons ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) possuem propriedades cariostáticas. O ferro adicionado à sacarose, sozinho ou em combinação com outros íons, como flúor e cobre, possuem grande efeito na redução do potencial cariogênico do açúcar (BOWEN; PEARSON²⁰, 1994; ROSALEN; PEARSON; BOWEN¹¹³, 1996; MIGUEL; BOWEN; PEARSON^{92, 93 e 94}, 1997).

O mecanismo exato relacionado às propriedades cariostáticas do ferro ainda não é conhecido, mas algumas hipóteses têm sido aceitas. Uma possível explicação para esse efeito seria a diminuição na acidogenicidade do biofilme dentário (OPPERMAN; ROLLA¹⁰⁶, 1980). O ferro poderia ter um efeito na colonização bacteriana da superfície do esmalte, bem como no metabolismo do biofilme dentário, reduzindo a produção de ácido láctico e também a taxa de incorporação do açúcar para dentro da bactéria pela ação do sistema fosfotransferase (DUNNING; MARQUIS³⁴, 1998). Um recente estudo *in situ* mostrou que a sacarose contendo ferro poderia reduzir o número de estreptococos mutans na formação do biofilme, reduzindo assim, a cárie dentária (PECHARKI et al.¹⁰⁷, 2005).

DEVULAPALLE; MOOSER³¹, 2001, demonstraram, *in vitro*, que 6 mmol/L FeSO_4 pode reduzir a atividade da glicosiltransferase. Essa enzima é um dos fatores de virulência mais importantes dos estreptococos mutans (HAMADA; SLADE⁴⁸, 1980; LOESCHE⁷⁸, 1986; WUNDER, BOWEN¹¹⁴, 1999). Entretanto, resultados obtidos por MARTINHON et al.⁸⁶, 2006, mostraram que 15 mmol/L de ferro não afetam significativamente as concentrações de carboidratos alcali-solúveis, flúor e cálcio na matriz do biofilme dentário. Esse íon reduziu a perda mineral em esmalte submetido a alto desafio cariogênico

quando comparado ao controle. Estes dados sugerem um possível efeito do Fe^{+2} diretamente no esmalte.

O efeito inibitório de íons metálicos na desmineralização ácida já tinha sido investigado (BUNDY; BUTLER; HOCHMAN²⁵, 1980). Outras possibilidades incluem redução da solubilidade do esmalte em ácidos (TORELL¹³¹, 1988), redução da acidogenicidade da placa dentária (OPPERMAN; ROLLA¹⁰⁶, 1980), efeito bactericida e bacteriostático nos estreptococos mutans (DUNNING; MARQUIS³⁴, 1998) e redução na atividade das glicosiltransferases dos estreptococos mutans (WUNDER; BOWEN¹¹⁴, 1999; DEVULAPALLE; MOOSER³¹, 2001).

Considerando o efeito do ferro no biofilme, PECHARKI et al.¹⁰⁷, 2005, sugerem que a ação esteja relacionada com a capacidade de interferir especificamente com a contagem de estreptococos mutans, devido à redução significativa dessas populações no biofilme, provocada por alta concentração de ferro. Mostraram ainda que o ferro é capaz de reduzir *in situ* o potencial cariogênico da sacarose, em concordância com MARTINHON et al.⁸⁶, 2006.

As evidências demonstraram que o cobre e o ferro podem exercer ação inibitória antibacteriana para cárie dentária. Em adição foi investigada a ação do ferro e do cobre na desmineralização ácida. Os resultados indicaram que o ferro pode inibir a desmineralização do mineral afetado diretamente pela dissolução química, e sua efetividade foi duas vezes maior que a do cobre. O ferro pode permitir a estabilização do mineral na superfície dentária pela substituição iônica ou pela formação de depósitos protetores (BROOKES et al.²², 2003).

BROOKES et al.²¹, 2004, realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar o ferro em relação a sua habilidade de inibir diretamente a desmineralização ácida em um sistema abiótico, num modelo que simula as condições erosivas. Soluções de 10 mmol/L de ácido acético sozinho ou contendo 10 mmol/L CuSO_4 e FeSO_4 foram adicionadas à hidroxiapatita sintética (1 mL/mg). As amostras foram agitadas por 30 s e separadas pela centrifugação. A dissolução da hidroxiapatita foi determinada pela medida

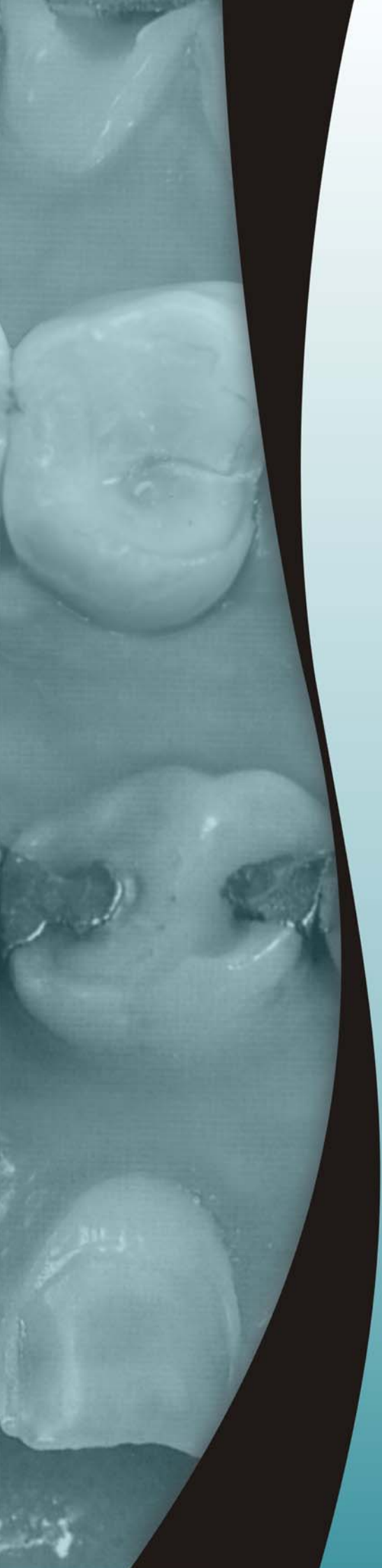
espectroscópica do fosfato liberado no sobrenadante. Os resultados demonstraram que a dissolução de hidroxiapatita na presença de FeSO_4 e CuSO_4 foi 75% e 51% menor, respectivamente. A inibição observada foi significativa em ambos os casos ($p < 0,05$). Em outro experimento o ferro ainda foi capaz de reduzir a perda mineral (hidroxiapatita sintética) em 10% quando presente em uma solução a 1,24 mmol/L. Os resultados indicaram que o ferro foi capaz de inibir a desmineralização, afetando a dissolução química mineral diretamente e sua efetividade foi aproximadamente 2 vezes mais que o cobre.

O mesmo modelo abiótico descrito por BROOKES et al.²², 2003 e BROOKES et al.²¹, 2004, foi utilizado por BUZALAF et al.²⁷, 2006, empregando pó de esmalte bovino como substrato. As autoras observaram inibições na desmineralização do pó de esmalte bovino de 10, 23 e 50% para as concentrações de FeSO_4 a 0,625, 5 e 15 mmol/L, respectivamente. Altas concentrações não proporcionaram um efeito extra na inibição da dissolução do pó de esmalte. A diferença de substrato empregado (pó de esmalte bovino X hidroxiapatita sintética) poderia parcialmente explicar as diferenças no percentual de inibição da desmineralização quando se comparam estes achados com os de BROOKES et al.²¹, 2004.

SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹⁶, 2007, avaliaram o uso do bochecho com solução de ferro na prevenção da erosão e erosão associada à abrasão. Durante 5 dias experimentais das fases cruzadas (intervalo de 10 dias), 10 voluntários utilizaram dispositivos palatinos, contendo 6 blocos de esmalte e 6 de dentina, arranjados em 3 fileiras horizontais (4 espécimes em cada). Na primeira fase, os voluntários imergiram o dispositivo por 5 min em 150 mL de Coca-Cola[®], 4 vezes por dia. Imediatamente depois da imersão, nenhum tratamento foi realizado na primeira fileira. A outra fileira foi escovada depois de 1 min, usando um dentifício fluoretado e o dispositivo permaneceu dentro da boca. Depois de 30 min, a fileira remanescente foi escovada. Na outra fase, os procedimentos foram repetidos, mas depois da imersão, os voluntários bochecharam 10 mL de solução de sulfato ferroso por 1 min. Os resultados indicaram que o esmalte apresentou mais desgaste que a dentina sobre todas as condições experimentais, sendo que a solução de ferro causou

uma redução significativa na %PDS no esmalte e uma redução significativa no desgaste na dentina.

Em virtude do exposto, fica claro que o íon ferro tem ação benéfica na inibição da desmineralização dentária. Assim, o seu potencial na inibição da erosão causada por ácidos merece ser testado sobre outras condições, como sendo adicionado às bebidas carbonatadas.

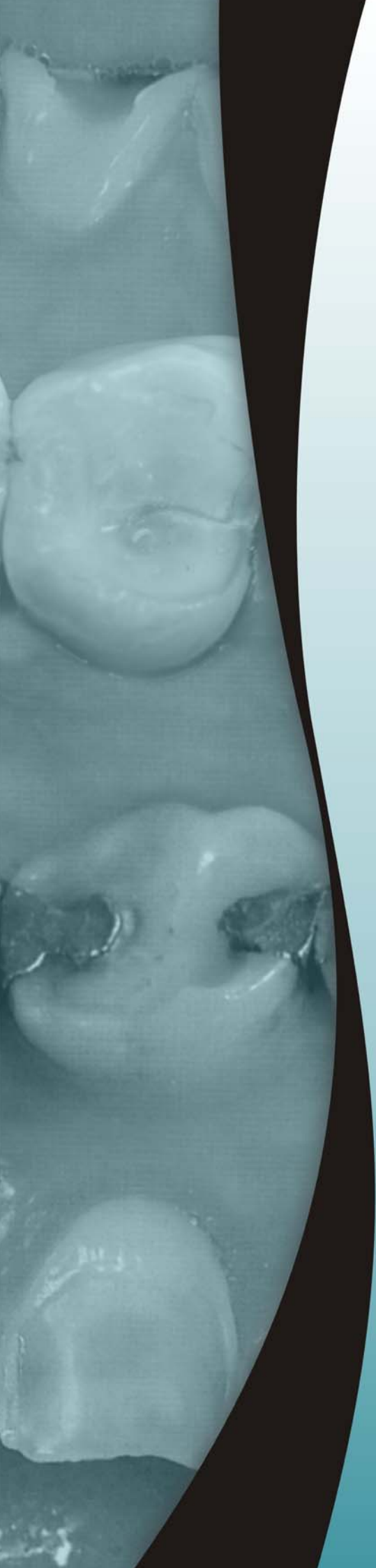


Proposição

3 Proposição

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do íon ferro na inibição da erosão de dentes bovino e humano provocada por bebidas ácidas, em estudos *in vitro* e *in situ*. A fim de se atingir estes objetivos, foram conduzidos um estudo piloto e 3 subprojetos, nos quais foram testadas as seguintes hipóteses nulas, respectivamente:

- a) A ausência do carbonato na bebida não altera o efeito protetor do ferro na inibição da desmineralização do pó de esmalte bovino;
- b) O efeito protetor do ferro na desmineralização provocada pela bebida não é influenciado pelo momento de contato com o pó de esmalte bovino.
- Não há interferência do ferro na dissolução do pó de esmalte dentário bovino na presença de bebidas ácidas.
- A adição de ferro a 10 mmol/L à Coca-Cola® não reduz a perda de dureza superficial e o desgaste de blocos de esmalte dentário bovino *in vitro*.
- A adição de ferro a 10 mmol/L à Coca-Cola® não reduz a perda de dureza superficial e o desgaste de blocos de esmalte e dentina humanos *in situ*.



*Materiais
e Métodos*

Esta metodologia foi dividida em três etapas, cada uma correspondente a um dos subprojetos desenvolvidos, a saber:

4.1 Subprojeto 1: Determinação da concentração de ferro capaz de inibir a desmineralização do pó de esmalte bovino provocada por dois tipos de refrigerante

4.1.1 Delineamento experimental do subprojeto 1

4.1.2 Escolha do refrigerante

4.1.3 Seleção e corte dos dentes bovinos

4.1.4 Polimento dos blocos de dente bovino

4.1.5 Obtenção do pó de esmalte

4.1.6 Preparo das bebidas com diferentes concentrações de ferro

4.1.6.1 Realização do estudo piloto do subprojeto 1: Efeito da adição de ferro em bebida carbonatada ou descarbonatada sobre a desmineralização de pó de esmalte bovino

4.1.7 Determinação do fósforo liberado pelo esmalte em pó

4.1.8 Análise estatística

4.2 Subprojeto 2: Análise do efeito do ferro na redução da erosão do esmalte dentário bovino submetido a regimes de des e remineralização

4.2.1 Delineamento Experimental

4.2.2 Amostra

4.2.3 Obtenção dos espécimes

4.2.3.1 Seleção e corte dos dentes bovinos

4.2.3.2 Planificação e polimento dos blocos de dente bovino

4.2.3.3 Seleção dos blocos de dente bovino

4.2.4 Etapa experimental

4.2.5 Avaliação do pH, capacidade tampão e concentração de fosfato e flúor na bebida

4.2.6 Análise de desgaste

4.2.7 Avaliação da microdureza de superfície inicial e final

4.2.8 Análise estatística

4.3 Subprojeto 3: Efeito do ferro na inibição da erosão do esmalte e dentina dentária humana provocada por um refrigerante *in situ*.

4.3.1 Delineamento experimental

4.3.2 Preparação dos espécimes

4.3.2.1 Seleção e corte dos dentes humanos

4.3.2.2 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina

4.3.3 Planificação e polimento dos blocos de esmalte e dentina humana

4.3.4 Padronização e seleção dos blocos de esmalte e dentina após planificação e polimento

4.3.5 Seleção dos voluntários

4.3.6 Preparação do dispositivo palatino

4.3.7 Instruções aos voluntários

4.3.8 Avaliação *in situ* - Fase intraoral

4.3.9 Análise de desgaste e perda de microdureza de superfície

4.3.10 Análise estatística

4.1 Subprojeto 1: Determinação da concentração de ferro capaz de inibir a desmineralização do pó de esmalte bovino provocada por dois tipos de refrigerante

4.1.1 Delineamento experimental do subprojeto 1

A metodologia foi adaptada de BROOKES et al.²², 2003. No tempo zero, 0,4 mL da bebida (Sprite Zero® ou Coca-Cola®, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brazil) foram adicionados a 40 mg de esmalte em pó (1 mg de esmalte em pó/ 10 µL de bebida) e agitados por 30 s. A amostra foi imediatamente centrifugada por 30 s a 11000 rpm e o sobrenadante removido após 1 minuto e 40 segundos (no tubo tipo *ependorf* havia 300 µL de sobrenadante). Portanto, o tempo total de contato do pó de esmalte com a bebida foi de 2 min e 40 segundos. Este procedimento foi repetido cinco vezes para as bebidas puras (controle) e para cada concentração diferente de ferro adicionada às bebidas (1,25, 2,5, 5, 10, 15, 30 e 60 mmol/L). O fosfato liberado ao meio foi analisado por espectrofotometria. (Figura 1).

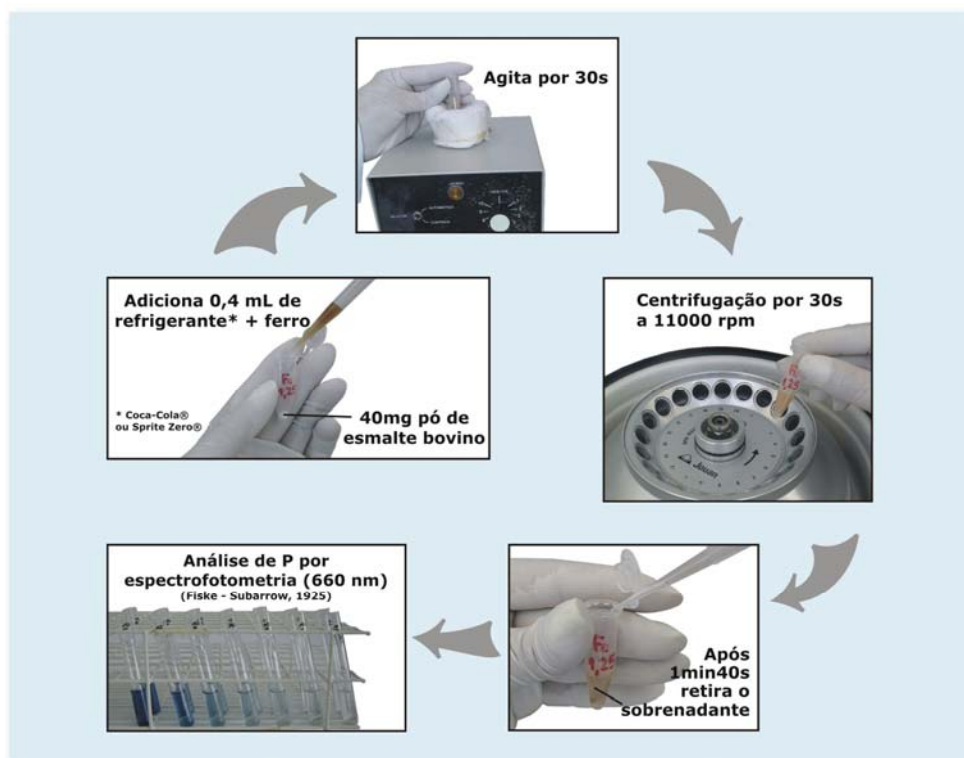


Figura 1 - Esquema ilustrando o delineamento experimental do subprojeto 1.

4.1.2 Escolha do refrigerante

Inicialmente, a bebida de escolha para a realização do experimento foi a Sprite Diet[®], por ser uma bebida carbonatada com maior capacidade tampão (SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007). Contudo, sendo a bebida carbonatada de nome comercial Coca-Cola[®] considerada a preferência de consumo entre os refrigerantes, além de possuir um potencial erosivo similar ao da Sprite Diet[®] (SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007), promovido pelo baixo pH, decidiu-se avaliar o efeito do ferro na inibição da desmineralização nos dois tipos de bebidas. Comercialmente, a Sprite Diet[®] foi substituída pela Sprite Zero[®].

4.1.3 Seleção e corte dos dentes bovinos

Para a realização deste estudo foram utilizados incisivos bovinos. Após extração (origem do Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., Bauru-SP) permaneceram armazenados em recipientes de vidro, contendo solução tamponada de formol a 2%, em pH 7,0 (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo), sob temperatura ambiente por 30 dias no mínimo. Os dentes passaram por uma seleção prévia, buscando-se selecionar os melhores dentes, eliminando aqueles com trincas, rachaduras, manchas hipoplásicas ou grande desgaste incisal.

Após limpar os dentes, removendo todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície dentária do dente bovino com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX. Ind. Bras.), estes foram preparados para a secção.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, made in U.S.A.) numa placa de madeira (40mm X 40mm X 5mm) para facilitar a adaptação posterior na máquina de corte. A placa de madeira foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Os cortes eram realizados com o auxílio de três discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 mm

X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e dois espaçadores de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada. Foram obtidos de 8-10 blocos de esmalte de 4 mm X 4 mm da porção mais plana da coroa, através de secção tripla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido méso-distal, aproveitando-se toda face vestibular possível. (Figuras 2, 3 e 4)

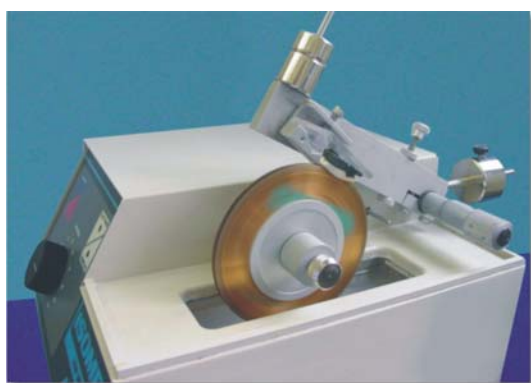


Figura 2 - Máquina de corte.



Figura 3 - Dente bovino.



Figura 4 - Corte da face vestibular, mostrando a obtenção de blocos de dente.

4.1.4 Polimento dos blocos de dente bovino

Os fragmentos de dentes obtidos sofreram desgaste na superfície de dentina por causa da curvatura interna da câmara pulpar. A superfície de dentina foi desgastada 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). Para tanto, a polítrix foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86 g, entre 30 s e 7 min, observando-se o desgaste até que não houvesse nenhum remanescente de dentina (Figura 5 e 6).

Os fragmentos foram levados à lavadora ultra-sônica (UNIC, USC 750, USA) com 1700 mL de água deionizada, por 2 min. Os blocos foram secos à temperatura ambiente e armazenados em frascos plásticos.

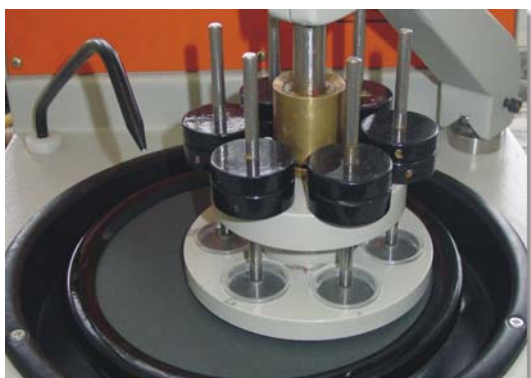


Figura 5 - Polítrix para desgaste da dentina.

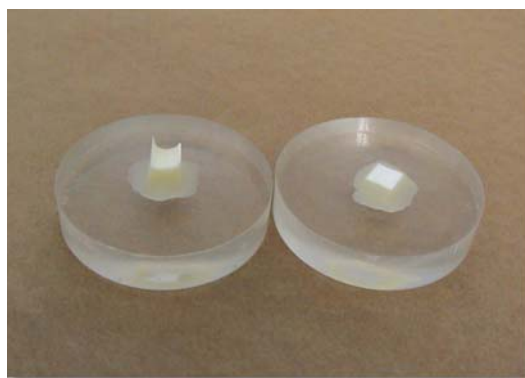


Figura 6 - Desgaste da dentina até obter apenas esmalte.

4.1.5 Obtenção do pó de esmalte

Foi produzido esmalte em pó a partir desses fragmentos, que foram moídos em equipamento tipo grau e pistilo (KM1, marca MLW, Hergerstellt, Alemanha) (Figura 7). A moagem foi executada até que se obtiveram fragmentos menores que 106 μm . Estes fragmentos eram selecionados através de passagem por uma peneira de Tamis (Bertel, Caieiras, Brasil), com uma malha que permitia a passagem de partículas menores que 106 μm . Para se padronizar o tamanho das partículas, após a passagem pela peneira acima descrita, o pó obtido era levado a uma peneira de Tamis (Bertel, Caieiras,

Brasil) que permitia a passagem de partículas menores que 75 µm. O pó de esmalte que não passasse por esta peneira teria, portanto, partículas entre 75 e 106 µm (Figura 8).



Figura 7 – Equipamento tipo gral e pistilo para obtenção do pó de esmalte.

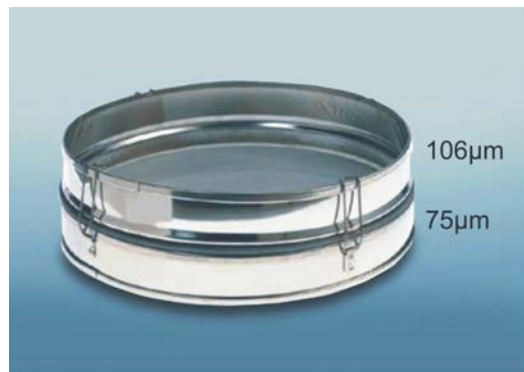


Figura 8 - Peneira de Tamis

4.1.6 Preparo das bebidas com diferentes concentrações de ferro

O preparo das bebidas, com diferentes concentrações de ferro, foi realizado da seguinte maneira:

- 1º Pesou-se o sal (Sal: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sulfato de ferro hepta-hidratado – Merck, Alemanha)
- 2º Colocaram-se no béquer 5 mL de refrigerante com gás
- 3º Colocou-se o sal de ferro no refrigerante
- 4º Agitou-se por 10 s
- 5º Transferiu-se para o balão e acrescentou-se o refrigerante até o volume final

Para calcular a massa (mg) do sal de ferro para a obtenção das concentrações desejadas (1,25, 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 mmol/L) foi utilizada a fórmula:

$$m = M.V / \text{mol} \quad m = \text{massa do sal (mg)}$$

M = concentração do sal desejado no refrigerante (mmol/L)

V = volume de refrigerante (L)

mol = peso molecular do sal (g)

Sendo assim, foram utilizados os dados expressos no Quadro 1:

Quadro 1 – Preparo das concentrações de ferro nas bebidas, de acordo com a massa (mg) do sal e volume (mL) final de refrigerante utilizado.

Concentração de ferro desejada (mmol/L)	massa (mg) de sal	Volume final de refrigerante (mL)
1,25	34,80	100
2,5	34,80	50
5,0	34,80	25
10,0	69,60	25
15,0	41,76	10
30,0	83,52	10
60,0	167,04	10

4.1.6.1 Realização do estudo piloto do subprojeto 1: Efeito da adição de ferro em bebida carbonatada ou descarbonatada sobre a desmineralização de pó de esmalte bovino

Para a realização do experimento do subprojeto 1, propriamente dito, houve a necessidade da realização de um estudo piloto para verificar a influência do gás carbônico presente na bebida carbonatada. Tal dúvida surgiu, pois havia certa dificuldade na hora de pipetar a bebida com gás carbônico para promoção da desmineralização do pó de esmalte, já que se formavam bolhas no interior da ponteira da pipeta, podendo alterar o volume final proposto pelo trabalho. Contudo, a remoção do gás, poderia alterar o pH da bebida e/ou alterar a sua formulação. Além disso, havia a necessidade de se determinar se o pó de esmalte seria exposto primeiramente à solução de ferro, seguido do acréscimo da bebida, ou se a bebida já deveria conter a concentração de ferro proposta. Portanto, foi realizado um estudo piloto, com a finalidade de se esclarecer tais dúvidas e dar seqüência à realização do subprojeto 1 (Figura 9).

A metodologia empregada para a obtenção do pó de esmalte foi a mesma que a utilizada e descrita nos itens **4.1.3** ao **4.1.5** acima, e a fase experimental foi baseada e adaptada da metodologia de BROOKES et al.²², 2003, descrita no item **4.1.1**, detalhada a seguir.

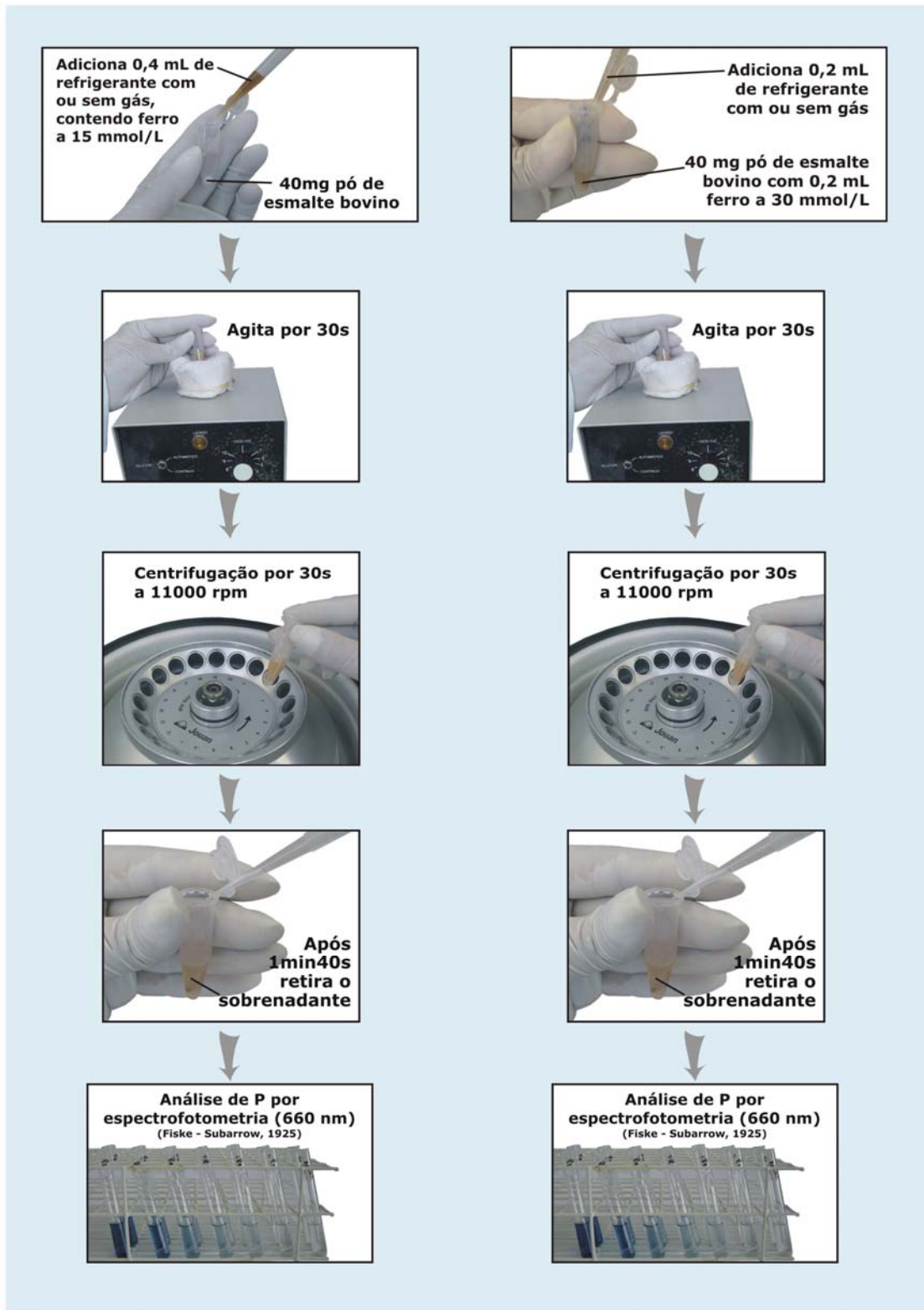


Figura 9 - Esquema do delineamento experimental do estudo piloto do subprojeto 1.

A bebida escolhida para esta etapa foi a Sprite Zero® (Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brazil).

Inicialmente foi feita a leitura do pH da bebida com e sem gás carbônico (pHmetro MB10 - Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí-MG), O gás carbônico foi removido, utilizando-se 150 mL de bebida durante 1 h na bomba à vácuo.

A fase experimental foi dividida em quatro partes, sendo as duas primeiras, utilizando bebida com gás (carbonatada), mas expondo o pó de esmalte à concentração de ferro separado ou junto à bebida, respectivamente. Nas outras duas partes experimentais, repetiu-se o processo, porém, utilizando bebida sem gás (descarbonatada), detalhado a seguir:

No experimento 1 (E1), no tempo zero, foram adicionados em 40 mg de esmalte em pó, primeiramente, 0,20 mL de ferro a 30 mmol/L, e logo depois, 0,20 mL de bebida carbonatada (Sprite Zero® com gás carbônico), completando 0,40 mL de refrigerante a 15 mmol/L de ferro para 40 mg de pó de esmalte (1 mg de esmalte em pó/ 10 µL de líquido). O conteúdo foi então agitado por 30 s. A amostra foi imediatamente centrifugada por 30 s a 11000 rpm e o sobrenadante removido após 1 min e 40 s.

No experimento 2 (E2), no tempo zero, foram adicionados em 40 mg de esmalte em pó uma solução de 0,40 mL, contendo refrigerante carbonatado com concentração de 15 mmol/L de ferro e seguida a mesma seqüência citada acima: agitação, centrifugação e retirada do sobrenadante.

No experimento 3 (E3), no tempo zero, foram adicionados em 40 mg de esmalte em pó, primeiramente 0,20 mL de ferro a 30 mmol/L, em seguida foi adicionado 0,20 mL de refrigerante sem gás carbônico, obtendo-se 0,40 mL de refrigerante sem gás a 15 mmol/L de ferro. A seqüência foi repetida como acima citada.

No experimento 4 (E4), no tempo zero foram adicionados em 40 mg de esmalte em pó, uma solução de 0,40 mL contendo 15 mmol/L de ferro na bebida descarbonatada. A seqüência foi repetida.

Para comparação, foram realizados controles de 1 a 4, sendo que nos controles 1 (C1) e 3 (C3) foram repetidos os experimentos E1 e E3, trocando-se a solução de ferro por água deionizada; e nos controles 2 (C2) e 4 (C4), foi utilizada bebida pura com e sem gás, respectivamente.

A metodologia utilizada pode ser conferida por meio do quadro resumo descrito abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 - Resumo da metodologia aplicada no estudo piloto

E1	1° 0,20 mL de ferro a 30 mmol/L 2° 0,20 mL de refrigerante com gás
E2	0,4 mL refrigerante com gás e concentração de 15 mmol/L de ferro
E3	1° 0,20 mL de ferro a 30 mmol/L 2° 0,20 refrigerante sem gás
E4	0,4 mL refrigerante sem gás e concentração de 15 mmol/L de ferro
C1	1° 0,20 mL de água 2° 0,20 ml de refrigerante com gás
C2	0,4 mL de refrigerante com gás
C3	1° 0,20 mL de água 2° 0,20 mL de refrigerante sem gás
C4	0,4 mL de refrigerante sem gás

A seguir, foi feita a quantificação de fósforo da amostra em duplicata para determinação da desmineralização provocada no pó de esmalte. A concentração de fósforo no grupo experimental foi normalizada em relação ao grupo controle (sem ferro, que foi tomada como 1). A metodologia está descrita no item **4.1.7**.

O experimento foi repetido cinco vezes (n=5) para cada grupo.

Os dados foram analisados utilizando-se o GraphPad InStat. Após a checagem da normalidade e homogeneidade dos dados, os mesmos foram submetidos ao teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4.1.7 Determinação do fósforo liberado pelo esmalte em pó

A fim de se determinar a quantidade de pó de esmalte dissolvido no subprojeto 1 e no estudo piloto, o fósforo liberado no sobrenadante foi determinado colorimetricamente em duplicata, pelo método de FISKE; SUBARROW³⁶, 1925, utilizando-se um espectrofotômetro digital (Cary 50, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). As amostras contendo crescentes concentrações de ferro foram lidas contra os padrões contendo 0,75, 1,5, 3,0, 6,0, 12,0 e 24,0 $\mu\text{g P}$. As leituras de absorvância foram convertidas para $\mu\text{g P}$, usando uma curva com coeficiente de correlação $r \geq 0,99$. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A repetibilidade média das leituras, baseada nas amostras em duplicata, foi 97%.

Para o preparo das amostras e dos padrões foram empregados 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

O volume final foi completado para 250 mL com água deionizada.

3- Padrão contendo 3 mg P%

A reação foi feita de acordo com o Quadro 3

Quadro 3 - Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBAROW³⁶, 1925.

	Blanck	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão 7	Amostra
Água deionizada	2,300 mL	2,275 mL	2,250 mL	2,200 mL	2,100 mL	1,900 mL	1,500 mL	0,7 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	1,6 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1 mL
Ácido molibdico	0,5 mL em todos, agitar e esperar 10 minutos								
Redutor	0,2 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 min e ler								
A 660 nm									
µg P/mL		0,75	1,5	3,0	6,0	12,0	24		

Inicialmente foi colocada água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos no Quadro 3. A seguir foram colocados, em duplicatas, os padrões de P ou as amostras. Então foi colocado 0,5 mL de ácido molibdico em todos os tubos, feita agitação e esperou-se 10 minutos. A coloração da reação foi promovida pela adição de 0,2 mL de reativo redutor. Após 20 minutos da colocação do reativo redutor procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Cary 50, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) a 660 nm de absorbância.

4.1.8 Análise estatística

Foi utilizado o GraphPad InStat. Após serem checadas a normalidade e homogeneidade dos dados. Para o estudo piloto, os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para comparação entre cada grupo experimental e o seu respectivo controle. O mesmo teste também foi usado para comparar E1XE3, E2XE4, C1XC3 e C2XC4. Para o subprojeto 1, os dados foram submetidos à ANOVA. Para comparações individuais entre as diferentes concentrações de ferro em relação ao grupo controle (sem ferro), foi empregado o teste de Tukey. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

4.2 Subprojeto 2: Análise do efeito do ferro na redução da erosão do esmalte dentário bovino submetido a regimes de des e remineralização

4.2.1 Delineamento Experimental

O estudo *in vitro* foi realizado utilizando-se blocos de esmalte bovino que foram expostos ao refrigerante Coca-Cola® (Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil) em 4 ciclos de desmineralização-remineralização. O estudo foi composto por dois grupos: experimental e controle. Para o grupo experimental foi avaliado o efeito do ferro no processo de des-remineralização do esmalte. Cada grupo foi composto por 24 blocos de esmalte, nos quais a parte controle estava presente, pois inicialmente, metade de suas superfícies havia sido protegida com esmalte de unha cosmético (Risque, Niasi, Taboão da Serra-SP). O efeito do ferro na inibição da erosão foi avaliado por meio da perfilometria e da análise da microdureza superficial (no lado controle, protegido pelo esmalte e no lado teste que recebeu a solução de ferro). Além disso, houve a avaliação do pH, concentração de fosfato e flúor e a capacidade tampão da bebida. A microscopia óptica num aumento de 40 vezes foi utilizada para ilustrar o desgaste sofrido nos grupos experimental e controle.

4.2.2 Amostra

Para o estudo foram utilizados 48 corpos de prova confeccionados em esmalte bovino, igualmente divididos em 2 grupos:

- **Grupo Experimental:** 24 fragmentos de esmalte bovino com metade hígida (controle) e a outra metade para avaliação do efeito erosivo da bebida acrescida de solução de ferro a 10 mmol/L.
- **Grupo Controle:** 24 fragmentos de esmalte bovino com metade hígida (controle) e a outra metade para avaliação do efeito erosivo da bebida sem o acréscimo do ferro.

4.2.3 Obtenção dos espécimes

4.2.3.1 Seleção e corte dos dentes bovinos

Para a realização deste estudo foram utilizados incisivos bovinos. Após extração (origem do Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., Bauru-SP) permaneceram armazenados em recipientes de vidro, contendo solução tamponada de formol a 2%, em pH 7,0 (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo), sob temperatura ambiente por 7 dias. Os dentes passaram por uma seleção prévia, buscando-se selecionar os melhores dentes, eliminando aqueles com trincas, rachaduras, manchas hipoplásicas ou grande desgaste incisal.

Após limpar os dentes removendo todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície dentária do dente bovino com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX Ind. Bras.), estes foram preparados para a secção.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, made in U.S.A.) numa placa de acrílico (40 mm X 40 mm X 5 mm) para facilitar a adaptação posterior na máquina de corte. A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Os cortes eram realizados com o auxílio de dois discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 mm X 0,3 mm X

12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada. Eram obtidos 1 ou 2 blocos de esmalte de 4 mm X 4 mm da porção mais plana da coroa, através de secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido méso-distal. (Figura 10).



Figura 10 - Obtenção de um bloco da porção plana do dente bovino.

4.2.3.2 Planificação e polimento dos blocos de dente bovino

Para a planificação dos blocos de esmalte, os blocos foram fixados com cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP) com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco de acrílico cristal (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a face de esmalte voltada para o disco, com o intuito de primeiramente realizar a planificação da dentina (Figura 11). O conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com sistema de polimento múltiplo capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova, permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico, no qual foram fixados os espécimes. Para a planificação foi utilizada uma lixa de silicone carbide de granulação 320 (Extec Corp.), com refrigeração de água deionizada, até que os blocos ficassem com espessura de aproximadamente 2,5 a 3 mm. Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86 g, entre 30 s e 7 min, até se alcançar a espessura desejada.

Em seguida os blocos foram removidos do disco de acrílico e limpos com xilol (MERCK, Darmstadt- GERMANY) para que se retirasse todo o resíduo de cera aderido a eles. Posteriormente, foram novamente fixados com cera pegajosa no centro da placa de acrílico com a face de dentina voltada contra a placa, para que fosse feito o polimento do esmalte, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base, indispensável para a realização dos testes de desgaste e microdureza. Novamente o conjunto foi adaptado na politriz (Figura 12) e inicialmente o esmalte foi desgastado com uma lixa de silicone carbide de granulação 320 (Extec Corp.), sobre refrigeração com água deionizada, entre 30 s e 2 min, até se obter uma superfície plana, com 2 pesos, em velocidade baixa. Em seguida, foi feito o polimento do esmalte com lixa de silicone carbide de granulação 600 (Extec Corp.), sobre refrigeração com água deionizada, por mais 1 min 30 s, com 2 pesos, também em velocidade baixa. Posteriormente, seguiu-se o polimento em velocidade alta, utilizando-se lixa de silicone carbide de granulação 800 e 1200 (Extec Corp.) por 30 s e 5 min respectivamente. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Extec Corp.) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Buehler), durante 1 min, com 2 pesos, também em velocidade alta. Este tratamento tem por objetivo planificar e remover ranhuras do bloco de esmalte, para permitir a aferição do desgaste no local.

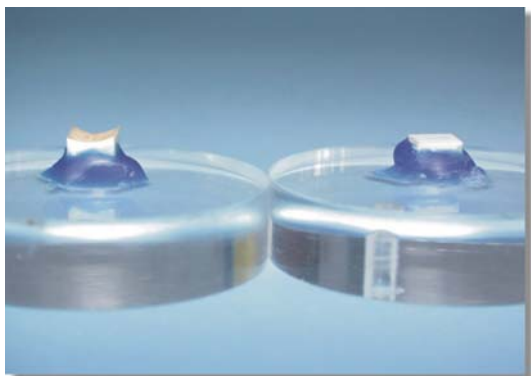


Figura 11 - Planificação da dentina.



Figura 12 - Planificação e polimento dos blocos de esmalte na politriz.

Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultra-som T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), com frequência de 40 KHz, durante 2 min, com água destilada deionizada e banho final de 10 min.

4.2.3.3 Seleção dos blocos de dente bovino

A padronização dos blocos foi feita por seleção prévia dos espécimes feita por microdureza superficial inicial, conforme o descrito no item **4.2.7**. Foram descartados os blocos que apresentavam trincas ou por não estarem totalmente paralelos após o polimento final, procedimento indispensável para a análise de microdureza de superfície. Portanto, de 80 espécimes no total, foram excluídos da amostra, os espécimes com valor de microdureza 10% acima e 10% abaixo da média. Permaneceram 48 blocos com microdureza superficial entre 335 e 380 KHN.

Os 48 blocos foram divididos inicialmente em dois grupos com relação à média de microdureza superficial (acima da média e menor ou igual à média). Desses dois grupos iniciais, foram subdivididos aleatoriamente por sorteio em dois grupos (controle e experimental).

4.2.4 Etapa experimental

Antes do experimento, os blocos foram armazenados em saliva artificial (VIEIRA et al.¹³³, 2005) por 24 horas, para reidratação do esmalte, embora estivessem permanecidos cobertos por gaze embebida em água destilada até o dia do experimento.

Composição da saliva artificial (VIEIRA et al.¹³³, 2005)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mmol/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 mmol/L

KCl 150 mmol/L

$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (TRIS) 0,1 mol/L

NaF 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para calcular a massa dos componentes para obtenção da concentração desejada, foi utilizada a fórmula $C = m/PM \cdot V$, o qual $C =$ concentração (mol/L); $PM =$ peso molecular; $m =$ massa (g) e $V =$ volume (L). Portanto, para obtenção de um litro de saliva artificial, foram utilizados: 355,125 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 160,191 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 11,2125 g de KCl; 12,114 g de TRIS e 110,5 μg de NaF.

Após esta ocasião, os grupos foram submetidos a 4 ciclos de des-re, realizados em um único dia, em um tubo fechado disposto sobre uma mesa agitadora (Figuras 13 e 14). Cada ciclo foi composto por:

- Desmineralização pela bebida (25 mL) Coca-Cola® por 10 min, sob agitação suave, sendo que para o grupo experimental foi acrescido solução de ferro a 10 mmol/L, cuja concentração foi determinada no subprojeto 1.
- Remineralização em 30 mL de saliva artificial por 60 min a 37°C.
- Após último ciclo, os espécimes foram lavados em água deionizada.



Figura 13 - Frasco plástico, contendo Coca-Cola® para imersão do bloco de esmalte



Figura 14 - Mesa agitadora

4.2.5 Avaliação do pH, capacidade tampão e concentração de fosfato e flúor na bebida

A bebida foi submetida à avaliação do pH logo após a abertura, utilizando para tal o eletrodo e pHmetro MB10 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí-MG), sendo o eletrodo imerso em 10 mL da bebida logo após a sua abertura.

A capacidade tampão foi avaliada pela adição de 50 μL de NaOH 0,2 mol/L em 6 mL do produto, em triplicata. Foi calculado o número de adições de solução de NaOH necessário para atingir os pHs 5,5 e 7,0. Quanto maior a quantidade necessária de hidróxido de sódio, maior a capacidade tampão da bebida e pior é o seu efeito erosivo. A concentração de fosfato foi analisada colorimetricamente pelo método de FISKE; SUBARROW³⁶, 1925 já descrita no item 4.1.6.

Para a análise do flúor (F) na bebida, as amostras foram colocadas em placa de Petri (Falcon 1007). O volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por TAVES¹²⁸, 1968, modificado por WHITFORD¹³⁹, 1996. Na tampa desta placa foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 mol/L, distribuídos em 5 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 mol/L). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 mol/L. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota, contendo todo o flúor, foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos por meio de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

4.2.6 Análise de desgaste

Foi utilizado um perfilômetro Hommel Tester T1000 basic (Hommelwerke GmbH ref. # 240851 – Schwenningem – Germany) para análise do desgaste sofrido pela ação do refrigerante em relação ao lado controle (Figura 15 e 16). O aparelho foi conectado a um microcomputador que processava as informações com o auxílio de um software (Turbo Datawin-NT, Versão 1.34, Copyright© 2001). Os espécimes foram secos e o desgaste no esmalte foi determinado em relação à superfície de referência (lado controle, protegido pelo esmalte de unha). Cinco leituras foram realizadas em cada bloco. Os traços perfilométricos foram tomados da superfície de referência (lado controle), atravessando a superfície exposta (lado experimental), percorrendo um total de 3 mm. A média da profundidade de desgaste foi obtida pela distância em micrômetros entre a linha média do gráfico, correspondente à área protegida do espécime (superfície de referência) e o pico de desgaste (Figura 17 e 18).



Figura 15 - Perfilômetro.

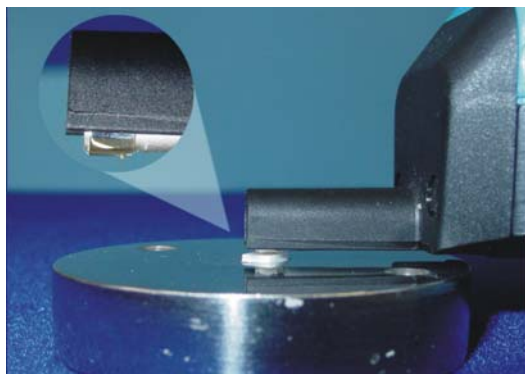


Figura 16 - Ponta apalpadora realizando a leitura de desgaste.

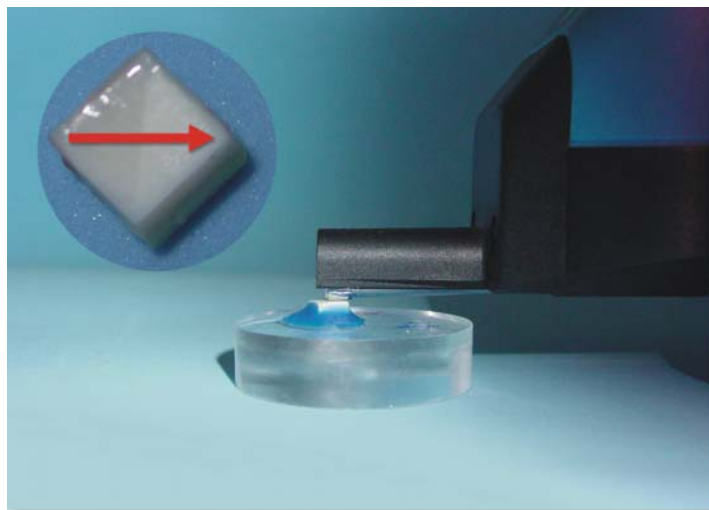


Figura 17 - Sentido da leitura para quantificação do desgaste (do lado controle para o lado experimental).

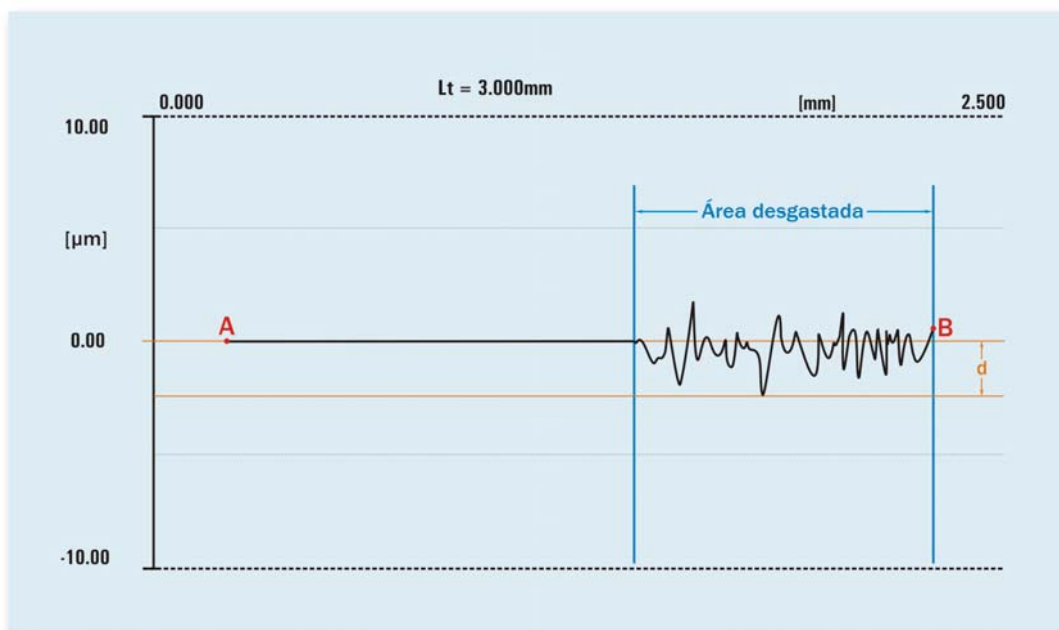


Figura 18 - Ilustração esquemática, mostrando o desgaste dos espécimes testados. (A) início da leitura feita pelo perfilômetro, (B) final da leitura feita pelo perfilômetro e (d) desgaste ocasionado (μm).

4.2.7 Avaliação da microdureza de superfície inicial e final

Todos os blocos de esmalte foram avaliados pela análise da microdureza superficial, utilizando-se um microdurômetro (HVM-2000/ Shimadzu Corporation, Japan,), acoplado a um software (CAMS-Win-New Age Industries, EUA) (Figura 19), composto por um penetrador diamantado piramidal tipo Knoop (Figura 20), com carga de 25 g, aplicada por 10 s. Foram feitas 5 endentações, sendo uma central, uma acima e outra abaixo, uma à esquerda e outra à direita, com distâncias aleatórias entre elas, englobando diferentes áreas da superfície de esmalte do bloco.

As endentações eram medidas, fazendo-se duas marcas pontilhadas que apareciam na tela do computador que se sobrepunham aos vértices agudos do losango correspondente à endentação, determinando o comprimento da maior diagonal (Figura 21) e, conseqüentemente, os resultados da dureza de Knoop por meio do cálculo automático feito pelo software por meio da seguinte equação:

$$KHN = c \times \text{carga} / d^2$$

KHN = valor de dureza Knoop

c (constante)= 14,230

Carga = 25 g

d= diagonal maior da endentação



Figura 19 - Microdurômetro acoplado ao computador.

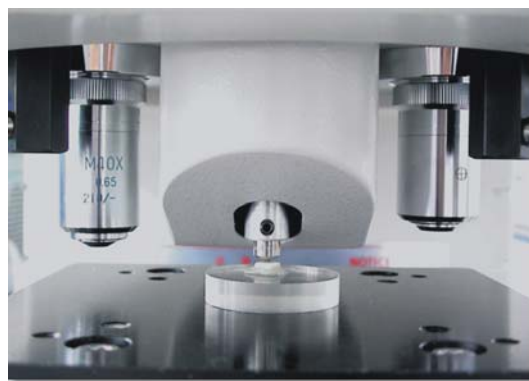


Figura 20 - Penetração da ponta tipo Knoop para obtenção da endentação.

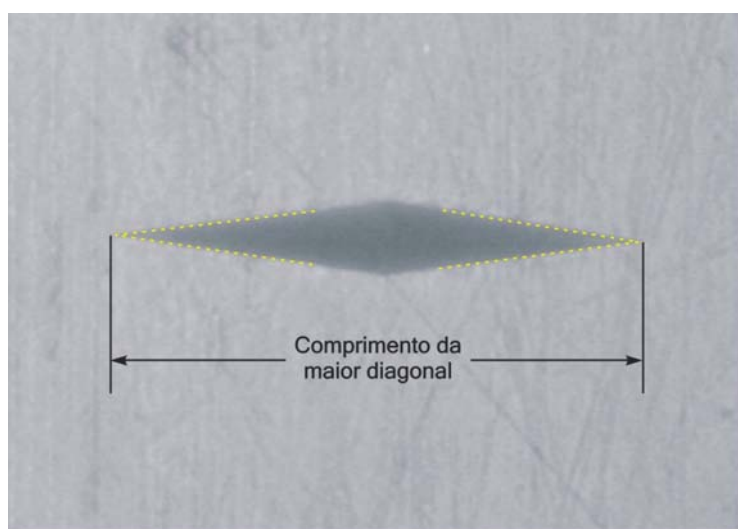


Figura 21 - Imagem de uma endentação feita para avaliação da microdureza no bloco de esmalte.

Após o experimento (ciclo de des-remineralização), para quantificar a alteração na dureza, foi realizada a microdureza final e avaliou-se a porcentagem de perda de microdureza de superfície (%PDS) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%PDS = \frac{\text{microdureza final} - \text{microdureza inicial}}{\text{microdureza inicial}} \times 100$$

4.2.8 Análise estatística

O software GraphPad InStat foi utilizado. Inicialmente foram checadas a normalidade e homogeneidade dos dados. Uma vez satisfeitos estes critérios, para a variável %PDS foi utilizado o teste *t* não pareado com fator de correção de Welch e para a variável desgaste foi utilizado teste *t* não pareado. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.3 Subprojeto 3: Efeito do ferro na inibição da erosão do esmalte e dentina dentária humana provocada por um refrigerante *in situ*.

4.3.1 Delineamento experimental

A etapa *in situ* foi do tipo cruzada, na qual os voluntários foram submetidos a duas fases experimentais cruzadas de 5 dias, utilizando um dispositivo palatino contendo 2 blocos de esmalte humano e 2 blocos de dentina humana. Na primeira fase, os voluntários retiraram os dispositivos da boca e os imergiram na bebida pura (Coca-Cola®, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil), enquanto que na segunda fase, imergiram os dispositivos na bebida, acrescida de ferro a 10 mmol/L (concentração previamente estabelecida no subprojeto 1). Foram realizadas 4 imersões diárias em horários pré-estabelecidos, em 150 mL da bebida contida em um copo calibrado, durante 5 minutos (RIOS et al.¹¹⁰, 2006 e SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007). A microscopia óptica, num aumento de 40 vezes foi utilizada para ilustrar o desgaste sofrido nos grupos experimental e controle. A hipótese nula testada foi que a adição de ferro à bebida não reduz a perda de microdureza de superfície (%PDS) e o desgaste (μm) de blocos de esmalte e da dentina *in situ*.

4.3.2 Preparação dos espécimes

4.3.2.1 Seleção e corte dos dentes humanos

Para a realização deste estudo foram utilizados 50 molares humanos doados pelo Banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Bauru (Anexo 1). Os dentes humanos permaneceram armazenados em recipientes de vidro, contendo solução tamponada de formol a 2%, em pH 7,0 (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo), refrigerados a 4 °C por 30 dias no mínimo. Os dentes passaram por seleções prévias, buscando-se selecionar os melhores dentes, hígidos, eliminando aqueles com trincas, rachaduras e manchas hipoplásicas.

4.3.2.2 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina

Após limpar os dentes, removendo todo e qualquer resíduo de tecido mole e duro (tártaro dentário) aderido à superfície dentária do dente humano com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX. Ind. Bras.), estes foram preparados para a secção.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, made in U.S.A.) no canto inferior direito de uma pequena placa de acrílico (40 mm X 40 mm X 5 mm) para facilitar a adaptação posterior na máquina de corte (Figura 22). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, obteve-se uma fatia de dente da porção coronária numa secção transversal (4 mm de espessura), com isso separava-se a coroa das raízes.

A partir da fatia de dente da porção coronária, foram demarcados com lápis grafite nº 5 (A.W.Faber-Castell S.A.) as áreas planas sem sulcos, devido às irregularidades e angulações do esmalte. Dessa forma, facilitava a análise de como seriam feitos os cortes de modo a obter o maior número de fragmentos de esmalte dentre as faces da fatia do dente (Figura 23).



Figura 22 - Fixação do terceiro molar.

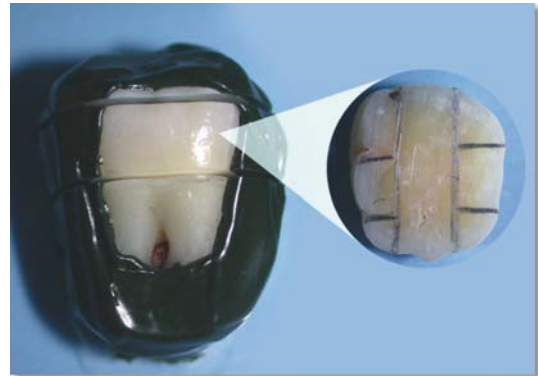


Figura 23 - Corte cervical, do qual eram obtidos os fragmentos de esmalte.

Geralmente os molares inferiores originam espécimes de esmalte das faces vestibular e lingual da coroa, sendo possível em alguns casos, das faces mesial e distal, podendo totalizar até 4 fragmentos por dentes. Neste caso, as fatias da porção coronária eram fixadas com a dentina voltada para a placa de acrílico e executava-se um corte duplo de mesial para distal com dois discos diamantados dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm). Esse corte era realizado de uma só vez sobre duas marcações. Como resultado, obtinham-se 2 fragmentos 4X4 mm unidos entre si e, com apenas um disco diamantado dupla face acoplado à máquina de corte, estes eram separados, Portanto, da fatia original, restavam duas porções correspondentes às faces mesial e distal da coroa, possibilitando, em alguns casos, a obtenção de mais dois espécimes. Nesse caso, essas porções eram fixadas uma ao lado da outra, com as áreas de esmalte demarcadas posicionadas para cima e paralelas entre si, em seguida, com dois discos diamantados dupla face e com

espaçador de 4 mm, realizava-se um corte sobre as demarcações, obtendo-se mais 2 espécimes de 4X4 mm .

Já os molares superiores, originam no máximo 3 espécimes de esmalte. Portanto, o primeiro corte era feito separando-se a fatia do dente em duas porções. Uma porção origina um bloco e a outra porção origina dois blocos. Sendo assim, o corte era realizado com apenas um disco diamantado para separação da área de uma das demarcações, pois o corte duplo atingiria o meio de outra região demarcada, impossibilitando a obtenção de maior quantidade de espécimes. Ao final, as três porções menores obtidas eram fixadas lado a lado, com as demarcações paralelas entre si e por meio de um corte duplo com dois disco diamantados dupla face e espaçador de 4 mm, obtinham-se 3 espécimes de 4X4 mm.

Os blocos de dentina foram obtidos a partir das raízes remanescentes. Utilizou-se a região cervical das raízes, obtendo-se uma fatia transversal da área, e como descrito para o esmalte, da mesma forma eram realizados os cortes. Como a superfície plana da raiz é menor que a superfície da coroa, os blocos de dentina ficam menores que os blocos de esmalte. Para isso, a única diferença na metodologia utilizada para a realização do corte, é que foi utilizado um espaçador de inox de 3 mm de espessura. Portanto, os blocos de dentina tinham dimensões de 3X3 mm no final.

Nova seleção de espécimes foi feita e aqueles que continham rachaduras, manchas, trincas eram eliminados, permanecendo ao final, cerca de 54 blocos de esmalte e 53 de dentina.

4.3.3 Planificação e polimento dos blocos de esmalte e dentina humana

A metodologia utilizada para planificação e polimento dos fragmentos de dente humano foi a mesma que a utilizada para os fragmentos de esmalte bovino, descrita anteriormente no item **4.2.3.2**. Porém, para os blocos de dentina, foi adaptada a metodologia, sendo que a única diferença foi o tempo de exposição de desgaste. Como o cemento é mais delgado que o esmalte, o

tempo de desgaste foi diferente, portanto, não foi utilizada a lixa de polimento de granulação 320 (Extec Corp.) e o tempo de exposição de desgaste com a lixa de polimento de granulação 600 (Extec Corp.) foi diminuída para 1 min. A seqüência e o tempo de exposição para as outras lixas permaneceu o mesmo.

4.3.4 Padronização e seleção dos blocos de esmalte e dentina após planificação e polimento

A padronização dos blocos foi feita por seleção prévia dos espécimes feita por microdureza superficial inicial, conforme o descrito no item **4.2.7**. Foram descartados os blocos que apresentavam trincas ou por não estarem totalmente paralelos após o polimento final, procedimento indispensável para a análise de microdureza de superfície. Portanto, de 54 espécimes no total de esmalte, foram excluídos da amostra, os espécimes com valor de microdureza 10% acima e 10% abaixo da média. Permaneceram os blocos de esmalte com microdureza superficial entre 350 e 407 KHN e média de 388,6 KHN. A mesma padronização foi feita para os blocos de dentina, permanecendo os blocos de dentina com microdureza superficial entre 59,5 e 71,2 KHN e média 65,3 KHN.

Todos os blocos, tanto de esmalte como de dentina foram divididos inicialmente em dois grupos com relação à média de microdureza superficial (acima da média e menor ou igual à média). Desses dois grupos iniciais, foram subdivididos aleatoriamente por sorteio para os 10 voluntários (2 blocos de cada espécime para cada fase - controle e experimental).

Metade da superfície de cada bloco recebeu a aplicação de duas camadas de esmalte de unhas (Risque, Niasi, Taboão da Serra-SP), para posterior determinação do desgaste sofrido pela erosão.

4.3.5 Seleção dos voluntários

Inicialmente o estudo foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – SP, processo número 130/2004, recebendo parecer favorável (Anexo 2).

Foram escolhidos 10 voluntários jovens, na faixa etária de 24 a 31 anos, sem distinção em relação ao gênero, que após leitura e explicação minuciosa, a partir da Carta de Informações ao Sujeito de Pesquisa, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 3 e 4), concordando em participar do estudo. Os critérios adotados para exclusão da amostra foram: fumar; apresentar lesões de cárie ativa no estágio de cavitação; apresentar desgaste dentário acentuado; ter recebido aplicações de flúor pelo menos até 2 semanas; ter utilizado no últimos 2 meses ou utilizar medicamentos que afetassem o fluxo salivar (antidepressivos, narcóticos, diuréticos, anti-histamínicos); fluxo salivar abaixo de 1 mL/min; ter sofrido irradiação; ter atividades aquáticas (cloro presente nas piscinas levam o indivíduo a ter contato com ambientes de baixo ph) ou trabalhar em ambientes poluídos por compostos de baixo ph (indústrias); apresentar doenças sistêmicas, tais como as auto-imunes, xerostomia, menopausa, diabetes tipo 1, má nutrição, problemas gastroesofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito (KOO; CURY⁷², 1999; TENOVUO; LAGERLOF¹³⁰, 1994).

4.3.6 Preparação do dispositivo palatino

Os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo palatino em resina acrílica.

O dispositivo palatino confeccionado em acrílico compreendia quatro sítios retidos internamente na superfície polida de cada dispositivo que serviram para a fixação dos blocos de esmalte e dentina.

A posição de cada bloco no dispositivo palatino foi padronizada, de forma que, para cada lado do dispositivo, existiam um bloco de esmalte e um bloco de dentina de forma invertida (Figura 24).



Figura 24 - Dispositivo palatino, contendo os espécimes de esmalte (em vermelho) e dentina (em azul).

4.3.7 Instruções aos voluntários

Cada voluntário recebeu uma Lista de Instruções ao Voluntário (Anexo 5); 10 garrafas de 600 mL de Coca-Cola® (uma por dia experimental); um estojo plástico, tipo frasqueira, contendo um dentifrício não fluoretado; porções de gaze; um estojo plástico, para guardar o dispositivo nos períodos das refeições e copos descartáveis com a demarcação padronizada no nível de 150 mL. Para a segunda fase experimental, foram fornecidos tubos plásticos J10, contendo 67 g de sal de ferro para adicionar à bebida, além de papel alumínio para envolver a garrafa de refrigerante para evitar a oxidação do ferro ao mínimo possível. Os materiais foram repostos conforme a necessidade (Figura 25).

O dispositivo foi instalado um dia antes do início de cada fase, à noite, após a última higiene e antes do voluntário dormir, para a formação da película adquirida.

Durante o uso, os voluntários foram instruídos a removerem o dispositivo somente durante as principais refeições (café da manhã, almoço e jantar) e antes da última higienização bucal, antes de dormir, ocasião em que o dispositivo deveria permanecer envolvido em gaze embebida em água de abastecimento.

A higienização bucal era realizada habitualmente, utilizando dentifrício não fluoretado oferecido ao voluntário. Após a higienização bucal, os voluntários deveriam aguardar 5 min para recolocar o dispositivo, tempo necessário para o pH salivar voltar ao nível normal (TENOVUOO; LAGERLOF¹³⁰, 1994).



Figura 25 - Kit entregue ao voluntário para realização da etapa experimental.

Para a imersão do aparelho na bebida, os voluntários seguiram, sempre que possível, os horários pré-sugeridos: após o café da manhã, almoço, jantar e após a última higienização (antes de dormir). Caso não conseguissem seguir esses horários, foram orientados, que entre as imersões, o dispositivo deveria permanecer na boca pelo menos por 2 horas, para que a saliva pudesse agir no processo de remineralização.

4.3.8 Avaliação *in situ* - Fase intraoral

Compreendeu dois períodos de seis dias consecutivos de uso do aparelho. Durante este período, os voluntários escovaram seus dentes com dentífrico não fluoretado. Nas primeiras 24 horas, os espécimes não foram submetidos a processo de erosão para permitir a formação de película adquirida. Nos 5 dias seguintes, o processo erosivo foi provocado extraoralmente 4 vezes por dia.

O aparelho permanecia imerso por 5 minutos em um copo contendo 150 mL de refrigerante Coca-Cola® recentemente aberto. Subseqüentemente, o aparelho era removido e recolocado na boca. Os voluntários foram instruídos a não fazer higienização dos espécimes para não provocar abrasão dos mesmos, e ainda a não consumirem alimentos ácidos. O dispositivo intraoral deveria ser usado durante o tempo todo, removendo-o somente durante o procedimento descrito acima, durante as refeições e para a higiene bucal.

No sétimo dia, os voluntários interromperam o uso do aparelho. Foi iniciada então a próxima etapa experimental, na qual foi adicionado à bebida, sal de ferro na concentração de 10 mmol/L, concentração pré-determinada no subprojeto 1.

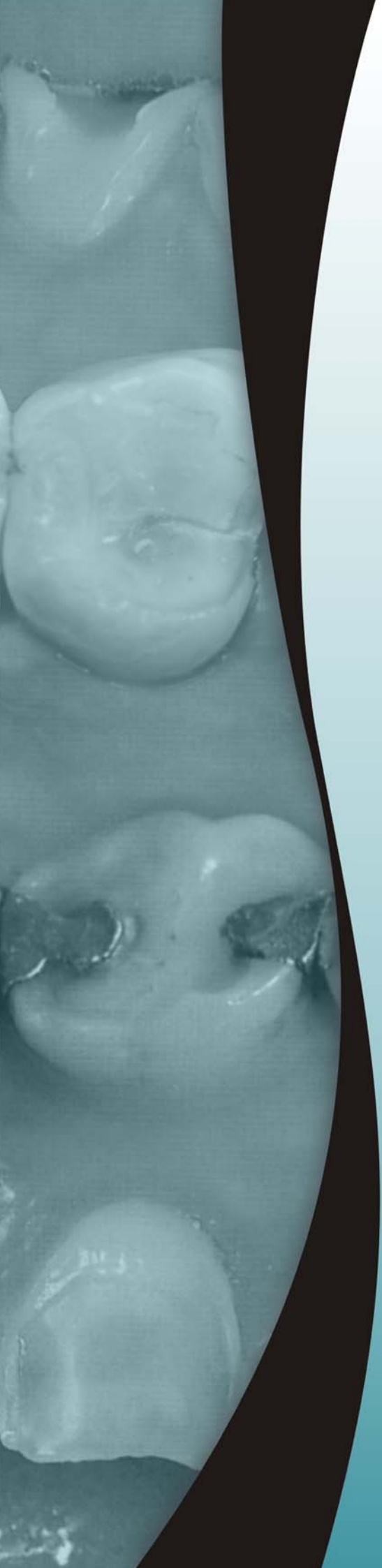
Ao final de cada etapa experimental, o esmalte de unha sobre as superfícies de referência foi cuidadosamente removido e os blocos foram removidos do aparelho. Os espécimes foram limpos e o desgaste no esmalte foi determinado em relação à superfície de referência.

4.3.9 Análise de desgaste e perda de microdureza de superfície

Os espécimes foram submetidos ao teste de perfilometria e perda de microdureza de superfície, conforme descrito acima nos itens **4.2.6** e **4.2.7** respectivamente. A única diferença consistia que para o esmalte humano, a microdureza foi realizada com carga de 50 g e tempo de 10 s e para a dentina humana, a carga foi de 25 g e tempo de 5 s.

4.3.10 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o *software* GraphPad InStat. Inicialmente foram checadas a normalidade e homogeneidade dos dados. Satisfeitos estes critérios, os dados foram submetidos ao teste *t* pareado, sendo adotado um nível de significância de 5%. As variáveis esmalte e dentina, bem como %PDS e perfilometria foram testadas individualmente.



Resultados

5 Resultados

5.1 Estudo piloto do subprojeto 1

A Tabela 1 demonstra a quantidade de fosfato liberado a partir do pó de esmalte e compara o grupo experimental com o respectivo grupo controle. O experimento E2 foi o que apresentou os melhores resultados, com uma inibição significativa (36%) da dissolução do esmalte quando o ferro foi adicionado ($p < 0,05$). Nos experimentos E3 e E4, uma ligeira inibição da dissolução do esmalte foi encontrada quando o ferro foi adicionado (4 e 12%, respectivamente), mas os grupos experimentais não diferiram significativamente do respectivo grupo controle ($p > 0,05$). Para o experimento E1, um aumento na perda mineral foi observado quando comparado com seu respectivo controle.

Quando a presença de carbonato foi considerada, não foram detectadas diferenças significativas entre o experimento E1 (presença de carbonato) e experimento E3 (ausência de carbonato), bem como entre os experimentos E2 (presença de carbonato) e E4 (ausência de carbonato). O mesmo foi observado para os respectivos grupos controles. Comparações diretas entre outros grupos (exemplo: E1XE2, E1XE4, E2XE3, C1XC2, C1XC4 e C2XC3) não são adequados, pois os experimentos possuem protocolos diferentes.

O pH do refrigerante antes e após a remoção do carbonato permaneceu inalterado (2,65), mas o efeito protetor do ferro na dissolução do esmalte foi reduzido (Grupos E1 comparado ao E3 e E2 comparado ao E4) quando o carbonato foi removido (Tabela 1).

A análise da Tabela 1 demonstra que a taxa de dissolução do esmalte do grupo experimental comparado ao respectivo controle foi menor quando o ferro foi adicionado diretamente à bebida.

Tabela 1 – Quantidade média (\pm DP) de fosfato liberado (μ g) do pó de esmalte exposto à Sprite Zero[®], contendo ou não carbonato, em função da presença de ferro previamente incubado com o pó de esmalte ou adicionado diretamente à bebida.

Grupos	Experimental* (E - com 15 mM FeSO ₄)	Controle** (C - sem FeSO ₄)	Alteração da taxa de dissolução***
1	22,78 \pm 4,63 ^A	18,07 \pm 2,39 ^A	+26%
2	21,18 \pm 0,42 ^A	33,48 \pm 0,95 ^B	-36%
3	18,98 \pm 1,85 ^A	19,80 \pm 3,09 ^A	-4%
4	29,61 \pm 8,17 ^A	33,66 \pm 0,62 ^A	-12%

*Para os grupos E1 e E3, a solução contendo ferro foi adicionada ao pó de esmalte bovino antes da exposição à bebida carbonatada ou descarbonatada (Sprite Zero[®]), respectivamente. Para os grupos E2 e E4, o ferro foi adicionado diretamente à bebida carbonatada ou descarbonatada, respectivamente.

** Para os grupos C1 e C3, os experimentos E1 e E3 foram repetidos, mas a solução de ferro foi substituída por água deionizada. Para os controles C2 e C4, a bebida carbonatada ou descarbonatada, respectivamente, foi usada, sem adição de ferro.

*** os sinais + e -, indicam, respectivamente, aumento e diminuição das taxas de dissolução dos grupos experimentais quando comparado ao grupo controle correspondente.

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre o grupo experimental e seu respectivo controle.

5.2 Subprojeto 1

A quantidade de fosfato liberado foi normalizado para o valor de um (100%), representando o fosfato liberado pelas amostras controle na ausência do ferro. As **Tabelas 2 e 3** mostram a quantidade média de fosfato liberado e normalizado a partir do pó de esmalte dissolvido em função de concentrações crescentes do ferro adicionadas à Coca-Cola[®] e Sprite Zero[®], respectivamente. Para a Coca-Cola[®], a adição de ferro até 15 mmol/L não teve efeito na diminuição da dissolução do pó de esmalte. As concentrações de 30 e 60 mmol/L de ferro reduziram a dissolução do pó de esmalte em 11 e 17%, respectivamente, e essa redução foi significativa quando comparada ao controle.

Considerando-se a Sprite Zero[®], nenhuma inibição da dissolução foi encontrada até 10 mmol/L de ferro. Entretanto, para concentrações maiores, houve aumento significativo na dissolução do pó de esmalte.

Tabela 2 – Quantidade média de fosfato (μg) liberado para o meio (\pm DP) e dados normalizados a partir do pó de esmalte dissolvido, em função do aumento da concentração de ferro adicionado à Coca-Cola[®].

Concentração de ferro (mmol/L)	Quantidade de fosfato liberado (μg)	Dados normalizados
0	23,74 \pm 0,39	1,00 \pm 0,02
1,25	23,42 \pm 0,60	0,99 \pm 0,02
2,5	23,04 \pm 0,81	0,97 \pm 0,04
5	22,53 \pm 0,84	0,95 \pm 0,01
10	22,30 \pm 0,88	0,96 \pm 0,04
15	23,05 \pm 1,52	1,00 \pm 0,06
30	20,47 \pm 0,39	0,89 \pm 0,02*
60	19,07 \pm 0,57	0,83 \pm 0,02*

*Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Quantidade média de fosfato (μg) liberado para o meio (\pm DP) e dados normalizados a partir do pó de esmalte dissolvido, em função do aumento da concentração de ferro adicionado à Sprite Zero[®].

Concentração de ferro (mmol/L)	Quantidade de fosfato liberado (μg)	Dados normalizados
0	33,39 \pm 0,47	1,00 \pm 0,02
1,25	32,12 \pm 0,20	0,96 \pm 0,01
2,5	32,82 \pm 0,19	0,98 \pm 0,01
5	32,78 \pm 0,25	0,98 \pm 0,01
10	33,99 \pm 0,17	1,02 \pm 0,01
15	35,14 \pm 0,45	1,04 \pm 0,02*
30	37,90 \pm 0,68	1,13 \pm 0,03*
60	38,58 \pm 0,35	1,15 \pm 0,01*

*Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.3 Subprojeto 2

5.3.1 Avaliação do pH, capacidade tampão e concentração de fosfato e flúor na bebida

Mesmo após a adição de ferro (10mmol/L) à Coca-Cola[®], seu pH permaneceu inalterado (2,1). O volume de 0,2 mol/L de NaOH necessário para mudar o pH da bebida para 5,5 e 7 foi 300 e 500 μL , respectivamente. A concentração de flúor na bebida foi 0,55 mg/L.

5.3.2 Perfilometria

As superfícies de esmalte bovino ficaram visivelmente alteradas após as condições erosivas, ficando nítida a diferença de translucidez entre as mesmas (Figuras 26, 27 e 28).



Figura 26

Figura 27

Figura 28

Figura 26 - Superfície do esmalte bovino antes do processo erosivo (aumento 40 X).

Figura 27 - Superfície do esmalte bovino após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X). **Figura 28** - Superfície do esmalte bovino após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).

O grupo experimental apresentou um desgaste médio (\pm EP) de $2,258 \pm 0,221 \mu\text{m}$, que foi significativamente menor ($t=3,669$, $p=0,0006$) que o observado para o grupo controle ($3,475 \pm 0,248 \mu\text{m}$).

5.3.3 Microdureza superficial

Após as condições de erosão, pôde-se observar em todos os espécimes o aumento no tamanho das endentações e uma diminuição do polimento em relação ao esmalte hígido (Figuras 29, 30 e 31).

**Figura 29****Figura 30****Figura 31**

Figura 29 - Endentação na superfície do esmalte hígido. Observa-se superfície lisa e o tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 30** - Endentação na superfície do esmalte após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 31** - Endentação na superfície do esmalte após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).

Com relação à %PDS, o grupo experimental apresentou valores médios (\pm EP) de $-85,3\pm 0,9$, que foram significativamente maiores ($t= 4,742$, $p<0,0001$) que os observados para o grupo controle ($-76,7\pm 1,6$).

5.4 Subprojeto 3

5.4.1 Perfilometria do esmalte

O grupo experimental apresentou um desgaste médio (\pm EP) de $2,8\pm 0,6$ μm , significativamente menor ($t=2,327$, $p=0,1841$) que o observado para o grupo controle ($5,8\pm 1,0$ μm).

O esmalte humano ficou com a superfície visivelmente alterada após a ação erosiva com a Coca-Cola[®], contendo ou não ferro Figuras 32, 33 e 34).

**Figura 32****Figura 33****Figura 34**

Figura 32 - Divisão da superfície do esmalte humano antes do processo erosivo (aumento 10 X). **Figura 33** - Superfície do esmalte humano após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X). **Figura 34** - Superfície do esmalte humano após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).

5.4.2 Microdureza superficial do esmalte

A %PDS média (\pm EP) do grupo experimental ($-82,8 \pm 2,5$) foi menor que do grupo controle ($-88,3 \pm 1,3$). Entretanto, a diferença entre os grupos não foi significativa ($t=2,185$, $p=0,0567$).

Após as condições de erosão, pôde-se observar em todos os espécimes o aumento no tamanho das endentações e uma diminuição do polimento em relação ao esmalte hígido, devido à ação erosiva do refrigerante (Figuras 35, 36 e 37).

**Figura 35****Figura 36****Figura 37**

Figura 35 - Endentação na superfície do esmalte humano hígido. Observa-se superfície lisa e o tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 36** - Endentação na superfície do esmalte humano após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 37** - Endentação na superfície do esmalte humano após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).

5.4.3 Perfilometria da dentina

O grupo experimental apresentou um desgaste médio (\pm EP) de $4,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$, que foi significativamente menor ($t=3,465$, $p=0,0071$) que o observado para o grupo controle ($1,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$).

A dentina ficou com a superfície visivelmente alterada após a ação erosiva com a Coca-Cola[®], contendo ou não ferro (Figuras 38, 39 e 40).

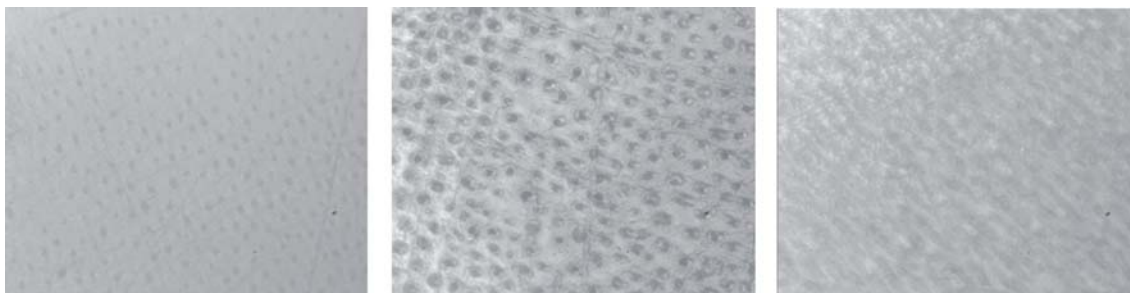
**Figura 38****Figura 39****Figura 40**

Figura 38 - Superfície dentina humana antes do processo erosivo (aumento 40 X). **Figura 39** - Superfície da dentina humana após o processo erosivo do grupo controle (aumento 40 X). **Figura 40** - Superfície da dentina humana após o processo erosivo do grupo experimental (aumento 40 X).

5.4.4 Microdureza superficial da dentina

A %PDS média (\pm EP) do grupo experimental ($-71,6 \pm 3,9$) foi significativamente maior ($t=2,34$, $p=0,044$) que a do grupo controle ($-64,9 \pm 2,1$).

Os dados de desgaste e perda de dureza do esmalte e da dentina podem ser verificados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Desgaste e porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) no esmalte e na dentina após erosão pela Coca-Cola[®], adicionando ou não ferro a 10 mmol/L à bebida.

Grupos	Variáveis	Condição experimental	
		Coca-Cola [®] sem ferro	Coca-Cola [®] com ferro
Esmalte	%PDS	-88,3±1,3 ^a	-82,8±2,5 ^a
	Desgaste (µm)	5,8±1,0 ^a	2,8±0,6 ^b
Dentina	%PDS	-64,9±2,1 ^a	-71,6±3,9 ^b
	Desgaste (µm)	4,8±0,8 ^a	1,7±0,7 ^b

Média±EP. Letras distintas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos com $p < 0,05$.

Após as condições de erosão, pôde-se observar em todos os espécimes o aumento no tamanho das endentações e uma diminuição do polimento em relação à dentina hígida, devido à ação erosiva do refrigerante (Figuras 41, 42 e 43).



Figura 41

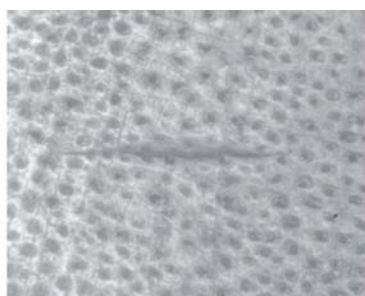
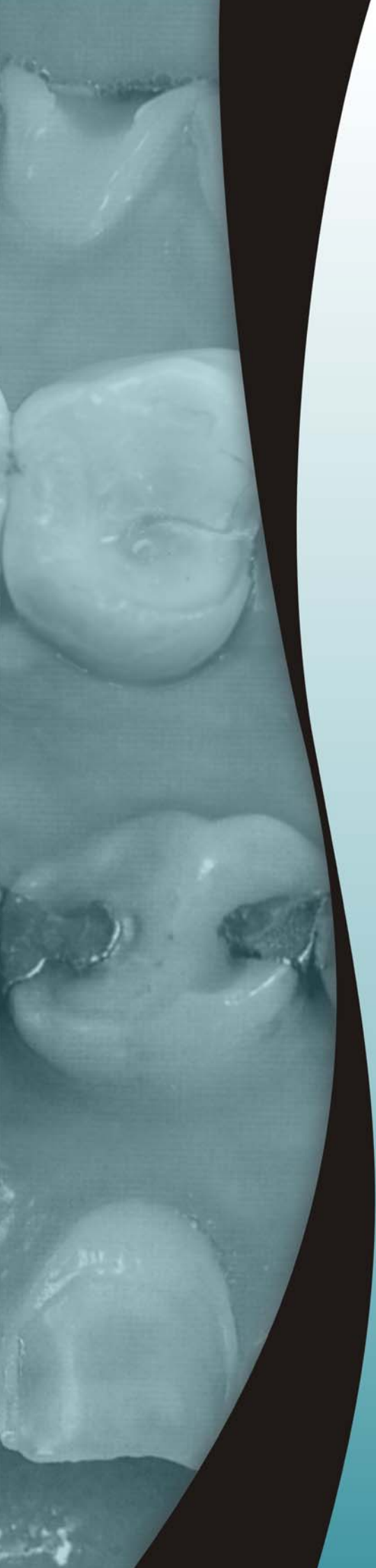


Figura 42



Figura 43

Figura 41 - Endentação na superfície da dentina humana hígida. Observa-se superfície lisa e os túbulos dentinários e o tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 42** - Endentação na superfície da dentina humana após a condição erosiva do grupo controle. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X). **Figura 43** - Endentação na superfície da dentina humana após a condição erosiva do grupo experimental. Observa-se a alteração da superfície e do tamanho da endentação (aumento de 40X).



Discussões

6 Discussões

O consumo excessivo de bebidas e outros produtos de baixo pH vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, em função de novos hábitos dietéticos e estilo de vida da população (JARVINEN; RYTOMAA; HEINONEN⁶⁷, 1991). No Brasil, o consumo de refrigerantes aumentou em 490% de 1995 a 2003 (IBGE⁶³, 2004). O baixo pH, o tipo de ácido e outros produtos químicos presentes nas bebidas são fatores que contribuem para a dissolução dos tecidos dentários duros. Assim, a modificação na formulação destes produtos seria uma opção para a prevenção da erosão dentária, que, no entanto, não tem sido totalmente explorada, pois poderia modificar o sabor dos alimentos e o pH.

Muitos estudos têm sugerido suplementar bebidas com íons, como o cálcio, fosfato e flúor na tentativa de torná-las mais saturadas em relação aos minerais presentes no dente, tentando, com isso, reduzir o seu potencial erosivo (WEST et al.¹³⁷, 1999; HUGHES et al.^{57 e 58}, 1999; HUGHES et al.⁵⁵ 2002; ATTIN et al.¹², 2003; HUNTER et al.⁶⁰, 2003; ATTIN et al.¹³, 2005; ATTIN⁸, 2006).

A adição de cálcio e fosfato tem mostrado resultados favoráveis (WEST et al.¹³⁷, 1999; HUGHES et al.^{57 e 58}, 1999; HUGHES et al.⁵⁵ 2002; ATTIN et al.¹², 2003; HUNTER et al.⁶⁰, 2003; ATTIN et al.¹³, 2005; ATTIN⁸, 2006), mas a adição de flúor tem mostrado bons resultados somente em concentrações tóxicas (ZIPKIN; MCCLURE¹⁴⁴, 1949; SPENCER; ELLIS¹²⁵, 1950; FUKS et al.³⁷, 1973; SHABAT et al.¹¹⁸, 1975; SORVARI; KIVIRANTA; LUOMA¹²⁴, 1988; SORVARI¹²³, 1989; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR⁵, 1998; DUARTE; COELHO; LESSA³³, 1999; LARSEN⁷³, 2001; LARSEN; RICHARDS⁷⁵, 2002; HUGHES; WEST; ADDY⁵⁶, 2004), o que exigiria um controle e monitoramento mais cauteloso, pelo risco de sobreconsumo (GRENBY⁴⁵, 1996).

Algumas investigações concluíram que o flúor não poderia exercer influência na desmineralização após um desafio erosivo. LARSEN; RICHARDS⁷⁵, 2002, compararam a capacidade erosiva de algumas bebidas de

frutas frescas ou saturadas com CaF_2 , com resultados prévios de algumas bebidas carbonatadas. Concluíram que tanto as bebidas carbonatadas quanto as não carbonatadas, não são apenas erosivas, mas também capazes de dissolver e remover o fluoreto de cálcio depositado pela aplicação tópica de flúor. Mostraram também que o flúor não é capaz de ter um efeito preventivo contra a erosão, tanto incorporado ao esmalte, como fluoreto de cálcio, quanto fazendo parte da formulação da bebida.

Na literatura, a ação do flúor na erosão dentária tem sido apresentada de forma controversa (SPENCER; ELLIS¹²⁵, 1950; HOLLOWAY; MELLANBY; STEWART⁵³, 1985; MEURMAN; TEN CATE⁹¹, 1996). Devido à ação ocorrer de forma combinada com outros íons da hidroxiapatita (cálcio e fosfato) e em concentrações saturantes em relação à fluorapatita, não parece provável que o flúor sozinho tenha a capacidade de suprimir a erosão (LARSEN; VON DER FEHR; BIRKELAND⁷⁶, 1976). FUSHIDA; CURY³⁸, 1999, relataram que ao considerar o fato de que o pH dos refrigerantes é inferior a quatro, nem o flúor incorporado ao dente, nem o presente no meio, afetariam o grau de subsaturação da solução com relação aos tecidos dentários. Por outro lado, haveria necessidade de uma concentração muito alta nas bebidas para que houvesse uma ação de proteção contra a desmineralização (LARSEN; RICHARDS⁷⁵, 2002). Assim, o custo-benefício dessa incorporação seria muito pequeno e possibilitaria o desenvolvimento de fluorose dentária, devido à intoxicação crônica pelo flúor ingerido durante o período de formação dos dentes (FEJERSKOV³⁵, 1996). Portanto, mais estudos são necessários para se esclarecer esse problema. É possível que o aumento da concentração de flúor na bebida possa contribuir para reduzir o potencial erosivo dos refrigerantes, mas por outro lado, isso poderia acarretar um aumento na incidência de fluorose, o que tornaria essa opção inviável.

Entre os possíveis candidatos para esta modificação na formulação encontram-se os íons metálicos, especialmente o ferro. O efeito inibitório de íons metálicos na desmineralização ácida já tinha sido investigado (BUNDY; BUTLER; HOCHMAN²⁵, 1980). Os possíveis mecanismos pelo qual isto ocorre incluem redução da solubilidade do esmalte em ácidos (TORELL¹³¹, 1988),

redução da acidogenicidade da placa dentária (OPPERMAN; ROLLA¹⁰⁶, 1980), efeito bactericida e bacteriostático nos estreptococos mutans (DUNNING; MARQUIS³⁴, 1998) e redução na atividade das glicosiltransferases dos estreptococos mutans (WUNDER; BOWEN¹⁴¹, 1999; DEVULAPALLE; MOOSER³¹, 2001). Tem-se relatado ainda que este íon é capaz de inibir a dissolução da apatita sintética (BROOKES et al.²¹, 2004) e do pó de esmalte bovino (BUZALAF et al.²⁷, 2006) quando adicionado a uma solução de ácido acético, num modelo abiótico que simula desafio erosivo.

Ainda em relação à influência do ferro no processo erosivo, SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007, num estudo *in situ*, concluíram que um bochecho à base de sulfato ferroso 10 mmol/L reduziu o efeito erosivo de bebida carbonatada (Coca-Cola[®]) sobre o esmalte e dentina humanos. Neste trabalho, aventou-se a possibilidade de adição do ferro diretamente a bebidas ácidas como uma forma de se reduzir o seu potencial erosivo, o que foi tema do presente estudo.

Inicialmente, a bebida de escolha para a realização dos experimentos foi a Sprite Diet[®], por ser uma bebida carbonatada com maior capacidade tampão (SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007), significando, com isso, possuir grande poder de desmineralização dentária. Contudo, sendo a bebida carbonatada de nome comercial Coca-Cola[®] considerada a preferência de consumo entre os refrigerantes, e por possuir considerável poder erosivo, similar ao da Sprite Diet[®], devido ao seu baixo pH (SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007), decidiu-se avaliar o efeito do ferro na inibição da desmineralização provocada pelos dois tipos de bebidas, no primeiro subprojeto. Comercialmente, a Sprite Diet[®] foi substituída pela Sprite Zero[®]. Já que SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a Sprite Diet[®] e a Coca-Cola[®] em relação à %PDS, para o segundo e terceiro subprojetos foi avaliada a ação do ferro quando adicionado somente à Coca-Cola[®]. Além disso, a Sprite Zero[®] não apresentou resultados favoráveis com relação à proteção e/ou inibição da desmineralização (subprojeto 1). Ao contrário, em concentrações a partir de 10 mmol/L, o ferro inclusive proporcionou um aumento na liberação de fósforo a partir do pó de esmalte.

O mecanismo envolvido nessa proteção do ferro contra a dissolução mineral ainda não é completamente entendida. É possível a formação de uma fina camada ácido-resistente de óxido de ferro na superfície mineral do esmalte ser um possível fator (TORELL¹³¹, 1988). Outras explicações possíveis podem ser sugeridas, como: a participação na remineralização do esmalte e na nucleação da apatita (BACHRA; VAN HARKAMP¹⁵, 1970; RAO¹⁰⁹, 1974), substituição do cálcio na apatita (RAO¹⁰⁹, 1974; OKASAKI; TAKAHASHI; KIMURA¹⁰³, 1985), concentração aumentada das lesões de cáries remineralizadas de dentina e esmalte (TAKUMA; OGIWARA; SUZUKI¹²⁷, 1975; DRIESSENS et al.³², 1986) e inibição da desmineralização (BACHRA; VAN HARKAMP¹⁵, 1970).

Um achado interessante deste estudo foi a diferença de comportamento das duas bebidas testadas na presença do ferro. Enquanto que altas concentrações de ferro na Coca-Cola[®] reduziram significativamente a dissolução do pó de esmalte, as mesmas concentrações, quando adicionadas à Sprite Zero[®], aumentaram a dissolução do pó de esmalte. É difícil explicar essa diferença, mas é possível que o distinto tipo de ácido presente em ambos os refrigerantes possa ter uma implicação no mecanismo pela qual o ferro interage com os minerais do dente, já que a Sprite Zero[®] possui ácido cítrico e a Coca-Cola[®], ácido fosfórico. A literatura é contraditória com relação ao potencial erosivo das bebidas contendo esses ácidos. Alguns estudos mostram que bebidas contendo ácido cítrico são mais erosivas que aquelas contendo ácido fosfórico, já que nestas, a presença do fósforo aumentaria a saturação da solução em relação à apatita (MILLER⁹⁵, 1952; BIBBY; MUNDORFF¹⁹, 1975; HOLLOWAY; MELLANBY; STEWART⁵³, 1985). Outros estudos, entretanto, têm mostrado o oposto (STEPHAN¹²⁶, 1966; IMFELD⁶⁴, 1983). Um ponto que merece atenção é que alguns ácidos orgânicos podem quelar íons inorgânicos. Então, pode ser possível que o ferro tenha sido quelado pelo ácido cítrico, reduzindo seu efeito protetor quando adicionado à Sprite Zero[®]. Em adição, ATTIN et al.⁹, 2004, reportaram que o ácido cítrico (CitH₃) é capaz de formar complexos quelando o cálcio (Ca²⁺), provocando queda do pH pelo aumento de H⁺, de acordo com a seguinte equação: $2\text{CitH}_3 + \text{Ca}^{2+} = (\text{CaCit}_2)^{4-} + 6\text{H}^+$. Apesar do pH da Sprite Zero[®] não ter sido mensurado depois da adição de

ferro, pode-se especular que o aumento significativo na dissolução do esmalte em altas concentrações de ferro tenha ocorrido devido a esse mecanismo.

De acordo com os resultados do subprojeto 1, mesmo para a Coca-Cola[®] não foi observada uma redução percentual importante (embora tenha havido diferença significativa entre os tratamentos) na desmineralização do pó de esmalte quando o ferro foi adicionado. BUZALAF et al.²⁷, 2006, utilizando metodologia semelhante, mostraram que a adição de ferro a 15 mmol/L em uma solução de ácido acético a 10 mmol/L seria capaz de inibir em cerca de 50% a desmineralização do pó de esmalte bovino, sendo que concentrações maiores de ferro não teriam um efeito adicional importante nesta inibição. O mesmo efeito foi observado por BROOKES et al.²¹, 2004. A ausência de uma proteção importante no presente estudo, quando comparada com os dois estudos acima citados, pode ser devida ao fato de que outros componentes presentes nas bebidas podem ter interferido na ação do ferro. Em adição, o estudo *in situ* de SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007, mostrou que a realização de um bochecho com solução de sulfato ferroso a 10 mmol/L, após desafio erosivo com Coca-Cola[®] e antes da escovação, foi capaz de reduzir o desgaste, aumentando a microdureza em blocos de esmalte e diminuindo a perda de massa em blocos de dentina humanos. É possível que no presente estudo, o fato de ter sido usado pó de esmalte, com uma área superficial de contato ampla, tenha potencializado a ação erosiva das bebidas, diminuindo o efeito protetor do ferro na inibição da desmineralização. Foi levantada a hipótese de que, quando da utilização de blocos de esmalte bovino, este efeito protetor pudesse também ser observado, devido à existência de uma menor área de contato entre a bebida e o substrato dentário. Assim, no subprojeto 2, foi testado o sulfato ferroso a 10 mmol/L adicionado à Coca-Cola[®] no grupo experimental, empregando-se como substratos blocos de esmalte dentário.

No subprojeto 2, após a ação erosiva do refrigerante foi utilizada saliva artificial para remineralização. Tem sido demonstrada a ação da saliva como agente efetivo para o reendurecimento do esmalte dentário amolecido, em vários estudos *in vitro* (RYTOMAA et al.¹¹⁴, 1988; ATTIN; ZIRKEL; HELLIWIG¹⁴, 1998; ATTIN et al.¹⁰, 2000) e *in situ* (FUSHIDA; CURY³⁸, 1999; AMAECHI;

HIGHAM⁴, 2001; RIOS et al.¹¹¹, 2006). A saliva artificial foi utilizada no lugar da saliva humana para minimizar a influência possivelmente exercida pela variação na composição da saliva humana coletada de diferentes fontes, bem como, a dificuldade em coletar cerca de 8 litros de saliva que seriam utilizados no estudo.

A saliva artificial (VIEIRA et al.¹³⁵, 2005) também foi utilizada 24 horas antes do experimento para reidratação do esmalte. Porém, estudos têm sugerido a utilização da saliva artificial antes do processo de des-remineralização, como forma de se formar película adquirida. A formação da película adquirida neste caso, serviria como barreira mecânica da erosão dentária, como confirmada em vários estudos (MEURMAN; FRANK⁸⁹, 1991; AMAECHI et al.⁶, 1999; HARA et al.⁵¹, 2003; NEKRASHESVYCH; STÖSSER¹⁰⁰, 2003; HARA et al.⁵⁰, 2006; HONÓRIO⁵⁴, 2006;). A saliva utilizada no presente estudo não contém proteínas em sua formulação, desta forma, foi houve formação de película adquirida. Assim, é possível que os resultados erosivos obtidos estejam superestimados quando se pensa na situação clínica.

À primeira vista, os resultados encontrados no subprojeto 2 para as variáveis perfilometria e % PDS parecem contraditórios, já que a utilização do ferro reduziu significativamente o desgaste, mas aumentou significativamente a % PDS, quando comparado ao controle. Na verdade, à luz dos mecanismos propostos para a reação do ferro com o esmalte dentário e seu efeito inibidor da desmineralização, estes resultados não se contradizem. Tem sido relatado que quando o esmalte é incubado com soluções de sais férricos, superfícies de esmalte ácido-resistentes são estabelecidas, devido à precipitação de fosfatos férricos sobre a superfície do esmalte, pela combinação dos íons férricos com os íons fosfato dissolvidos da superfície do esmalte (TORELL¹³¹, 1988). A formação desta barreira de fosfato férrico também foi sugerida em estudos *in situ* recentes, simulando uma situação de alto desafio cariogênico (MARTINHON et al.⁸⁶, 2006), bem como um desafio erosivo ou erosivo/abrasivo (SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007). A formação desta barreira de fosfato férrico vem de encontro aos resultados do presente estudo, já que, uma vez formada, esta barreira reduziria o contato do refrigerante com o esmalte nos desafios ácidos subseqüentes. Devido a isto,

acredita-se ter sido observada uma redução no desgaste dos blocos de esmalte quando o ferro foi utilizado. Por outro lado, a formação deste composto sobre a superfície do esmalte alteraria a microdureza superficial, já que, quando o teste é realizado, o penetrador entraria em contato não apenas com apatita (do esmalte), mas também com o fosfato férrico formado. Isto explicaria a redução na % PDS observada quando o ferro foi utilizado. Para confirmação desta hipótese, seria necessária a análise do conteúdo de cálcio, fósforo e ferro na superfície do esmalte, o que poderia ser feito por meio de análise de energia dispersiva de raio-X (MEV-EDS), bem como a análise do tipo de composto formado na superfície, através de difração de raios-X (DRX), ou ainda por meio de espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier.

No subprojeto 1, somente altas concentrações de ferro (30 e 60 mmol/L) reduziram significativamente a perda mineral na dissolução do esmalte pela Coca-Cola[®]. Do ponto de vista prático, a adição dessa alta concentração de ferro na bebida não seria viável, uma vez que alteraria o gosto da bebida. Entretanto, o substrato dentário testado foi o pó de esmalte bovino, o qual possui uma área superficial maior, quando comparado aos blocos de esmalte. Isso poderia interferir na reação da bebida com o esmalte, facilitando a desmineralização. Por essas razões, foi hipotetizado que talvez fosse possível encontrar efeito favorável do ferro na redução da perda do esmalte pela Coca-Cola[®], utilizando uma concentração menor. Essa hipótese foi confirmada, pois o uso de ferro a 10 mmol/L reduziu significativamente o desgaste dos blocos de esmalte, quando comparado à bebida sem ferro.

Os modelos *in vitro* são muito importantes para determinar as características químicas erosivas de diversas bebidas (LUSSI; JAEGGI; SCHARER⁸¹, 1993; LUSSI; JAEGGI; JAEGGI-SCHARER⁸⁰, 1995; GRANDO et al.⁴³, 1996; ZERO¹⁴², 1996; AMAECHI et al.⁶, 1999; LARSEN; NYVAD⁷⁴, 1999; O'SULLIVAN; CURZON¹⁰⁴, 2000; BRUNTON; HUSSAIN²³, 2001; HUGHES; ADDY¹³⁶, 2001; BURATTO et al.²⁶, 2002; LUSSI; JAEGGI; ZERO⁸², 2004; SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007), mas não são capazes de simular os vários fatores que agem na boca para equilibrar a ação dos ácidos exógenos, tais como a saliva e a película adquirida.

Já os modelos *in situ* permitem simular eventos intrabucais e simultaneamente padronizar as condições experimentais. Em curto intervalo de tempo, permitem o desenvolvimento de alterações nos espécimes, em função do desafio erosivo (JAEGGI; LUSI⁶⁶, 1999; HUGHES et al.⁵⁵, 2002; ATTIN et al.⁹, 2004; HONÓRIO⁵⁴, 2006; RIOS et al.¹¹¹, 2006; MAGALHÃES et al.⁸⁴, 2007; SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007).

Sendo assim, o modelo *in situ* foi escolhido pela melhor simulação do fenômeno *in vivo*, além de complementar os dados obtidos na primeira parte desenvolvida, que foi *in vitro*.

Em relação ao número de voluntários para um estudo *in situ*, não existem regras rígidas (ZERO¹⁴³, 1995). Com base em outros trabalhos de erosão (AMAECHI; HIGHAM⁴, 2001, ATTIN et al.⁹, 2004; HONÓRIO⁵⁴, 2006; RIOS, et al.¹¹¹, 2006; MAGALHÃES et al.⁸⁴, 2007; SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007), nos quais foi utilizado o mesmo modelo, adotou-se uma amostra de 10 indivíduos.

A duração de cada etapa foi formulada a partir dos achados de WEST et al.¹³⁸, 1998; HUGHES et al.⁵⁵, 2002; SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007, que demonstraram que 5 dias de desafio erosivo, com a utilização da bebida 4 vezes ao dia, já eram suficientes para se detectar desgaste dentário. Nos estudos de WEST et al.¹³⁸, 1998; SALES-PERES et al.¹¹⁵, 2007, foram realizados 5 dias em cada etapa com um período de *wash-out* de 7 dias entre as fases. Segundo ZERO¹⁴³, 1995, umas das maiores dificuldades relatadas dos modelos *in situ* é a colaboração e o seguimento do protocolo pelos voluntários. Para tentar minimizar este viés, optou-se por não haver o período de *wash-out*, pois o período compreendido entre as duas etapas permaneceria entre feriados nacionais prolongados. Caso fosse realizado o intervalo, ficaria dificultada a realização do experimento por parte dos voluntários. Como não foi realizado o *wash out*, estabeleceu-se que todos os voluntários deveriam, na primeira etapa *in situ*, utilizar o refrigerante sem a adição de ferro, a fim de se evitar um possível efeito residual deste.

A frequência de 4 imersões diárias do aparelho, na bebida ácida por

5 minutos, vai de encontro a dados anteriores da literatura (WEST et al.¹³⁸, 1998; HUGHES et al.⁵⁵, 2002; HUNTER et al.⁶⁰, 2003; SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007), Em estudo *in vitro*, MEURMAN et al.⁹⁰, 1990, demonstraram que o tempo de 5 minutos de imersão do esmalte em bebida à base de cola promoveu uma desmineralização significativa, enquanto que o tempo de 1 minuto não causou desmineralização. Por essa razão, adotou-se o tempo de imersão na bebida de 5 minutos.

Para que a dentição dos voluntários não fosse exposta ao desgaste erosivo, bem como os voluntários não fossem submetidos a uma possível toxicidade promovida pelo ferro, estando de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa, optou-se pela imersão do dispositivo palatino na bebida fora da boca, o que também foi realizado por ATTIN et al.¹¹, 2001. Esta forma de utilização do refrigerante não seria a mais adequada para simular o que ocorre na boca, pois durante a ingestão, há uma diluição da bebida pela saliva e ação do tampão bicarbonato (DAWES; MACPHERSON²⁹, 1992). Além disso, a bebida ácida gera um aumento do fluxo salivar da glândula parótida, que retorna a níveis normais após 6 minutos e provoca uma queda no pH, abaixo do valor crítico, por aproximadamente 2 minutos (MILLWARD et al.⁹⁶, 1997).

Não há evidências conclusivas quanto à influência do biofilme dentário no fenômeno erosivo. Existe a hipótese de que a erosão ocorre em superfícies onde não há desenvolvimento de biofilme dentário. Por outro lado, relata-se que o próprio biofilme dentário poderia influenciar como barreira de difusão de ácidos, diminuindo o progresso da erosão (O'SULLIVAN; CURZON¹⁰⁴, 2000; HONÓRIO⁵⁴, 2006;). Devido a estes fatores, os estudos *in situ* relacionados à erosão procuram eliminar o biofilme dentário dos espécimes, para que não haja dúvida de que as alterações superficiais resultantes tenham sido provocadas pela erosão e não pela cárie (RIOS et al.¹¹¹, 2006). O presente estudo não utilizou nenhum método para promover remoção do biofilme dentário formado nos espécimes, como a escovação, pois poderia provocar abrasão pela ação mecânica da escova. Além disso, cada etapa do experimento durou apenas 5 dias, o que afasta a hipótese de desmineralização provocada por cárie. Portanto, os voluntários, foram

orientados a fazerem a higienização bucal normalmente, e ao final do dia, antes de dormirem, poderiam escovar o dispositivo palatino apenas da face que fica em contato com o palato.

Estudos *in situ*, utilizando dispositivos intrabucais são reconhecidos como uma alternativa viável entre as limitações dos estudos *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo procurou-se estabelecer uma relação entre o grupo experimental (com ferro) e controle (sem ferro) e dois tipos de substrato (esmalte e dentina). Para isso foi utilizado um dispositivo palatino removível. A vantagem deste dispositivo é que os espécimes ficam localizados próximos à face lingual dos incisivos centrais superiores, correspondente aos dentes com maior incidência e severidade de erosão, simulando, dessa forma, a região mais susceptível à lesão (FUSHIDA; CURY³⁸, 1999). A desvantagem se relaciona à ação da língua, pois os espécimes podem sofrer uma carga adicional de desgaste pela abrasão oriunda do contato lingual (JARVINEN; RYTOMAA, HEINONEN⁶⁷, 1991). Para diminuir essa interferência, foram tomadas algumas medidas. Inicialmente os espécimes foram posicionados na região de canino, portanto para posterior da papila incisiva, região correspondente ao local de repouso da língua, ou seja, quando o indivíduo não está falando, normalmente posiciona a ponta da língua na papila incisiva (RIOS et al.¹¹¹, 2006). Os voluntários foram orientados a evitarem posicionar a ponta da língua sobre os espécimes, bem como a não ficarem tateando os blocos de esmalte e dentina com a língua.

O dispositivo palatino removível pode resultar em diferenças no acesso da saliva e formação da película adquirida. A capacidade da saliva em remineralizar o esmalte dentário submetido à erosão foi avaliada por AMAECHI; HIGHAM⁴, 2001. Diferentes locais da boca foram analisados, e os espécimes posicionados por palatino sofreram menor remineralização do que os espécimes por lingual. Em controvérsia, o modelo utilizado neste estudo pressupõe uma ação maior da glândula parótida, já que NIEW-AMERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN¹⁰¹, 1987, suscitaram a hipótese de que a glândula parótida apresenta maior ação sobre os dentes superiores, o que pressupõe uma menor capacidade protetora, por apresentar uma pequena quantidade de mucina. Os espécimes posicionados mais próximos ao ducto da parótida, na

área do primeiro molar superior, poderiam resultar em diferença no acesso à saliva. Portanto, tomou-se o cuidado no posicionamento dos espécimes, alterando-se a localização correspondente aos grupos em fileira horizontal diferente.

A saliva e a película adquirida são os principais aspectos de um modelo *in situ*. O tempo necessário para formação da película adquirida é muito questionável na literatura. AMAECHI et al.⁶, 1999, propuseram o período de 1 hora para a formação da película adquirida. FUSHIDA; CURY³⁸, 1999, instalaram os dispositivos 2 horas antes do início do experimento. HONÓRIO⁵⁴, 2006; RIOS et al.¹¹¹, 2006; SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁵, 2007, instalaram 8 horas antes. Este estudo propôs aos voluntários para que dormissem no dia anterior ao experimento com o dispositivo e na manhã seguinte iniciassem o experimento, resultando em torno de 8 horas para formação da película adquirida, antes da primeira imersão no refrigerante. A maturação da película adquirida é importante para que ela exerça ação protetora diante um ataque erosivo. Esta maturação ocorre em um tempo médio de 24 horas (NIEW-AMAERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN¹⁰¹, 1987; HANNING, BALZ⁴⁹, 1999; AMAECHI; HIGHAM⁴, 2001). Portanto, a função protetora da película adquirida deve ser considerada neste estudo *in situ*. A renovação e maturação da película adquirida vai variar em função da frequência da ingestão de alimentos e bebidas e da escovação do indivíduo. Por esse motivo, o intervalo mínimo entre duas imersões foi estipulado em 2 horas (SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007), possibilitando a formação da película, mas não sua maturação.

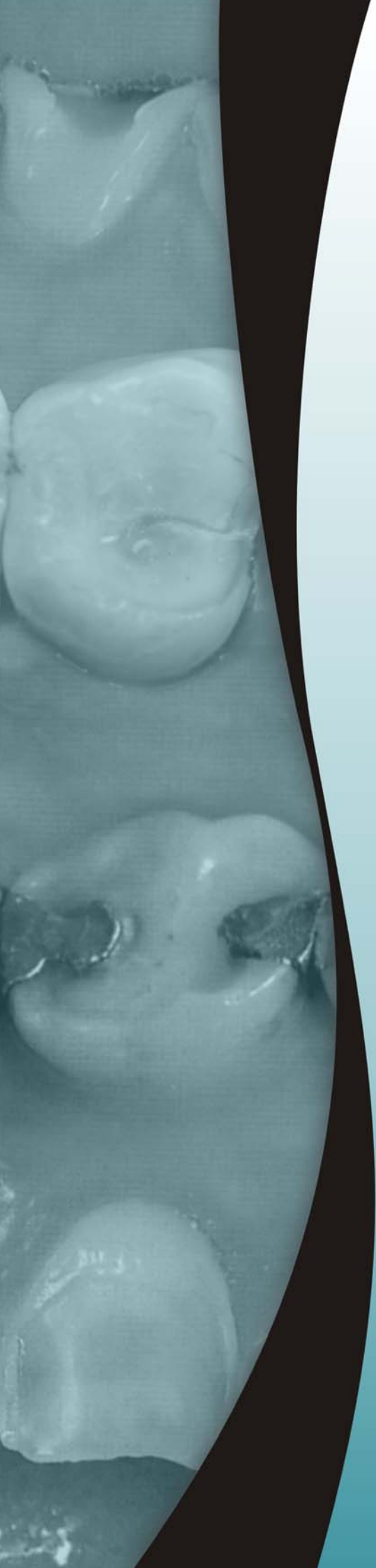
No subprojeto 3, a adição de ferro a 10 mmol/L à Coca-Cola[®], reduziu significativamente o desgaste, tanto em esmalte quanto em dentina. Estes dados confirmam os obtidos no estudo *in vitro* (subprojeto 2) para o esmalte. O fato de o efeito protetor do ferro contra o desgaste ter sido maior para a dentina que para o esmalte também foi observado por SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹¹⁶, 2007, que avaliaram uma medida preventiva utilizando o bochecho com a solução de FeSO₄ a 10 mmol/L para aumentar a ação remineralizadora e diminuir o desgaste do esmalte e da dentina submetidos a

condições de erosão provocada pela Coca-Cola[®], associada ou não à abrasão. Esta diferença pode ser devida às diferentes composições do esmalte e da dentina. Na dentina, a erosão parece ser mais que um fenômeno de superfície (GANSS et al.⁴⁰, 2001). Estudos com microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica têm mostrado que a desmineralização da dentina torna-se aparente inicialmente na interface entre as dentinas inter e peritubular, e, com o aumento no tempo de exposição, resulta em estreitamento da parede dos túbulos, até a completa dissolução da dentina peritubular. A dentina mais interna sadia fica então seguida por uma zona de dentina parcialmente desmineralizada, que por sua vez fica recoberta por uma camada de colágeno completamente desmineralizada, correspondendo a cerca de 1/3 de espessura total da camada atacada pelo ácido (MEURMAN; DRYSDALE; FRANK⁸⁸, 1991; KINNEY et al.⁷⁰, 1995;). A presença desta camada orgânica desmineralizada pode atrapalhar a difusão iônica, interferindo na desmineralização (GANSS et al.⁴⁰, 2001). Neste sentido, tem sido demonstrado, que em dentina radicular bovina desmineralizada, apresentando uma camada de colágeno completamente desmineralizada, a perda mineral é aumentada quando as amostras são tratadas com colagenase, o que enfatiza o papel protetor desta camada de colágeno desmineralizado (KLETER et al.⁷¹, 1994). Isto foi confirmado por um estudo *in vitro* por GANSS et al.⁴⁰, 2001, que demonstraram que na dentina, a perda mineral erosiva foi relativamente alta no começo do período experimental e continuou com graus de dissolução menores. Um estudo subsequente de GREGG et al.⁴⁴, 2004, reforçou esta hipótese, já que um padrão de erosão não linear ao longo do tempo foi observado para a dentina, com menos erosão ocorrendo durante os períodos de 5 ciclos sucessivos. Após 15 ciclos erosivos, o que lembra o protocolo do presente estudo (20 ciclos), o desgaste encontrado para a dentina foi consideravelmente menor quando comparado com o esmalte, o que também foi observado no presente estudo. Também tem sido sugerido que esta camada orgânica pode ainda exibir propriedades tampão (GANSS et al.³⁹, 2004), pois poderia adsorver íons H⁺ durante um desafio erosivo, prevenindo a perda mineral da dentina mais interna. Assim, esta barreira de difusão constituída pelo colágeno deve ter sido responsável pelo menor desgaste e perda mineral sofridos pela dentina quando comparada ao esmalte.

Com relação aos dados obtidos para a %PDS no subprojeto 3, a adição de ferro à bebida carbonatada reduziu a perda mineral para o esmalte ($-82,8 \pm 2,5$), mas sem significância estatística em relação ao controle, cujo valor foi de $-88,2 \pm 1,3$ (embora o valor de p encontrado tenha sido marginal – 0,0567). No subprojeto 2 foi observado um efeito inverso, ou seja, no grupo experimental houve um aumento significativo na perda mineral ($-85,2 \pm 0,9\%$) quando comparado ao controle ($-76,7 \pm 1,6\%$). Como mencionado anteriormente, foi aventada a hipótese, no subprojeto 2, da formação de um composto sobre a superfície do esmalte, alterando a sua microdureza e interferindo com a reação do refrigerante com o mesmo, desta maneira, reduzindo o desgaste. Embora, à primeira vista, os resultados dos subprojetos 2 e 3 pareçam contraditórios, na verdade não o são, se for considerado o diferente desafio erosivo envolvido nos dois subprojetos. No subprojeto 2 foram feitos apenas 4 desafios erosivos de 10 min cada, enquanto que no 3, foram 20 desafios erosivos de 5 min cada. Assim, no subprojeto 2, o grupo controle sofreu uma perda mineral maior quando comparado ao grupo controle do subprojeto 3, o que levou a esta interpretação distinta dos resultados entre os dois subprojetos. Já o valor observado para o grupo experimental dos subprojetos 2 e 3 é bastante semelhante, o que parece confirmar a hipótese da formação de um composto, contendo ferro na superfície do esmalte. Se forem observados os resultados de %PDS obtidos para a dentina, pode-se sugerir que um composto contendo ferro também se forma sobre a sua superfície, já que a %PDS na dentina também foi significativamente maior no grupo contendo ferro.

Em resumo, os resultados do presente estudo, utilizando protocolos *in vitro* e *in situ*, mostram que a suplementação da Coca-Cola® com ferro a 10 mmol/L reduz a dissolução do esmalte e dentina na presença do refrigerante. Entretanto, os possíveis efeitos adversos da suplementação com ferro, como pigmentação dos dentes (SALES-PERES; PESSAN; BUZALAF¹⁶, 2007), modificação no gosto da bebida e mesmo sua toxicidade, devem ser considerados, antes que a suplementação de bebidas com este íon possa ser realizada em larga escala. No International Programme on Chemical Safety⁶², evento promovido pela Organização Mundial de Saúde (WHO), foi calculada a

dose diária de ingestão máxima de ferro em 56 mg/dia (0,8 mg/Kg/dia), embora níveis menores tenham sido definidos em alguns países. Considerando que a bebida contenha 10 mmol/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, isso implica que o volume máximo a ser consumido diariamente não deveria exceder 200 mL somente. Então, seria interessante testar se concentrações menores de ferro também poderiam ser efetivas, bem como a combinação de concentrações menores de ferro com outros íons, como cálcio, fosfato e flúor, os quais têm mostrado ter efeitos promissores na inibição da dissolução da superfície dentária.

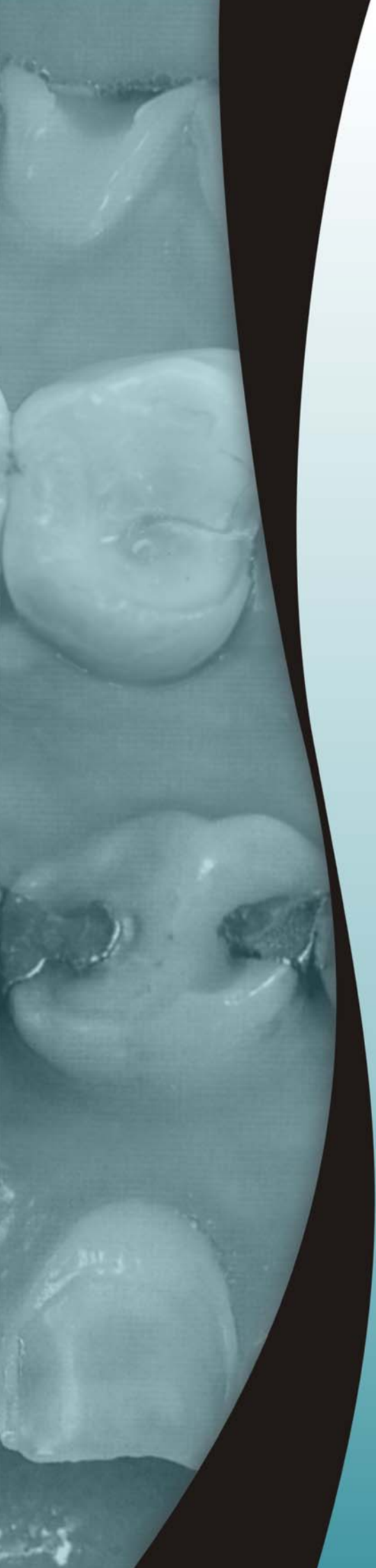


Conclusões

7 Conclusões

Baseado nas hipóteses nulas consideradas e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- No estudo piloto, a remoção do carbonato da bebida reduziu o efeito protetor do ferro na dissolução do esmalte bovino, enquanto que o momento no qual o ferro entra em contato com o esmalte influenciou no processo de desmineralização do pó de esmalte bovino.
- No primeiro subprojeto, houve inibição da dissolução do pó de esmalte dentário bovino quando o ferro foi adicionado à Coca-Cola®, mas houve um aumento na dissolução do pó de esmalte dentário bovino quando altas doses de ferro foram acrescentadas à Sprite Zero®. Portanto, o ferro pode interferir com a dissolução do pó de esmalte bovino na presença de bebidas ácidas e o tipo de ácido presente nessas bebidas parece modular esse efeito.
- No segundo subprojeto, a adição de ferro a 10 mmol/L à Coca-Cola® aumentou a perda de dureza superficial e diminuiu o desgaste dos blocos de esmalte dentário bovino *in vitro*.
- A adição de ferro a 10 mmol/L à Coca-Cola® não reduziu significativamente a perda de dureza superficial, mas reduziu significativamente o desgaste dos blocos de esmalte humano *in situ*. Já para os blocos de dentina humana, houve um aumento da perda de dureza superficial e uma redução no desgaste significativos quando da adição de ferro.
- Portanto, a primeira, segunda e terceira hipóteses nulas formuladas foram totalmente rejeitadas, enquanto que a quarta e quinta foram parcialmente rejeitadas.
- Assim, concluiu-se que o íon ferro pode reduzir a erosão de dentes bovino e humano provocada por bebidas ácidas, sendo esta ação dependente do tipo de ácido presente na bebida.



Anexos

Anexo 1



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Banco de Dentes Humanos

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru-SP - CEP:17043-101

C.P. 73 - PABX: (14) 3235-8000 - FAX: (14) 3223-4679

Termo de cessão 092006

Bauru-SP, 11 de Outubro de 2006.

Pesquisa intitulada: "Avaliação *in vitro* e *in situ* do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana"

Pesquisador responsável: Melissa Thiemi Kato

Instituição responsável: FOB-USP

Protocolo de pesquisa submetido ao CEP: FOB-USP

Espécimes /origem: Dente humano

Ilmo. Sr. **Relator** do CEP.

Cumpro com dever de informar que o BDH/FOB-USP cede e transfere na melhor forma de direito, em consonância com a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, ao pesquisador acima identificado os elementos dentários abaixo citados:

IC e IL	C	PM	M	TOTAL
0	0	0	50	50

Melissa Thiemi Kato

Fato posto, o cessionário declara que aceita a presente cessão e se compromete em ao terminar a pesquisa apresentar seus resultados para o BDH/FOB-USP que disponibiliza de modo facultativo ao sujeito da pesquisa envolvido.

Atenciosamente,

Ac. Marina Duarte Garcia

Bolsista BDH/FOB-USP

Pelo cedente

Melissa Thiemi Kato

Pesquisadora

Cessionário

Anexo 2



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

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

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)

Processo nº 130/2004

Bauru, 14 de dezembro de 2004.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação pendente referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa “**Estudo in vitro e in situ do efeito inibidor do íons ferro na erosão do esmalte dental bovino**”, de autoria de Melissa Thiemi Kato, sob sua orientação foi novamente avaliado e aprovado nesta data.

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

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Melissa Thiemi Kato



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

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

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356

Processo nº130/2004

Bauru, 03 de novembro de 2004.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa intitulado “Estudo in vitro e in situ do efeito inibidor do íons ferro na erosão do esmalte dental bovino” de autoria de Melissa Thiemi Kato, que será desenvolvido sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 21 de outubro de 2004, o relator emitiu o seguinte parecer, que foi considerado **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO** pelo Comitê:

“...Foi observada a falta do orçamento financeiro detalhado do projeto.”

Sendo assim, solicitamos o envio do documento acima citado, para nova análise e posterior aprovação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas



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 (3235-8356)

Of.nº CEP/34 2006/FOB

Processo nº 130/2004

Bauru, 06 de dezembro de 2006.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria referente ao projeto de dissertação de mestrado da aluna Melissa Thiemi Kato, anteriormente intitulado "Estudo *in vitro* e *in situ* do efeito inibidor dos íons ferro na erosão do esmalte dental bovino", sob sua orientação para mudança na utilização de dentes bovinos para dentes humanos, obtidos junto ao Banco de Dentes desta Faculdade.

Após análise ética pelo Relator deste Comitê de Ética em Pesquisa apreciada em reunião realizada no dia 29 de novembro de 2006, este Colegiado aprovou a referida solicitação, uma vez que a metodologia não será modificada, como também o pedido de alteração do título para "**Avaliação *in vitro* e *in situ* do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana**".

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo

Coordenador

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Melissa Thiemi Kato

Anexo 3

Carta de Informações ao Sujeito de Pesquisa

Houve uma redução na incidência de cárie nos indivíduos, mantendo, desta forma, seus dentes por mais tempo na boca, o que levou a um maior risco para o desenvolvimento a outros tipos de lesões, como a erosão dentária. A erosão dentária é a destruição da camada externa do dente causada principalmente pela ingestão de alimentos ou bebidas ácidas, por exemplo, pelo refrigerante. Uma tentativa de preveni-la seria acrescentar ferro à bebida. Portanto, esta pesquisa tem por objetivo avaliar se o ferro realmente inibe o desenvolvimento da erosão dentária. Para isso, será utilizado um aparelho usado dentro da boca, contendo blocos de dente humano, previamente esterilizados, durante duas fases de seis dias cada. O aparelho deverá ser utilizado constantemente, sendo removido durante às refeições e mais quatro vezes por dia, a ser estipulado pelos pesquisadores, devendo permanecer dentro de um copo, coberto por refrigerante e por meio de adição ou não, dependendo da fase, de uma solução de ferro. Os benefícios esperados resumem-se em saber a eficiência desse método de prevenção. O desconforto consistirá no uso constante do aparelho. Os riscos são praticamente inexistentes, uma vez que o tratamento será realizado fora da boca. Portanto, não haverá qualquer forma de ressarcimento de despesas ou indenização decorrentes da participação nesta pesquisa.

A participação será voluntária e entende-se que poderá fazer qualquer pergunta sobre os procedimentos, sendo que será livre para desistir de participar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo de sua parte. Tem, também, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo que assegura a sua privacidade.

Entende-se que este estudo será sendo realizado em benefício das ciências médica e odontológica e que concorda com a divulgação dos dados obtidos por meio de publicações científicas.

Caso 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 ou ainda pelo telefone dos pesquisadores (14) 3203-2285, (14) 8124-7215 ou (14) 3235-8346.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Profa. Da. Marília A. R. Buzalaf
(pesquisadora responsável)

Anexo 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, após a leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA, devidamente explicada pelos profissionais 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 voluntário 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 de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Profa. Da. Marília A. R. Buzalaf
(pesquisadora responsável)

Anexo 5

Lista de Instruções ao Voluntário

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

Instruções ao voluntário

- 1- Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretam em custo ao voluntário.
- 2- Durante o experimento, os voluntários deverão escovar os dentes com o dentifrício não fluoretado fornecido pela autora do trabalho.
- 3- A pesquisa será composta por 2 etapas, com duração de 5 dias cada uma.
- 4- Os voluntários deverão utilizar um dispositivo bucal e só o removerão para as principais refeições (café da manhã, almoço, jantar), ocasião em que o dispositivo ficará envolvido em gaze encharcada com água de abastecimento.
- 5- Durante o uso do dispositivo, **nenhum tipo de alimento ou bebida** poderá ser ingerido, exceto água.
- 6- Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a refeição (**máximo de 1 hora por refeição**).
- 7- Realize sua higiene bucal normalmente, utilizando o dentifrício fornecido.
- 8- Os voluntários deverão imergir **4 vezes por dia** em 150 mL da bebida (Coca-Cola), fornecida pela autora, durante **5 minutos**, nos horários compreendidos após às refeições e antes de dormir. Caso não consigam seguir estritamente os horários, os voluntários deverão ter em mente que a imersão na bebida só poderá ser efetuada 5 minutos após as refeições e, que após a imersão, o aparelho deverá **permanecer na boca pelo menos por 2 horas**, para depois se executar uma nova imersão.

9- Uma vez ao dia, antes de dormir, os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo, somente **da face voltada para o palato** e com o **dentifrício oferecido pela autora**.

10- Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja repostado.

11- Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se a proteção das metades dos fragmentos permanecem intactas. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a autora.

12- Qualquer dúvida entrar em contato com a autora do trabalho pelo telefone: 3203-2285 (residência) ou 8124-7215 (celular) ou 3235-8246 (bioquímica).

Resumo das instruções aos voluntários

- 1- Colocar o dispositivo após a última escovação da noite.
- 2- No dia seguinte (1º dia), tirar o dispositivo para tomar o café da manhã.
- 3- Após o café, escovar os dentes, recolocar o dispositivo e **aguardar 5 minutos**.
- 4- *Voluntário de número ímpar irá realizar a imersão do dispositivo em 150 mL de Coca-cola por 5 minutos.
*Voluntário de número par irá adicionar o sal de ferro dentro da garrafa de Coca-Cola uma única vez ao dia (assim que abri-la) e agitar por no mínimo 10 vezes, lentamente, para que o ferro se dissolva e não crie pressão e/ou espuma no interior da garrafa. Imergir o dispositivo em 150 mL de Coca-cola, contendo o ferro por 5 minutos.
O item 4 será repetido após o almoço, jantar e antes de dormir.
- 5- Recolocar o dispositivo na boca, o qual deverá permanecer por no mínimo 2 horas, antes da próxima imersão.
- 6- Antes da última imersão do dia, poderá escovar somente a **face voltada para o palato** com o dentifrício oferecido pela autora.

Obs:

- Após as refeições, o voluntário irá realizar a sua higiene bucal e recolocar o dispositivo, devendo permanecer com o aparelho por no mínimo **5 minutos antes de realizar a imersão no refrigerante.**
- Poderá escovar o dispositivo 1 vez por dia, somente da face voltada para o palato e com o dentifrício oferecido pela autora.
- O intervalo entre as imersões deverá ser superior a 2 horas.
- **O REFRIGERANTE É DESTINADO À PESQUISA E NÃO DEVERÁ SER INGERIDO EM HIPÓTESE NENHUMA.**
- O refrigerante deverá permanecer em temperatura ambiente.
- A garrafa do refrigerante que contiver o ferro, deverá ser agitada toda vez antes da imersão do dispositivo. A mesma deverá permanecer envolta por papel alumínio

Anexo 6

Manuscrito enviado a Journal of Applied Oral Sciences, referente ao piloto do subprojeto 1. Texto escrito de acordo com as normas do periódico.

EFFECT OF IRON SUPPLEMENTATION ON THE EROSIVE POTENTIAL OF CARBONATED OR DECARBONATED BEVERAGE

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO NO POTENCIAL DESMINERALIZANTE DE BEBIDA CARBONATADA OU DESCARBONATADA

Melissa Thiemi KATO^I; Andrea Gutierrez MARIA^{II}; Luís Guilherme Matiazi VAZ^{II}; Flávia de Moraes ITALIANI^{III}; Sílvia Helena de Carvalho SALES-PERES^{IV}; Marília Afonso Rabelo BUZALAF^V

I- DDS, MSc, Graduate student (Master degree), Social Dentistry Department, Bauru Dental School – University of São Paulo.

II- DDS, Undergraduate student, Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo.

III- DDS, MSc, Graduate student (Master degree), Department of Biological Sciences, Bauru Dental School – University of São Paulo.

IV- DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Social Dentistry Department, Bauru Dental School, University of São Paulo.

V- DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo.

Signature

Name

Date

Melissa Thiemi Kato

Andrea Gutierrez Maria

Luís Guilherme Matiazi Vaz

Flávia de Moraes Italiani

Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres

Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Corresponding address: Marília Afonso Rabelo Buzalaf - Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75. Bauru-SP, 17012-901, Brazil. Tel. + 55 14 32358246 Fax + 55 14 32262076 E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

ABSTRACT

This study evaluated, *in vitro*, the effect of iron (previously exposed with enamel powder or added directly to the beverage) on the erosive potential of carbonated or decarbonated beverage. Four sets of experiments were done. For groups E1 and E3, a solution containing 30 mmol/L FeSO₄ was added to bovine enamel powder (particles between 75-106 μm) before exposure to the carbonated or decarbonated beverage (Sprite Zero®), respectively. For groups E2 and E4, 15 mmol/L FeSO₄ was added directly to the carbonated or decarbonated beverage, respectively. For comparison control groups were included. In controls C1 and C3, the experiments E1 and E3 were repeated, but the iron solution was replaced by deionized water. For controls C2 and C4, the carbonated and decarbonated beverage, respectively, was used, without addition of iron. After addition of the beverage to the powdered enamel (40 mg enamel powder/400 μL of final volume), the sample was vortexed for 30 s and immediately centrifuged for 30 s (11,000 rpm). The supernatant was removed after 1 min 40s. This procedure was repeated in quintuplicate and the phosphate released was analyzed spectrophotometrically. The results were analyzed by Student's *t* test ($p < 0.05$). E2 presented the best results, with a significant inhibition (around 36%) of phosphate released. For E3 and E4 a non-significant inhibition (around 4 and 12%, respectively), was observed. For E1 an increase in phosphate loss was detected. Thus, the protective effect of iron seems to be better when this ion is directly added to the carbonated beverage.

Uniterms: tooth erosion; demineralization; iron; dental enamel.

INTRODUCTION

Various studies have shown the protective effect of iron on the demineralization of enamel (Bowen and Pearson², 1994; Rosalen et al.¹⁷, 1996; Miguel et al.^{11,12,13}, 1997; Dunning et al.⁸, 1998; Pecharki et al.¹⁵, 2005; Martinhon et al.¹⁰, 2006). Many hypothesis mechanisms have been proposed to explain this protective effect, but the precise mechanisms have not been definitely determined.

Some preliminary studies conducted in our laboratory suggest that the presence of increasing iron concentrations can inhibit the dissolution of bovine enamel powder under acidic conditions, with the best protection around 15 mmol/L FeSO₄. (Buzalaf et al.⁵, 2006). Thus, it was speculated that the supplementation of foods and beverages with iron could be an alternative strategy to reduce not only dental caries, but also dental erosion. This would also help to prevent anemia, another important public health problem (DeMaeyer and Adiels-Tegman⁶, 1985)

Trying to find a preventive method for dental erosion, our research group is currently studying the addition of iron in carbonated beverages, which have been shown to have a high erosive potential (Sales-Peres et al.¹⁸, 2007). However, before these experiments could be definitely conducted, important questions have arisen. The first question was related to the possible influence of the presence of carbonate on the protective effect of iron, since the removal of carbonate would make easier to pipette samples, but, on the other hand, could change the beverage pH. The second question refers to the moment by which iron would exert its protective effect: if when previously added to enamel, or when directly added to the beverage. This study was designed to analyze these situations. The null hypotheses tested were: a) the absence of carbonate does not alter the protective effect of iron on the inhibition of enamel demineralization and b) the protective effect of iron on enamel demineralization is not influenced by the moment it enters in contact with enamel.

MATERIAL AND METHODS

Bovine enamel powder preparation

Fragments of enamel were obtained from bovine incisors. The teeth were sterilized by storage in 10% formalin buffered solution, pH 7, for 30 days. Using one diamond disk (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, USA) the crowns were sectioned from the roots. Next, using three parallel diamond disks separated by two

4 mm spacers, 8-10 fragments were cut from the crown of each bovine incisor. About one hundred enamel slabs (4 X 4 mm) were obtained and these fragments had their dentine totally removed by abrasion. Their surfaces were flattened with 300 and 600 of AL₂O₃ papers.

They were then grinded in a steel pestle and mortar (KM1, model MLW, Hergestellt, Germany). From the enamel powder, particles between 75 and 106 µm were selected using appropriated meshes.

Experimental design

The beverage chosen was Sprite Zero® because it has been reported to have a strong buffer capacity (Sales-Peres et al.¹⁹, 2007). Firstly, its pH was analyzed (pHmeter MB10 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí-MG), with and without carbonate. When necessary, carbonate was removed by leaving 150 mL of beverage in a vacuum pump, for 1 h.

The experimental phase was divided into four sets of experiments. In the first two sets the beverage containing carbonate was used. The difference between the two sets was that in the first one, the powdered enamel was previously exposed to the iron and then to the beverage (E1), while in the second one, the iron was added directly to the beverage (E2). In the other two sets (E3 and E4), the beverage was decarbonated, as mentioned above. In E3 the powdered enamel was previously exposed to the iron and then to the beverage, and in E4 the iron was added directly to the beverage. The procedure was repeated five times (n=5) for each group.

In E1, at time zero, 40 mg of powdered enamel was initially added to 0.20 mL of 30 mmol/L FeSO₄, immediately 0.20 mL of the carbonated beverage (Sprite Zero® with carbon dioxide) was added (0.40 mL of the beverage at 15 mmol/L FeSO₄/ 40 mg enamel powder). The sample was vortexed for 30 s and immediately centrifuged for more 30 s (11,000 rpm) and the supernatant was removed after 1 min 40s.

In E2, at time zero, 40 mg of powdered enamel was added to 0.40 mL of carbonated beverage, containing 15 mmol/L FeSO₄, following the same sequence mentioned above: agitation, centrifugation and the removal of supernatant.

Experiments E3 and E4 followed a protocol virtually identical to E1 and E2, respectively, except for the use of the decarbonated beverage.

For comparison, controls 1-4 were made. In controls 1 (C1) and 3 (C3) the experiments E1 and E3 were repeated, but the iron solution was replaced by

deionized water. As for controls 2 (C2) and 4 (C4), pure beverage was used, with and without carbonate, respectively.

Phosphate analysis

In order to determine the amount of enamel dissolved the phosphate released in the supernatant was analyzed colorimetrically, in duplicate, using the Fiske-Subarrow⁹ (1925) method (Cary 50, Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Samples containing various iron concentrations were read against standard phosphate solutions containing 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 and 24 µg P. The absorbance readings were converted to µg phosphate using a standard curve with a coefficient correlation of $r \geq 0.99$. All samples were analyzed in duplicate. The mean repeatability of the readings, based on duplicate samples, was 97.0%.

The phosphate concentration in experimental group was normalized to the respective control group (without iron).

Statistical analysis

GraphPad InStat software was used. After checking the normality and homogeneity, the results were analyzed by Student's *t* test for comparison between each experimental group and its respective control. The same test was also used to compare E1XE3, E2XE4, C1XC3 and C2XC4. A significant level of 5% was set *a priori* as indicator of statistical significance.

RESULTS

Table 1 demonstrates the quantity of phosphate released from the enamel powder for the experimental and control groups and also the dissolution rate of the experimental group as a function of the dissolution rate of the respective control group. The experiment E2 showed the best results, with a significant inhibition (36%) in the enamel dissolution when iron was added ($p < 0.05$). For experiments E3 and E4 a slight inhibition of enamel dissolution was found when iron was added (4 and 12%, respectively), but experimental groups did not significantly differ from the respective control groups ($p > 0.05$). As for experiment E1, an increase in the mineral loss was observed when compared to its respective control (C1).

When the presence of carbonate was considered, no significant differences were detected between experiment E1 (presence of carbonate) and experiment E3 (absence of carbonate), as well as between experiments E2 (presence of carbonate)

and E4 (absence of carbonate). The same was observed for the respective control groups. Direct comparisons between other groups (e.g. E1XE2, E1XE4, E2XE3, C1XC2, C1XC4 and C2XC3) are not adequate, because the experiments are designed differently.

The pH of the soft drink before and after removing the carbonate dioxide remained unaltered (2.65), but the protective effect of iron on the enamel dissolution was reduced (Groups E1 compared to E3 and E2 compared to E4) when the carbonate was removed (Table 1).

The analysis of Table 1 shows that the dissolution rate when compared to the respective control was smaller when iron was added directly to the beverage.

DISCUSSION

The results of various *in vitro* studies suggest that the presence of increasing iron concentrations can inhibit the dissolution of enamel under the acidic conditions (Brookes et al.³, 2004; Brookes et al.⁴, 2003; Buzalaf et al.⁵, 2006). A recent *in situ* study has shown that a 10 mmol/L iron rinse prior to an acidic challenge with Coke® can reduce the superficial microhardness change and wear of human enamel and dentin blocks (Sales-Peres et al.¹⁸, 2007). The mechanism involved in this protection of iron against mineral dissolution is not completely understood. Torell²¹ (1988) reported that when enamel is incubated with ferrous salt solutions, acid-resistant enamel surfaces are established due to the precipitation of ferric phosphates on the enamel surface, due to the combination of ferric ions with phosphate ions dissolved at the enamel surface. The formation of this ferric phosphate barrier was also suggested in recent *in situ* studies simulating a high cariogenic challenge (Martinhon et al.¹⁰, 2006) and erosive/abrasive challenges (Sales-Peres et al.¹⁸, 2007). Other possible explanations have been suggested, such as: participation in the remineralization of human enamel and in the nucleation of apatite (Bachra and Van Harskamp¹, 1970; Rao¹⁶, 1974), substitution of calcium in apatite (Rao¹⁶, 1974; Okasaki et al.¹⁴, 1985) increased concentration in remineralised caries lesions in dentin and enamel (Takuma et al.²⁰, 1975; Driessens et al.⁷, 1986) and inhibition of demineralization (Bachra and Van Harskamp¹, 1974).

In this study we evaluated some variables that could influence the effect of iron on the inhibition of enamel dissolution by an acidic soft drink. One of the variables tested was the presence or absence of carbonate. This variable was

tested because in preliminary experiments, it was observed that in the presence of carbonate there was the formation of bubbles in the pipette, which could alter the final volume of the samples. However, it was hypothesized that if the carbonate were removed, there could be changes in the pH, which, in turn, could interfere with the effect of iron on enamel. It was observed, however, that despite the pH remained unaltered after the carbonate was removed, the protective effect of iron on the enamel dissolution was reduced (Groups E1 compared to E3 and E2 compared to E4). The reasons why this reduction on the protective effective of iron occurs when the carbonate is removed cannot be answered by the protocol of this study, but this observation is useful for future studies involving the addition of iron to carbonated beverages. Thus, despite the presence of carbonate can make more difficult the pipetting of the samples, it must not be removed when the addition of iron to the beverage is under test. It must be highlighted that the presence of carbonate in the beverage represents the “real” situation when the beverage is consumed. This is one more point in favour of the addition of iron in carbonated beverages as a preventive measure for enamel erosion.

The other variable tested was the moment when iron should enter in contact with enamel in order that its maximum protective effect could be reached. For this purpose, we tested the addition of iron to the enamel prior to the exposition to the beverage, when compared to the addition of iron directly to the beverage. It was observed that the dissolution rate was smaller when iron was added directly to the beverage. This certainly makes easier the use of iron for the prevention of enamel demineralization, since it can be added directly to acid beverages and does not seem to require a pre-treatment of the enamel with a rinse, for example.

The results of the present study show that the best protective effect of iron when added to a soft drink, regarding the prevention of enamel dissolution, is reached when the soft drink is carbonated and iron is added directly to the beverage. Thus, in further studies this protocol must be preferentially followed.

CONCLUSION

The results showed that the carbonate removal of the soft drink reduced the protective effect of iron on enamel dissolution and that the moment when iron enters in contact with enamel also influences this process. Thus, both null hypotheses formulated were rejected.

RESUMO

Avaliou-se, *in vitro*, o efeito do ferro (previamente exposto com o pó de esmalte ou adicionado diretamente à bebida) no potencial erosivo da bebida carbonatada ou descarbonatada. A fase experimental foi dividida em quatro grupos. Nos grupos E1 e E3 a solução contendo FeSO_4 a 30 mmol/L foi adicionada ao pó de esmalte bovino (partículas de 75-106 μm) antes da exposição à bebida carbonatada ou descarbonatada (Sprite Zero®), respectivamente. Para os grupos E2 e E4, 15 mmol/L de FeSO_4 foi adicionado diretamente à bebida carbonatada ou descarbonatada, respectivamente. Para comparação, grupos controles foram incluídos. Nos controles C1 e C3, os experimentos E1 e E3 foram repetidos, mas a solução de ferro foi substituída por água deionizada. Para os controles C2 e C4, a bebida carbonatada e descarbonatada, respectivamente, foi utilizada, sem adição de ferro. Após a adição da bebida ao pó de esmalte (40 mg pó de esmalte/400 μL de volume final), a amostra foi agitada por 30s e imediatamente centrifugada por mais 30 s (11000 rpm). O sobrenadante foi removido após 1 min 40s. Este procedimento foi repetido em quintuplicada e a quantidade de fosfato foi analisada espectrofotometricamente. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$). E2 foi o que apresentou os melhores resultados, com uma inibição significativa (aproximadamente 36%) na quantidade do fosfato. Para E3 e E4 uma inibição não significativa (ordem de 4 e 12%, respectivamente) foi observada. Para E1 um aumento da perda de fosfato foi detectado. Portanto, o efeito protetor do ferro parece ser melhor quando este íon é diretamente adicionado à bebida carbonatada.

Unitermos: erosão de dente; desmineralização; ferro; esmalte dentário.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank FAPESP – Foundation for Support to the Research of the State of São Paulo (Grants n. 04/12632-2) for the financial support.

REFERENCES

- 1- Bachra BN, Van Harskamp GA. The effect of polyvalent ions on the stability of a buffer system for calcification *in vitro*. Calc Tissue Res. 1970;4:358-65.
- 2- Bowen WH, Pearson SK. Residual effects of fluoride on a severe cariogenic challenge in rats. Caries Res. 1994;28(4):246-50.
- 3- Brookes SJ, Robinson C, Shore Rc, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralisation. In: Caries Res, 51st Annual ORCA Congress; Germany v. 38 p.401, June-July 2004.
- 4- Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel. Arch Oral Biol. 2003;48(1):25-30.
- 5- Buzalaf MAR, Italiani FM, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralization of bovine dental enamel *in vitro*. Arch Oral Biol. 2006;51(10):844-8.
- 6- DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. World Health Statistics Quarterly. 1985;38:302-316.
- 7- Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. Caries Res. 1986;20(5):398-405.
- 8- Dunning JC, Ma Y, Marquis RE. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. Appl Environ Microbiol. 1998;64(1):27-33.
- 9- Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem. 1925;66:375-400.
- 10- Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "*in situ*". Arch Oral Biol. 2006;51(6):471-5.
- 11- 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.
- 12- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. Arch Oral Biol. 1997;42(5): 377-83.
- 13- 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.

- 14- Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch.* 1985;25:17-24.
- 15- Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005;39(2):123-9.
- 16- Rao SVC. Preparation of solid solutions of calcium and iron hydroxylapatites. *J Inst Chem Calcutta.* 1974;46:30-1.
- 17- 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.
- 18- Sales-Peres SHC, 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.
- 19- Sales-Peres SHC, Magalhães AC, Machado MAAM, Buzalaf MAR. In vitro evaluation of the erosive potential of five soft drinks. *Eur J Dent.* 2007 (in press).
- 20- Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res.* 1975;9(4):278-85.
- 21- Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J.* 1988;12(3):113-24.

Table 1 –The mean (\pm sd) amount of phosphate released (μ g) from enamel powder exposed to Sprite Zero containing or not

carbonate as a function of the presence of iron previously incubated with the enamel powder or added directly to the beverage

Groups	Control** (C - without FeSO ₄)	Experimental* (E - with 15 mM FeSO ₄)	Alteration of dissolution rate***
1	18.07±2.39 ^A	22.78±4.63 ^A	+26%
2	33.48±0.95 ^A	21.18±0.42 ^B	-36%
3	19.80±3.09 ^A	18.98±1.85 ^A	-4%
4	33.66±0.62 ^A	29.61±8.17 ^A	-12%

*For groups E1 and E3, the solution containing iron was added to bovine enamel powder before exposure to the carbonated or decarbonated beverage (Sprite Zero®), respectively. For groups E2 and E4, iron was added directly to the carbonated or decarbonated beverage, respectively.

** For groups C1 and C3, the experiments E1 and E3 were repeated, but the iron solution was replaced by deionized water. For controls C2 and C4, the carbonated and decarbonated beverage, respectively, was used, without addition of iron.

*** + and - numbers, indicate, respectively, increase and decrease of dissolution rate of experimental groups when compared to the correspondent control groups.

Distinct letters in the same line indicate statistical difference between experimental and respective control groups.

Anexo 7

Manuscrito enviado para Archives of Oral Biology e aceito para publicação. Texto escrito de acordo com as normas do periódico.

Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder *in vitro* by carbonated beverages

Melissa Thiemi Kato, DDS^a

Andrea Gutierrez Maria^b

Sílvia Helena de Carvalho Sales-Peres, DDS, MS, PhD^a

*Marília Afonso Rabelo Buzalaf, DDS, MS, PhD^b

^aSocial Dentistry Department, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP 17012-901, Brazil.

^bDepartment of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP 17012-901, Brazil.

Running title: Effect of iron on enamel demineralisation.

***Corresponding author:** Present address: Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75. Bauru-SP, 17012-901, Brazil. Tel. + 55 14 32358246 Fax + 55 14 32262076 E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Abstract

(1)Objectives: The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder, when added to two carbonated beverages. (2)Design: Powdered enamel was produced by grinding enamel fragments of bovine incisor in a steel pestle and mortar. Particles between 75 and 106 μm were selected using appropriated meshes. At time zero, the carbonated beverage (Coke® or Sprite Zero®) was added to powdered enamel (1 mg enamel powder/10 μL of beverage) and vortexed for 30 s. The sample was immediately centrifuged (11,000 rpm) for 30 s and the supernatant was removed at 1 min 40 s. This procedure was repeated five times with the beverage containing increasing ferrous sulphate concentrations (1.25, 2.5, 5, 10, 15, 30 and 60 mmol/L). The phosphate released in the medium was analyzed spectrophotometrically. Data were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). (3)Results: When iron at 30 and 60 mmol/L was added to Coke®, a significant reduction in the dissolution of powdered enamel was observed when compared to control (11 and 17%, respectively), while lower iron concentrations did not have any effect on enamel powder dissolution. Regarding Sprite Zero®, iron concentrations up to 10 mmol/L had no significant effect, while higher concentrations significantly increased enamel powder dissolution. (4)Conclusions: The results suggest that iron can interfere with the dissolution of dental enamel powder in the presence of acidic beverages and the type of acid in these beverages seems to modulate this effect.

KEYWORDS: tooth erosion; demineralisation; iron; dental enamel.

Introduction

In the developed countries, the incidence of the previous major dental disease, caries, has declined [1]. Therefore, more teeth are at risk of suffering other dental lesions, such as erosion. Dental erosion is defined as loss of tooth substance by chemical processes not involving bacteria [2] caused by a variety of intrinsic and extrinsic factors. Intrinsic factors are the result of endogenous acid, generally gastric acids that contacts teeth during anorexia, bulimia and gastrointestinal disturbances [3]. Extrinsic factors are related to frequent consumption of acidic foodstuffs or beverages and exposure to acidic contaminants in the working environment [4]. The extrinsic factor is becoming more important, due to increased consumption of acid drinks as soft drinks, sport drinks, fruit juices and fruit teas [5].

The interest in studying dental erosion is increasing in the last decade. Firstly, *in vitro* models were used to evaluate the erosive potential of drinks (pH and buffering capacity) [6, 7 and 8] and its effect on tooth specimens [9 and 10].

Many studies have tried to supplement soft drinks with ions, such as calcium, phosphate and fluoride in order to make these beverages more saturated in respect to the

dental minerals, thus reducing their erosive potential [11-18]. The addition of calcium and phosphate has shown favorable results [11-18], but the addition of fluoride has only a good effect when toxic concentrations are used [2, 19-28]. Due to this, some researches have been focusing on the addition of other ions to acidic beverages. Among these ions, copper and iron seem to be plausible alternatives. Brookes et al. [29] developed a simple abiotic model system to test the effects of copper and iron ions on the inhibition of enamel demineralisation. Using synthetic hydroxyapatite, the authors found that 10 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ inhibited mineral loss by 49%. The same authors found 51% inhibited mineral loss by 10 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [30]. Buzalaf et al. [31] used the same model to determine the potential of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ to inhibit the demineralisation of bovine enamel powder. A dose response was observed, with the amount of phosphate released into the acetic acid decreasing when iron concentration increased. The concentrations of 15 mmol/L reduced the dissolution of enamel powder by 50%, but higher iron concentrations did not have an extra effect. Since this abiotic model is more similar to conditions associated with erosion, addition of iron to carbonated beverages could be an important coadjuvant in reducing their erosive potential. Additionally, iron has an important role on the prevention of anemia, which is an important public health problem [32].

Since the consumption of soft drinks has been increasing all over the world [11], the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of iron on the dissolution of the bovine enamel powder by two carbonated beverages.

Material and methods

Bovine enamel powder preparation

Fragments of permanent bovine enamel were obtained from bovine incisors. The teeth were sterilized by storage in 10% formalin buffered solution, pH 7, for 30 days. Using one diamond disk (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, USA) the crowns were sectioned from the roots. Next, using three parallel diamond disks separated by two 4 mm spacers, 8-10 fragments were cut from the crown of each bovine incisor. About one hundred enamel slabs (4 X 4 mm) were obtained and these fragments had their dentine totally removed by abrasion. Their surfaces were flattened with 300 and 600 of Al_2O_3 papers.

They were then ground in a pestle and mortar (KM1, model MLW, Hergestellt, Germany). From the enamel powder, particles between 75 and 106 μm were selected using appropriated meshes.

Experimental design

At time zero, 0.4 mL of carbonated beverage (Coke® or Sprite Zero®, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brazil) was added to 40 mg of powdered bovine enamel (1 mg enamel powder / 10 μL beverage) and shaken for 30 s. The sample was immediately centrifuged for 30 s (11,000 rpm) and the supernatant was removed at 1 min 40 s after

centrifugation [29]. Thus, the total time of contact between the enamel powder and the beverages was 2 min 40 s. This procedure was repeated with carbonated beverages containing different concentrations (1.25, 2.50, 5, 10, 15, 30 and 60 mmol/L) of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany). For each iron concentration five repetitions were made.

In order to determinate the amount of dissolved enamel powder, the phosphate released on supernatant was analysed colorimetrically, in duplicate, using the Fiske-Subarrow (1925) method [33] (Cary 50, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Samples containing various iron concentrations were read against standard phosphate solutions containing 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 and 24 μg P. The absorbance readings were converted to μg phosphate using a standard curve with a coefficient correlation of $r \geq 0.99$. All samples were analyzed in duplicate. The mean repeatability of the readings, based on duplicate samples, was 97.0%.

Statistical analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked. Since the assumptions were satisfied, one-way ANOVA was chosen. For individual comparisons among the different iron concentrations groups in respect to control group (no iron), Tukey's test was used. The significance level was set at 5%.

Results

The amount of phosphate released was normalized to a value of one (100%), representing the phosphate released by the control samples in the absence of iron. Tables 1 and 2 show the mean amount of phosphate released and normalized data of powered enamel dissolved in function of increasing iron concentrations added to Coke® and Sprite Zero®, respectively. For Coke®, the addition of iron up to 15 mmol/L had no effect on the degree of enamel powder dissolution. The iron concentrations of 30 and 60 mmol/L reduced the enamel powder dissolution by 11 and 17%, respectively, and this reduction was significant when compared to control. Regarding Sprite Zero®, no inhibition of dissolution was observed up to 10 mmol/L iron. However, higher concentrations significantly increased enamel powder dissolution.

Discussion

The results of various *in vitro* studies suggest that the presence of increasing iron concentrations can inhibit the dissolution of enamel powder under the acidic conditions [30 and 31]. A recent *in situ* study has shown that a 10 mmol/L iron rinse prior to an acidic challenge with Coke® can reduce the superficial microhardness change and wear of human enamel and dentin blocks [10]. The mechanism involved in this protection of iron against mineral dissolution is not completely understood. It is possible that the formation of a thin acid resistant coating of hydrous iron oxide on the enamel mineral surface may be a

possible factor [34]. Other possible explanations have been suggested, such as: participation in the remineralisation of human enamel and in the nucleation of apatite [35 and 36], substitution of calcium in apatite [36 and 37] increased concentration in remineralised caries lesions in dentin and enamel [38 and 39] and inhibition of demineralisation [35]. The analysis of the type of compound formed on the surface of dental enamel when iron is used may be a useful test and could help to understand its benefic effect.

An interesting finding of this study was the different behaviour of the two different soft drinks tested, in the presence of iron. While for Coke® the highest iron concentrations significantly reduced enamel powder dissolution, the same concentrations when added to Sprite Zero® significantly enhanced enamel powder dissolution. It seems difficult to explain this difference, but it is possible that the distinct type of acid present in both soft drinks may play a role in the mechanism by which iron interacts with dental minerals, since Sprite Zero® has citric acid and Coke® has phosphoric acid. The literature is contradictory regarding the erosive potential of beverages containing these acids. Some studies have shown that beverages containing citric acid are more erosive than those containing phosphoric acid, because the presence of phosphate could increase the degree of saturation with respect to apatite [40, 41 and 42]. Others studies, however, have shown the opposite [43 and 44]. One point that deserves attention is that some organic acids can chelate inorganic ions. Thus, it is possible that iron could have been chelated by citric acid, thus reducing its protective effect when added to Sprite Zero®. In addition, Attin et al. [45] have reported that citric acid (CitH_3) is capable of forming chelating complexes with calcium (Ca^{2+}) leading to a drop of pH due to the release of H^+ , according to the following equation: $2\text{CitH}_3 + \text{Ca}^{2+} = (\text{CaCit}_2)^{4-} + 6\text{H}^+$. Despite the pH of Sprite Zero® was not measured after addition of iron, we could speculate that the significant increase in enamel dissolution when the higher iron concentrations were present could be due to this mechanism.

Another point that should be highlighted is that in this study powdered enamel was used, instead of enamel. Powdered enamel has a greater surface area when compared to enamel, which could have interfered in the reaction of the beverages with enamel. Thus, it is possible that differences in the reactivity of these two types of substrates with the soft drinks exist and this should be tested.

The results suggest that iron can interfere with the dissolution of dental enamel powder in the presence of acidic beverages and this interference is modulated by the type of acid present in the beverage. However, the possible adverse effects of iron supplementation, such as tooth staining, possible modification of the taste of the beverage, as well as toxicity, must be taken into account when beverages are intended to be supplemented with this ion. WHO has calculated a Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (PMDTI) of 56 mg/day (0.8 mg/Kg/day) [46], although lower levels have been defined in some countries. Considering a beverage containing 15 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, this implies that the maximum volume to be consumed daily would be around 70 mL only. Since iron had only a moderate effect in the powdered enamel dissolution and other ions such as calcium,

phosphate and fluoride have also been shown to have promising effects, it would be interesting to test if the association of iron with these ions would give a good protective effect against enamel dissolution, with lower doses of iron.

Acknowledgement: The authors thank FAPESP – Foundation for Support to the Research of the State of São Paulo (Grant n. 04/12632-2) for the financial support.

References

- 1- Petersson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci* 1996;**104**(4):436-43 Aug.
- 2- Zipkin J, 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.
- 3- Scheutzel P. Etiology of dental erosion – intrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;**104**(2):178-90 Apr.
- 4- Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;**104**(2):162-77 Apr.
- 5- Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on *in vitro* enamel erosion. *Caries Res* 1993;**27**(5):387-93.
- 6- Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH. *In vitro* study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res* 1996;**30**(5):373-8.
- 7- Gudmundsson K, Kristleifsson G, Theodors A, Holbrook WP. Tooth erosion, gastroesophageal reflux, and salivary buffer capacity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;**79**(2):185-9.
- 8- Robb ND, Smith BG, Geidrys-Leeper, E. The distribution of erosion in the dentitions of patients with eating disorders. *Br Den J* 1995;**178**(5):171-5 Mar.
- 9- Rios D, Honorio HM, Magalhaes Ac, Delbem AC, Machado MA, Silvia SM, Buzalaf MA. 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.
- 10- Sales-Peres SHC, 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 Feb.
- 11- Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2006;**20**:152-72.
- 12- Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis* 2005; **11**:7-12.

- 13- Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2003; **48**:753-9.
- 14- Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. *Caries Res* 2002; **36**:70-4.
- 15- Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ 1: comparison with orange juice. *J Dent* 1999; **27**:285-90.
- 16- Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: 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**:345-50.
- 17- Hunter ML, Hughes JA, Parker DM, West NX, Newcombe RG, Addy M Development of low erosive carbonated fruit drinks 1: evaluation of two experimental orange drinks *in vitro* and *in situ*. *J Dent* 2003; **31**(4):253-60 May.
- 18- West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. *J Dent* 1999;**27**:341-4.
- 19- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. *Arch Oral Biol* 1998; **43**:157-61.
- 20- Duarte JM, Coelho LGC, Lessa NDDA. Avaliação in vitro da eficácia do flúor adicionado em refrigerantes na prevenção da desmineralização do esmalte do dente. *Rev ABO nac* 1999; **7**:307-1
- 21- Fuks A, Anaise J, Westreich V, Gedalia I. Effect of fluoride supplementation of a citrus beverage on the erosion rate of molars of hamsters. *J Dent Res* 1973; **52**:1149.
- 22- Hughes JA, West NX, Addy M. The protective effect of fluoride treatments against enamel erosion in vitro. *J Oral Rehabil* 2004; **31**:357-63.
- 23- Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res* 2002; **36**:75-80.
- 24- Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res* 2001; **35**:229-34.
- 25- Shabat E, Anaise J, Westreich B, Gedalia I. Erosion and fluoride content in molar surfaces of rats that drank a cola beverage with and without fluoride. *J Den Res* 1975; **54**:426.
- 26- Sorvari R. Effects of various sport drink modifications on dental caries and erosion in rats with controlled eating and drinking pattern. *Proc Finn Dent Soc* 1989; **85**(1):13-20.

- 27- Sorvari R, Kiviranta I, Luoma H. Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats. *Scand J Dent Res* 1988; **96**:226-31.
- 28- Spencer AJ Jr, Ellis LN. The effect of fluoride and grapefruit juice on the etching of teeth. *J Nutr* 1950; **42**:107-15.
- 29- Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel. *Arch Oral Biol* 2003; **48**(1):25-30 Jan.
- 30- Brookes SJ, Robinson C, Shore Rc, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralisation. *Caries Res* 2004; **38**(4):401 [abstract 132].
- 31- Buzalaf MAR, Italiani FM, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2006; **51**(10):844-8
- 32- DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Statistics Quarterly* 1985, **38**:302-316.
- 33- Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;**66**:375-400.
- 34- Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;**12**(3):113-24.
- 35- Bachra BN, Van Harskamp GA. The effect of polyvalent ions on the stability of a buffer system for calcification *in vitro*. *Calc Tissue Res* 1970;**4**:358-65.
- 36- Rao SVC. Preparation of solid solutions of calcium and iron hydroxylapatites. *J Inst Chem Calcutta* 1974;**46**:30-1.
- 37- Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch* 1985;**25**:17-24.
- 38- Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res* 1975;**9**(4):278-85.
- 39- Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res* 1986;**20**(5):398-405.
- 40- Bibby BG, Mundorff SA. Enamel demineralization by snack foods. *J Dent Res* 1975; **54**(3):461-70 May-Jun.
- 41- Holloway PJ, Mellanby M, Stewart RJC. Fruit drinks and tooth erosion. *Brit Dent J* 1985;**104**:305-9.
- 42- Miller CD. Enamel erosion properties of fruits and various beverages. *J Am Diet Assoc* 1952;**28**:319-24.

- 43- Imfeld TN. Acidogenic and erosive potential of soft drinks and mineral waters; in Meyers HM (ed): Identification of low caries risk dietary components. *Monog Oral Sci Base* 1983;**11**:165-74.
- 44- Stephan RM. Effects of different types of human foods on dental health experimental animals. *J Dent Res* 1966;**45**(5):1551-61 Sep-Oct.
- 45- Attin T, Barlage D, Buchalla W, Hannig C, Becker K. Dentine erosion by two citric acid concentrations with varying amounts of calcium. *Caries Res* 2004;**38**:389 [abstract 96].
- 46- International Programme on Chemical Safety, The 27th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1983. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additive Series: 18.

Table 1 – The mean (\pm SD) amount of phosphate released and normalized data of powered enamel dissolved in function of increasing iron concentrations added to Coke®.

Iron concentration (mmol/L)	Amount of phosphate released (μ g)	Normalised data
0	23.74 \pm 0.39	1.00 \pm 0.02
1.25	23.42 \pm 0.60	0.99 \pm 0.02
2.5	23.04 \pm 0.81	0.97 \pm 0.04
5	22.53 \pm 0.84	0.95 \pm 0.01
10	22.30 \pm 0.88	0.96 \pm 0.04
15	23.05 \pm 1.52	1.00 \pm 0.06
30	20.47 \pm 0.39	0.89 \pm 0.02*
60	19.07 \pm 0.57	0.83 \pm 0.02*

*Significantly different from control
($p < 0.05$).

Table 2 – The mean (\pm SD) amount of phosphate released and normalized data of powered enamel dissolved in function of increasing iron concentrations added to Sprite Zero®.

Iron concentration (mmol/L)	Amount of phosphate released (μ g)	Normalised data
0	33.39 \pm 0.47	1.00 \pm 0.02
1.25	32.12 \pm 0.20	0.96 \pm 0.01
2.5	32.82 \pm 0.19	0.98 \pm 0.01
5	32.78 \pm 0.25	0.98 \pm 0.01
10	33.99 \pm 0.17	1.02 \pm 0.01
15	35.14 \pm 0.45	1.04 \pm 0.02*
30	37.90 \pm 0.68	1.13 \pm 0.03*
60	38.58 \pm 0.35	1.15 \pm 0.01*

*Significantly different from control ($p < 0.05$).

Anexo 8

Manuscrito enviado para Archives of Oral Biology, referente ao subprojeto 2. Texto escrito de acordo com as normas do periódico.

Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink

Melissa Thiemi Kato, DDS^a

Sílvia Helena de Carvalho Sales-Peres, DDS, MS, PhD^a

*Marília Afonso Rabelo Buzalaf, DDS, MS, PhD^b

^aSocial Dentistry Department, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP 17012-901, Brazil.

^bDepartment of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP 17012-901, Brazil.

Running title: Effect of iron on enamel demineralisation.

***Corresponding author:** Present address: Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75. Bauru-SP, 17012-901, Brazil. Tel. + 55 14 32358246 Fax + 55 14 32262076 E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Abstract

(1) Objectives: The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of iron on the acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. (2) Design: Twenty-four blocks of bovine enamel were randomly assigned to 2 groups (experimental and control), which were exposed to 4 cycles of demineralisation in Coke® containing or not 10 mmol/L of iron, respectively, and another 4 cycles of remineralisation in artificial saliva. The softening of enamel was evaluated by %SMHC and wear analysis. Data were analysed using *t* test ($p < 0.05$). (3) Results: With regard to %SMHC, the experimental group presented average values (\pm EP) of -85.3 ± 0.9 , that were significantly higher ($t = 4.742$, $p = 0.0001$) than the ones observed for control group (-76.7 ± 1.6). The experimental group presented a mean wear (\pm EP) of 2.258 ± 0.221 μm , that was significantly lesser ($t = 3.669$, $p = 0.0006$) than the one observed for the control group (3.475 ± 0.248 μm). (4) Conclusions: Iron at 10 mmol/L significantly reduced the wear, but significantly enhanced the %SMHC of enamel blocks submitted to erosion by Coke®.

KEYWORDS: tooth erosion; demineralisation; iron; dental enamel; dental wear; soft drinks

Introduction

Dental erosion is a relatively new risk factor for dental health, introduced by today's lifestyle. This dental lesion is defined as loss of tooth substance by chemical processes not involving bacteria [1] caused by a variety of extrinsic and intrinsic factors. Demineralisation of tooth by erosion is caused by frequent contact between the tooth surface and acids as the acid present in soft drinks.

Many studies have tried to supplement soft drinks with ions, such as calcium, phosphate and fluoride in order to make these beverages more saturated in respect to the dental minerals, thus reducing their erosive potential [2-8]. The addition of calcium and phosphate has shown favorable results [2-8], but the addition of fluoride has only a good effect when toxic concentrations are used [9-12].

The iron ion is known by its important role in prevention of anemia [13]. Results from studies, conducted in humans and animals, have shown that iron ions (Fe^{2+} and Fe^{3+}) also have cariostatic properties. Alone or in combination with other ions, like fluoride and copper, iron has a great effect on the reduction of the cariogenic potential of the sugar [14-18]. Due to this, some researches have been focusing on the addition of other ions to acidic beverages. Among these ions, copper and iron seem to be plausible alternatives. Additionally, iron has an important role on the prevention of anemia, which is an important public health problem [19]. The supplementation of soft drinks with iron can be a strategy to reduce both problems.

Brookes et al. [20] developed a simple abiotic model system, which has been used to show the beneficial effect of copper [20] and iron [21 and 22] ions on the inhibition of enamel demineralisation. In these studies, acetic acid was used, in a process that mimics the erosive condition. Kato et al. [23], using this model, reported a significant inhibition of enamel powder dissolution by a soft drink supplemented with iron at 30 and 60 mmol/L. However, it could be hypothesized that the reactivity of the enamel powder with the acid of the soft drink would be higher when compared to that presented by enamel blocks, due to the greater surface area of the former. In the present study, we evaluated if these results found by Kato et al. [23] using enamel powder would be similar to those obtained using enamel blocks as a substrate.

Materials and methods

Analysis of the soft drink

The fluoride concentration in the soft drink (Coke®, Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brazil) was analysed by a specific electrode (Orion 9609, Orion Research, Cambridge, MA, USA), after buffering the samples with an equal volume of TISAB II. The pH was determined using a pHmeter (MB10, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brazil) immediately after opening the bottle and after adding iron.

The buffering capacity was determined by monitoring the pH, after serial additions of 50 µL of 0.2 mol/L NaOH in 6 mL of drink. The volume of NaOH necessary to change the pH of the drink to 5.5 and 7.0 was calculated.

Preparation of the enamel specimens

Enamel blocks (4X4X3 mm) were prepared from recently extracted and sound bovine incisors sterilized by storage in 2% formaldehyde solution (pH 7.0) for 30 days at room temperature. Enamel surface of the blocks was ground flat with water-cooled carborundum discs (320, 600 and 1200 grades of Al₂O₃ papers; Buehler, Lake Bluff, IL, USA), and polished with felt papers with diamond spray (1 µm; Buehler, Lake Bluff, IL, USA).

For standardization of the blocks, a previous selection of specimens for the initial microhardness was made (five indentations in different regions of the blocks, 25 g, 10 s, HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

Experimental design

Forty-eight blocks with a mean surface microhardness between 335 and 380 KHN were randomly divided into 2 groups (experimental and control), which differed according to the presence or not of iron (10 mmol/L) in the soft drink. In order to maintain reference surfaces for lesion depth determination, two layers of nail varnish (Risque, Niasi, Taboão da Serra, São Paulo, Brazil) were applied on half of the specimens' surfaces.

The blocks were subjected to four cycles of demineralisation and remineralisation. One complete cycle comprised the following steps: (1) Demineralisation in 25 mL of the drink for 10 min under gentle agitation at 37°C (for the experimental group, iron at 10 mmol/L was added to the drink) and (2) remineralization in 30 mL of artificial saliva [24] for 60 min under gentle agitation at 37°C. After each treatment, specimens were rinsed under deionized water.

Analysis of % superficial microhardness change

After the de-remineralisation cycles, the enamel surface Knoop microhardness was again measured as described earlier. In total, ten indentations on each specimen were made, five initially on sound enamel surface (SMH) and five after the demineralisation/remineralisation cycles (SMH₁). Using these measurements, the percentage of superficial microhardness change (%SMHC) was calculated ($\%SMH = [(SMH_1 - SMH) / SMH] * 100$).

Wear analysis

The enamel wear was determined in relation to the reference surfaces, by profilometry using a profilometer (Hommel Tester T 1000, Hommelwerke, VS, Schwenningen, Germany). Five readings were performed on each slab and the average wear depth was calculated. These profilometric traces were taken from the reference surface, across the exposed surface.

Statistical Analysis

GraphPad InStat was used. The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked. For the variables % SMHC and wear, unpaired *t* tests with and without Welch correction, respectively, were used. The significance level was set at 5%.

Results

The pH of Coke® remained unchanged (2.1) even after the addition of the iron. The volume of 0.2 mol/L NaOH necessary to change the pH of the drink to 5.5 and 7 was 300 and 500 μ L, respectively. The fluoride concentration of the drink was 0.55 mg/L.

With regard to %SMHC, the experimental group presented average values (\pm EP) of -85.3 ± 0.9 , that were significantly higher ($t= 4.742$, $p=0.0001$) than the ones observed for control group (-76.7 ± 1.6).

The experimental group presented a mean wear (\pm EP) of 2.258 ± 0.221 μ m, that was significantly lesser ($t=3.669$, $p=0.0006$) than the one observed for the control group (3.475 ± 0.248 μ m).

Discussion

A recent study conducted by our research group [23], evaluating the effect of increasing iron concentrations on the dissolution of enamel by Coke®, has shown that only the higher iron concentrations (30 and 60 mmol/L) significantly reduced the mineral loss. From the practical point of view, the addition of such high iron concentrations to the soft drink would not be feasible, due the alteration in the taste. However, the dental substrate tested by Kato et al. [23] was bovine enamel powder, which has a greater surface area when compared to enamel blocks. This could have interfered in the reaction of the beverages with enamel, thus facilitating the demineralisation. Due to these reasons, we hypothesized that it should be possible to find a favorable effect of iron on the reduction of enamel loss by Coke® even in lower concentrations, which was tested in the present study. Confirming this hypothesis, we found a significant reduction in the wear of enamel blocks when iron at 10 mmol/L was added to drink, when compared to control.

However, for the other response variable tested in the present study (%SMHC), an apparently contradictory result was found, since a significant increase in the %SMHC was seen when Coke® was supplemented with iron. At the light of the mechanisms considered for the reaction of iron with the dental enamel and its inhibiting effect on demineralisation, it is possible that these appearing discrepant results can be concealed. It has been shown that when the enamel is incubated with solutions of ferric salts, acid-resistant enamel surfaces are established, due to precipitation of ferric phosphate on the surface of the enamel, for the combination of ions ferric with ions phosphate dissolved of the surface of enamel [25]. The formation of this barrier of ferric phosphate was also suggested in recent in situ studies, simulating situations of high cariogenic [26] and erosive/abrasive challenges [27]. The formation of such barrier of ferric phosphate would reduce the contact of the soft drink with

the enamel in the subsequent acid challenges, which would in turn diminish the wear. On the other hand, when the microhardness test was performed, the indenter may have entered in contact not only with apatite (of the enamel), but also with the formed ferric phosphate layer. This could explain the reduction in %SMHC observed when the iron was used. It must be highlighted that this hypothesis still needs confirmation, which could be achieved through the analysis of the contents of Ca, P and Fe in the surface of the enamel using energy dispersive X-ray analysis (EDX).

In summary, the results of the present study show that iron at 10 mmol/L can reduce the dissolution of dental enamel in vitro in the presence of Coke®. However, the possible adverse effects of iron supplementation, such as teeth staining, possible modification of the taste of the beverage, as well as toxicity, must be taken into account when beverages are intended to be supplemented with this ion. WHO [28] has calculated a Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (PMDTI) of 56 mg/day (0.8 mg/Kg/day), although lower levels have been defined in some countries. Considering a beverage containing 10 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, this implies that the maximum volume to be consumed daily would be around 200 mL only. Thus, it would be interesting to test if lower iron concentrations would also be effective, as well as the combination of lower iron concentrations with other ions such as calcium, phosphate and fluoride, which have also been shown to have promising effects on enamel dissolution.

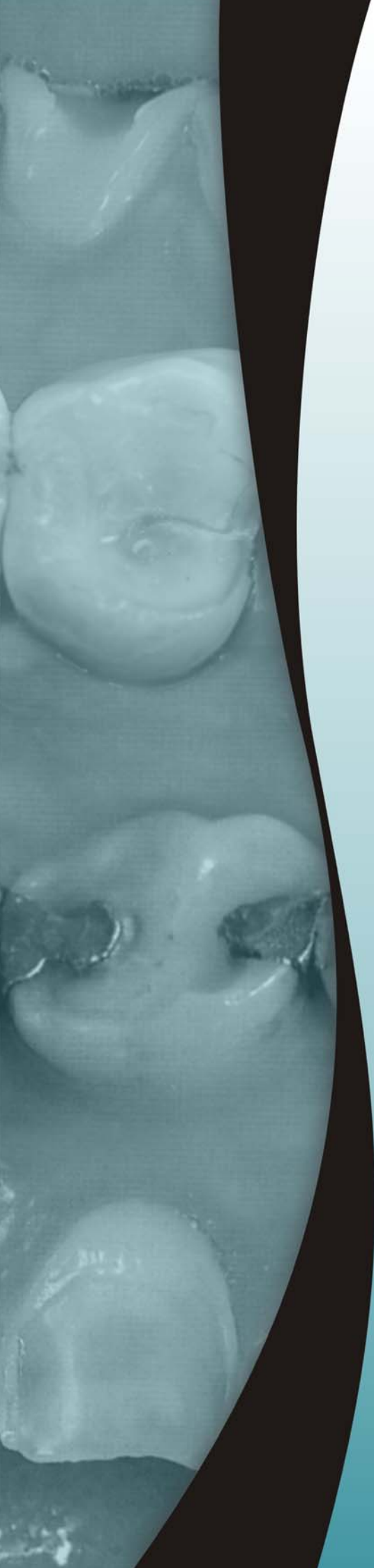
Acknowledgement: The authors thank FAPESP – Foundation for Support to the Research of the State of São Paulo (Grant n. 04/12632-2) - for the financial support.

References

- 1 - Zipkin J, 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**:613-26.
- 2 - Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;**20**:152-72.
- 3 - Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003;**48**:753-9.
- 4 - Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis.* 2005;**11**:7-12.
- 5 - Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. *Caries Res* 2002;**36**: 70-4.
- 6 - Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ 1: comparison with orange juice. *J Dent* 1999;**27**: 285-90.

- 7 - Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: 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**: 345-50.
- 8 - Hunter ML, Hughes JA, Parker DM, West NX, Newcombe RG, Addy M Development of low erosive carbonated fruit drinks 1: evaluation of two experimental orange drinks *in vitro* and *in situ*. *J Dent* 2003;**31**(4):253-60 May.
- 9 - Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. *Arch Oral Biol.* 1998;**43**:157-61.
- 10 - Hughes JA, West NX, Addy M. The protective effect of fluoride treatments against enamel erosion in vitro. *J Oral Rehabil.* 2004;**31**:357-63.
- 11 - Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res* 2002;**36**:75-80.
- 12 - Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. *Caries Res* 2001;**35**:229-34.
- 13 - Lynch SR. The impact of iron fortification on nutritional anemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;**18**:336-46.
- 14 - Bowen WH, Pearson SK. Residual effects of fluoride on a severe cariogenic challenge in rats. *Caries Res* 1994;**28**:246-50.
- 15 - 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**:1003-10.
- 16 - 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**:238-43.
- 17 - 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**:244-8.
- 18 - Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol* 1997;**42**:377-83.
- 19 - DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Statistics Quarterly* 1985, **38**:302-316.
- 20 - Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralization of human enamel. *Arch Oral Biol* 2003; **48**(1):25-30 Jan.
- 21 - Brookes SJ, Robinson C, Shore Rc, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralization. *Caries Res* 2004; **38**(4):401 [Abstract 132].

- 22 - Buzalaf MAR, Italiani FM, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralization of bovine dental enamel *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2006;**51**(10):844-8.
- 23 - Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SHC, Buzalaf MAR. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder *in vitro* by carbonated beverages. *Arch Oral Biol* 2006; *in press*
- 24 - Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;**39**(6):514-20.
- 25 - Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;**12**(3):113-24.
- 26 - Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf, MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed *in situ*. *Arch Oral Biol* 2006;**51**(6):471-5.
- 27 - Sales-Peres SHC, 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 Feb.
- 28 - International Programme on Chemical Safety, The 27th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1983. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additive Series: 18.



*Referências
Bibliográficas*

Referências Bibliográficas

- 1 Aine L, Baer M, Maki M. Dental erosions caused by gastroesophageal reflux disease in children. *ASDC J Dent Child*. 1993;60(3):210-14.
- 2 Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part I: prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds. *Br Dent J*. 2001;190(3):145-9.
- 3 Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old school children. Part II: influence of dietary intake. *Br Dent J*. 2001;190(5):258-61.
- 4 Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2001;46(8):697-703.
- 5 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. *Arch Oral Biol*. 1998;43(2):157-61.
- 6 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res*. 1999;78(12):1821-8.
- 7 Amin WM, Al-Omoush SA, Hattab FN. Oral health status of workers exposed to acid fumes in phosphate and battery industries in Jordan. *Int Dent J*. 2001;51(3):169-74.
- 8 Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:152-72.
- 9 Attin T, Barlage D, Buchalla W, Hannig C, Becker K. Dentine erosion by two citric acid concentrations with varying amounts of calcium [abstract 96]. *Caries Res*. 2004;38:389.
- 10 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.

- 11 Attin T, Knofel S, Buchalla W, Tutuncu R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. *Caries Res.* 2001;35(3):216-22.
- 12 Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003;48:753-9.
- 13 Attin T, Weiss K, Becker K, Buchalla W, Wiegand A. Impact of modified acidic soft drinks on enamel erosion. *Oral Dis.* 2005;11(1):7-12.
- 14 Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. *Caries Res.* 1998;32(5):344-50.
- 15 Bachra BN, Van Harskamp GA. The effect of polyvalent metal ions on the stability of a buffer system for calcification in vitro. *Calcif Tissue Res.* 1970;4(4):359-65.
- 16 Bardsley, PF, Taylor S, Milosevic A. Epidemiological studies of tooth wear and dental erosion in 14-year-old children in North West England. Part 1: The relationship with water fluoridation and social deprivation. *Br Dent J.* 2004;197(7):413-6.
- 17 Bartlett DW, Coward PY, Nikkah C, Wilson RF. The prevalence of tooth wear in a cluster sample of adolescent schoolchildren and its relationship with potential explanatory factors. *Br Dent J.* 1998;184(3):125-9.
- 18 Bartlett DW, Smith BG, Wilson RF. Comparison of the effect of fluoride and non-fluoride toothpaste on tooth wear in vitro and the influence of enamel fluoride concentration and hardness of enamel. *Br Dent J.* 1994;176(9):346-8.
- 19 Bibby BG, Mundorff SA. Enamel demineralization by snack foods. *J Dent Res.* 1975;54(3):461-70
- 20 Bowen WH, Pearson SK. Residual effects of fluoride on a severe cariogenic challenge in rats. *Caries Res.* 1994;28(4):246-50.
- 21 Brookes SJ, Robinson C, Shore Rc, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralization [abstract 132]. *Caries Res.* 2004;38(4):401.

22 Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):25-30.

23 Brunton PA, Hussain A. The erosive effect of herbal tea on dental enamel. *J Dent.* 2001;29(8):517-20.

24 Buchalla W, Lagerweij M, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Fluoride is able to reduce and erosive/abrasive enamel loss under severe erosive conditions [abstract 102]. *Caries Res.* 2004;38(4):291.

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

26 Buratto EM, Andrade L, Rath IBS, Tames DR. Avaliação do potencial erosivo aos tecidos duros dentais de bebidas esportivas nacionais. *Rev ABO Nac.* 2002;10(2):109-12.

27 Buzalaf MAR, Italiani FM, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2006;51(10):844-8.

28 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.

29 Dawes C, Macpherson LM. Effects of nine different chewing-gums and lozenges on salivary flow rate and pH. *Caries Res.* 1992;26(3):176-82

30 Deery C, Wagner ML, Longbottom C, Simon R, Nugent ZJ. The prevalence of dental erosion in a United States and a United Kingdom sample of adolescents. *Pediatr Dent.* 2000;22(6):505-10.

31 Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res.* 2001;80(2):466-9.

32 Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res.* 1986;20(5):398-405.

33 Duarte JM, Coelho LGC, Lessa WDDA. Avaliação *in vitro* da eficácia do flúor adicionado em refrigerantes na prevenção da desmineralização do esmalte do dente. Rev ABO Nac. 1999;7(5):307-13.

34 Dunning JC, Ma Y, Marquis RE. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. Appl Environ Microbiol. 1998;64(1):27-33.

35 Ferjerskov O. Fluoride in dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

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

37 Fuks A, Anaise J, Westreich V, Gedalia I. Effect of fluoride supplementation of a citrus beverage on the erosion rate of molars of hamsters. J Dent Res. 1973;52(5):1149.

38 Fushida CE, Cury JA. Estudo *in situ* do efeito da frequência de ingestão de coca-cola na erosão de esmalte-dentina e reversão pela saliva. Rev Odontol Univ. São Paulo. 1999;13(2):127-34.

39 Ganss C, Klimek J, Brune V, Schurmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in situ*. Caries Res. 2004;38(6):561-6.

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

41 Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. Am J Dent. 1991;4(3):120-2.

42 Grandó LJ, Gabilan NH, Petry A, Cardoso AC, Tames DR. Erosão dental: estudo *in vitro* da erosão causada por refrigerantes e suco de limão no esmalte de dentes decíduos humanos: análises bioquímicas. Rev Odontopediatr. 1995;4(1):1-10.

43 Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH. In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1996;30(5):373-8.

44 Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res.* 2004;38(6):557-60.

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

46 Gudmundsson K, Kristleifsson G, Theodors A, Holbrook WP. Tooth erosion, gastroesophageal reflux, and salivary buffer capacity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(2):185-9.

47 Hall A F, 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.

48 Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):331-84.

49 Hanning M, Baltz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1999;33(5):372-9.

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

51 Hara AT, Turssi CP, Teixeira TC, Serra MC, Cury JA. Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(5):423-7.

52 Harding MA, Whelton H, O'Mullane DM, Cronin M. Dental erosion in 5-year-old Irish school children and associated factors: a pilot study. *Community Dent Health.* 2003;20(3):165-70.

53 Holloway PJ, Mellanby M, Stewart RJC. Fruit drinks and tooth erosion. *Br Dent J.* 1985;104:305-9.

54 Honório HM. Avaliação in situ do efeito individual e associado dos desafios erosivo e cariogênico em dentes humanos [tese doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2006.

55 Hughes JA, Jandt KD, Baker N, Parker D, Newcombe RG, Eisenburger M et al. Further modification to soft drinks to minimise erosion. A study in situ. *Caries Res.* 2002;36(1):70-4.

56 Hughes JA, West NX, Addy M. The protective effect of fluoride treatments against enamel erosion in vitro. *J Oral Rehabil.* 2004;31(4):357-63.

57 Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ 1. Comparison with orange juice. *J Dent.* 1999;27(4):285-9.

58 Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: 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.

59 Hughes JA, West NX, Parker DM, Van Den Braak HM, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent.* 2000;28(2):147-52.

60 Hunter ML, Hughes JA, Parker DM, West NX, Newcombe RG, Addy M. Development of low erosive carbonated fruit drinks 1. Evaluation of two experimental orange drinks in vitro and in situ. *J Dent.* 2003;31(4):253-60.

61 Hunter ML, West NS, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent.* 2000;28(4):257-63.

62 International Programme on Chemical Safety, The 27th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1983. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additive Series: 18.

63 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.

64 Imfeld TN. Acidogenic and erosive potential of soft drinks and mineral waters; in Meyers HM (ed): Identification of low caries risk dietary components. Monog Oral Sci Base. 1983;11:165-74.

65 Imfeld TN. Dental erosion. Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):151-5.

66 Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. Caries Res. 1999;33(6):455-61.

67 Jarvinen VK, Rytomaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. J Dent Res. 1991;70(6):942-7.

68 Johansson AK, Sorvari R, Birkhed D, Meurman JH. Dental erosion in deciduous teeth: an in vivo and in vitro study. J Dent. 2001;29(5):333-40.

69 Jones L, Lekkas D, Hunt D, McIntyre J, Rafir W. Studies on dental erosion: An in vivo-in vitro model of endogenous dental erosion-its application to testing protection by fluoride gel application. Aust Dent J. 2002;47(4):304-8.

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

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

72 Koo H, Cury JA. Avaliação in situ de um dentifrício contendo MFP/DCPD na incorporação de flúor e remineralização do esmalte dental humano. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999;13(3):245-9.

73 Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. Caries Res. 2001;35(3):229-34.

74 Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. Caries Res. 1999;33(1):81-7.

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

76 Larsen MJ, Von der Fehr FR, Birkeland JM. Effect of fluoride on the saturation of an acetate buffer with respect to hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 1976;21(12):723-8.

77 Linnett V, Seow WK. Dental erosion in children: a literature review. Pediatr Dent. 2001;23(1):37-43.

78 Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353-80.

79 Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):191-8.

80 Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. Caries Res. 1995;29(5):349-54.

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

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

83 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.

84 Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MAR, 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.

85 Maia LC, Modesto A. Análise comparativa, ao microscópio eletrônico de varredura, de esmalte bovino exposto a diferentes soluções ácidas: um estudo *in vitro*. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1996;10(3):161-8.

86 Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed *in situ*. *Arch Oral Biol.* 2006;51(6):471-5.

87 McCracken M, O'Neal SJ. Dental erosion and aspirin headache powders: a clinical report. *J Prosthodont.* 2000;9(2):95-8.

88 Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res.* 1991;99(6):457-62.

89 Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.* 1991;25(2):81-7.

90 Meurman JH, Harkonen M, Naveri H, Koshinen J, Torkko H, Rytomaa I et al. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res.* 1990;98(2):120-8.

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

92 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.

93 Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol.* 1997;42(5):377-83.

- 94 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.
- 95 Miller CD. Enamel erosion properties of fruits and various beverages. *J Am Diet Assoc.* 1952;28:319-24.
- 96 Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res.* 1997;31(1):44-49.
- 97 Millward A, Shaw L, Smith AJ, Rippin JW, Harrington E. The distribution and severity of tooth wear and the relationship between erosion and dietary constituents in a group of children. *Int J Paediatr Dent.* 1994;4(3):151-7.
- 98 Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Res.* 1993;27(1):21-5.
- 99 Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J.* 1998;48(6) :529-39.
- 100 Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res.* 2003;37(3):225-31.
- 101 Niew Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res.* 1987;21(4):297-309.
- 102 Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):156-61.
- 103 Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch* 1985;25:17-24.
- 104 O'Sullivan EA, Curzon MEJ. A comparison of acid dietary factors in children with and without dental erosion. *ASDC J Dent Child.* 2000;67(3):186-92, 160

105 Oginni O, Olusile AO. The prevalence, aetiology and clinical appearance of tooth wear: the Nigerian experience. *Int Dent J.* 2002; 52(4):268-72.

106 Oppermann RV, Rolla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Caries Res.* 1980;14(6):422-7.

107 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.

108 Peres KG, Armenio MF, Peres MA, Traebert J, De Lacerda JT. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. *Int J Paediatr Dent.* 2005;15(4):249-55.

109 Rao SVC. Preparation of solid solutions of calcium and iron hydroxylapatites. *J Inst Chem Calcutta* 1974;46:30-1.

110 Rios D, Honorio 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.

111 Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Buzalaf MAR, Lauris JRP, Machado MAAM. The prevalence of deciduous tooth wear in 6-year-old children and its relationship with potential explanatory factors. *Oral Health Prev Dent.* In press 2007.

112 Robb ND, Smith BG, Geidrys-Leeper E. The distribution of erosion in the dentitions of patients with eating disorders. *Br Dent J.* 1995;178(5):171-5.

113 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.

114 Rytomaa I, Meurman JH, Koshinen J, Laakso T, Gharasi S, Turunen R. In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res.* 1988;96(4):324-33.

- 115 Sales-Peres SHC, Magalhães AC, Machado MAAM, Buzalaf MAR. In vitro evaluation of the erosive potential of five soft drinks. *Eur J Dent*. In press 2007.
- 116 Sales-Peres SHC, 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.
- 117 Scheutzel P. Etiology of dental erosion – intrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2):178-90.
- 118 Shabat E, Anaise J, Westreich V, Gedalia I. Erosion and fluoride content in molar surfaces of rats that drank a cola beverage with and without fluoride. *J Dent Res*. 1975;54(2):426.
- 119 Shipley S, Taylor K, Mitchell W. Identifying causes of dental erosion. *Gen Dent*. 2005;53(1):73-5.
- 120 Smith AJ, Shaw L. Baby fruit juices and tooth erosion. *Br Dent J*. 1987;162(2):65-7.
- 121 Smith BG, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. *Br Dent J*. 1984;156(12):435-8.
- 122 Sobral MAP, Luz MAAC, Teixeira AG, Garona Netto N. Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento da erosão dental. *Pesqui Odontol Bras*. 2000;14(4):406-10.
- 123 Sorvari R. Effects of various sport drink modifications on dental caries and erosion in rats with controlled eating and drinking pattern. *Proc Finn Dent Soc*. 1989;85(1):13-20.
- 124 Sorvari R, Kiviranta I, Luoma H. Erosive effect of a sport drink mixture with and without addition of fluoride and magnesium on the molar teeth of rats. *Scand J Dent Res*. 1988;96(3):226-31.
- 125 Spencer AJ Jr, Ellis LN. The effect of fluoride and grapefruit juice on the etching of teeth. *J Nutr*. 1950;42(1):107-15.

126 Stephan RM. Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals. *J Dent Res.* 1966;45(5):1551-61.

127 Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res.* 1975;9(4):278-85.

128 Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta.* 1968;15:969-74.

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

130 Tenovuo J, Lagerlog F. Saliva. In : Thylstrup A, Fejerskov O. *Textbook of clinical cariology.* 2 ed. Copenhagen : Munksgaard ; 1994. p.17-43.

131 Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J.* 1988;12(3):113-24.

132 Vieira A, Jager DH, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. *Caries Res.* 2007;41(1):61-7.

133 Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2005;39(5):371-9.

134 Vieira A, Ruben JL, Stokroos I, Huysmans MCDNJM. Surface and subsurface analysis of eroded bovine enamel pretreated with fluoride [abstract 101]. *Caries Res.* 2004;38(4):391.

135 Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005;39(6):514-20.

136 West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil.* 2001;28(9):860-4.

137 West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink 2: comparison with a

conventional blackcurrant juice drink and orange juice. *J Dent.* 1999; 27(5):341-4.

138 West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent.* 1998;26(4):329-35.

139 Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16(2):1-153.

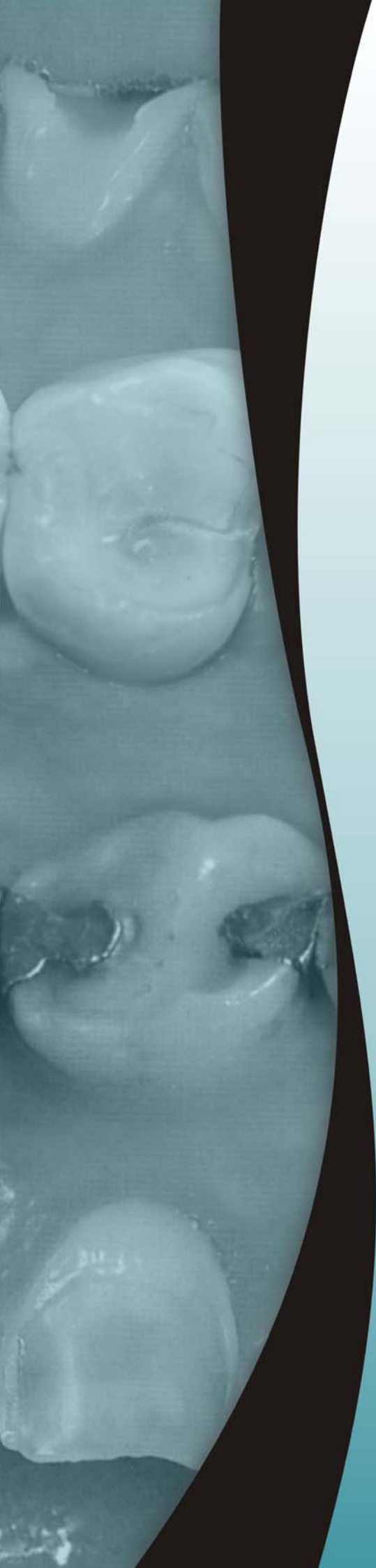
140 Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(4):245-53.

141 Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Arch Oral Biol.* 1999;44(3):203-14.

142 Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):162-77.

143 Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995;9(3):214-30.

144 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.



Abstract

Abstract

In vitro and *in situ* evaluation of the effect of iron ions on the erosion of bovine and human dental surface

The general aim of this study was to evaluate the effect of iron ion on inhibition of the erosion of bovine and human teeth submitted to acidic drinks, using *in vitro* and *in situ* protocols. The study was conducted in 3 steps. At the first subproject, it was evaluated, *in vitro*, the effect of increasing iron concentrations on the dissolution of bovine enamel powder when added to Coke[®] or Sprite Zero[®]. The iron concentration for which an inhibition of enamel dissolution was observed was used in the subsequent experiments. The average concentration of phosphate released was analysed spectrophotometrically. Data were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). In the second subproject, 24 specimens of bovine enamel were randomly assigned to 2 groups (experimental and control). They were exposed *in vitro* to 4 cycles of demineralization in Coke[®] containing or not 10 mmol/L of iron (experimental and control groups, respectively). Each demineralization cycle was followed by a remineralization cycle in artificial saliva. As for the third subproject, in an *in situ* crossover protocol, 10 volunteers wore palatal devices containing human 2 enamel and 2 dentin blocks during two 5-day crossover phases. The difference between these phases was the addition or not of iron at 10 mmol/L in Coke[®] before the immersion of the devices. The volunteers immersed the devices for 5 minutes in 150 mL of cola drink, containing or not iron, 4 times per day. The effect of iron on the inhibition of erosion in subprojects 2 and 3 was evaluated by %SMH and wear analysis. Data were analyzed using *t* test ($p < 0.05$). Results: Subproject 1 - when iron at 30 and 60 mmol/L was added to Coke[®], a significant reduction in the dissolution of powdered enamel was observed when compared to control (11 and 17%, respectively), while lowering iron concentrations did not have any effect on enamel powder dissolution. Regarding Sprite Zero[®], iron concentrations up to

10 mmol/L had no significant effect, while higher concentrations significantly increased enamel powder dissolution. Subproject 2- Iron at 10 mmol/L significantly reduced the wear, but significantly increased the %SMH of enamel blocks submitted to *in vitro* erosion by Coke[®]. Subproject 3- For enamel, when iron was used, a significant reduction in the wear and a non-significant reduction in the %SMH were observed. For dentin, the use of iron significantly reduced the wear but significantly enhanced the %SMH. Hence, we concluded that iron ion may reduce the erosion of bovine and human teeth caused by acidic drinks, depending on the type of acid present in the beverage.

Keywords: Tooth erosion. Demineralization. Iron. Dental enamel. Dentine.