

MEIRE COELHO FERREIRA

**AÇÃO DE ABRASIVOS NO ESMALTE HUMANO SUBMETIDO À  
EROSÃO – UM ESTUDO *IN SITU/EX VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

FLORIANÓPOLIS

2006

F383a Ferreira, Meire Coelho

Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão – um estudo in situ/ex vivo / Meire Coelho Ferreira; orientador Ricardo de Sousa Vieira. - Florianópolis, 2006.  
205 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Opção Odontopediatria.

Inclui bibliografia.

1. Esmalte dentário. 2. Abrasão dentária. 3. Erosão dentária. 4. Bebidas gasosas. 5. Dentifrícios. 6. Odontopediatria. I. Vieira, Ricardo de Sousa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-053.2

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

MEIRE COELHO FERREIRA

**AÇÃO DE ABRASIVOS NO ESMALTE HUMANO SUBMETIDO À EROSÃO –  
UM ESTUDO *IN SITU/EX VIVO***

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor em Odontologia”, área de concentração Odontopediatria, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de Dezembro de 2006.

---

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira  
*Orientador*

---

Prof. Dr. Saul Martins de Paiva  
*Membro*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Puppim Rontani  
*Membro*

---

Prof. Dr. Sylvio Monteiro Junior  
*Membro*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Santos Almeida  
*Membro*

*Dedico esta Tese,*

*A meus pais, **José e Antônia**, pelo amor incondicional,  
incentivo e apoio constante, dedicação integral,  
exemplos de luta, trabalho e caráter.  
Eu amo vocês...*



## *Agradecimentos Especiais*

*A meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**, pelo apoio irrestrito para a realização deste trabalho. Pelo apoio incondicional durante os anos que aqui passei, mesmo que em silêncio, no entanto, sempre transmitindo boa vontade e desprendimento. Tu és um exemplo de professor, que se traduz em carácter, educação, respeito, postura, bom ouvinte e solicitude para com o aluno. Mestre, muito obrigada pelas oportunidades e amizade!*

*A **meus irmãos**, que me apoiaram durante toda esta jornada.*

## *Agradecimentos*

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, pela oportunidade de crescimento intelectual e pessoal.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa do Coordenador, **Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira** e do Sub-Coordenador, **Prof. Dr. Luiz Henrique Maykot Prates**, pelo apoio irrestrito.

Ao diretor do Centro de Ciências da Saúde, **Cléo Nunes de Souza**, pela atenção e apoio.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia**, por contribuir com meu aperfeiçoamento profissional.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria, **Ricardo de Sousa Vieira, Izabel Cristina Santos Almeida, Joeci de Oliveira, Maria José de Carvalho Rocha, Vera Lúcia Bosco e Rosamaria T. Nogueira Areal**, pelos ensinamentos e amizade.

Às secretárias da Disciplina de Odontopediatria, **Elizabete Caldeira de Andrade e Ivalda Delorme dos Santos**, pelo apoio e amizade.

Ao **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp), pela co-orientação na realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp), pela atenção dispensada durante a análise laboratorial desta pesquisa.

Ao engenheiro **Marcos Blanco Cangiani**, do Laboratório da Disciplina de Materiais Dentários, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp), pelo auxílio prestado na operação do rugosímetro.

Aos colegas de doutorado, **Ana Cristina Gerent Petry Nunes, Ângela Scarparo Caldo Teixeira, Carla Moreira Pitoni, Eduardo Grigollo Patussi, Isabelita Azevedo Duarte, Michele da Silva Bolan e Mirian de Waele Souchois de Marsillac**, por terem compartilhado comigo saber, amizade e grandes momentos.

Aos voluntários, **Alexandre Cavazzola, Eduardo J. Berbigier, Catherine Schmitz Espezim, Helen Cristhiane Müller Nagano, Jaqueline Zanetti Depiné, Kazuza Bueno Ferreira, Michele da Silva Bolan, Mirian de Waele Souchois de Marsillac, Patrícia Nahirniak, Thais Regina Kummer e Valeska M. Pivatto**, pela contribuição inestimável! O apoio de vocês foi fundamental na realização desta pesquisa. Muito obrigada!

A **Thais Regina Kummer, Claudia de Abreu Busato, Karin Faust, Ana Carolina Couto Robles e Mariane Cardoso**, pelo convívio e amizade.

A amiga **Maria Letícia Ramos-Jorge**, pela realização da análise estatística desta pesquisa. Muito obrigada pelas horas e horas dedicadas à análise e pela disponibilidade sempre.

Às funcionárias da Biblioteca Setorial de Odontologia, **Vera Ingrid Hobold Sovernigo, Avani Feltz e Márcia Dietrich Santiago**, pelo carinho e dedicação dispensada.

Aos funcionários da Biblioteca Setorial de Medicina, **Maria Gorete Montguti Savi e Fabrício Simas**, pelo incansável auxílio e amizade.

*Ao funcionário do Laboratório de Pesquisa, **Lauro Silva**, pela amizade e convívio diário.*

*Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Ana Maria Vieira Frandolozzo e Diego André Caron**, pela presteza e atenção.*

*A **Misleine A. de Castro**, pelo companheirismo e amizade.*

*Às professoras **Rosemary de Souza Ferreira e Maria Augusta Moreira**, pela disponibilidade a qualquer hora.*

*Aos **funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina**, sempre prontos a nos atender.*

FERREIRA, Meire Coelho. **Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão – um estudo *in situ/ex vivo***. 2006. 205f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração Odontopediatria) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Este estudo *in situ/ex vivo* investigou o efeito abrasivo de dentifrícios não fluoretados contendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou sílica ( $\text{SiO}_2$ ), sobre o esmalte permanente humano erodido com um refrigerante do tipo cola. Durante 2 fases de 5 dias, 12 voluntários (média, 28 anos) usaram aparelhos palatais contendo 6 blocos de esmalte. Em cada fase, os aparelhos foram imersos em refrigerante, por 5min, 4x ao dia. Em dois momentos de desafio erosivo, 2 blocos não tiveram tratamento adicional, 2 blocos foram escovados com  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{SiO}_2$  imediatamente após a erosão e 2 blocos após 1h. A escovação foi executada por 30s. Entre as fases, um período de descanso de 2 dias foi seguido. Experimento *in vitro* foi realizado a fim de verificar a influência da saliva natural e artificial na variação da erosão. A variável de resposta foi rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) e análise morfológica. Os blocos de esmalte erodidos e abrasionados mostraram alteração da rugosidade superficial significativamente maior do que os blocos erodidos ( $p < 0,05$ ). Entre os blocos submetidos à abrasão imediata ou após 1h, não houve diferença estatisticamente significativa. Ambos os dentifrícios tiveram efeito abrasivo semelhante sobre os blocos erodidos. Não houve diferença significativa de rugosidade entre os blocos do GE (*in vitro*) e os blocos dos grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*). Os dados mostraram que independente do tipo de abrasivo de um dentifrício, a rugosidade superficial é aumentada quando há associação da

erosão à abrasão dental. Não houve um efeito maior da saliva natural ou artificial sobre a erosão dental.

**Palavras-chave:** esmalte dental, erosão, abrasão, bebidas gasosas, dentifrícios, carbonato de cálcio, dióxido de silício, rugosidade superficial, *in vitro*, *in situ/ex vivo*.

FERREIRA, Meire Coelho. **Evaluation of different abrasives on eroded human enamel – an in situ/ex vivo study.** 2006. 205f. Thesis (PhD in Dentistry – Pediatric Dentistry) – Postgraduate Program of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

This in situ/ex vivo study aimed to investigate the effects of two non-fluoridated dentifrices with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and silica ( $\text{SiO}_2$ ) on human permanent enamel eroded by a carbonated soft drink. During two phases over 5 days, 12 volunteers (mean age 28) used a palatal appliance with 6 enamel blocks. In each period, the appliances were immersed in the soft drink for 5 min, 4 times a day. In two moments of the erosive challenge, 2 enamel blocks were not additional treatment, 2 blocks were brushed either with a  $\text{CaCO}_3$  or  $\text{SiO}_2$  dentifrices, immediately after the erosive treatment and 2 blocks 1 h later. Brushing was made for 30 s. Between phases a 2 day washout period was followed. An in vitro study was also conducted to investigate artificial and natural saliva influence on the erosion variation. The results were expressed in enamel roughness ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) and morphology analysis. The eroded and abraded enamel blocks showed superficial roughness changes significant higher than the eroded blocks ( $p < 0.05$ ). Blocks submitted to immediate abrasion or 1 h later did not show significant statistical difference. Both dentifrices had a similar abrasive effect on the eroded blocks. There was no significant difference in roughness between the enamel blocks from the experimental group (in vitro) and blocks from the in situ/ex vivo groups ( $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$  control). Data showed that independently of the abrasive used, surface roughness is increased when erosion is associated to dental abrasion. It also did not have a

higher effect when comparing natural with artificial saliva in relation to dental erosion.

**Key words:** dental enamel, erosion, abrasion, carbonated beverages, dentifrices, calcium carbonate, silicon dioxide, surface roughness, in vitro, in situ/ex vivo.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CaCO<sub>3</sub>**: carbonato de cálcio

**SiO<sub>2</sub>**: sílica

**CNS**: Conselho Nacional de Saúde

**MS**: Ministério da Saúde

**ADA**: *American Dental Association*

**x**: vezes

**min**: minuto

**mm**: milímetro

**nº**: número

**s**: segundo

**µm**: micrometro

**SMH**: microdureza superficial

**R<sub>a</sub>**: rugosidade

**pH**: poder de hidrogênio

**g**: grama

**ml**: mililitro

**MEV**: microscópio eletrônico de varredura

**kV**: kilovoltagem

**h:** hora

**FDI:** *Fédération Dentaire Internationale*

**l:** litro

**ppmF:** parte por milhão de íon flúor

**KHN:** *knoop hardness number*

**REA:** *relative enamel abrasivity*

**RDA:** *relative dentin abrasivity*

**ISO:** *International Standards Organization*

**#:** *number*

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Versão em Português.....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Tabelas.....	44
2.1.2	Figuras.....	46
<b>2.2</b>	<b>Versão em Inglês.....</b>	<b>49</b>
2.2.1	Tables.....	68
2.2.2	Figures.....	70
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>196</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De tempos em tempos se observa uma mudança nos padrões alimentares da população, ora decorrente de valores e costumes agregados de outras culturas, ora decorrente de adaptações que a própria natureza obriga, ora como consequência dos avanços que a evolução produz. Não obstante, nos dias atuais, com a sofisticação das propagandas, onde questões como rapidez e praticidade de uso são salientadas, ocorreu um aumento no consumo de alimentos industrializados. Dentre estes alimentos estão as bebidas para pronto uso, como os refrigerantes, os sucos artificiais e as bebidas esportivas, consumidas, principalmente, por crianças e adolescentes. A indústria de refrigerantes é o segmento mais representativo do setor de bebidas no mercado brasileiro, sendo a Coca-Cola® a líder de mercado.

O ácido, maior constituinte dessas bebidas, é usado para balancear a doçura do açúcar, além de aumentar ou complementar o sabor associado e evitar a deterioração da bebida (WEST; HUGHES; ADDY, 2000). Os alimentos e bebidas ácidas são considerados os principais fatores causais para a ocorrência de lesões de erosão dental (JÄRVINEN; RYTÖMAA; HEINONEN, 1991; O'SULLIVAN; CURZON, 2000).

O processo erosivo é representado pela dissolução química dos tecidos dentais mineralizados por ácidos e/ou quelação, sem envolvimento bacteriano (TEN CATE; IMFELD, 1996). Este processo crônico pode levar à perda prematura do tecido dental, com conseqüente sensibilidade, irritação pulpar e necessidade de reconstruções coronárias extensas (HALL et al., 1999). A prevalência da erosão dental varia entre 25 a 60% (LUSSI et al., 1991; MILLWARD; SHAW; SMITH, 1994; MILOSEVIC; YOUNG; LENNON, 1994; NUNN, 1996; SMITH; ROBB, 1996; BARTLETT et al., 1998; AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2001; DUGMORE; ROCK, 2004) e é baseada em uma variedade de índices para erosão, critérios estabelecidos para os estudos, superfícies dentais examinadas, grupos populacionais e países (MATHEW; CASAMASSIMO; HAYES, 2002).

Além de alimentos e bebidas ácidas (LUSSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993), medicamentos como a vitamina C (HAYS et al., 1992) e aspirina (GRACE; SARLANI; KAPLAN, 2004), a exposição a ácidos ambientais provenientes de indústrias (BRITISH DENTAL ASSOCIATION, 1959) e piscinas cloradas (CENTERWALL et al., 1986) são fatores causais extrínsecos da erosão dental. Como fator intrínseco está o ácido gástrico que entra em contato com o meio bucal através do vômito crônico, decorrente de doenças orgânicas ou psicossomáticas e por meio de regurgitação ou refluxo gastroesofágico, complicação comum em pacientes com problemas gastrointestinais e durante a gravidez (SCHEUTZEL, 1996).

Qualquer substância que apresente um valor de pH abaixo de 5,5 pode causar erosão dental, no entanto, a freqüência de exposição deve ser alta e a

duração do contato ácido deve ser longa (MEURMAN; TEN CATE, 1996). O potencial erosivo do alimento ou bebida ácida não é exclusivamente dependente de seu pH, mas é também fortemente influenciado por sua capacidade tampão, tipo de ácido, propriedades quelantes, conteúdo e concentração de cálcio, fosfato e fluoreto, temperatura (LUSSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993; ZERO, 1996; MOSS, 1998; LUSSI et al., 2000; HUGHES; WEST; ADDY, 2004; LUSSI; JÄEGGI; ZERO, 2004) e adesividade (IRELAND, McGUINNESS; SHERRIFF, 1995).

Além dos fatores químicos, os comportamentais também influenciam na erosão, seja em sua extensão ou distribuição na cavidade bucal. Estas incluem o consumo diário de alimentos e bebidas ácidas (ASHER; READ, 1987; MILOSEVIC; YOUNG; LENNON, 1997), a ingestão de bebidas ácidas na hora de dormir (LUSSI; JÄEGGI; ZERO, 2004), a forma como os ácidos da dieta são introduzidos na cavidade bucal (ZERO, 1996; JOHANSSON; LINGSTRÖM; BIRKHED, 2002) e as práticas de higiene bucal (LUSSI; JÄEGGI; ZERO, 2004). O padrão de deglutição tem influência sobre a duração do contato entre a substância erosiva e a superfície dental, sobre quais dentes são contactados pela substância erosiva e o padrão de eliminação do ácido da cavidade bucal.

Quanto aos fatores biológicos, a saliva, através de mecanismos de proteção, pode modificar o desafio erosivo. O fluxo salivar atua na diluição e remoção dos agentes erosivos da cavidade bucal (HANNIG; BALZ, 1999) e a capacidade tampão salivar promove a neutralização dos ácidos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A composição mineral, a anatomia e oclusão dental, a anatomia dos tecidos moles bucais em relação aos dentes, os movimentos fisiológicos dos

tecidos moles e hábitos parafuncionais também modificam o processo erosivo (THOMAS, 1957; LUSSI; JÄEGGI; ZERO, 2004). A influência da língua em superfícies dentais palatais, acometidas severamente por erosão é uma constatação (MEURMAN et al., 1987; JÄRVINEN; RYTÖMAA; MEURMAN, 1992). Entretanto, além da ação mecânica, a manutenção do pH baixo, sobre a língua, após a ingestão de alimentos e bebidas ácidas, propicia a permanência, por mais tempo, da ação química (MEURMAN et al., 1987).

A película adquirida salivar afeta o desenvolvimento da erosão (HANNIG; BALZ, 1999), uma vez que restringe a difusão ácida, impedindo a dissolução imediata do esmalte dental (LENDEMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000) sendo, portanto, capaz de diminuir o efeito erosivo de soluções ácidas (MEURMAN; FRANK, 1991a). Investigações *in vitro* e *in situ* têm demonstrado o efeito protetor significativo conferido por esta membrana à superfície dental (NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN, 1987; AMAECHI et al., 1999b; HANNIG; BALZ, 1999, 2001; NEKRASHEVYCH; STÖSSER, 2003; HANNIG et al., 2004). A espessura mais fina da película na superfície palatina em relação a outras regiões da dentição (AMAECHI et al., 1999b) contribui de forma significativa para o maior envolvimento dessa superfície pela erosão dental (MILOSEVIC; YOUNG; LENNON, 1994; MILLWARD; SHAW; SMITH, 1994).

A erosão dental é freqüentemente associada a indivíduos com um alto nível de higiene bucal (MILLWARD; SHAW; SMITH, 1994), onde o abrasivo contido em dentifrícios tem papel preponderante na remoção total ou parcial da película, diminuindo, de tal maneira, seu efeito protetor (KUROIWA; KODAKA; KUROIWA, 1993).

A estrutura dental é submetida a outros tipos de desgaste, como a atrição e abrasão. Esses desgastes são decorrentes de fatores físicos, sendo a atrição um processo fisiológico resultante do contato entre um dente e outro (IMFELD, 1996; AL-MALIK et al., 2001), o qual se torna patológico e acentuado em portadores de bruxismo (SHINKAI et al., 1998). A abrasão, por sua vez, é um desgaste físico causado por um agente externo, mais comumente relacionado à higiene bucal excessiva, onde o paciente e material têm mostrado influenciar o processo. Os fatores relativos ao paciente incluem a técnica e frequência de escovação, o tempo gasto para sua execução e a força aplicada durante o procedimento. Os fatores relativos ao material abrangem o tipo de material das cerdas, a rigidez e tipo de término das cerdas, o desenho dos tufo, a flexibilidade e comprimento do cabo, assim como a abrasividade do dentífrico utilizado (IMFELD, 1996).

Pode-se afirmar que a superfície dental erodida é mais susceptível a influências mecânicas de atrição e abrasão (LINNETT; SEOW, 2001; WIEGAND et al., 2004), pois uma camada de tecido desmineralizado permanece (IMFELD, 1996). Quanto à ordem dos processos, é impossível definir qual ocorre primeiro, no entanto, é possível afirmar que de tempos em tempos um pode estar mais eminente que o outro, o que revela uma associação de fatores causais para os desgastes dentais (MEURMAN; TEN CATE, 1996; LARSEN et al., 2000).

Em se tratando do substrato dental erodido, a escovação com dentífrico, imediatamente após a desmineralização, promove um desgaste significativo do esmalte dental, entretanto, tende a diminuir com o aumento do período pré-escovação (JAEGGI; LUSSI, 1999; ATTIN et al., 2000; ATTIN et al., 2001).



Esse intervalo de tempo propicia o restabelecimento salivar quanto à supersaturação dos níveis de íons cálcio, fosfato e hidroxila e o retorno do pH salivar fisiológico. Uma vez restabelecidos, a superfície dental tende a ganhar íons, o que pode promover remineralização em alguma extensão e, conseqüentemente, tornar essa superfície menos vulnerável à abrasão (GEDALIA et al., 1991; EDGAR, 1992; AMAECHI; HIGHAM, 2001a). Este poder remineralizador da saliva é maior quando o fluxo salivar é aumentado por estímulo, uma vez que quando alto, possui maior capacidade tamponadora, pois os níveis de bicarbonato estarão aumentados (FDI, 1992; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; EDGAR, 1998), agindo mais eficazmente na neutralização dos ácidos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Associado à ação salivar, um dentífrício com abrasividade menor pode minimizar os efeitos da abrasão sobre uma superfície dental erodida. A abrasividade de um dentífrício é determinada pelo tamanho, quantidade, forma e dureza das partículas abrasivas assim como pelo conteúdo de flúor, pH e capacidade tampão (WÜLKNITZ, 1997; WIEGAND et al., 2004). As partículas abrasivas com formato regular e porosidade superficial conferem uma menor abrasividade aos dentífrícios (ANDRADE JÚNIOR; MACHADO, 2000). A porosidade faz com que a resistência à pressão das cerdas seja diminuída, propiciando uma abrasividade menor ao agente de polimento (PADER, 1988).

A abrasividade de uma formulação dentífrica é comumente descrita em termos de abrasividade relativa à dentina (RDA - *relative dentin abrasivity*) e abrasividade relativa ao esmalte (REA - *relative enamel abrasivity*) (HEFFERREN, 1976). A Organização Internacional de Padronização (ISO, 1995) especificou que para dentina, a abrasividade da formulação teste não

deve exceder 2,5x o abrasivo de referência (pirofosfato de cálcio – poder de limpeza de 100), em outras palavras, o RDA não deve exceder 250. Para esmalte, a ISO não tem definido um valor máximo de REA, mas tem utilizado um valor arbitrário de 10, ou seja, abaixo desse valor os dentifrícios são menos abrasivos ao esmalte do que o padrão pirofosfato de cálcio.

A menor abrasividade relativa ao esmalte (REA) de um dentifrício propicia um desgaste menor do esmalte dental hígido (JOINER et al., 2004), no entanto, em se tratado de esmalte erodido, mesmo com um valor de REA menor, o desgaste pode ser significativamente maior (JAEGGI; LUSSI, 1999).

Existem diversos tipos de carbonato de cálcio, os quais são diferenciados por sua forma cristalina, tamanho de partícula e densidade. A falta de uniformidade na forma cristalina e a presença de um percentual elevado de cristais de quartzo tornam esse abrasivo demasiado agressivo para o esmalte dental (PRISTA; BAHIA; VILAR, 1995). A sílica abrasiva constitui-se de partículas muito pequenas com grande poder de adsorção, possibilitando a formulação de produtos de densidade baixa (PEDRAZZI; LARA; PANZERI, 1999).

Avaliando dentifrícios comercializados na Europa, Wülknitz (1997) constatou que dentifrício contendo sílica hidratada foi o melhor, dentre os dentifrícios mono-abrasivos, em termos de efetividade de limpeza combinado ao valor baixo a moderado de abrasividade à dentina e esmalte. A adição de 1% de óxido de alumínio a dentifrícios à base de sílica melhorou a eficácia desses dentifrícios sem aumentar sua abrasividade em dentina. Os dentifrícios contendo carbonato de cálcio apresentaram valores de abrasividade à dentina

maiores, no entanto, não tiveram efetividade de limpeza proporcional a esses valores.

Como a severidade da perda de estrutura dental é aumentada quando uma superfície erodida é abrasionada, a exploração do efeito de abrasivos, contidos em dentifrícios, é justificável. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito abrasivo de dentifrícios não fluoretados contendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou sílica ( $\text{SiO}_2$ ), em dois tempos, sobre o esmalte permanente humano erodido com refrigerante do tipo cola. Foi realizado também um estudo *in vitro*, a fim de verificar a influência da saliva natural e artificial na variação da erosão.

## 2 ARTIGO

### 2.1 Versão em Português

#### **Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão – um estudo *in situ/ex vivo***

M.C. Ferreira<sup>a</sup> A.C.B. Delbem<sup>b</sup> R.S. Vieira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Disciplina de Odontopediatria, Departamento de Estomatologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, Brasil

Ação abrasiva no esmalte submetido à erosão

**Palavras-chave:** esmalte dental, erosão, abrasão, bebidas gasosas, dentifrícios, carbonato de cálcio, dióxido de silício, rugosidade superficial, *in vitro*, *in situ/ ex vivo*.

Artigo formatado segundo normas do Caries Research

**Autora para Correspondência:** Meire Coelho Ferreira

Rua 12, 648 – Ilha dos Araújo – Governador Valadares

CEP: 35.020-690 – MG – Brasil

Fone: (0) 33 32752988

e-mail: [meirecofe@ig.com.br](mailto:meirecofe@ig.com.br)

## Resumo

Este estudo *in situ/ex vivo* investigou o efeito abrasivo de dentifrícios não fluoretados contendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou sílica ( $\text{SiO}_2$ ), sobre o esmalte permanente humano erodido com um refrigerante do tipo cola. Durante 2 fases de 5 dias, 12 voluntários usaram aparelhos palatais contendo 6 blocos de esmalte. Em cada fase, os aparelhos foram imersos em refrigerante, por 5min, 4x/dia. Em dois momentos de desafio erosivo, 2 blocos não tiveram tratamento adicional, 2 blocos foram escovados com  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{SiO}_2$  imediatamente após a erosão e 2 blocos após 1h. A escovação foi executada por 30s. Entre as fases, um período de descanso de 2 dias foi seguido. Experimento *in vitro* foi realizado a fim de verificar a influência da saliva natural e artificial na variação da erosão. A variável de resposta foi rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) e análise morfológica. Os blocos de esmalte erodidos e abrasionados mostraram alteração da rugosidade superficial significativamente maior do que os blocos erodidos ( $p < 0,05$ ). Entre os blocos submetidos à abrasão imediata ou após 1h, não houve diferença significativa. Ambos os dentifrícios tiveram efeito abrasivo semelhante sobre os blocos erodidos. Não houve diferença significativa de rugosidade entre os blocos do GE (*in vitro*) e os blocos dos grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*). Os dados mostraram que independente do tipo de abrasivo de um dentifrício, a rugosidade superficial é aumentada quando há associação da erosão à abrasão dental. Não houve um efeito maior da saliva natural ou artificial sobre a erosão dental.

## Introdução

O consumo habitual de bebidas ácidas, principalmente de refrigerantes, por crianças e adolescentes, leva a uma maior predisposição à erosão dental. Esta patologia crônica representa a dissolução química dos tecidos dentais mineralizados por ácidos e/ou quelação, sem o envolvimento bacteriano [ten Cate e Imfeld, 1996].

Na fase inicial do processo erosivo, a desmineralização superficial do esmalte pode ser remineralizada. No entanto, em um estágio mais avançado, o mineral do esmalte externo é totalmente perdido e o reparo superficial já não é mais possível ficando, então, restrito à camada de esmalte desmineralizada subjacente [Lussi et al., 2004a]. A perda de estrutura dental torna-se acentuada caso a abrasão estiver associada. Estudos demonstram que o esmalte erodido é mais susceptível a abrasão do que o esmalte hígido [Attin et al., 2001; Hooper et al., 2003; Joiner et al., 2004; Turssi et al., 2004; Lussi et al., 2004b].

Diante de desafios erosivos, a atuação salivar ocorre por meio da neutralização e/ou eliminação dos ácidos que se encontram sobre a superfície dental [Hannig e Balz, 1999] e por atuação reparadora, mediante a reposição de minerais perdidos da estrutura dental [Amaechi e Higham, 2001a]. A película adquirida confere proteção à integridade do dente [Amaechi et al., 1999b; Hannig e Balz, 1999] através da restrição à difusão ácida.

Em geral, o processo de abrasão dental está ligado à higiene bucal e, mais precisamente, à escovação. Segundo Addy e Hunter [2003], a abrasão do

tecido dental é principalmente uma função do dentífrico. Como o hábito de higiene dental é popularmente difundido e atua na prevenção de doenças bucais e, uma vez que o consumo diário de sucos e refrigerantes, em alta frequência, por grupos de crianças e adolescentes, é um fato, a interação entre erosão e abrasão pode ter um efeito significativo na perda tecidual. Alguns estudos têm comprovado uma maior susceptibilidade do esmalte erodido à abrasão por dentífricos [Jaeggi e Lussi, 1999; Attin et al., 2001; Eisenburger et al., 2003; Hooper et al., 2003; Turssi et al., 2004; Rios et al., 2006].

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito abrasivo de dentífricos contendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e sílica ( $\text{SiO}_2$ ), sobre o esmalte permanente humano erodido com refrigerante do tipo cola. Um estudo *in vitro* foi também realizado, a fim de verificar a influência da saliva natural (estudo *in situ/ex vivo*) e artificial (estudo *in vitro*) na variação da erosão dental.

## **Materiais e Métodos**

### Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina. Doze voluntários adultos saudáveis (10 mulheres e 2 homens, média de idade: 28 anos) e com fluxo salivar estimulado  $> 1$  ml/min foram recrutados junto ao Curso de Odontologia da UFSC. O consentimento informado foi obtido junto aos voluntários.



## Desenho experimental

O estudo *in situ/ex vivo* foi do tipo cruzado, executado em duas fases de 5 dias. Os elementos sob avaliação foram: condição do substrato (erodido e erodido/abrasionado), dentífrico não fluoretado à base de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e tempo decorrido entre procedimento de erosão e abrasão (0min, 1h e desafio erosivo somente). Os abrasivos contidos nos dentífricos apresentavam abrasividade média. Doze voluntários utilizaram aparelhos palatais contendo 6 blocos de esmalte permanente humano (2 blocos/tratamento). Na 1ª fase do experimento, os voluntários foram escolhidos, aleatoriamente, para o tratamento com dentífrico à base de  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{SiO}_2$ , seguido do cruzamento na 2ª fase. Os grupos sob estudo foram: grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  (desafio erosivo), grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  imediata (escovação com dentífrico à base de  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{SiO}_2$  imediatamente após erosão) e grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  após 1h (escovação com dentífrico à base de  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{SiO}_2$  após 1h da erosão).

Um estudo *in vitro* foi também realizado por 5 dias, sendo blocos de esmalte submetidos a desafio erosivo (grupo experimental – GE) e saliva artificial (grupo controle – GC).

As variáveis de resposta foram rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) e análise morfológica.

## Preparo dos blocos de esmalte

Os blocos de esmalte (4 x 4 x 2mm) foram obtidos da superfície vestibular e/ou palatal de terceiros molares humanos totalmente inclusos, os quais foram armazenados em solução de timol a 0,1%, pH 7,0, à temperatura ambiente, até o momento da utilização.

Os blocos do estudo *in situ/ex vivo* foram fixados em bases acrílicas e os blocos do estudo *in vitro* foram embutidos em resina poliestirênica (Central do Fiberglass, Florianópolis, SC). A superfície do esmalte dos blocos foi planificada com lixas de carbetto de silício (600 e 1200; Norton, Vinhedo, SP). Para o polimento foi utilizado diamante em suspensão 1 e 1/4 $\mu$ m (Arotec, Cotia, SP) em disco de feltro SUPRA (Arotec, Cotia, SP). Parte da superfície do bloco foi coberta com duas camadas de verniz de unha (Risqué, Taboão da Serra, SP). O teste de microdureza Knoop foi executado com o microdurômetro HMV 2 versão 1.23 (Shimadzu Corp., Tokyo, Japão), sob a carga de 50g por 5s. Foram realizadas 5 indentações eqüidistantes em 100 $\mu$ m.

Foram selecionados 144 blocos para o estudo *in situ/ex vivo* e 48 blocos para o estudo *in vitro*, com média ( $\pm$ SD) de dureza de 297,35  $\pm$ 16,04KHN (*Knoop Hardness Number*) e 333,75  $\pm$  29,61KHN, respectivamente. Os valores médios dos blocos não variaram mais do que 10% entre si.

## Análise da rugosidade ( $R_a$ ) inicial

Os blocos foram secos com papel absorvente e a análise da  $R_a$  foi executada através de um rugosímetro (Surfcorder SE-1700 profilometer,

Kosaka Laboratory Ltd., Tokyo, Japão) equipado com uma agulha de diamante (raio = 2 $\mu$ m). Para registrar a medida de rugosidade, a agulha moveu-se em uma velocidade constante de 0,100mm/s com uma força de 0,7mN. O valor do *cut-off* foi de 0,250mm e o comprimento de leitura de 1,250mm. Cinco leituras, perpendiculares à direção do movimento da escovação, foram executadas em cada bloco de esmalte, e a média obtida foi utilizada como o valor inicial. O ponto de partida da agulha foi na região limítrofe do esmalte coberto com verniz de unha e do esmalte descoberto.

#### Preparo do aparelho palatal

O aparelho palatal foi confeccionado em resina acrílica, com 6 nichos (5 x 5 x 3mm), 3 de cada lado, na região posterior, de pré-molar a molar. Os blocos de esmalte, previamente esterilizados com óxido de etileno, foram fixados aos nichos com cera pegajosa (Newwax Technew, Rio de Janeiro, RJ), de forma que a superfície do bloco ficasse ao nível da resina acrílica, a fim de permitir contato uniforme da escova/dentifrício na superfície do bloco e para evitar o acúmulo de biofilme bacteriano.

#### Fase intra/extrabucal

Um período de *lead-in* de 7 dias foi seguido. Durante este período e por todo o período do experimento, os voluntários escovaram os dentes com dentifrício não fluoretado. Os aparelhos palatais foram usados em 2 fases experimentais de 5 dias com um período de *washout* de 2 dias. A cada dia, o aparelho foi inserido na cavidade bucal 1h antes [Jaeggi e Lussi, 1999] do 1º

procedimento de erosão, para a formação da película adquirida [Amaechi et al., 1999b]. Entre os procedimentos e após o último, o dispositivo permaneceu na cavidade bucal por 2h, a fim de que a saliva pudesse agir sobre os blocos de esmalte [Amaechi e Higham, 2001a]. Seis blocos foram submetidos à erosão, extrabucalmente, com 25ml de refrigerante do tipo cola fresco e gelado (*Coca-Cola*<sup>®</sup>, Vonpar Refrescos S.A., Antônio Carlos, SC), 4x/dia (9:00, 11:00, 14:00 e 16:00h), por 5min em cada imersão, sob agitação leve e à temperatura ambiente.

Em uma fase experimental, após dois momentos de desafio erosivo, foi realizada escovação de 4 blocos com  $\text{CaCO}_3$ , sendo 2 blocos escovados imediatamente após e 2 blocos escovados após 1h de exposição intrabucal. Os 2 blocos restantes não foram escovados. Após o ensaio de abrasão, o aparelho foi lavado por 20s em água corrente e inserido na cavidade bucal. Na outra fase foi utilizado  $\text{SiO}_2$ : foram repetidos os mesmos procedimentos do tratamento com  $\text{CaCO}_3$ . O procedimento de escovação foi realizado pela pesquisadora MCF e consistiu de movimentos lineares, por 30s [Jaeggi e Lussi, 1999], com uma escova dental infantil macia modificada (Linha Basic, Condor S.A., São Bento do Sul, SC) e 0,09g, aproximadamente, de dentífrico. Os voluntários foram cegados quanto ao dentífrico que estava sendo utilizado.

A cada dia do experimento, o aparelho foi imerso em solução aquosa de clorexidina a 0,2%, por 3 min, antes e após o uso, para evitar a formação de placa bacteriana. O aparelho foi usado das 8:00 às 18:00h, exceto durante as refeições, ingestão de líquidos que não fosse água e para a higiene bucal. Nestes momentos e após as 18:00h, o aparelho foi armazenado em caixa plástica e coberto com gaze embebida em soro fisiológico [West et al., 1998].

Findada a 1ª fase experimental, novos blocos de esmalte foram fixados ao aparelho. Após a finalização de cada fase, o aparelho foi imerso em solução de clorexidina a 0,5%, em 70% de base alcoólica por, no mínimo, 30min, para desinfecção [Pontefract et al., 2001].

Os voluntários foram instruídos a manter a alimentação diária habitual, com restrição ao consumo de alimentos e bebidas ácidas, a fim de não impedir o efeito remineralizador da saliva [Amaechi e Higham, 2001a]. A higienização da superfície do aparelho em contato com o palato foi feita 1x/dia, à noite, com escova dental macia sem dentifício [Hooper et al., 2004]. A água consumida pelos voluntários continha, em média, 0,8ppmF.

#### Estudo laboratorial

Vinte e nove blocos (grupo experimental - GE) foram submetidos à erosão com refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, sob agitação leve, à temperatura ambiente, 4x/dia (9:00, 11:00, 14:00 e 16:00h), por 5min em cada imersão [Amaechi et al., 1999a], por 5 dias. Cada bloco foi imerso em 10ml de refrigerante [Meurman e Frank, 1991]. Após cada imersão, os blocos foram lavados com água deionizada por 20s, imersos em saliva artificial e mantidos a 37°C até o próximo procedimento de erosão. Os blocos permaneceram em saliva artificial por 2h. Findada a última imersão diária em refrigerante, os blocos foram mantidos em saliva artificial por mais 2h. Após este tempo os blocos foram removidos da saliva artificial, lavados com água deionizada por 20s, cobertos com gaze umedecida em soro fisiológico e mantidos à temperatura ambiente até o dia seguinte. Previamente ao primeiro procedimento de erosão, os blocos foram imersos em saliva artificial [Amaechi

et al., 1999a] por 1h. Dezenove blocos (grupo controle - GC) permaneceram em saliva artificial por 5 dias. A saliva artificial foi trocada diariamente [Amaechi et al., 1999a].

#### Análise da rugosidade ( $R_a$ ) final

A  $R_a$  final foi executada em todos os blocos, após os tratamentos, assim como descrito para a leitura da  $R_a$  inicial.

#### Preparo dos blocos dentais para análise morfológica ao microscópio eletrônico de varredura

Vinte e quatro blocos do estudo *in situ/ex vivo* foram selecionados, aleatoriamente, 4 blocos por grupo, para análise das alterações morfológicas na superfície de esmalte erodida e/ou abrasionada.

Os blocos de esmalte tiveram, primeiramente, o esmalte de unha removido com um cotonete umedecido em acetona, sendo tomado o devido cuidado para não contaminar a superfície erodida e/ou abrasionada. Para a remoção da película adquirida, os blocos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 24h [Hannig e Balz, 1999]. Em seguida, os blocos foram secos, desidratados em sílica gel (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ), montados em suportes específicos para MEV (“stubs” de alumínio) e cobertos 2x por 80s com ouro-paládio através do metalizador (SCD 005, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram analisadas ao MEV (Philips XL 30, Philips Electronic Instruments Inc, Mahwah, NJ, USA), que operou a 10-20 kV e com aumentos de 15x a 4.000x.

## Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância (teste de Levene) e ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Os dados de desfecho para esmalte erodido e/ou abrasionado foram avaliados estatisticamente usando testes não paramétricos (Wilcoxon e Mann-Whitney). A diferença entre as medianas de rugosidade ( $R_a$  inicial e  $R_a$  final) e a alteração na rugosidade ( $R_a$  final menos  $R_a$  inicial) foram consideradas para análise.

O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os cálculos estatísticos foram executados empregando o programa *Software Package for Social Sciences* (SPSS for Windows, version 12.0, SPSS Inc, Chicago, Ill).

## Resultados

O desafio erosivo proporcionou um padrão de dissolução variável, com amostras de esmalte apresentando dissolução do centro dos prismas (fig. 1), da bainha dos prismas ou da área interprismática (fig. 2). Observaram-se regiões com padrão de dissolução irregular (fig. 3) e áreas menos afetadas e denotando ausência de dissolução (fig. 4). As amostras erodidas e abrasionadas apresentaram semelhanças estruturais com as amostras erodidas, onde o padrão prismático foi mantido (fig. 5).

Os dados de rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final dos grupos (*in situ/ex vivo* e *in vitro*) são sumarizados nas tabelas 1 e 2. A comparação da alteração da rugosidade entre os grupos está contida nas tabelas 3 e 4. Para o estudo *in situ/ex vivo*, diferença significativa foi verificada entre o grupo controle  $\text{CaCO}_3$  e

CaCO<sub>3</sub> imediata ( $p < 0,001$ ), controle CaCO<sub>3</sub> e CaCO<sub>3</sub> após 1h ( $p = 0,001$ ), controle SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub> imediata ( $p = 0,014$ ) e controle SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub> após 1h ( $p = 0,039$ ). Entre os dentifrícios (CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub>), não houve diferença significativa na alteração da rugosidade dos blocos de esmalte. No estudo *in vitro*, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ( $p < 0,001$ ).

Não houve diferença significativa entre o GE (*in vitro*) e controles CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> (*in situ/ex vivo*) ( $p = 0,748$ ;  $p = 0,567$ , respectivamente).

## **Discussão**

O modelo intrabucal possibilita verificar a resistência da estrutura dental frente a desafios ácidos e de abrasão, pois permite a interação com a saliva e película adquirida. Este estudo simulou uma situação diária, em que a ingestão de bebidas ácidas 4x/dia é considerada uma frequência alta e fator de risco para a erosão dental [O'Sullivan e Curzon, 2000]. O ensaio de abrasão por dois momentos retrata uma tendência nos hábitos de higiene bucal [Al-Dlaigan et al., 2002]. Quanto aos dentifrícios, deu-se preferência aos manipulados, a fim de minimizar efeitos não controlados de outros ingredientes. A limitação do estudo vai de encontro a questões éticas, como a ingestão de bebidas ácidas, fazendo com que o procedimento fosse executado extrabucalmente. Desta forma, o desafio erosivo não pôde estimular o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva.

A ingestão de líquidos produz um fluxo na superfície dental que tem influência sobre o grau de erosão e desmineralização dessa estrutura [Eisenburger e Addy, 2003]. Para simular esta turbulência, em ambos experimentos, o procedimento de erosão foi realizado sob agitação.



A capacidade tampão, pH, propriedades quelantes, adesividade e o deslocamento de um líquido devem ser considerados no processo erosivo. A habilidade de adesão de uma bebida ao esmalte dental é baseada em suas propriedades termodinâmicas, isto é, no trabalho termodinâmico de adesão. A aderência maior de uma substância ácida faz com que haja um tempo de contato prolongado com a superfície dental, tornando crescente a probabilidade de erosão. Um refrigerante à base de cola adere mais fortemente ao esmalte dental do que a saliva, e sob condições de equilíbrio esse refrigerante não seria deslocado da superfície do esmalte pela saliva (Ireland et al., 1995). Portanto, qualquer bebida que possa ser prejudicial para o esmalte, pode ser mais nociva ainda se for resistente à remoção pela saliva.

Evidências laboratoriais e clínicas indicam que a erosão do esmalte dental causa perda irreversível do esmalte superficial e desmineralização da superfície subjacente ao fenômeno erosivo [Eisenburger et al., 2000, 2001; Amaechi e Higham, 2001a; Gregg et al., 2004; Rios et al., 2006]. Esta superfície desmineralizada é mais susceptível à remoção por abrasão física do que o esmalte hígido [Hooper et al., 2003; Joiner et al., 2004; Turssi et al., 2004; Lussi et al., 2004b]. No presente estudo, uma diferença estatisticamente significativa foi constatada entre blocos de esmalte erodidos e blocos erodidos e abrasionados, o que confirma a vulnerabilidade da superfície erodida. Ambas, erosão e profundidade de desmineralização, *in situ*, podem ser reduzidas pela proteção proporcionada pela película adquirida e pela remineralização salivar. A restrição à difusão ácida pela película é limitada [Hannig e Balz, 1999], principalmente diante de desafios ácidos freqüentes. O aparelho palatal foi inserido na cavidade bucal 1h antes do início do experimento diário e mantido

por 2h entre os procedimentos de erosão e/ou abrasão. Segundo Wetton et al., [2006], o pré-tratamento com saliva natural por períodos de 1, 2 e 4h é capaz de limitar a profundidade da erosão dental.

Embora a resistência à abrasão possa ser aumentada ao se postergar a escovação pós-eventos erosivos, não ocorreu diferença significativa na abrasão dos blocos escovados imediata e 1h após, contrariamente aos resultados de Jaeggi e Lussi [1999], Attin et al. [2001] e Rios et al. [2006], que constataram diferença estatisticamente significante entre 0 e 60min de exposição intrabucal. Entretanto, corroborando os achados de Attin et al. [2001], ao se compararem os blocos somente erodidos com aqueles submetidos à abrasão imediata ou 1h após o desafio erosivo, observou-se uma diferença significativa. Os valores de rugosidade dos blocos erodidos e escovados após 1h não foram significativamente distintos dos blocos escovação imediata, o que conjectura que a abrasão pela língua [Gregg et al., 2004] pode ter contribuído com a alteração na rugosidade superficial dos blocos escovados após 1h.

Ao se compararem os blocos tratados com  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$ , não houve diferença significativa entre eles em promover a abrasão do esmalte erodido. Estes resultados são confirmados por Turssi et al. [2004], que avaliaram dentifrícios com abrasivos distintos e não constataram diferenças significativas na abrasão conferida ao esmalte erodido, comprovando que até mesmo um dentifrício menos abrasivo remove com facilidade mineral de uma superfície desmineralizada. Hooper et al. [2003] também verificaram abrasividade similar de dentifrícios com valores de RDA (*relative dentin abrasivity*) distintos ao esmalte dental erodido, demonstrando que o fator abrasivo foi sobreposto pelo

fator esmalte erodido. A mesma constatação foi obtida por Eisenburger et al. [2003], em que a sílica abrasiva não teve efeito contundente no desgaste do esmalte dental erodido. A escovação dos espécimes de esmalte com pasta fluida de sílica propiciou desgaste tecidual maior, no entanto, não significativo quando comparado à escovação com solução salina. Isto comprova que a região mais externa do esmalte desmineralizado é mecanicamente instável.

Os blocos de esmalte do GE e GC (*in vitro*) tiveram um aumento significativo na rugosidade e uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre eles, demonstrando que o refrigerante à base de cola, pelo período proposto, foi eficaz em promover a erosão dental. O efeito do refrigerante sobre o esmalte dental não é função somente do pH ácido e da acidez titulável do meio, mas também da adesão à superfície. Embora um filme viscoso de saliva artificial possa ser retido na superfície impedindo a desmineralização, sua atuação é de curta duração, uma vez que o desafio erosivo com refrigerante à base de cola é capaz de deslocá-lo [Ireland et al., 1995], juntamente com a turbulência promovida pela agitação durante o procedimento.

Eisenburger et al. [2001] constataram que a exposição de espécimes de esmalte desmineralizado à saliva artificial por 1, 2 ou 4h resultou em remineralização parcial, enquanto os espécimes mantidos em saliva por 6, 9 e 24h mostraram pouca evidência de perda tecidual. Segundo Amaechi et al. [1999a], a saliva artificial atuando alternadamente ao processo erosivo pode proporcionar menor perda mineral às amostras de esmalte. No entanto, a precipitação espontânea de íons cálcio e fosfato sobre o esmalte erodido tende a ocorrer após longos períodos de contato [Amaechi et al., 1999a].

A erosão dos blocos do GE foi similar à verificada nos blocos do controle  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*), contrariamente aos achados de West et al. [1998], em que a erosão, *in vitro*, foi consideravelmente maior do que a registrada *in situ*. Entretanto, diferentemente deste estudo, a erosão do experimento *in situ* foi realizada extrabucalmente, o que pode ter influenciado os resultados, uma vez que não houve estímulo do fluxo salivar e da capacidade tampão da saliva.

O padrão morfológico do esmalte erodido e/ou abrasionado foi, em geral, de dissolução preferencial do centro dos prismas. Segundo Meurman e ten Cate [1996], este tipo de dissolução está relacionado à exposição ácida prolongada. Áreas aparentemente não afetadas, adjacentes a áreas erodidas, foram constatadas. A ocorrência dessas regiões mostra que os efeitos da acidez não são uniformes [Whitehead et al., 1997] e está ligada a variações estruturais no esmalte ou devido à presença de esmalte aprismático [Meurman e Frank, 1991; Sorvari et al., 1994].

Mesmo após a escovação, a estrutura prismática foi ainda identificável, o que sugere que a escovação com dentífrico remove somente parte do esmalte desmineralizado. A morfologia similar entre as amostras erodidas e erodidas/abrasionadas é corroborada em estudo conduzido por Lippert et al. [2004]. Os achados de rugosidade são confirmados pelo padrão prismático característico que ocorre diante de desafios ácidos.

Os dados mostraram que independente do tipo de abrasivo utilizado em um dentífrico, a rugosidade superficial é aumentada quando há associação da erosão à abrasão dental. Não houve um efeito maior da saliva natural ou artificial sobre a erosão dental.

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos voluntários que prontamente aceitaram participar deste estudo e a Maria Letícia Ramos-Jorge por realizar a análise estatística.

## Referências

Addy M, Hunter ML: Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *Int Dent J* 2003;53:177-186.

Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith AJ: Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part III: Influence of oral hygiene practices. *Br Dent J* 2002;192:526-530.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil* 1999a;26:97-102.

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* 1999b;78:1821-1828.

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* 2001a;46:697-703.

Attin T, Knöfel S, Buchalla W, Tütüncü R: In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralised enamel. *Caries Res* 2001;35:216-222.

Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M: Ultrasonication as a method to study enamel demineralization during acid erosion. *Caries Res* 2000;34:289-294.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP: Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001;35:211-215.

Eisenburger M, Addy M: Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehabil* 2003;30:1076-1080.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M: Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 2003;37:450-455.

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;38:557-560.

Hannig M, Balz M: Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1999;33:372-379.

Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M: Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin Periodontol* 2003;30:802-808.

Hooper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'Ath J, Parker DM, Roedig-Penman A, Addy M: A comparison of enamel erosion by a new sports drink compared to two proprietary products: a controlled, crossover study in situ. *J Dent* 2004;32:541-545.

Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M: An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res* 1995;29:470-476.

Jaeggi T, Lussi A: Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res* 1999;33:455-461.

Joiner A, Pickles MJ, Tanner C, Weader E, Doyle P: An in situ model to study the toothpaste abrasion of enamel. *J Clin Periodontol* 2004;31:434-438.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD: Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res* 2004;38:464-472.

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

Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B: Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. *Caries Res* 2004b;38:567-571.

Mathew T, Casamassimo PS, Hayes JR: Relationship between sport drinks and dental erosion in 304 university athletes in Columbus, Ohio, USA. *Caries Res* 2002;36:281-287.

Meurman JH, Frank RM: Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25:81-87.

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

O'Sullivan EA, Curzon MEJ: A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000;67:186-192.

Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Yates R, Newcombe RG, Addy M: The erosive effects of some mouthrinses on enamel. *J Clin Periodontol* 2001;28:319-324.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, Buzalaf MAR: 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;40:218-223.

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM: Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 1994;28:227-232.

ten Cate JM, Imfeld T: Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci* 1996;104:241-244.

Turssi CP, Faraoni JJ, Rodrigues Jr. AL, Serra MC: An in situ investigation into the abrasion of eroded dental hard tissues by a whitening dentifrice. *Caries Res* 2004;38:473-477.

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;26:329-335.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M: Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 2006;40:213-217.

Whitehead AS, Lo LY, Watts DC, Wilson NHF: Changes of surface texture of enamel in vivo. *J Oral Rehabil* 1997;24:449-453.

## Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) inicial e final dos grupos (*in situ/ex vivo*). Valores medianos.

	Rugosidade ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ )		Valor de $p^*$
	Inicial	Final	
<b>Grupos <math>\text{CaCO}_3</math></b>			
Controle $\text{CaCO}_3$	0,07	0,25	<0,001
$\text{CaCO}_3$ imediata	0,06	0,35	<0,001
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,06	0,32	<0,001
<b>Grupos <math>\text{SiO}_2</math></b>			
Controle $\text{SiO}_2$	0,08	0,26	<0,001
$\text{SiO}_2$ imediata	0,06	0,36	<0,001
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,06	0,34	<0,001

Controle  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  (erosão);  
 $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  imediata (erosão/abrasão);  
 $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  após 1h (erosão/abrasão).  
 24 blocos de esmalte/grupo  
 \*Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

Tabela 2 – Rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) inicial e final dos grupos (*in vitro*). Valores medianos.

Grupos	Rugosidade ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ )		Valor de $p^*$
	Inicial	Final	
<b>GE</b>	0,06	0,25	<0,001
<b>GC</b>	0,06	0,08	0,003

Grupo experimental (GE) – 29 blocos de esmalte  
 Grupo controle (GC) – 19 blocos de esmalte  
 \*Teste de Wilcoxon para amostras pareadas



Tabela 3 - Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos do estudo *in situ/ex vivo*.

	Mediana
<b>Grupos <math>\text{CaCO}_3</math></b>	
Controle $\text{CaCO}_3$	0,16 <sup>a,c</sup>
$\text{CaCO}_3$ imediata	0,30 <sup>b,d</sup>
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,27 <sup>b,e</sup>
<b>Grupos <math>\text{SiO}_2</math></b>	
Controle $\text{SiO}_2$	0,18 <sup>a,c</sup>
$\text{SiO}_2$ imediata	0,31 <sup>b,d</sup>
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,28 <sup>b,e</sup>

Medianas que não são diferentes significativamente compartilham a mesma letra sobrescrita (letras a, b – para cada dentifrício; letras c, d, e – entre dentifrícios).

Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas.

Tabela 4 - Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre GE e GC (*in vitro*).

Grupos	Mediana
<b>GE</b>	0,16
<b>GC</b>	0,02

Grupo experimental (GE) – 29 blocos de esmalte

Grupo controle (GC) – 19 blocos de esmalte

Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas.

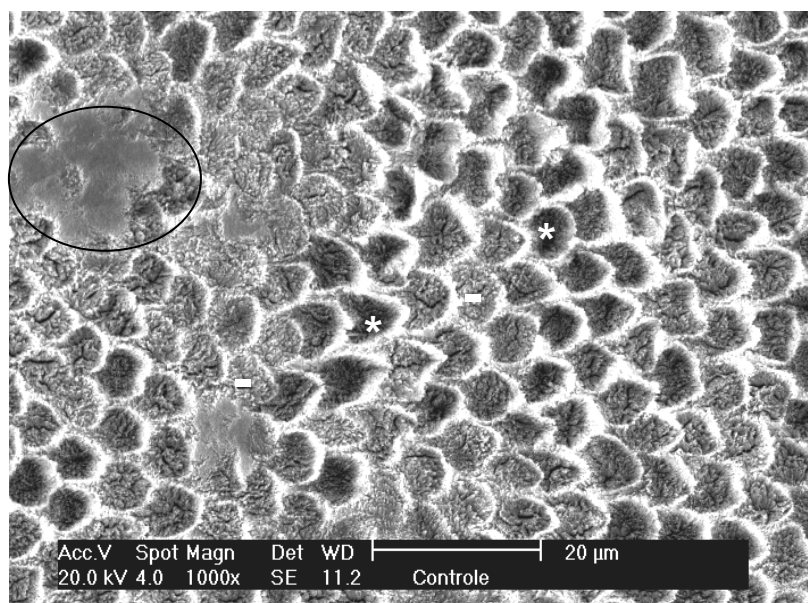


Figura 1 - Amostra do grupo controle  $\text{CaCO}_3$ . Padrão não uniforme de erosão pode ser observado. Em alguns prismas, o centro foi mais atacado (asterisco) do que em outros prismas (quadrado). Área apresentando esmalte menos afetado (círculo).

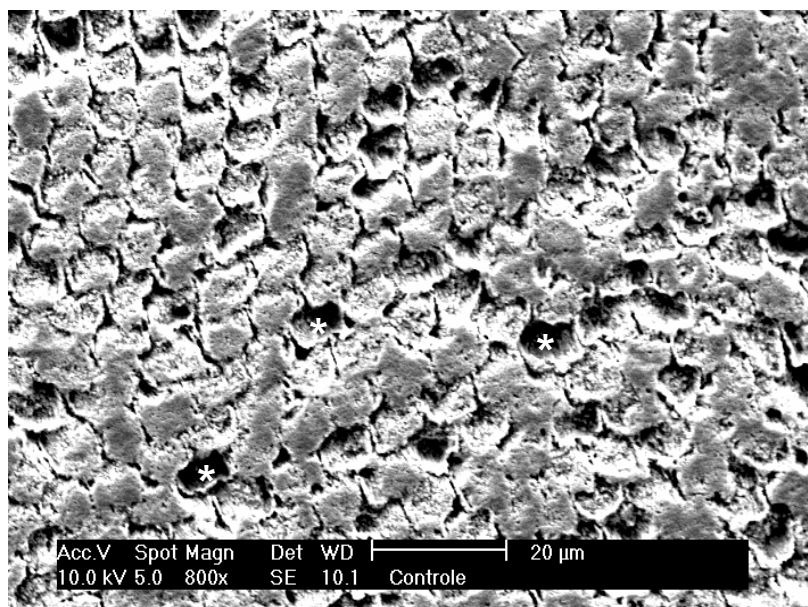


Figura 2 - Amostra do grupo controle  $\text{CaCO}_3$ . Observa-se um padrão de condicionamento reverso que indica uma dissolução preferencial ocorrendo nas áreas periféricas do prisma (área interprismática), com exceção para alguns prismas isolados (asterisco).

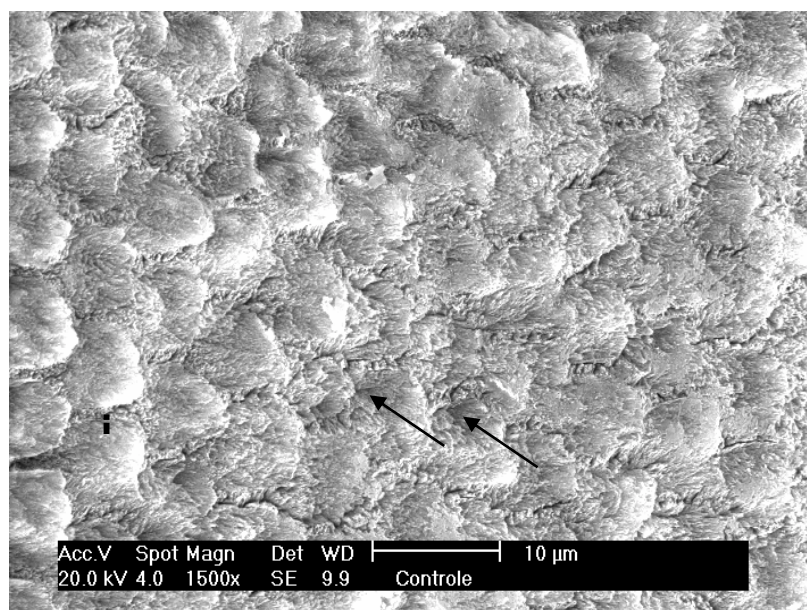


Figura 3 - Amostra do grupo controle CaCO<sub>3</sub>. Observa-se uma variabilidade do padrão de dissolução. No lado esquerdo da imagem, visualiza-se dissolução na região interprismática (i) e, no centro da imagem, a cabeça dos prismas foi também afetada (setas).

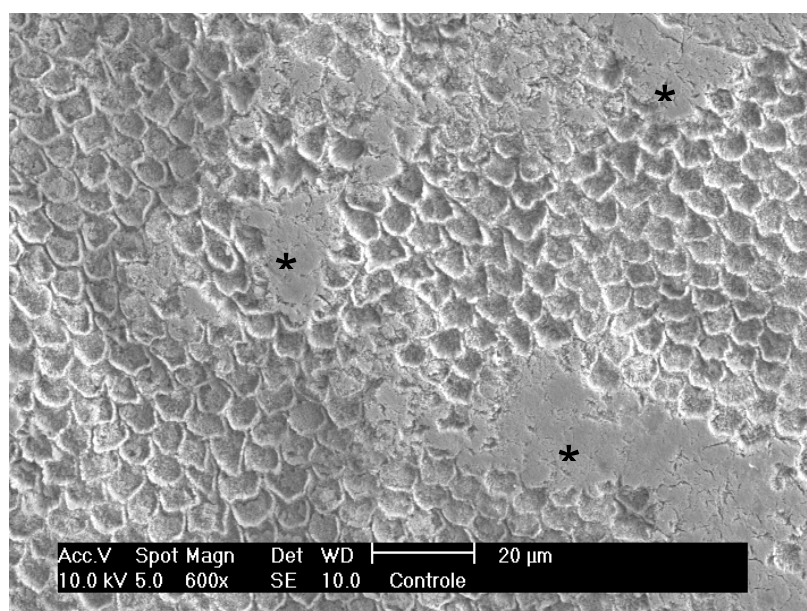


Figura 4 - Amostra do grupo controle SiO<sub>2</sub>. Dissolução preferencial do centro do prisma. Áreas menos afetadas (asterisco).



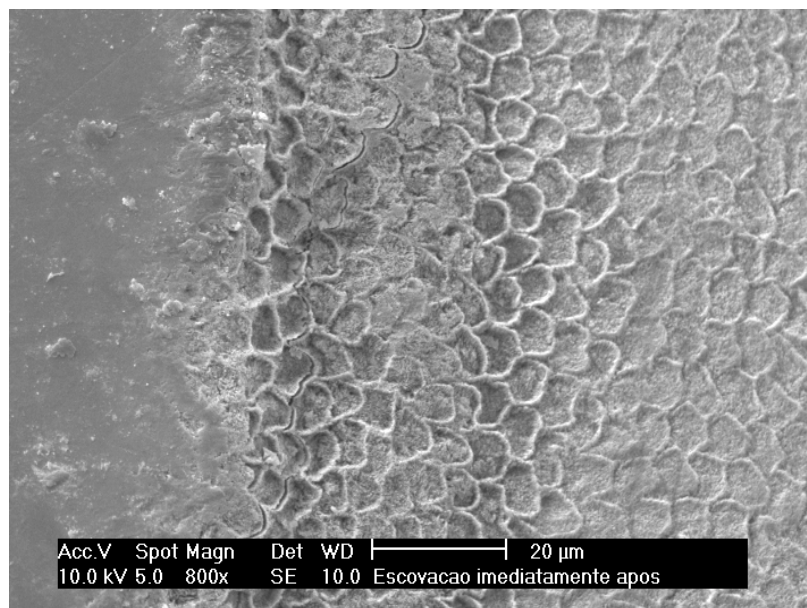


Figura 5 - Amostra do grupo SiO<sub>2</sub> escovação imediata. As regiões mais claras mostram-se menos comprometidas.

## 2.2 Versão em Inglês

### **Evaluation of different abrasives on eroded human enamel – an in situ/ex vivo study**

M.C. Ferreira<sup>a</sup> A.C.B. Delbem<sup>b</sup> R.S. Vieira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pediatric Dentistry Course, Estomatology department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pediatric Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, Brazil

Evaluation of abrasives on eroded human enamel

**Key words:** dental enamel, erosion, abrasion, carbonated beverages, dentifrices, calcium carbonate, silicon dioxide, surface roughness, in vitro, in situ/ex vivo.

**Corresponding author:** Meire Coelho Ferreira

Rua 12, 648 – Ilha dos Araújos – Governador Valadares

CEP: 35.020-690 – MG – Brazil

Fone: + 55 (0) 33 32752988

e-mail: [meirecofe@ig.com.br](mailto:meirecofe@ig.com.br)

### **Declaration of interests**

**Title of article: “Evaluation of different abrasives on eroded human enamel – an in situ/ex vivo study“.**

This letter states that none of the authors have a conflict of interest in regard to financial, economic or professional interests that may influence positions presented in the article.

## Abstract

This in situ/ex vivo study aimed to investigate the effects of two non-fluoridated dentifrices with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and silica ( $\text{SiO}_2$ ) on human permanent enamel eroded by a carbonated soft drink. During two phases over 5 days, 12 volunteers used a palatal appliance with 6 enamel blocks. In each period, the appliances were immersed in the soft drink for 5 min, 4 times a day. In two moments of the erosive challenge, 2 enamel blocks were not additional treatment, 2 blocks were brushed either with a  $\text{CaCO}_3$  or  $\text{SiO}_2$  dentifrices, immediately after the erosive treatment and 2 blocks 1 h later. Brushing was made for 30 s. Between phases a 2 day washout period was followed. An in vitro study was also conducted to investigate artificial and natural saliva influence on the erosion variation. The results were expressed in enamel roughness ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) and morphology analysis. The eroded and abraded enamel blocks showed superficial roughness changes significant higher than the eroded blocks ( $p < 0.05$ ). Blocks submitted to immediate abrasion or 1 h later did not show significative difference. Both dentifrices had a similar abrasive effect on the eroded blocks. There was no significant difference in roughness between the enamel blocks from the experimental group (in vitro) and blocks from the in situ/ex vivo groups ( $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$  control). Data showed that independently the abrasive used, surface roughness is increased when erosion is associated to dental abrasion. It also did not have a higher effect when comparing natural with artificial saliva in relation to dental erosion.



## Introduction

Dental erosion can be defined as an irreversible loss of dental hard tissue due to a chemical process without involvement of microorganisms [ten Cate and Imfeld, 1996]. The widespread use of acidic beverages leads to the development of dental erosion.

In the initial phase of the erosive process the enamel can be remineralized. As the erosive process continues the enamel surface is lost and repair is not possible [Lussi et al., 2004a]. The loss of dental structure is higher if abrasion is associated. Studies show that the eroded enamel is more prone to abrasion than the sound enamel [Attin et al., 2001; Hooper et al., 2003; Joiner et al., 2004; Turssi et al., 2004; Lussi et al., 2004b].

Saliva plays an important role in erosive challenges cleaning dietary acids from the mouth [Hannig and Balz, 1999], minimizing the surface loss and rehardening of enamel softening [Amaechi and Higham, 2001a]. Acquired pellicle also plays an important role in the process protecting the tooth surface [Amaechi et al., 1999b; Hannig and Balz, 1999] by limiting acid diffusion.

In general dental abrasion is linked to oral hygiene mainly to brushing. According Addy and Hunter [2003] abrasivity is due mainly to the dentifrice. Dental hygiene habits are widely popular and prevent oral diseases but one must observe that, for fact, as the daily consumption of juices and soft drinks, in high frequencies, occurs on groups of children and adolescents, the interaction between erosion and abrasion might have a significant effect on dental tissue

loss. Some studies have demonstrated a higher susceptibility of eroded enamel to abrasion by dental dentifrices [Jaeggi and Lussi, 1999; Attin et al., 2001; Eisenburger et al., 2003; Hooper et al., 2003; Turssi et al., 2004; Rios et al., 2006].

The aim of this study was to evaluate the abrasive effect of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and silica ( $\text{SiO}_2$ ) dentifrices on eroded human permanent enamel. An in vitro study also was accomplished to assess the influence of natural (in situ/ex vivo study) and artificial saliva (in vitro study) in the dental erosion process.

## **Materials and Methods**

### Ethical aspects

This study was approved by the Human Being Research Ethics Committee from the Federal University of Santa Catarina. Twelve healthy adult volunteers (10 women and 2 men, average age of 28 years) and with a stimulated saliva flow rate  $> 1$  ml/min were recruited among dentistry students. The informed consent was obtained.

### Experimental design

The in situ/ex vivo study was a two-period crossover design, developed in 5 days on each phase. Eroded and eroded/abraded enamel, non-fluoridated dentifrices with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and silica ( $\text{SiO}_2$ ) and period occurred between erosion and abrasion were evaluated (0 min, 1 h and

erosive challenge only). The abrasives used presented a medium abrasivity. Twelve volunteers used a palatal appliance containing 6 blocks of permanent human enamel. In the first phase of the experiment the volunteers were randomly chosen either the CaCO<sub>3</sub>-based or SiO<sub>2</sub>-based dentifrice and then crossed in the second phase. The groups under study were: CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> control groups (erosive challenge), CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> immediate groups (brushing with either CaCO<sub>3</sub> or SiO<sub>2</sub> dentifrice immediately after erosion) and CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> after 1h groups (brushing with either CaCO<sub>3</sub> or SiO<sub>2</sub> dentifrice 1 h after erosion).

An in vitro study was also conducted for 5 days and blocks were submitted erosive challenge (experimental group – GE) and artificial saliva (control group – GC).

The response variables were expressed in enamel roughness ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) and morphology analyses.

#### Preparation of enamel blocks

Enamel blocks (4 x 4 x 2 mm) were obtained from buccal and/or palatal surfaces of unerupted human third molars, which were stored in a 0.1% thymol solution (pH 7.0), at room temperature until their use.

Blocks for the in situ/ex vivo study were fixed on acrylic bases and the blocks used for the in vitro study were embedded in self-curing polyester resin. The surface enamel of the block was ground flat with water-cooled 600 and 1,200-grit silicon carbide papers (Norton, Vinhedo, Brazil) and polishing with 1 e 1/4 $\mu\text{m}$  diamond suspension on cloths (Arotec, Cotia, Brazil). Part of the block

surface was covered with two layers of nail varnish. A surface Knoop microhardness was performed under a load of 50 g for 5 s in a hardness tester (HMV 2, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Five indentations with 100  $\mu\text{m}$  between them were made. One hundred forty four blocks were selected to the in situ/ex vivo and 48 blocks for the in vitro study ( $297,35 \pm 16,04$  and  $333,75 \pm 29,61$  KHN, respectively). The blocks mean values did not vary more than 10%.

#### Measurement of roughness ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ ) initial

The roughness ( $R_a$ ) of the enamel blocks was measured using profilometer (Surfcorder SE-1700, Kosaka, Tokyo, Japan). The diamond stylus had a tip radius of 2  $\mu\text{m}$  and recordings were performed at a constant velocity of 0.1 mm/s and a load of 0.7 mN. The cut-off value was 0.25 mm and the reading length was 1.25 mm. Five readings were performed on each block. These profilometric traces were taken from the limit between area covered with nail varnish and treatment area.

#### Palatal appliance preparation

Acrylic palatal appliance was made with 6 sites (5 x 5 x 3 mm) recessed into the polished surface of device. Enamel blocks, previously sterilized in ethylene oxide, were fixed with sticky wax (Newwax Technew, Rio de Janeiro, Brazil). The enamel blocks surface were located at the same level of the acrylic resin to allow an uniform contact between the block surface and the brush bristles avoiding accumulation of dental plaque.

## Intra and extra-oral phases

The lead-in period was performed in 7 days. During this period and throughout the experimental phase, the volunteers brushed their teeth with a non-fluoridated dentifrice. The palatal appliances were worn in two 5 days experimental phases with a 2 days washout period. At each day the appliance was inserted into the oral cavity 1 h prior the first erosion procedure [Jaeggi and Lussi, 1999], to allow the formation of the acquired pellicle. Between the procedures the appliance was used for 2 h to allow saliva to interact the enamel surface [Amaechi et al., 1999b]. The blocks were submitted to erosion extrabuccally with 25 ml of fresh and cold cola soft drink (*Coca-Cola*<sup>®</sup>, Vonpar Refrescos S.A., Antônio Carlos, Brazil), 4 times a day (9:00am, 11:00am, 2:00pm e 4:00pm), for 5 min in each bath, under agitation, at room temperature. After two erosion challenges 4 blocks were brushed with CaCO<sub>3</sub>, 2 blocks brushed immediately after and 2 blocks brushed after 1 h in mouth. The other 2 blocks were no brushed. After the abrasion test, the appliance was washed for 20 s under running water and again used by the volunteer. In the other phase was repeated the same procedures but the blocks were brushed with SiO<sub>2</sub>. Brushing was performed by researcher MCF with linear movements for 30 s [Jaeggi and Lussi, 1999] with a soft brush (Condor S.A., São Bento do Sul, Brazil) and approximately 0.09 g of dentifrice. Volunteers were blinded in regard to the dentifrice used.

At each day the appliance was immersed in a 0.2% chlorhexidine aqueous solution for 3 min, before and after its use in the mouth to avoid

formation of bacterial plaque. Appliance was used from 8:00am to 6:00pm, except during meals times. At these moments and after 6:00pm, appliance was stored in a plastic box and covered with a gauze embebed in 0.9% saline [West et al., 1998]. After this first experimental phase, new enamel blocks were fixed to the appliance. At the end of each phase, the appliance was immersed in a 0.5% chlorhexidine in 70% spirit base solution for at least 30 min [Pontefract et al., 2001].

Volunteers were instructed to maintain their habitual dietary habits, avoiding acidic beverages and food. They were asked to brush the inner surface of the appliance once a day, at night, with a soft brush without dentifrice [Hooper et al., 2004]. Volunteers live in a fluoridated area (mean 0.8 ppmF).

#### Laboratory study

Twenty and nine enamel blocks (experimental group – GE) were eroded by a fresh and cold cola soft drink, under agitation, at room temperature, 4 times a day (9:00am, 11:00am, 2:00pm and 4:00pm), 5 min per immersion [Amaechi et al., 1999a], for 5 days. Each block was immersed in 10 ml of the soft drink [Meurman and Frank, 1991]. After each bath blocks were washed with deionized water for 20 s, immersed in artificial saliva and stored at 37°C until the next erosive challenge. The blocks were maintained in this fluid for 2 h. At the day final, blocks were removed from the artificial saliva, washed with deionized water for 20 s, covered with a gauze embebed in 0.9% saline and keep at room temperature until the next day. At each day, previously to the first erosion challenge, the blocks were immersed in artificial saliva [Amaechi et al.,

1999a] for 1 h. Nineteen blocks (control group – GC) were stored in artificial saliva for 5 days. The artificial saliva was changed daily [Amaechi et al., 1999a].

#### Measurement of roughness ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ ) final

The final  $R_a$  was assessed in all enamel blocks after the treatments as the initial  $R_a$  had been recorded.

#### Enamel blocks preparation for morphologic analysis in the scanning electronic microscope

Twenty four blocks in the in situ/ex vivo study were randomly selected to analyse morphologic alterations at the eroded and/or abraded enamel surface by scanning electronic microscope (SEM). Prior to the SEM evaluation, the enamel blocks were immersed in a 3% sodium hypochlorite solution for 24 h in order to removing acquired pellicle. After, the blocks were washed with deionized water, air-drying and sputter-coated with gold. The SEM (Philips XL 30, Philips Electronic Instruments Inc, Mahwah, NJ, USA) operated at 10-20kV with a magnification of 15x to 4,000x.

#### Statistical analysis

Data was submitted to the variance homogeneity test (Levene test) and to the normality test (Shapiro-Wilk). Data from the eroded and/or abraded was statistically evaluated using a non-parametric tests (Wilcoxon and Mann-

Whitney). Differences between medians ( $R_a$  initial e  $R_a$  final) and roughness change ( $R_a$  final less  $R_a$  initial) were considered for analysis.

The significance level was set at 5%. The analyses were performed with the Software Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 12.0, SPSS Inc, Chicago, USA).

## Results

Erosive challenge lead to a variable dissolution pattern, with samples show enamel dissolution at the center of the rods (fig. 1) or interprismatic areas (fig. 2). It was observed irregular dissolution pattern (fig. 3) and areas less affected with no dissolution (fig. 4). Eroded and abraded samples presented similar structural with eroded samples where the prismatic pattern was maintained (fig. 5).

Roughness data initial and final from the groups are summarized in tables 1 and 2. Tables 3 and 4 show a comparison of roughness change between the groups. In the in situ/ex vivo study a significant difference was assessed between the groups  $\text{CaCO}_3$  control and  $\text{CaCO}_3$  immediate ( $p < 0.001$ ),  $\text{CaCO}_3$  control and  $\text{CaCO}_3$  after 1 h ( $p = 0.001$ ),  $\text{SiO}_2$  control and  $\text{SiO}_2$  immediate ( $p = 0.014$ ) and  $\text{SiO}_2$  control and  $\text{SiO}_2$  after 1 h ( $p = 0.039$ ). In the in vitro study there was a significant statistical difference between the groups ( $p < 0.001$ ).

There was no significant difference between the dentifrices ( $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$ ) regarding roughness change of the blocks. There was no significant



difference between GE (in vitro) and CaCO<sub>3</sub> control and SiO<sub>2</sub> control (in situ/ex vivo) ( $p = 0.748$ ;  $p = 0.567$ , respectively).

## **Discussion**

In situ models provide conditions to verify the dental structure resistance to acidic and abrasive challenges because of the presence of the saliva and acquired pellicle. This study simulated an every day situation in which a 4x/day ingestion of acidic beverage is considered as high frequency ingestion and a risk factor to dental erosion [O'Sullivan and Curzon, 2000]. The abrasion assay for 2 times reproduces oral hygiene habits [Al-Dlaigan et al., 2002]. Manipulated dentifrices were chosen in order to minimize other ingredients effects, as additional abrasives. This study was limited by ethical matters as the ingestion of erosive beverages, so the erosive procedures were performed extra-orally. Thus the erosive challenge did not stimulate salivary flow nor the salivary buffer capacity.

Liquid ingestion produces a turbulence on the enamel surface and this has an influence on the erosion and demineralization process [Eisenburger and Addy, 2003]. In order to simulate this turbulence, in both experiments erosion procedures were made under agitation.

Buffer capacity, pH, chelating properties and adhesiveness towards a tooth surface must be considered in the erosive process. Adhesiveness of a beverage to the dental enamel is based on the thermodynamic adhesion. Soft drinks like Coca-Cola<sup>®</sup> adhere more strongly to enamel than saliva, and under equilibrium conditions it would not be displaced from the enamel surface by

saliva [Ireland et al., 1995]. Therefore, any beverage which may be harmful to enamel may promote higher damage if it is resistant to removal by saliva, due to a high thermodynamic work of adhesion.

Several studies have shown that dental erosion causes irreversible loss of the superficial enamel and demineralization of the subsurface [Eisenburger et al., 2000, 2001; Amaechi and Higham, 2001a; Gregg et al., 2004; Rios et al., 2006]. This demineralized surface is more susceptible to removal by abrasion than the sound enamel [Hooper et al., 2003; Joiner et al., 2004; Turssi et al., 2004; Lussi et al., 2004b]. In the present study a significant statistical difference was found between the eroded enamel blocks and eroded/abraded blocks. Both, in situ, erosion and demineralization depth can be reduced by the acquired pellicle and by salivary remineralization. The acid diffusion is partially inhibited by the acquired pellicle [Hanning and Balz, 1999], specially when acids challenges are frequent. The palatal appliance was used 1 h prior to the exposure to the soft drinks and kept in the mouth for 2 h between acidic exposure. According to Wetton et al. [2006], the enamel treated with natural saliva for periods of 1, 2 and 4 h presents lower erosion rates when exposed to a citric acid.

Although abrasion resistance could be increased delaying brushing, no significant difference was found in abrasion of the blocks that had been brushed immediately or 1 h after, contrary the results found by Jaeggi and Lussi [1999], Attin et al. [2001] and Rios et al. [2006]. However, there was a significant difference between the eroded blocks with those in which abrasion was immediately or 1 h after induced, which support the findings showed by Attin et al. [2001]. Results of surface roughness of the eroded blocks that had been

brushed 1 h later were not significant from those that had been immediately brushed after erosive challenge. This could be due to the tongue action [Gregg et al., 2004].

There was not a significant difference in abrasion of the eroded enamel between the blocks treated with  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$  dentifrices. These results are in agreement with those found by Turssi et al. [2004]. This supports that even a less abrasive dentifrice easily removes mineral from a demineralized surface. Hooper et al. [2003] also found that the erosive factor is determinant over the abrasive factor. The same was found by Eisenburger et al. [2003] showing that abrasive silica did not have a higher effect on the wear of the eroded enamel. Brushing with a fluid silica paste promotes a higher tissue wear, but it was not significant when compared to brushing with a saline solution. Therefore, the outer layer of the demineralized enamel is mechanically shaky.

Enamel blocks from GE and GC (in vitro) showed increased roughness and a significant statistical difference demonstrating that the soft drink used with the tested period was effective in promoting dental erosion. The effect of soft drink over dental enamel isn't only a function of acid pH and titratable acidity, but adhesion to surface. Although an artificial saliva film can be restrained over the surface, its action is brief, once erosion with cola soft drink is capable of displacing the saliva [Ireland et al., 1995], together with a turbulence promoted by agitation during this process.

Eisenburger et al. [2001] found that demineralized enamel exposed to artificial saliva for 1, 2 or 4 h promotes to partial remineralization, while the specimens stored in saliva for 6, 9 and 24 h showed less evidence of recidual

loss. According to Amaechi et al. [1999a] artificial saliva when acts alternatively to the erosive process it may cause a smaller mineral loss.

Erosion in the GE blocks was similar as found in  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$  control blocks (in situ/ex vivo). West et al. [1998] found that in vitro erosion was considerably larger than in situ. In our study in situ erosion was performed extra-orally, which could influence the results, once there was no salivary flow stimulus nor influence of the buffer capacity.

The morphologic pattern of the eroded and/or abraded enamel was in general dissolution of the center of the prisms. According Meurman and ten Cate [1996] this type of dissolution is related to longer acidic exposition. Areas not affected boundary to eroded areas were found. This shows that acidic effects are not uniform [Whitehead et al., 1997] and probably is related to structural variations in enamel or the presence of aprismatic enamel [Meurman e Frank, 1991; Sorvari et al., 1994].

Even after brushing, prismatic structure was observed. It suggests that brushing with a dentifrice removes only part of the demineralized enamel. Similar morphology between eroded and eroded/abraded samples was found by Lippert et al. [2004]. Roughness results are confirmed by the prismatic pattern which is characteristic in acidic challenges. Data showed that no matter the abrasive used, surface roughness is higher when there is an association with erosion and dental abrasion. It also did not have a higher effect when comparing natural with artificial saliva in relation to dental erosion.

## Acknowledgments

The authors thank the volunteers for their participation in this study and Maria Letícia Ramos-Jorge for her statistical analysis.

## References

Addy M, Hunter ML: Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *Int Dent J* 2003;53:177-186.

Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith AJ: Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part III: Influence of oral hygiene practices. *Br Dent J* 2002;192:526-530.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil* 1999a;26:97-102.

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* 1999b;78:1821-1828.

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* 2001a;46:697-703.

Attin T, Knöfel S, Buchalla W, Tütüncü R: In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralised enamel. *Caries Res* 2001;35:216-222.

Eisenburger M, Hughes J, West NX, Jandt KD, Addy M: Ultrasonication as a method to study enamel demineralization during acid erosion. *Caries Res* 2000;34:289-294.

Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP: Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001;35:211-215.

Eisenburger M, Addy M: Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehabil* 2003;30:1076-1080.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M: Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res* 2003;37:450-455.

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;38:557-560.

Hooper S, West NX, Pickles MJ, Joiner A, Newcombe RG, Addy M: Investigation of erosion and abrasion on enamel and dentine: a model in situ using toothpastes of different abrasivity. *J Clin Periodontol* 2003;30:802-808.

Hooper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'Ath J, Parker DM, Roedig-Penman A, Addy M: A comparison of enamel erosion by a new sports drink compared to two proprietary products: a controlled, crossover study in situ. *J Dent* 2004;32:541-545.

Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M: An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res* 1995;29:470-476.

Jaeggi T, Lussi A: Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res* 1999;33:455-461.

Joiner A, Pickles MJ, Tanner C, Weader E, Doyle P: An in situ model to study the toothpaste abrasion of enamel. *J Clin Periodontol* 2004;31:434-438.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD: Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res* 2004;38:464-472.

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

Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B: Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. *Caries Res* 2004b;38:567-571.

Meurman JH, Frank RM: Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25:81-87.

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

O'Sullivan EA, Curzon MEJ: A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child* 2000;67:186-192.

Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Yates R, Newcombe RG, Addy M: The erosive effects of some mouthrinses on enamel. *J Clin Periodontol* 2001;28:319-324.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, Buzalaf MAR: 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;40:218-223.

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM: Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 1994;28:227-232.

ten Cate JM, Imfeld T: Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci* 1996;104:241-244.

Turssi CP, Faraoni JJ, Rodrigues Jr. AL, Serra MC: An in situ investigation into the abrasion of eroded dental hard tissues by a whitening dentifrice. *Caries Res* 2004;38:473-477.

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;26:329-335.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M: Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 2006;40:213-217.

Whitehead AS, Lo LY, Watts DC, Wilson NHF: Changes of surface texture of enamel in vivo. *J Oral Rehabil* 1997;24:449-453.

## Tables and Figures

Table 1 – Initial and final roughness ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) of the groups (in situ/ex vivo). Medians values.

	Roughness ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ )		p-value*
	Initial	Final	
<b>CaCO<sub>3</sub> groups</b>			
CaCO <sub>3</sub> control	0.07	0.25	<0.001
CaCO <sub>3</sub> immediate	0.06	0.35	<0.001
CaCO <sub>3</sub> after 1h	0.06	0.32	<0.001
<b>SiO<sub>2</sub> groups</b>			
SiO <sub>2</sub> control	0.08	0.26	<0.001
SiO <sub>2</sub> immediate	0.06	0.36	<0.001
SiO <sub>2</sub> after 1h	0.06	0.34	<0.001

CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> controls (erosion);  
 CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> immediate (erosion/abrasion);  
 CaCO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> after 1h (erosion/abrasion).

24 enamel blocks/group

\* paired non-parametric Wilcoxon test

Table 2 – Initial and final roughness ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) of the groups (in vitro). Medians values.

Groups	Roughness ( $R_a$ , $\mu\text{m}$ )		p-value*
	Initial	Final	
<b>GE</b>	0.06	0.25	<0.001
<b>GC</b>	0.06	0.08	0.003

Experimental group (GE) – 29 enamel blocks

Control group (GC) – 19 enamel blocks

\* paired non-parametric Wilcoxon test



Table 3 – Comparison of roughness (Ra,  $\mu\text{m}$ ) changes between groups of the in situ/ex vivo study.

	Median
<b>CaCO<sub>3</sub> groups</b>	
CaCO <sub>3</sub> control	0.16 <sup>a,c</sup>
CaCO <sub>3</sub> immediate	0.30 <sup>b,d</sup>
CaCO <sub>3</sub> after 1h	0.27 <sup>b,e</sup>
<b>SiO<sub>2</sub> groups</b>	
SiO <sub>2</sub> control	0.18 <sup>a,c</sup>
SiO <sub>2</sub> immediate	0.31 <sup>b,d</sup>
SiO <sub>2</sub> after 1h	0.28 <sup>b,e</sup>

Each group – 24 enamel blocks

Medians followed by the same superscript letter are not significantly different (letters a, b – for each dentifrice; c, d, e – between dentifrices).

Non-paired Mann-Whitney test

Table 4 – Comparison of roughness (Ra,  $\mu\text{m}$ ) changes between GE and GC (in vitro).

Groups	Median
<b>GE</b>	0.16
<b>GC</b>	0.02

Experimental group (GE) – 29 enamel blocks

Control group (GC) – 19 enamel blocks

Non-paired Mann-Whitney test

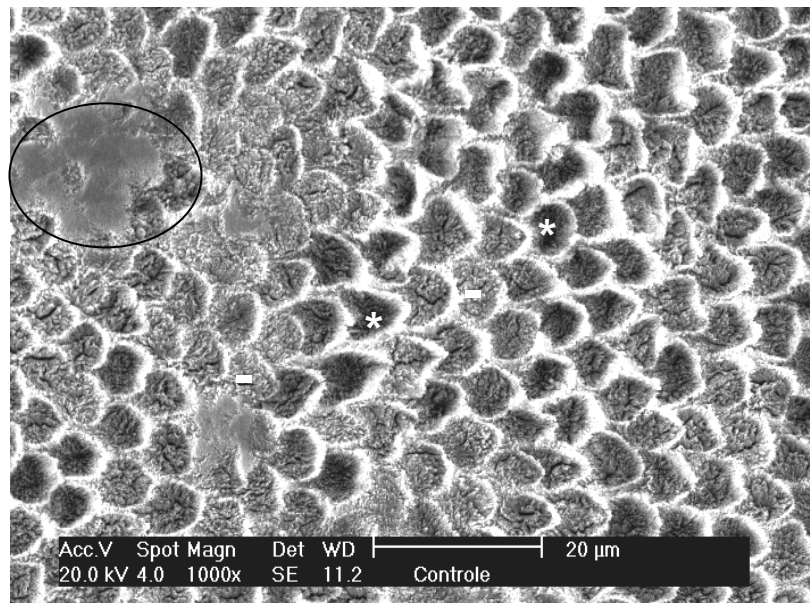


Figure 1 - Sample from  $\text{CaCO}_3$  control group. Non-uniform erosion can be observed. In some prisms, center was more attacked (asterisk) than in others prisms (square). Area with less affected enamel (circle).

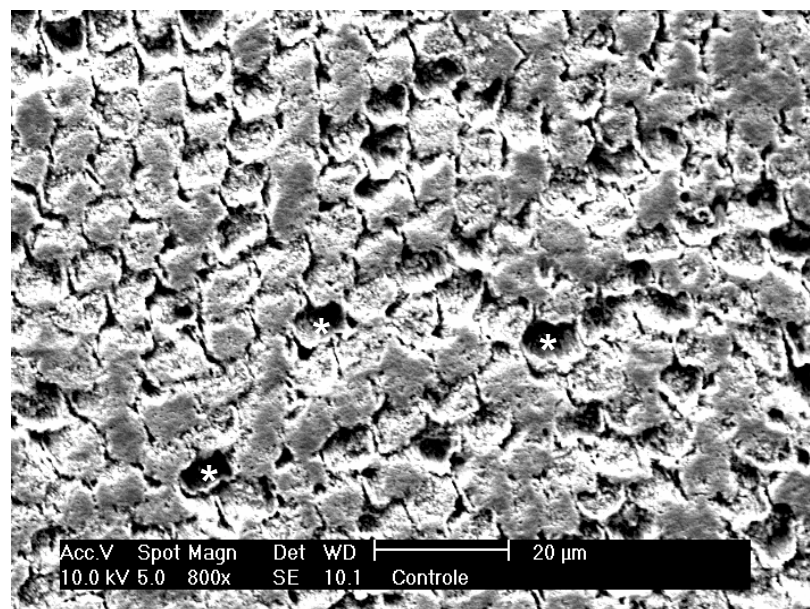


Figure 2 - Sample from  $\text{CaCO}_3$  control group. Note the reverse demineralization pattern which indicates preferential dissolution occurring in the boundary of the prisms (interprismatic area), with exception some isolated areas (asterisk).

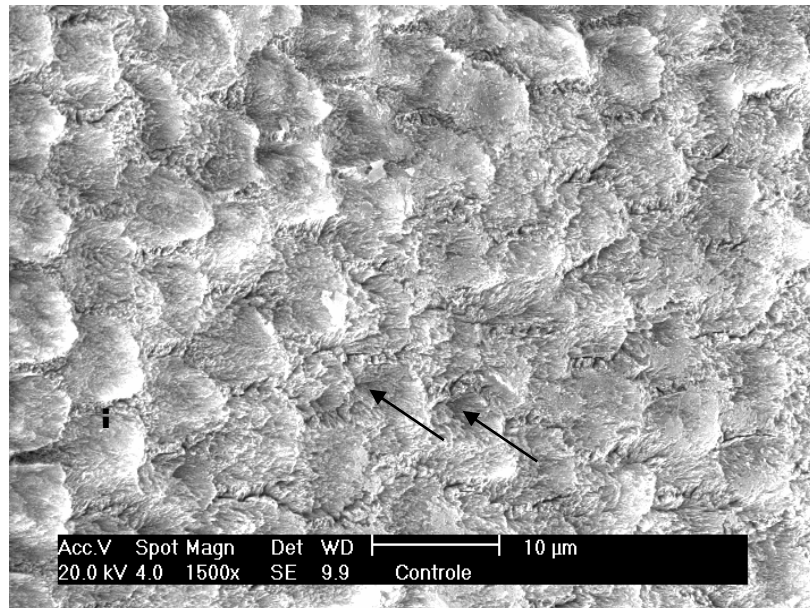


Figure 3 - Sample from CaCO<sub>3</sub> control group. Note the variability in dissolution pattern. At left side of the image one can see dissolution at interprismatic region (i) and at the center prisms heads were also affected (arrows).

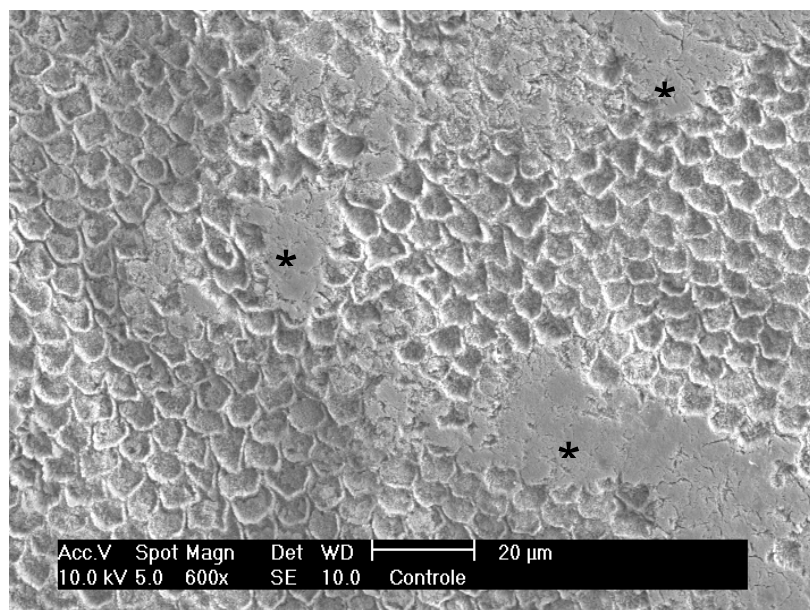


Figure 4 - Sample from SiO<sub>2</sub> control group. Dissolution in the center of the prisms. Less affected areas (asterisk).



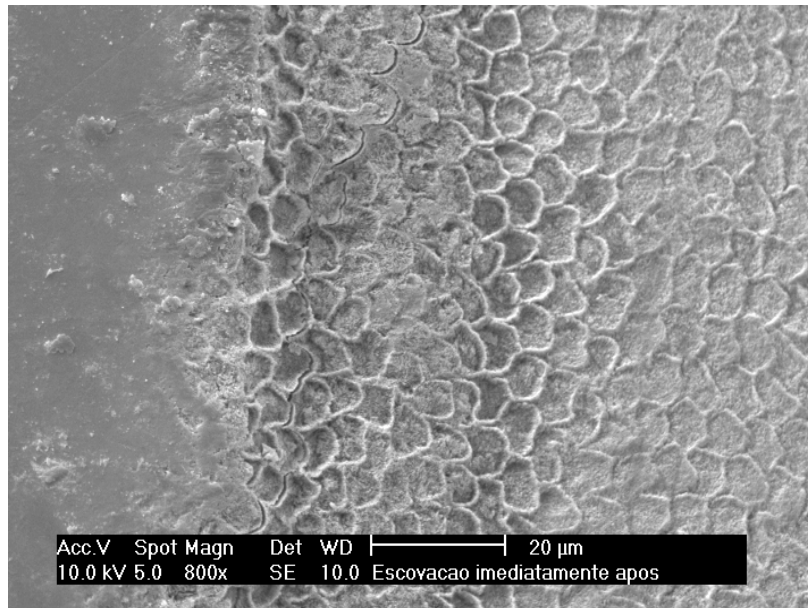


Figure 5 - Sample from SiO<sub>2</sub> group - immediate brushing. Bright areas are less attacked.

## REFERÊNCIAS

American Dental Association. Council on dental materials, instruments and equipment. Council on dental practice and council on dental therapeutics. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory. *J Amer Dent Assoc.* 1988;116(2):241-8.

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;190:145-9.

Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R, Speight PM. Investigation of an index to measure tooth wear in primary teeth. *J Dent.* 2001;29:103-7.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. *J Oral Rehabil.* 1999a;26:97-102.

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.* 1999b;78:1821-8.

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.* 2001a;46:697-703.

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

Andrade Júnior A, Machado WAS. Caracterização físico-química dos componentes inorgânicos dos dentifrícios. *Rev ABOPREV.* 2000;3:50-6.

Asher C, Read MJF. Early enamel erosion in children associated with the excessive consumption of citric acid. *Brit Dent J.* 1987;162:384-7.

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;34:48-52.

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

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; 184:125-9.

- British Dental Association. Memorandum on the erosion of teeth. *Brit Dent J.* 1959;106:239-42.
- Buchala W, Attin T, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Fluoride uptake, retention, and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. *J Dent Res.* 2002;81:329-33.
- Centerwall BS, Armstrong CW, Funkhouser LS et al. Erosion of dental enamel among swimmers at a gas-chlorinated swimming pool. *Am J Epidemiol.* 1986;123:641-7.
- Craig RG, Peyton FA. The microhardness of enamel and dentin. *J Dent Res.* 1958;37: 661-8.
- Davis WB, Winter PJ. The effect of abrasion on enamel and dentine after exposure to dietary acid. *Brit Dent J.* 1980;148:253-6.
- Dugmore CR, Rock WP. The prevalence of tooth erosion in 12-year-old children. *Brit Dent J.* 2004;196:279-282.
- Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 1992;172:305-12.
- Edgar WM. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries – a review. *Br Dent J.* 1998;184:29-32.
- FDI Working Group 10, CORE, Fédération Dentaire Internationale. Saliva: Its role in health and disease. *Int Dent J.* 1992;42:291-304.
- Ferreira MC. Preparo de amostras para a realização do teste de microdureza/Meire Coelho Ferreira. – Florianópolis; 2004. Apostila.
- Fushida CE, Cury JA. Estudo in situ do efeito da frequência de ingestão de Coca-Cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1999;13:127-34.
- Gandara BK, Truelove EL. Diagnosis and management of dental erosion. *J Contemporary Dent Practice.* 1999;1:1-16.
- 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;4:120-2.
- Grace EG, Sarlani E, Kaplan S. Tooth erosion caused by chewing aspirin. *J Am Dent Assoc.* 2004;135:911-4.
- Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentin erosion. *J Dent.* 1999;27:333-9.

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

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

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

Hays GL, Bullock Q, Lazzari EP, Puente ES. Salivary pH while dissolving vitamin C-containing tablets. *Am J Dent.* 1992;5:269-71.

Hefferren JJ. A laboratory method for assessment of dentifrice abrasivity. *J Dent Res.* 1976;55:563-73.

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

Hooper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'Ath J et al. A comparison of enamel erosion by a new sports drink compared to two proprietary products: a controlled, crossover study in situ. *J Dent.* 2004;32:541-5.

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

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85:162-9.

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

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:151-5.

International Organization for Standardization. ISO 11609. Dentistry – toothpastes-requirements, test methods and marking. Geneva; 1995.

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

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

Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res.* 1991;70:942-7.

Järvinen V, Rytömaa I, Meurman JH. Location of dental erosion in a referred population. *Caries Res.* 1992;26:391-6.

Johansson AK, Lingström P, Birkhed D. Comparison of factors potentially related to the occurrence of dental erosion in high- and low-erosion groups. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:204-11.

Joiner A, Pickles MJ, Tanner C, Weader E, Doyle P. An in situ model to study the toothpaste abrasion of enamel. *J Clin Periodontol.* 2004;31:434-8.

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; 47:304-8.

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;13:245-9.

Kuroiwa M, Kodaka T, Kuroiwa M. Microstructural changes of human enamel surfaces by brushing with and without dentifrice containing abrasive. *Caries Res.* 1993;27:1-8.

Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994;8:229-38.

Larsen IB, Westergaard J, Stoltze K, Larsen AI, Gyntelberg F, Holmstrup P. A clinical index for evaluating and monitoring dental erosion. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28:211-7.

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

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

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

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

Lussi A, Portmann P, Burhop B. Erosion on abraded dental hard tissues by acid lozenges: an in situ study. *Clin Oral Invest.* 1997;1:191-4.

Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:110-4.

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



Mathew T, Casamassimo OS, Hayes JR. Relationship between Sports Drinks and Dental Erosion in 304 University Athletes in Columbus, Ohio, USA. *Caries Res.* 2002;36:281-7.

Mellberg JR, Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. *J Dent Res.* 1992;71:913-9.

Meurman JH, Rytömaa I, Kari K, Laakso T, Murtomaa H. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res.* 1987;21:353-9.

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

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

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

Millward A, Shaw L, Smith A. Dental erosion in four-year-old children from differing socioeconomic backgrounds. *J Dent Child.* 1994;61:263-6.

Milosevic A, Young PJ, Lennon MA. The prevalence of tooth wear in 14-year-old school children in Liverpool. *Community Dent Health.* 1994;11:83-6.

Milosevic A, Lennon MA, Fear SC. Risk factors associated with tooth wear in teenagers: a case control study. *Community Dent Health.* 1997;14:143-7.

Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J.* 1998;48(6):529-39.

Nekrashevych Y, Stösser L.. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 2003;37:225-31.

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

Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:156-61.

O'Sullivan EA, Curzon MEJ. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *J Dent Child.* 2000;67:186-92.

Pader M. Oral hygiene products and practice. New York: Marcel Dekker; 1988.

Pedrazzi V, Lara EHG, Panzeri H. Sílica em dentifrícios: Aspectos físicos e físico-químicos. *Cosmet Toiletries.* 1999;11:66-9.

Pegoraro CN, Sakamoto FFO, Domingues LA. Perimólise: etiologia, diagnóstico e prevenção. Rev APCD. 2000;54:156-61.

Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Yates R, Newcombe RG, Addy M. The erosive effects of some mouthrinses on enamel. J Clin Periodontol. 2001;28:319-24.

Prista LN, Bahia MF, Vilar E. Dermofarmácia e cosmética. Porto: Associação Nacional de Farmácia; 1995.

Robinson HBG. Individualizing dentifrices: the dentist's responsibility. J Am Dent Assoc. 1969;79:633-6.

Rugg-Gunn AJ, Maguire A, Gordon PH, McCabe JF, Stephenson G. Comparison of erosion of dental enamel by four drinks using an intra-oral appliance. Caries Res. 1998;32:337-43.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion – intrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104:178-90.

Shinkai RSA, Santos LM, Silva FA, Nobre dos Santos M. Contribuição ao estudo da prevalência de bruxismo excêntrico noturno em crianças de 2 a 11 anos de idade. Rev Odontol Univ São Paulo. 1998;12:29-37.

Smith BGN, Robb ND. The prevalence of toothwear in 1007 dental patients. J Oral Rehabil. 1996;23:232-39.

Sreebny LM. Recognition and treatment of salivary induced conditions. Int Dent J. 1989;39:197-204.

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

Thomas AE. Further observations on the influence of citric fruit juice on human teeth. New York State Dent J. 1957;23:424-30.

Thylstrup A, Fejerskov O. Saliva: In Thylstrup A, Fejerskov O, editores: Cariologia clínica. 2a. ed. São Paulo: Santos; 1995. p. 17-43.

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;26:329-35.

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

Wiegand A, Wolmershäuser E, Hellwig E, Attin T. Influence of buffering effects of dentifrices and fluoride gels on abrasion on eroded dentine. *Archs Oral Biol* 2004;49:259-265.

Wülknitz P. Cleaning power and abrasivity of European toothpastes. *Adv Dent Res*. 1997;11:576-9.

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

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

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 Materiais

#### 1.1 Refrigerante

Foi utilizado um refrigerante do tipo cola (*Coca-Cola*<sup>®</sup>, Vonpar Refrescos S.A., Antônio Carlos, SC), de um mesmo lote, adquirido no comércio de Florianópolis, SC. A composição e o pH do refrigerante é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 – Composição e pH do refrigerante do tipo cola.**

Produto	Composição	pH
<i>Coca-Cola</i> <sup>®</sup>	Água gaseificada; Açúcar; Extrato de Noz de Cola; Cafeína; Corante caramelo IV; Acidulante INS 338 (ácido fosfórico); Aroma natural.	3,0

## 1.2 Saliva artificial

A saliva artificial (Farmácia Dermus, Florianópolis, SC) foi utilizada no estudo *in vitro*. Sua composição está descrita no Quadro 1.

Saliva artificial*	
Cloreto de potássio	0,625g/l
Cloreto de magnésio	0,059g/l
Cloreto de cálcio	0,166g/l
Fosfato de potássio dibásico	0,804g/l
Fosfato de potássio monobásico	0,326g/l
Fluoreto de sódio	0,022ppm
Metilparabeno	2,0g/l
Carboximetilcelulose de sódio (CMC)	10,0g/l
Água destilada qsp	500ml
pH	6,75

Quadro 1 – Composição da saliva artificial (g/l).  
\* Fonte: Amaechi et al. (1999a).

## 1.3 Dentifrícios

Foram utilizados dois dentifrícios não fluoretados que apresentavam formulação básica idêntica e abrasivos distintos (carbonato de cálcio e sílica). Foram manipulados (Farmácia Dermus, Florianópolis, SC) e armazenados em bisnagas plásticas brancas identificadas por códigos, com a finalidade de não identificar qual dentifrício estava sendo utilizado. A composição do dentifrício

não fluoretado contendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou sílica ( $\text{SiO}_2$ ) é apresentada na Tabela 2. Os agentes de polimento utilizados apresentavam abrasividade média.

**Tabela 2 – Formulação dos dentifrícios manipulados.**

Constituintes	Concentração
$\text{CaCO}_3$ ou $\text{SiO}_2^*$	40%
Lauril sulfato de sódio	2%
Glicerina	20%
Hidroxietilcelulose	3%
Sacarina sódica	0,1%
Mentol	1%
Nipagim	0,1%
Água destilada	100ml

\* **Abrasivos: Carbonato de cálcio (Henrifarma, São Paulo, SP)**

**Sílica (Tixosil 73 - Sílica abrasiva, Rhodia, São Paulo, SP).**

#### 1.4 Escova dental

Para escovação dos blocos de esmalte foi utilizada escova dental infantil macia (Linha Basic, Dinossauros, Condor S.A., São Bento do Sul, SC), a qual teve 2/3 das cerdas removidas com alicate ortodôntico 139 (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda, São Paulo, SP) (Figura 1).



**Figura 1 – a) Escova utilizada na escovação dos blocos de esmalte; b) Remoção de parte das cerdas com alicate ortodôntico 139; c) Conformação final da escova.**

## 1.5 Dentes

Foram utilizados terceiros molares humanos totalmente inclusos, obtidos junto a cirurgiões bucomaxilofaciais de uma única localidade e com a devida autorização por parte dos pacientes. Os dentes eram isentos de trincas, hipoplasias e hipocalcificações no esmalte da superfície vestibular e lingual (palatina). Os restos de ligamento periodontal foram removidos com cureta universal (Poliodonto, Duque de Caxias, RJ) e a profilaxia realizada com escova de Robinson e pasta de pedra-pomes (Figura 2). Os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1%, pH 7,0, à temperatura ambiente, até o momento da utilização (WIEGAND et al., 2004).



**Figura 2 – a) Terceiros molares permanentes; b) Remoção de restos do ligamento periodontal; c) Profilaxia.**

## 1.6 Voluntários

Foram selecionados 12 voluntários, com média de idade de 28 anos, graduandos e pós-graduandos em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O recrutamento foi realizado em sala de aula,



mediante esclarecimento verbal sobre os objetivos e procedimentos a serem realizados na pesquisa, e do convite aos alunos para participarem.

Aos voluntários foi dada a oportunidade de fazer perguntas, permitindo-lhes tempo suficiente para decidir quanto a participar ou não da pesquisa. Para o processo de seleção, dados anamnésicos foram coletados, seguidos de exame clínico e teste salivar (fluxo e capacidade tampão) dos candidatos (APÊNDICE B).

Uma vez selecionados para a pesquisa, os voluntários receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (CNS, Res. 196 de 10/10/1996), a ficha para anotação dos alimentos consumidos durante o dia, a ficha de instruções e a ficha com o horário das atividades (APÊNDICE C, D, E e F).

#### 1.5.1 Critérios de inclusão

- Disposição em cooperar com o protocolo clínico da pesquisa;
- Disposição em abster-se de produtos de higiene bucal, exceto aqueles fornecidos pela pesquisadora (BUCHALA et al., 2002);
- Sexo feminino ou masculino;
- Ter boa saúde geral (BUCHALA et al., 2002);
- Ter boa saúde bucal (ausência de atividade de cárie, doença gengival e periodontal, recessão gengival e desgaste dental excessivo; e alto padrão de higiene bucal) (WEST et al., 1998; HUNTER et al., 2000; LARSEN et al., 2000; HOOPER et al., 2003);
- Residir em local com água fluoretada;
- Fluxo salivar estimulado intermediário ou normal;

- Capacidade tampão salivar intermediária ou normal (BUCHALA et al., 2002);
- Disposição para dar o consentimento informado escrito antes do início da pesquisa (BUCHALA et al., 2002).

#### 1.5.2 Critérios de exclusão

- Utilizar aparelho ortodôntico removível ou fixo (HUNTER et al., 2000; PONTEFRACT et al., 2001);
- Estar em tratamento dental ou sob qualquer outra terapia na cavidade bucal (BUCHALA et al., 2002);
- Apresentar alteração patológica na mucosa bucal ou gengiva (BUCHALA et al., 2002);
- História de alergia a produtos de higiene bucal ou material de moldagem (BUCHALA et al., 2002);
- Uso, nos últimos dois meses, de medicamentos com potencial erosivo ou que pudessem alterar a taxa de fluxo salivar, tais como expectorantes erosivos, drogas antiasmáticas (BUCHALA et al., 2002), antiácidos (GANDARA; TRUELOVE, 1999), anticolinérgicos, anoréticos, antihistamínicos, antidepressivos, antipsicóticos, antihipertensivos, diuréticos, ansiolíticos (SREEBNY, 1989; EDGAR, 1992);
- História de disfunções gástricas, que provocam refluxo gastroesofágico crônico, como: hérnia de hiato, úlceras e gastrites (PEGORARO; SAKAMOTO; DOMINGUES, 2000); e vômito proveniente de distúrbios psicossomáticos (bulimia e anorexia) (HOOPER et al., 2003);

- Fumantes (BUCHALA et al., 2002);
- Doenças sistêmicas crônicas tais como as auto-imunes (artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, sarcoidose) e diabetes (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995);
  - História de terapia antineoplásica na região de cabeça e pescoço (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995; GANDARA; TRUELOVE, 1999);
  - Prática de atividades aquáticas (CENTERWALL et al., 1986);
  - Gravidez (BUCHALA et al., 2002; JOINER et al., 2004);
  - Aplicação tópica de flúor até, pelo menos, 2 semanas antes do início do estudo (KOO; CURY, 1999);
  - Ingestão de frutas cítricas mais de 2x/dia (JÄRVINEN; RYTÖMAA; HEINONEN, 1991).

## **2 Métodos**

### **2.1 Princípios éticos**

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com a Resolução 196 de 10/10/96 (CNS/MS, 1996), e protocolada sob o nº195/2005 (ANEXO A).

Para evitar contaminação cruzada durante o exame clínico dos voluntários, os padrões e recomendações internacionais foram seguidos (ADA, 1988). A pesquisadora e o anotador trajaram roupa branca, jaleco, gorro, máscara, óculos e luvas de látex descartáveis para a realização do exame

clínico. Todo o instrumental foi previamente esterilizado em autoclave e após o uso, passou por desinfecção em glutaraldeído, seguida de lavagem, secagem e esterilização.

## **2.2 Controle de variação na pesquisa**

### **2.2.1 Voluntários**

Uma semana antes do início da pesquisa, os voluntários passaram a utilizar escova e dentifrício sem flúor, fornecidos pela pesquisadora, a fim de eliminar o efeito residual do flúor (KOO; CURY, 1999). Os voluntários foram submetidos a um exame clínico, a fim de assegurar a inexistência de qualquer contra-indicação à utilização do aparelho. Neste momento, foram submetidos à profilaxia dental com pasta sem flúor com o objetivo de padronizar a condição bucal e, conseqüentemente, minimizar a variação.

Um diário alimentar de 3 dias/semana foi preenchido pelos voluntários em cada fase experimental, com o objetivo de determinar a existência de alguma mudança significativa na alimentação que pudesse alterar a resposta do modelo e invalidar o desenho do tipo cruzado.

No decorrer de cada fase experimental, os voluntários foram questionados quanto ao horário de inserção e remoção do aparelho da cavidade bucal, quanto à estabilidade do aparelho e sobre possível incômodo.

A compreensão do protocolo clínico pelo voluntário foi monitorada constantemente. Além das instruções verbais, foram fornecidas instruções escritas. As instruções foram revisadas freqüentemente, do início ao fim da pesquisa.

### 2.2.2 Pesquisadora

Como forma de diminuir a variabilidade no ensaio de abrasão sobre o esmalte dental, a escovação dos blocos foi realizada pela pesquisadora (HOOPER et al., 2003), a qual passou por um treinamento 1 semana antes da pesquisa, a fim de padronizar a força imposta durante a escovação. O treinamento consistiu na escovação de um bloco de esmalte fixado em uma base de acrílico, 4x/dia, por 7 dias.

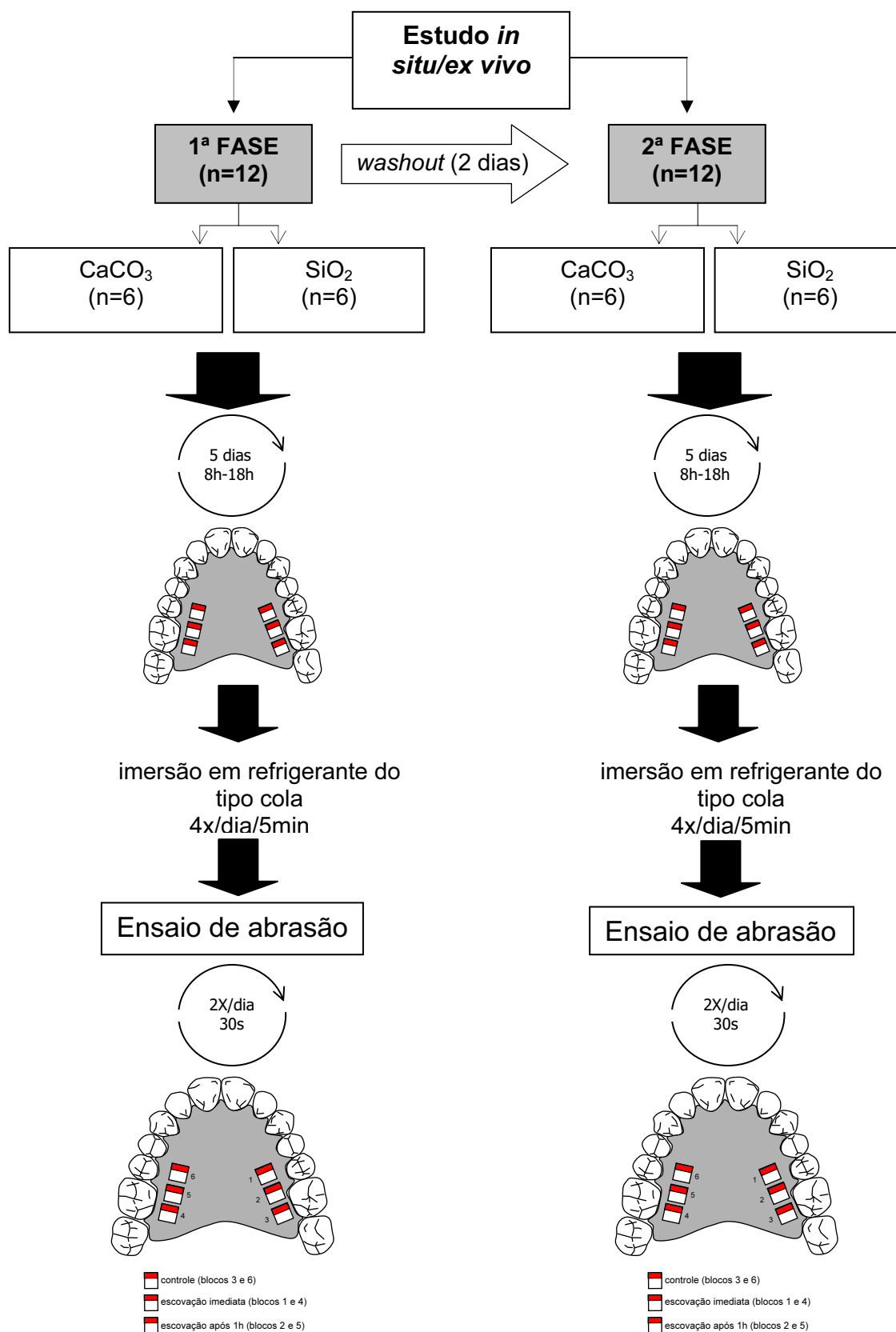
### 2.2.3 Amostra

Os blocos tiveram a superfície de esmalte desgastada durante o lixamento, a fim de obter uma superfície mais homogênea (MELLBERG, 1992). Este procedimento reduz a variação no modelo e, conseqüentemente, aumenta sua sensibilidade (LUSSI; PORTMANN; BURHOP, 1997).

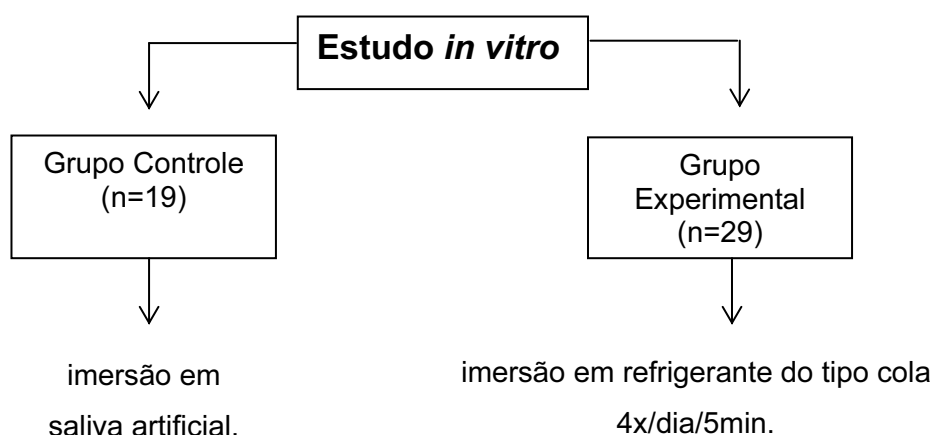
Para evitar a formação de biofilme bacteriano sobre os blocos de esmalte, os aparelhos foram imersos em solução aquosa de clorexidina a 0,2% por 3min, antes e após o uso diário (PONTEFRACCT et al., 2001; HOOPER et al., 2004). O acúmulo do biofilme bacteriano poderia induzir a formação de lesão de cárie (FUSHIDA; CURY, 1999).

### 2.3 Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *in situ/ex vivo* (erosão e/ou abrasão) e um estudo *in vitro* (erosão), sendo a unidade experimental bloco de esmalte proveniente de terceiros molares totalmente inclusos. O estudo *in situ/ex vivo* foi do tipo cruzado e executado em duas fases experimentais de 5 dias. Doze voluntários utilizaram aparelhos removíveis palatais, em acrílico, contendo 6 blocos de esmalte. A designação dos voluntários aos tratamentos ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$ ) foi aleatória na primeira fase. Na segunda fase do estudo foi feito o cruzamento entre voluntários e tratamentos (Figura 3). O estudo *in vitro* teve duração de 5 dias (Figura 4).



**Figura 4 – Esquema ilustrativo do delineamento experimental do estudo *in situ/ex vivo*.**



**Figura 4 – Esquema ilustrativo do delineamento experimental do estudo *in vitro*.**

## 2.4 Fase laboratorial

### 2.4.1 Obtenção e preparo dos blocos de esmalte

Para a obtenção dos blocos de esmalte, primeiramente a coroa foi separada da raiz ao nível da junção amelo-cementária com um disco de diamante dupla face (disco nº 11-4254 série 15 LC – Diamond BUEHLER® Ltd., Lake Bluff, IL, USA) acoplado a uma cortadeira Isomet Low Speed Saw (BUEHLER® Ltd., Lake Bluff, IL, USA), sob refrigeração.

Em seguida, a coroa foi fixada com godiva exata baixa fusão verde (DFL Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ) em uma placa de acrílico. Primeiramente foi seccionada no sentido mésiodistal para a obtenção de duas metades (vestibular, lingual/palatina). Posteriormente, a porção (vestibular ou lingual/palatina) foi fixada em placa de acrílico para a obtenção do bloco de esmalte do terço médio. Após a obtenção do bloco, as dimensões (4 x 4 x



2mm) foram aferidas por meio de um paquímetro digital série 727 (Starrett Ind. Com. Ltda, Itu, SP) (Figura 5).



**Figura 5 – a) Remoção da porção radicular do dente em Isomet; b) Obtenção do bloco dental do terço médio da superfície vestibular ou lingual; c) Aferição da área do bloco.**

Os blocos obtidos para o estudo *in situ/ex vivo* foram seguros com pinça Allis (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda, São Paulo, SP) e submetidos à planificação da dentina com lixa d'água de carbeto de silício nº 400 (Norton, Vinhedo, SP) acoplada ao prato giratório da Politriz DP 10 (Panambra Técnica Impor. e Exportação Ltda, São Paulo, SP), em baixa rotação e sob refrigeração. Posteriormente, os blocos foram fixados em bases acrílicas e realizado o desgaste da superfície de esmalte com lixa nº 600 (Norton) por 10s, seguida da lixa nº 1200 (Norton) por 10s, a fim de se obter uma superfície plana (Figura 6).



**Figura 6 – a) Planificação da dentina; b) Conjunto bloco/base de acrílico e dispositivo metálico; c) Lixamento.**

Os blocos foram submetidos ao ultra-som (Branson 1210 – Odontobrás, Ribeirão Preto, SP), com água deionizada, durante 5min, entre uma lixa e outra, e após a última lixa, a fim de impedir a interferência dos grãos na lisura do tecido dental (FERREIRA, 2004). Para o polimento foi utilizado um disco de feltro SUPRA (Arotec S/A Ind. e Com., Cotia, SP) e diamante em suspensão 1 $\mu$ m e ¼ $\mu$ m Plus (Arotec S/A Ind. e Com., Cotia, SP) em baixa velocidade (Figura 7). Entre os polimentos com diamante em suspensão de diferentes granulometrias e após o polimento final, os blocos foram lavados em água deionizada e submetidos ao ultra-som por 10min (FERREIRA, 2004).



**Figura 7 – a) Diamante em suspensão para polimento; b) Polimento do bloco de esmalte.**

Os blocos de esmalte foram inspecionados com uma lente de aumento (4x), sendo descartados os que apresentaram superfície com defeitos (depressões) ou dentina exposta (HUNTER et al., 2000). Os blocos tiveram a microdureza superficial (SMH) medida por um microdurômetro (Figura 8). O limite de microdureza estabelecido foi de 272 a 440KHN (CRAIG; PEYTON, 1958). Os blocos com SMH inicial dentro da faixa de 10% a mais ou a menos

da média da amostragem foram selecionados para compor a amostra (APÊNDICE G).

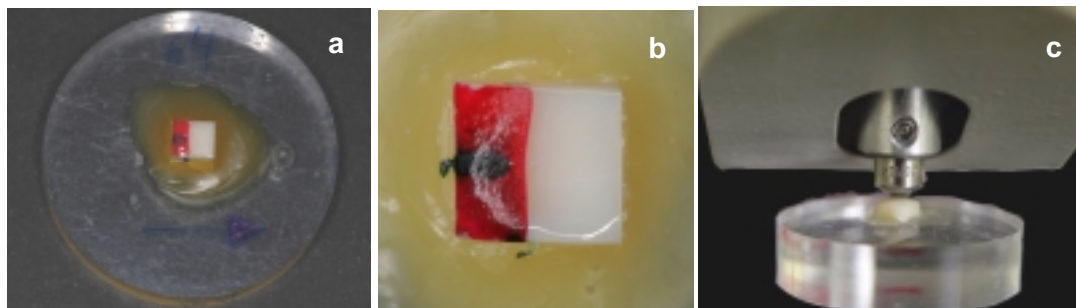


Figura 8 – a) Bloco de esmalte fixado com cera pegajosa em base de acrílico; b) Vista aproximada do bloco; c) Bloco posicionado próximo ao indentedor Knoop para realização do teste de microdureza.

Os blocos obtidos para o estudo *in vitro* foram embutidos em resina poliestirênica (Central do Fiberglass, Florianópolis, SC) (Figura 9), lixados, polidos (Figura 10), ultra-sonicados, submetidos ao teste de SMH inicial (Figura 11), e selecionados nos moldes dos blocos do estudo *in situ/ex vivo*.

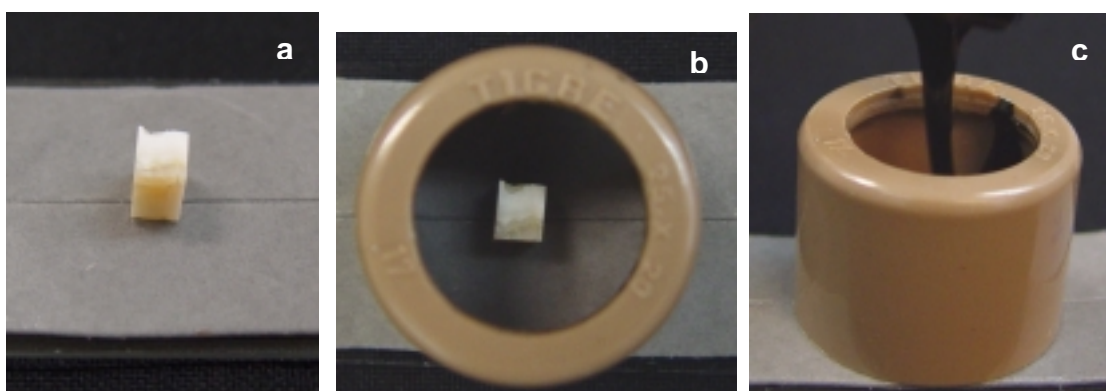


Figura 9 – a) Fixação do bloco na fita adesiva; b) Tubo de PVC posicionado; c) Resina poliestirênica vertida no interior do tubo de PVC.

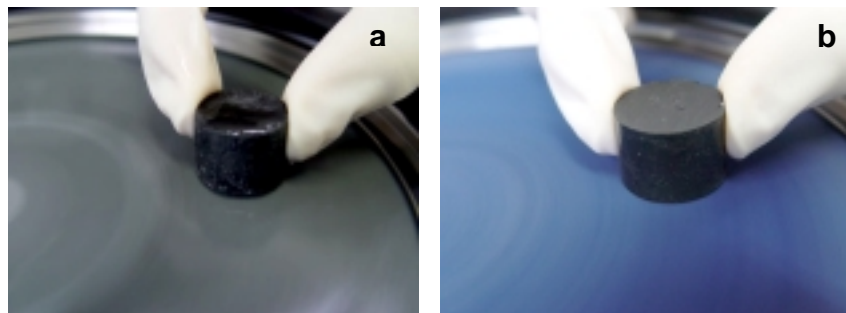


Figura 10 – a) Lixamento da superfície do bloco de esmalte, embutido, com lixas nº 600 e 1200; b) Polimento com feltro e diamante em suspensão.

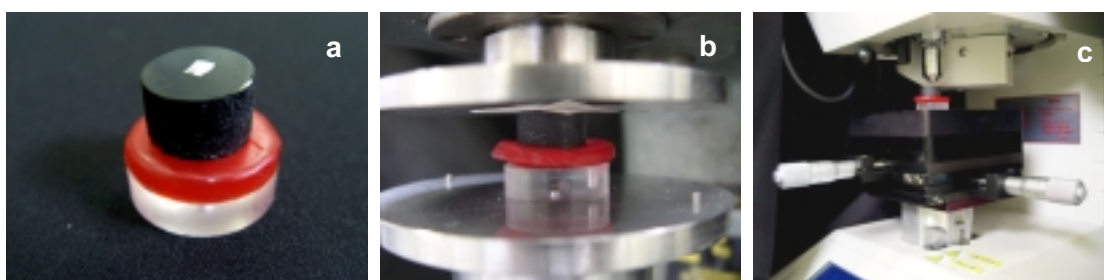


Figura 11 – a) Bloco posicionado sobre cera nº 7 e base acrílica; b) Conjunto posicionado na prensa e submetido à planificação do conjunto; c) Bloco pronto para a leitura de microdureza.

Os blocos do estudo *in situ/ex vivo* e do estudo *in vitro* foram conservados sob refrigeração e em ambiente úmido até o momento do início da pesquisa. Previamente à utilização, os blocos do estudo *in situ/ex vivo* foram esterilizados com óxido de etileno (Mic – Serviços de Esterilizações Ltda, Porto Alegre, RS) (Figura 12) sendo, em seguida, mantidos ao ar livre, por 1 semana, para remoção/volatilização do agente esterilizante (JONES et al., 2002).



**Figura 12 – Blocos de esmalte acondicionados e esterilizados com óxido de etileno.**

#### 2.4.2 Confeção do aparelho removível palatal

Os voluntários tiveram o arco superior moldado com alginato (Avagel, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ). A partir da moldagem foi obtido modelo em gesso-pedra (Rutenium, Queimados, RJ) para a confecção do aparelho removível palatal em resina acrílica autopolimerizável incolor (Vipi Flash, Vipi, Pirassununga, SP). Para alojar os 6 blocos de esmalte, nichos (5 x 5 x 3mm) foram preparados, sendo 3 do lado direito e 3 do lado esquerdo. Os blocos foram fixados aos nichos com cera pegajosa (Newwax Technew Comércio e Indústria Ltda, Rio de Janeiro, RJ). A superfície do bloco ficou ao nível da resina acrílica (JOINER et al., 2004) para permitir contato uniforme da escova/dentífrício na superfície do bloco e para evitar o acúmulo de biofilme bacteriano. Os blocos foram posicionados na região posterior, de pré-molar a molar. A fim de estabelecer o ponto de partida para as análises dos tratamentos efetuados, parte do bloco foi coberta com duas camadas de esmalte de unha (Risqué, Taboão da Serra, SP) (Figura 13).



**Figura 13 – Aparelho removível palatal e blocos de esmalte.**

Os blocos de esmalte, num total de 144 (distribuídos em 2 fases experimentais e, mais especificamente, 6 blocos por aparelho, para um total de 12 voluntários), constituiu a amostra do estudo *in situ/ex vivo*. Os blocos de esmalte foram distribuídos aleatoriamente, visto que diferenças de resposta podem ocorrer entre o lado direito e esquerdo da cavidade bucal de um mesmo indivíduo (ZERO, 1995) e entre os indivíduos.

#### 2.4.3 Mensuração do pH do refrigerante do tipo cola

Cinco alíquotas de 30ml foram coletadas de uma mesma embalagem de refrigerante do tipo cola e o pH (poder de hidrogênio) de cada amostra foi medido com um eletrodo combinado de pH (HI 1131, Hanna® Instruments Brasil, São Paulo, SP), calibrado e conectado a um pHmetro (Modelo pHMeter Tec-2, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP). A mensuração do pH do líquido se deu à temperatura em que foi utilizado, ou seja, gelado em refrigerador doméstico.

Os valores absolutos das 5 alíquotas de refrigerante do tipo cola são apresentados no APÊNDICE H.

#### 2.4.4 Avaliação da forma, tamanho e característica superficial das partículas abrasivas dos dentifrícios

A forma, o tamanho e a característica superficial das partículas abrasivas foi analisada ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Para este fim, 5g de cada dentifrício foi misturado com 175ml de água destilada, por 2min, num cilindro de agitação. Com o auxílio de um conta-gotas, as soluções foram gotejadas em lâminas de vidro e deixadas secar ao ar livre. A seguir, foram cobertas 1x por 80s com ouro-paládio através de metalizador (Bal-Tec SCD 005, Balzers, Liechtenstein) (Figura 14) e analisadas em MEV (Philips XL 30, Philips Electronic Instruments Inc, Mahwah, NJ, USA), que operou a 20 kV e com aumentos de 200x a 10000x, de acordo com as particularidades de cada amostra (APÊNDICE I).

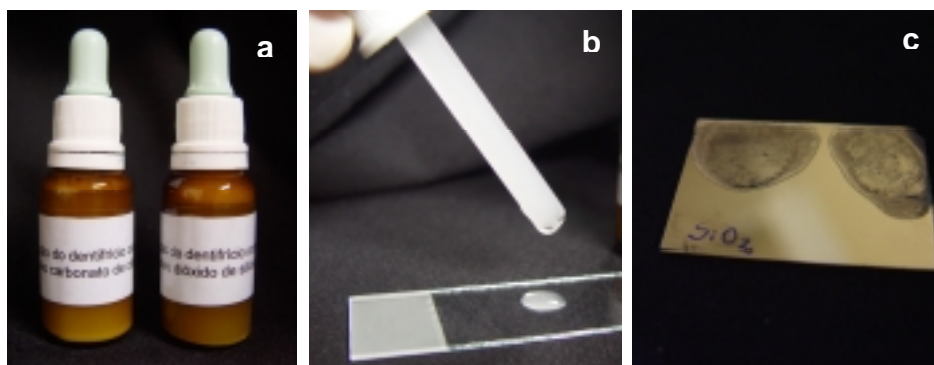


Figura 14 – a) Dentifrício diluído; b) Gotejamento em placa de vidro; c) Metalização da amostra.

## 2.5 Fase clínica

### 2.5.1 Exame clínico

O exame clínico foi realizado previamente ao início da pesquisa, como um dos pré-requisitos para a inclusão do voluntário, e uma semana antes de seu início, a fim de assegurar a inexistência de qualquer contra-indicação para utilização do aparelho. Neste momento, os voluntários foram submetidos à profilaxia dental com pasta sem flúor com o objetivo de padronizar a condição bucal.

### 2.5.2 Determinação do fluxo salivar estimulado e da capacidade tampão salivar

O fluxo salivar estimulado e a capacidade tampão salivar foram determinados previamente ao início da pesquisa, como um dos pré-requisitos para a inclusão do voluntário na pesquisa. A coleta da saliva ocorreu no período das 14:00 às 17:00h, estando o voluntário em jejum por um período de 2h (SREEBNY, 1989; FDI, 1992).

A estimulação inicial da saliva foi realizada por meio da mastigação de um tablete de goma base neutra, por 30s. Decorrido esse tempo, a saliva foi deglutida ou expelida. A mastigação prosseguiu por 5min, concomitantemente à expectoração da saliva, em uma proveta graduada. Dividindo-se a quantidade de saliva formada (ml) pelo tempo gasto (min), foi obtida a velocidade de secreção salivar em ml/min.



Para a determinação da capacidade tampão salivar, 1ml da saliva coletada foi, através do método colorimétrico (DentoBuff<sup>®</sup>, Inodon, Porto Alegre, RS) (Figura 15), adicionada a um flaconete de vidro contendo ácido clorídrico e misturada. Em seguida, foi adicionado 4 gotas do indicador e o flaconete fechado e agitado por 10s. Posteriormente, o flaconete foi destampado e mantido aberto por 5 a 10min, para permitir a evaporação do CO<sub>2</sub>. Por fim, o flaconete foi fechado e a cor obtida da mistura foi comparada com a escala de cores do DentoBuff<sup>®</sup>.



Figura 15 – Kit DentoBuff<sup>®</sup>

O fluxo salivar estimulado e a capacidade tampão salivar dos voluntários estão contidos na Tabela 3. Os valores absolutos da velocidade de secreção e do pH final determinado pela cor na escala comparativa do DentoBuff<sup>®</sup> estão contidos no APÊNDICE J.

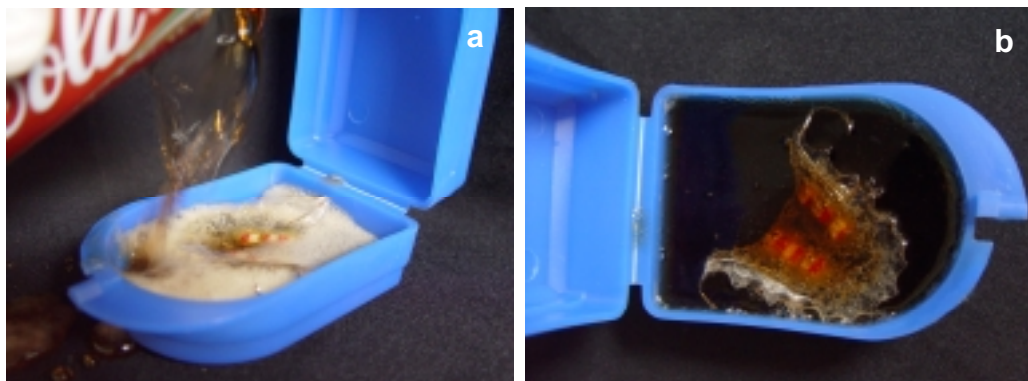
**Tabela 3 – Fluxo e capacidade tampão salivar dos voluntários.**

Voluntário	Fluxo salivar estimulado	Capacidade tampão salivar
1	Intermediário	Normal
2	Intermediário	Normal
3	Intermediário	Normal
4	Baixo	Normal
5	Intermediário	Intermediária
6	Intermediário	Intermediária
7	Normal	Normal
8	Baixo	Intermediária
9	Normal	Intermediária
10	Normal	Normal
11	Normal	Normal
12	Intermediário	Normal

## 2.6 Fase experimental

No estudo, *in situ/ex vivo*, foram utilizados 144 blocos de esmalte estéreis. Doze voluntários utilizaram aparelho removível palatal contendo 6 blocos. Cada fase teve duração de 5 dias e o aparelho foi utilizado das 8:00 às 18:00h. Em cada fase, os 6 blocos foram submetidos à erosão, extrabucalmente, com refrigerante do tipo cola (25ml), fresco e gelado, 4x/dia (9:00, 11:00, 14:00 e 16:00h), por 5min para cada imersão, sob agitação leve e à temperatura ambiente (Figura 17). Para cada fase experimental, o tempo total de desafio erosivo foi de 1h e 40min. Previamente ao primeiro procedimento de erosão, o dispositivo permaneceu na cavidade bucal por, no mínimo, 1h (JAEGGI; LUSSI, 1999), para a formação da película adquirida (AMAECHI et al., 1999b). Entre os procedimentos e após o último procedimento, o dispositivo

permaneceu na cavidade bucal por 2h, a fim de que a saliva pudesse agir sobre os blocos de esmalte desmineralizados (AMAECHI; HIGHAM, 2001a).



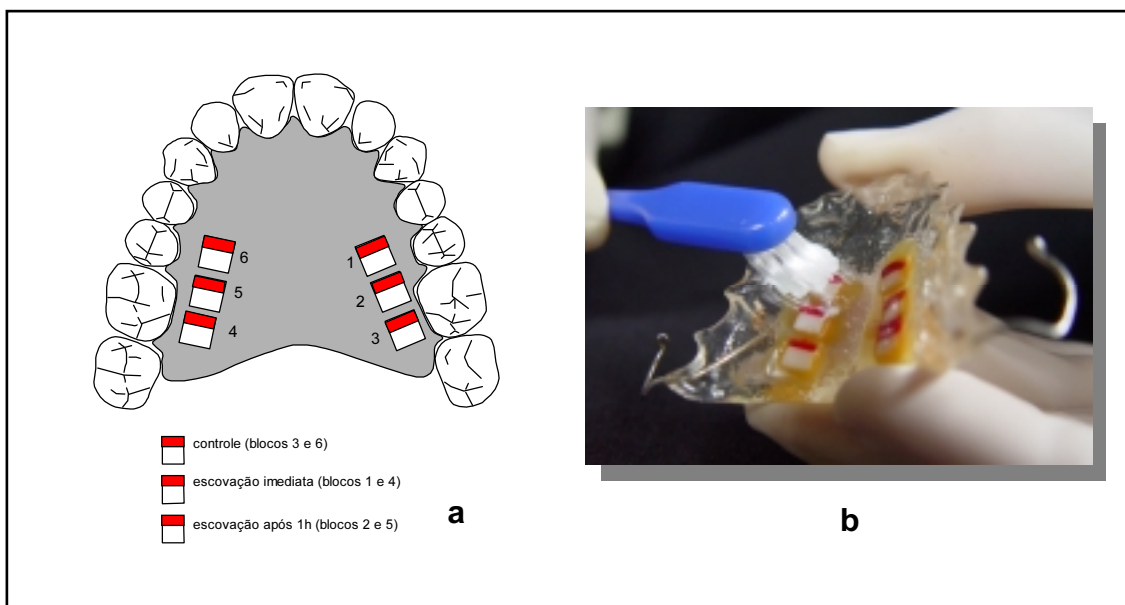
**Figura 17 – a) Refrigerante do tipo cola sendo despejado no recipiente contendo o aparelho; b) Aparelho imerso em refrigerante do tipo cola.**

- Tratamento com  $\text{CaCO}_3$ : em dois momentos de imersão em refrigerante tipo cola, dois blocos foram escovados imediatamente após (blocos 1 e 4) e dois blocos foram escovados após 1h (2 e 5) (Figura 18a). Os blocos 3 e 6 não foram escovados. Após a escovação imediatamente seguinte à erosão, o aparelho foi lavado por 20s em água corrente e inserido na cavidade bucal, sendo aguardada 1h para sua remoção e escovação dos blocos designados para tal, seguido de lavagem em água corrente por 20s.

- Tratamento com  $\text{SiO}_2$ : foram repetidos os mesmos procedimentos do tratamento com  $\text{CaCO}_3$ .

Os blocos de esmalte, previamente definidos, foram escovados com dentífrico não fluoretado, por 30s (JAEGGI; LUSSI, 1999; JOINER et al., 2004), com uma quantidade de dentífrico de, aproximadamente, 0,09g. A direção do movimento da escovação foi perpendicular ao segmento acrílico do

aparelho contactando os dentes posteriores (Figura 18b). Foi utilizada escova dental infantil macia (JOINER et al., 2004).



**Figura 18 – a) Esquema ilustrativo com a numeração dos blocos de esmalte; b) Direção do movimento da escovação.**

Durante a escovação de um bloco, foi evitado o contato da escova e dentífricio com os blocos remanescentes. Os voluntários foram cegados quanto a qual dentífricio estava sendo utilizado.

Para a imersão do aparelho no refrigerante do tipo cola, os voluntários deveriam seguir os horários pré-estabelecidos. Quando não conseguiram cumprir os horários, deveriam ter em mente que o 1º procedimento de erosão só poderia ser efetuado após, no mínimo, 1h da inserção do aparelho na cavidade bucal, e que entre os procedimentos de erosão e após o último, o aparelho deveria permanecer na cavidade bucal por 2h. Neste caso, o horário de remoção do aparelho da cavidade bucal se estendia para além das 18:00h.

O aparelho foi removido durante as refeições, exceto para a ingestão de água; para a imersão em refrigerante do tipo cola; para a realização da escovação dos dentes naturais; para a escovação dos blocos com o dentifrício não fluoretado; e às 18:00h. Durante as refeições, no momento da escovação dos dentes naturais e à noite, o aparelho foi coberto com gaze embebida em soro fisiológico, armazenado em caixa plástica e mantido à temperatura ambiente (WEST et al., 1998).

A cada dia do experimento, o aparelho foi imerso em solução aquosa de clorexidina a 0,2%, por 3min, antes e após o seu uso, ou seja, antes das 8:00h e após as 18:00h (PONTEFRACT et al., 2001; HOOPER et al., 2004).

Durante a pesquisa, os voluntários escovavam os dentes com dentifrício não fluoretado e escova dental fornecida pela pesquisadora, no mínimo, 2x/dia (após café da manhã e almoço). A superfície do aparelho em contato com o palato foi higienizada 1x/dia (após as 18:00h), com escova dental infantil macia sem dentifrício (RUGG-GUNN et al., 1998; HOOPER et al., 2004). Os voluntários foram instruídos a manter a alimentação diária habitual, com restrição ao consumo em alta frequência de alimentos e bebidas ácidas, a fim de não impedir o efeito remineralizador da saliva (AMAECHI; HIGHAM, 2001a). A água consumida pelos voluntários continha 0,8ppmF.

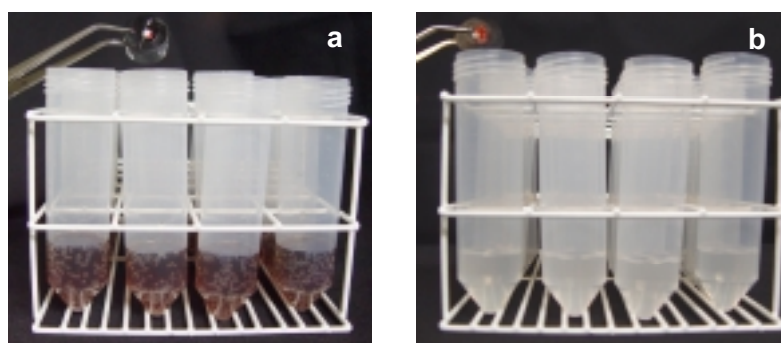
Entre a troca de fases experimentais, os voluntários tiveram 2 dias de descanso ("washout"), período em que continuaram a utilizar dentifrício não fluoretado. Neste período, os blocos utilizados na 1ª fase experimental foram removidos do aparelho, sendo fixados novos blocos para a 2ª fase.

Após a finalização de cada fase, o aparelho foi imerso em solução de clorexidina a 0,5%, em 70% de base alcoólica por, no mínimo, 30min, para desinfecção (PONTEFRACCT et al., 2001).

O aparelho removível palatal foi entregue aos voluntários, juntamente com a ficha de instruções (APÊNDICE E), ficha com os horários das atividades (APÊNDICE F), soro fisiológico, solução de clorexidina a 0,2%, estojo plástico para guardar o aparelho, gaze, dentifrício não fluoretado ( $\text{CaCO}_3$ ), escova dental macia (Linha Premium, Maxil, Condor S.A., São Bento do Sul, SC) para escovação dos dentes naturais e escova dental infantil macia (Linha Basic, Dinossauros, Condor S.A., São Bento do Sul, SC) para a higienização da parte interna do aparelho (em contato com o palato). O refrigerante do tipo cola foi fornecido no momento do procedimento de erosão. A escova para a realização do ensaio de abrasão ficou sob a responsabilidade da pesquisadora, visto que esta tarefa foi desempenhada pela mesma.

No estudo, *in vitro*, foram utilizados 48 blocos de esmalte. Previamente ao primeiro procedimento de erosão, os blocos foram imersos em saliva artificial por 1h. Vinte e nove blocos (grupo experimental - GE) foram submetidos à erosão com refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, sob agitação leve e à temperatura ambiente (AMAECHI; HIGHAM, 2001b), 4x/dia (9:00, 11:00, 14:00 e 16:00h), com um total de 5min para cada imersão (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1999a), por 5 dias. Cada bloco foi imerso em 10ml (MEURMAN; FRANK, 1991b) de refrigerante (Figura 16a). Após cada imersão, os blocos foram lavados com água deionizada por 20s, imersos em saliva artificial (Figura 16b) e mantidos a 37°C até o próximo procedimento de erosão. Entre os procedimentos de erosão, os blocos permaneceram em saliva

artificial por, no mínimo, 2h. Findada a última imersão diária em refrigerante, os blocos foram mantidos em saliva artificial por mais 2h. Após este tempo, os blocos foram removidos da saliva artificial, lavados com água deionizada por 20s e mantidos umedecidos com soro fisiológico, à temperatura ambiente, até o dia seguinte. Dezenove blocos (grupo controle - GC) permaneceram em saliva artificial por 5 dias. A saliva artificial foi trocada diariamente (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1999a). O tempo total do desafio erosivo foi de 1h e 40min.



**Figura 16 – a) Imersão do bloco de esmalte em refrigerante do tipo cola; b) Imersão do bloco de esmalte em saliva artificial.**

## **2.7 Métodos de avaliação**

### **2.7.1 Microdureza superficial (SMH)**

Primeiramente, todos os blocos (estudo *in situ/ex vivo* e *in vitro*) tiveram uma parte de sua superfície pintada com duas camadas de esmalte de unha (Risqué, Taboão da Serra, SP), a fim de delimitar o ponto de partida da agulha do rugosímetro.

A medida de SMH inicial, pré-requisito para a inclusão do bloco de esmalte na amostra, foi executada com um indentador de diamante Knoop vinculado a um microdurômetro HMV 2 versão 1.23 (Shimadzu Corp., Tokyo, Japão), sob a carga de 50g por 5s (LUSSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993). Em cada bloco foram realizadas 5 indentações eqüidistantes em 100 $\mu$ m. O longo eixo das indentações foi posicionado paralelo à borda superior/inferior do bloco.

O comprimento das indentações e o cálculo da dureza Knoop (KHN) foram realizados através do Software Newage Testing Instruments C.A.M.S Testing System, instalado em um computador ligado ao microdurômetro através de um sistema ótico de transferência digital de imagem (Genwac High Resolution), com a imagem magnificada em 40x.

O microdurômetro foi calibrado, previamente ao teste, de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.7.2 Rugosidade ( $R_a$ )

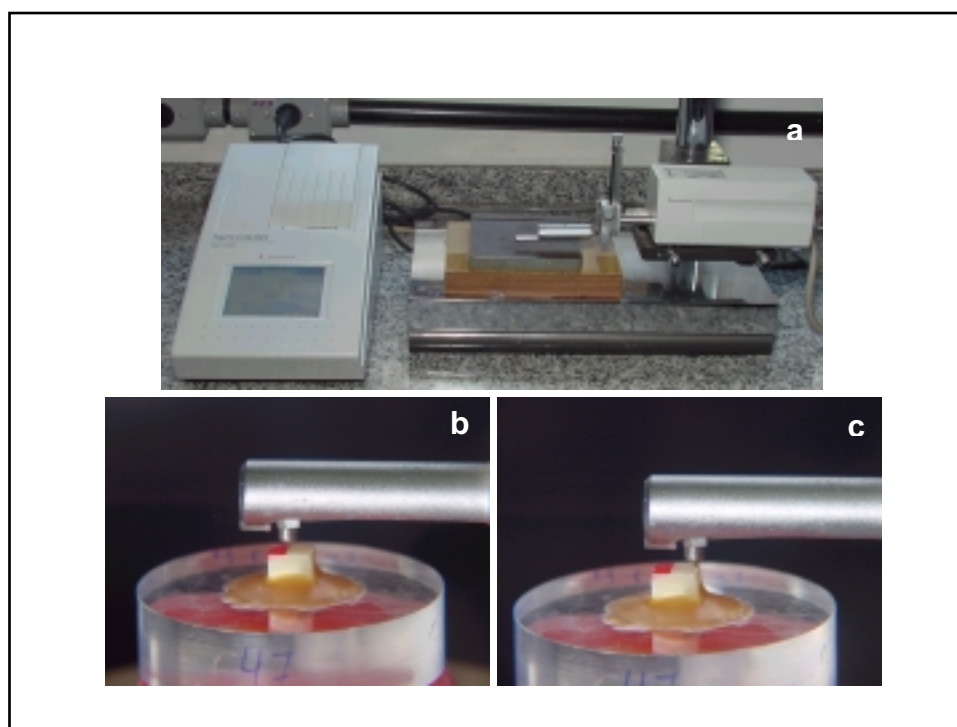
Os parâmetros de rugosidade estabelecidos no rugosímetro (Surfcorder SE-1700 profilometer – KosakaLab, Tokyo, Japão) foram:

- $\lambda_c$  (ou CUT-OFF) = 0,250mm ;
- $L_n$  = 1,250mm – comprimento percorrido pela agulha (com pré-leitura);
- Velocidade constante = 0,100mm/s;
- Força de 0,7mN.

A agulha de diamante (raio = 2 $\mu$ m) do rugosímetro percorreu a superfície do bloco, perpendicularmente, em direção ao movimento da escovação,



caracterizando a  $R_a$ , que é o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média dentro do comprimento de medição  $L_n$ . As informações obtidas pela agulha foram captadas pelo rugosímetro de forma quantitativa. Foram realizadas 5 leituras e obtida a média aritmética dos valores absolutos dessas leituras, o que caracterizou a  $R_a$  inicial e final (Figura 19).



**Figura 19 – a) Rugosímetro utilizado; b) Agulha do rugosímetro posicionada no limite esmalte de unha e esmalte dental; c) Agulha finalizando a leitura da área tratada.**

Os dados de  $R_a$  inicial e final estão contidos nos APÊNDICES G e K, respectivamente.

### 2.7.3 Microscopia eletrônica de varredura

Vinte e quatro blocos do estudo *in situ/ex vivo* foram selecionados, aleatoriamente, 4 de cada grupo, para análise das alterações micromorfológicas na superfície de esmalte erodida e/ou abrasionada.

Os blocos de esmalte tiveram, primeiramente, o esmalte de unha removido com um cotonete umedecido em acetona, sendo tomado o devido cuidado para não contaminar a superfície erodida e/ou abrasionada. Para a remoção da película adquirida sobre os blocos, os mesmos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 24h (HANNIG; BALZ, 1999). Em seguida, os blocos foram secos, desidratados em sílica gel (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ), montados em suportes específicos para MEV (“stubs” de alumínio) e cobertos 2x por 80s com ouro-paládio através do metalizador (SCD 005, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram analisadas ao MEV (Philips XL 30, Philips Electronic Instruments Inc, Mahwah, NJ, USA), que operou a 10-20 kV e com aumentos de 15x a 4000x (APÊNDICE L).

## 2.8 Análise dos dados

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva, sendo observada a média, desvio-padrão, mediana, valores mínimos e máximos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância (teste de Levene) e ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Foi avaliada a presença de *outliers*

(APÊNDICE M e N). Os dados de desfecho para esmalte erodido (grupos controle – estudo *in situ/ex vivo* e *in vitro*) e/ou abrasionado (grupos escovação imediata e após 1h com  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$ ) foram avaliados estatisticamente usando testes não paramétricos (Wilcoxon e Mann-Whitney). A diferença entre as medianas de rugosidade ( $R_a$  inicial e  $R_a$  final) e a alteração na rugosidade ( $R_a$  final menos  $R_a$  inicial) foram consideradas para análise (APÊNDICES O, P, Q).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar os efeitos das interações dentífricos ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$ ) e tempos (escovação imediata e após 1h) sobre o esmalte erodido (APÊNDICE O).

Análise dos dados de rugosidade final de cada grupo entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo ( $n = 2$ ) e voluntários com fluxo salivar estimulado normal ( $n = 10$ ) foi realizada através do teste t de Student e Mann-Whitney (APÊNDICE R).

A correlação entre GE (*in vitro*) e grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e controle  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*) foi estabelecida utilizando o teste não paramétrico de Correlação de Spearman (APÊNDICE S).

O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os cálculos estatísticos foram executados empregando o programa Software Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 12.0, SPSS Inc, Chicago, III).

## APÊNDICE B - FICHA CLÍNICA

nº: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Fase: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Fone residencial: \_\_\_\_\_

Celular: \_\_\_\_\_

Nome Pai: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Nome mãe: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

### Anamnese

#### 1 – Experiência médica e odontológica:

a) Já foi hospitalizado (a)? ( ) sim ( ) não Motivo: ( ) renal ( ) pulmonar  
( ) cardiológico ( ) hemorrágico ( ) neurológico ( ) alérgico – medicamento,  
alimento, produtos dentários: \_\_\_\_\_

b) Doenças crônicas: ( ) hepática ( ) reumática ( ) asma ( ) renal ( ) diabetes

d) Está sob tratamento médico? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

e) Está tomando algum medicamento? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

f) Já realizou tratamento odontológico? ( ) sim ( ) não. Que tipo de tratamento? \_\_\_\_\_

g) Está em tratamento odontológico? ( ) sim ( ) não. Que tipo de tratamento? \_\_\_\_\_

**2 – Hábitos deletérios:** ( ) bruxismo ( ) roer unhas ( ) morder lábio ( ) morder lápis ou caneta ( ) cigarro

#### 3 – Hábitos alimentares:

a) Alimentos e bebidas ácidas.

Quais? \_\_\_\_\_

Frequência: \_\_\_\_\_

Modo de ingestão de bebidas: ( ) diretamente do copo ( ) com canudo

b) Alimentos doces.

Quais? \_\_\_\_\_

Frequência: \_\_\_\_\_

c) Tipo de água utilizada para beber e preparar alimentos

Para beber: ( ) água mineral ( ) água filtrada

Para preparar alimentos: ( ) água mineral ( ) água filtrada ( ) água da torneira

#### 4 – Higiene bucal:

a) Frequência de escovação: ( ) irregular ( ) uma vez ao dia ( ) duas vezes ao dia  
( ) três vezes ao dia

b) Placa visível: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_

#### 5 – Exame clínico:

5.1 – Exame intrabucal:

a) Língua: Lesões: ( ) sim ( ) não Especificação: \_\_\_\_\_

b) Gengiva: ( ) gengivite ( ) periodontite ( ) recessão gengival \_\_\_\_\_

c) Dentes: Cárie: ( ) ausência de atividade ( ) presença de atividade

Desgaste dental: ( ) erosão ( ) atrição ( ) abrasão ( ) abfração \_\_\_\_\_

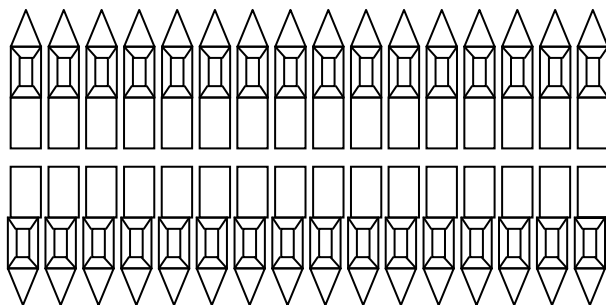
Cálculo dental: ( ) sim ( ) não Área: \_\_\_\_\_

d) Palato: ( ) normal ( ) ogival

e) Assoalho bucal: ( ) normal ( ) anormal

f) Mucosa bucal: Lesões: ( ) sim ( ) não Especificação: \_\_\_\_\_

Secura: ( ) sim ( ) não



#### 6 – Parâmetros salivares:

6.1 – Fluxo salivar: \_\_\_\_\_

6.2 – Capacidade tampão: \_\_\_\_\_

7 – Obs. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### 8 – Procedimentos executados

Data	



## APÊNDICE C



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOPEDIATRIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título da pesquisa:** “Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão – um estudo *in situ/ex vivo*”.

**Pesquisador principal:** Meire Coelho Ferreira

**Pesquisador responsável:** Ricardo de Sousa Vieira

**Objetivo da pesquisa:** Avaliar a influência de agentes abrasivos presentes em dentifrícios em esmalte permanente humano submetido à erosão e exposto ao meio bucal.

**Justificativa:**

Com o consumo habitual de bebidas ácidas, principalmente de refrigerantes, por crianças e adolescentes, observa-se uma maior predisposição à erosão dental. Esta patologia é representada pela dissolução química superficial dos tecidos dentais duros sem o envolvimento de bactérias. É causada por fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos, o consumo de alimentos e bebidas ácidas é o fator mais importante. O uso freqüente de medicamentos como vitamina C e aspirina, e a exposição a ácidos ambientais provenientes de indústrias e piscinas cloradas também são fatores causais extrínsecos. Como fator intrínseco está o ácido gástrico que entra em contato com o meio bucal através do vômito crônico decorrente

de doenças orgânicas ou psicossomáticas (bulimia e anorexia) e por meio de regurgitação, complicação comum em problemas gastrointestinais.

A evolução do processo ocorre através da exposição em alta frequência às fontes ácidas acima citadas e, geralmente, associado a outros tipos de desgaste dental, como a atrição e a abrasão. A atrição é resultante do contato entre dentes e a abrasão está mais comumente relacionada à forma e frequência de escovação, ao tempo e força de escovação, ao material e rigidez das cerdas da escova, a abrasividade, pH e quantidade de dentífrico utilizado.

Com a evolução do processo, a sensibilidade dental e um possível envolvimento pulpar podem se fazer presentes. O controle da lesão erosiva deve ser realizado mediante a investigação de hábitos alimentares (alimentos e bebidas ácidas), ácidos no ambiente e doenças (orgânicas e psicossomáticas) que possam causar o processo, do aconselhamento de acordo com a causa.

#### **Procedimentos:**

O estudo será compreendido por duas fases experimentais de 5 dias. Os voluntários utilizarão aparelhos removíveis palatais contendo 6 blocos de esmalte estéreis, provenientes de dentes permanentes humanos. Os blocos serão submetidos à erosão com refrigerante do tipo cola 4x/dia e em dois momentos do procedimento de erosão, 4 blocos serão escovados com dentífrico não fluoretado (2 blocos, imediatamente após e, em 2 blocos, 1h após).

Em uma fase do experimento a escovação será realizada com dentífrico não fluoretado contendo abrasivo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e na outra fase, a escovação será realizada com dentífrico não fluoretado contendo abrasivo sílica ( $\text{SiO}_2$ ).

Os voluntários da pesquisa serão distribuídos aleatoriamente para os 2 tratamentos. Na segunda fase da pesquisa será feito o cruzamento entre voluntários e tratamentos.

#### **Desconfortos e riscos:**

1 – O voluntário pode apresentar discreta halitose (mal hálito) durante o período experimental, o que poderá ser resolvido com adequada higiene da parte interna do aparelho removível, ou seja, da parte que fica em contato com o palato;



2 – O aparelho removível pode causar um leve desconforto que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamento semanal será realizado, para verificar as condições do aparelho e da cavidade bucal;

**Benefícios da pesquisa:**

No que tange os voluntários, os mesmos serão beneficiados por receberem orientações individuais sobre as causas dos desgastes dentais, contribuindo, assim, não somente com os cuidados pessoais em relação à saúde bucal, como também acrescentado em sua formação profissional. Além disso, a pesquisa contribuirá com a comunidade científica através da geração de conhecimento quanto ao controle da erosão e abrasão dental. Este conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população.

**Forma de acompanhamento e assistência:**

A pesquisadora principal estará à disposição dos voluntários para ajuste no aparelho removível, a fim de minimizar qualquer desconforto.

**Garantia de esclarecimentos:**

O voluntário tem garantia de que receberá esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, a pesquisadora principal assume o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante a pesquisa, ainda que esta possa afetar a vontade do voluntário em continuar participando.

Qualquer dúvida ou problema com o aparelho removível, por favor, comunique-se com a pesquisadora principal com a maior brevidade possível.

Tel: (48) 3234-2817 (Meire - residência)

(48) 9923-5654 (Meire)

(48) 3331-9920 (Disciplina de Odontopediatria)

**Liberdade para se recusar em participar da pesquisa:**

A decisão em fazer parte desta pesquisa é voluntária. O voluntário tem inteira liberdade para escolher em participar ou não da pesquisa.

**Retirada de consentimento:**

Os voluntários da pesquisa têm a liberdade para retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa e por qualquer razão, sem penalidades e sem prejuízo ao seu cuidado. Para isso, o voluntário deve comunicar ao pesquisador principal pessoalmente ou através dos telefones: (48) 3234-2817 / 9923-5654 / 3331-9920.

**Garantia de sigilo:**

Os pesquisadores asseguram a privacidade do voluntário quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa e quanto a sua identidade.

**Formas de ressarcimento:**

A pesquisa não causará nenhum custo adicional ao participante, visto que se dará durante o dia, coincidindo com o período de permanência do voluntário no Centro de Ciências da Saúde (UFSC) para assistir aulas. Sendo assim, despesas com transporte e alimentação não necessitarão ser ressarcidas.

**Formas de indenização:**

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

**Consentimento pós-informação:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, certifico que, tendo lido as informações acima e estando suficientemente esclarecido de todos os itens, pela doutoranda Meire Coelho Ferreira, estou plenamente de acordo em participar da pesquisa **“Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão – um estudo *in situ/ex vivo*”**, como voluntário.

---

Assinatura do voluntário

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

Este consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do voluntário da pesquisa e outra de propriedade do pesquisador principal.

**APÊNDICE D - DIÁRIO ALIMENTAR**

Nome: \_\_\_\_\_ Ficha nº: \_\_\_\_\_

Fase experimental: \_\_\_\_\_

**DIAS DA SEMANA (2ª, 4ª e 6ª feira)**

<b>REFEIÇÃO</b>	<b>HORA</b>	<b>CONTEÚDO e QUANTIDADE</b>
Café da Manhã	_____	_____ _____
Lanche	_____	_____ _____
Almoço	_____	_____ _____ _____
Sobremesa	_____	_____ _____
Lanche	_____	_____ _____
Jantar	_____	_____ _____
Outros	_____	_____ _____ _____

## APÊNDICE E - INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Voluntário, você está recebendo um Kit composto por um aparelho removível, estojo para guardar o aparelho, gaze, soro fisiológico, solução de clorexidina a 0,2%, dentífrico não fluoretado (com abrasivo  $\text{CaCO}_3$ ), escova dental macia para escovação dos dentes naturais e escova dental infantil macia para escovação da parte interna do aparelho (em contato com o palato). O refrigerante do tipo cola será fornecido no momento do procedimento de erosão e a escova para realização do procedimento de abrasão nos blocos de esmalte ficará sob responsabilidade da pesquisadora.

### INSTRUÇÕES ESPECÍFICAS

1- Nos dias do experimento, o aparelho deverá ser inserido na cavidade bucal às 8:00h, ou seja, 1h antes do 1º procedimento de erosão, e removido após 1h do último procedimento. Será recolocado na cavidade bucal somente no dia seguinte.

2- A cada dia do experimento, o aparelho deve ser imerso em clorexidina a 0,2% por 3min, antes e após seu uso. Após imersão, o aparelho deve ser lavado em água corrente por 20s;

3- A imersão do aparelho em refrigerante do tipo cola (fresco e gelado) será realizada 4x/dia, por 5min a cada vez. Findado este período, o aparelho será removido do refrigerante e recolocado na cavidade bucal;

4- Após o 2º e 4º procedimento erosivo, os blocos de esmalte serão escovados pela pesquisadora. Após a escovação, lavar o aparelho em água corrente por 20s e recolocá-lo na cavidade bucal;

5- O aparelho deve ser removido durante as refeições (exceto para a ingestão de água); para a realização da escovação dos dentes naturais; e após 1h do último procedimento. Durante as refeições, no momento da escovação dos dentes naturais e à noite, o aparelho deve ser coberto com gaze embebida em soro fisiológico, armazenado em caixa plástica e mantido a temperatura ambiente. **Este procedimento é importante para não ressecar os blocos de esmalte;**

6- A escovação dos dentes naturais deve ser realizada, no mínimo, 2x/dia (após o café da manhã e após o almoço). A escovação deve ser realizada exclusivamente com a escova e dentífrico não fluoretado fornecido pela pesquisadora;

7- O dentifrício não fluoretado e a escova dental fornecida pela pesquisadora deve ser usada durante todo o período experimental e por 7 dias, previamente ao início da pesquisa;

8- O aparelho deve ter sua parte interna, ou seja, a parte que fica em contato com o palato, higienizada 1x/dia (após imersão em clorexidina a 0,2% ao final do dia), com a escova dental infantil macia fornecida.

### **INSTRUÇÕES GERAIS**

1 – Manter padrões similares de alimentação (sólidos e líquidos) durante todo o período da pesquisa, evitando o consumo de refrigerantes ou de outros líquidos ácidos, ou então, remover o aparelho no momento do consumo;

2 – Evitar o uso de gomas de mascar e de balas durante a pesquisa para evitar a destruição e deslocamento dos blocos de esmalte do aparelho;

3 – Não utilizar expectorantes ou drogas antiasmáticas nos últimos 2 meses antes do início da pesquisa e durante a pesquisa;

4 – Preencher, com atenção, o diário alimentar por 3 dias (2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> feira);

5 – Seguir, com atenção, a ficha de horários das atividades diárias;

6 – Comparecer ao Laboratório de Pesquisa (2<sup>o</sup> andar), todos os dias, em horários a serem definidos. No 5<sup>o</sup> dia de cada fase experimental, comparecer ao Laboratório de Pesquisa ao final do dia para a entrega do aparelho;

**Agradeço pelo apoio e colaboração!**

**Sem a sua participação não seria possível a realização desta pesquisa!**

QUALQUER DÚVIDA ENTRE EM CONTATO:

(48) 3234-2817 (Meire - residência)

(48) 9923-5654 (Meire)

(48) 3331-9920 (Disciplina de Odontopediatria)

## APÊNDICE F - HORÁRIO DAS ATIVIDADES

**Previamente ao início da pesquisa:**

**Horário a ser definido com os voluntários** – Clínica de Pós-Graduação – anamnese, exame clínico, coleta de saliva e moldagem.

**Semana da pesquisa (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> feira):**

**7:50h** – Imersão do aparelho em solução de clorexidina a 0,2%, por 3min, seguida de lavagem em água corrente;

**8:00h** – Inserção do aparelho na cavidade bucal;

**9:00h** – Remoção do dispositivo e imersão em 25ml de refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, por 5min. Após, retornar com o aparelho para a cavidade bucal;

**11:00h** – Remoção do aparelho e imersão em 25ml de refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, por 5min. Os blocos de esmalte serão escovados pela pesquisadora imediatamente após e 1h após o procedimento erosivo (durante este intervalo de 1h, o aparelho deverá ser inserido na cavidade bucal). Após os procedimentos de escovação, lavar o aparelho em água corrente por 20s e retornar com o aparelho para a cavidade bucal;

**Remover o aparelho no horário do almoço. Após a escovação dos dentes naturais, retornar com o aparelho para a cavidade bucal.**

**14:00h** – Remoção do aparelho e imersão em 25ml de refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, por 5min. Após, retornar com o aparelho para a cavidade bucal;

**16:00h** – Remoção do aparelho e imersão em 25ml de refrigerante do tipo cola, fresco e gelado, por 5min. Os blocos de esmalte serão escovados pela pesquisadora imediatamente após e 1h após o procedimento erosivo (durante este intervalo de 1h, o aparelho deverá ser inserido na cavidade bucal). Após os procedimentos de escovação, lavar o aparelho em água corrente por 20s e retornar com o aparelho para a cavidade bucal;

**18:00h** – Remoção do aparelho, escovação da parte interna (em contato com o palato) sem dentífrico. Imersão do aparelho em clorexidina 0,2%, por 3min, lavagem em água corrente por 20s, cobertura dos blocos de esmalte do aparelho com gaze embebida em soro fisiológico e armazenamento no estojo fornecido.

**APÊNDICE G – Valores de microdureza e rugosidade ( $R_a$ ) inicial dos blocos de esmalte utilizados no estudo *in situ/ex vivo* e *in vitro*.**

Quadro 1 – Valores de microdureza inicial dos blocos selecionados para o estudo *in situ/ex vivo*.

Amostra	Dureza 1	Dureza 2	Dureza 3	Dureza 4	Dureza 5	Média
94	271	268	271	271	279	272
210	271	274	271	276	268	272
194	263	263	266	276	302	274
72	271	282	282	268	271	275
93	290	276	258	274	276	275
152	274	276	274	268	285	275
21	231	282	309	282	276	276
22	244	276	271	290	299	276
83	276	276	279	268	282	276
133	282	274	268	271	287	276
108	258	279	293	282	271	277
134	271	271	276	276	290	277
140	287	279	293	256	271	277
169	274	274	276	274	287	277
205	258	263	290	282	293	277
11	268	225	306	296	296	278
163	279	268	290	285	268	278
23	296	266	274	268	290	279
24	268	287	285	274	279	279
27	249	274	285	285	302	279
44	299	271	287	285	251	279
85	359	253	268	253	261	279
63	276	276	274	290	282	280
66	299	268	276	274	282	280
67	268	253	333	274	271	280
131	282	282	276	282	276	280
97	290	290	276	274	276	281
102	285	282	279	279	279	281
191	285	276	287	279	279	281
69	274	282	299	282	274	282



112	312	282	282	266	268	282
5	319	299	287	266	242	283
47	208	287	290	322	309	283
50	276	271	285	287	293	283
187	285	309	319	274	227	283
207	263	296	287	299	268	283
19	276	279	299	285	282	284
52	261	296	285	312	268	284
65	279	282	287	279	290	284
25	293	287	279	287	276	285
79	285	290	293	282	276	285
151	285	279	290	296	276	285
37	285	299	285	282	279	286
64	306	293	276	282	268	286
74	326	282	285	271	268	286
114	282	276	293	290	290	286
115	279	287	290	290	282	286
202	296	279	290	279	285	286
60	355	274	261	285	263	287
157	287	282	293	296	274	287
211	290	282	287	285	290	287
49	282	306	285	290	276	288
73	299	282	276	282	299	288
149	306	285	282	279	287	288
71	290	282	285	299	290	289
90	276	287	299	287	296	289
95	347	263	290	268	274	289
119	287	306	285	282	287	289
123	274	290	287	299	293	289
148	302	279	287	287	290	289
77	279	285	293	296	296	290
16	306	302	282	282	282	291
137	271	299	302	293	287	291
15	276	282	306	290	306	292
89	279	290	290	299	299	292
103	290	287	293	282	309	292
57	302	299	293	290	285	294
106	306	287	276	299	302	294
109	293	302	296	293	285	294

116	456	263	258	235	258	294
139	276	290	287	302	312	294
179	299	296	290	293	290	294
143	293	306	312	276	287	295
144	309	287	293	306	282	295
58	389	268	276	276	268	296
59	309	271	296	296	309	296
98	290	290	296	296	306	296
126	287	302	296	287	312	297
158	279	282	306	315	302	297
208	279	296	287	326	296	297
13	282	293	309	302	306	298
29	296	258	312	312	319	299
35	336	282	279	285	319	300
127	296	299	290	306	309	300
183	282	312	315	287	306	300
41	309	293	306	312	285	301
164	312	290	302	302	299	301
91	312	326	296	282	296	302
141	299	309	287	319	302	303
175	306	306	315	309	282	303
38	329	299	290	293	309	304
87	319	312	309	293	287	304
135	302	290	299	309	319	304
138	309	312	296	309	299	305
153	293	312	306	312	303	305
165	326	299	306	296	299	305
122	299	296	319	319	296	306
201	319	285	312	312	302	306
4	309	282	315	306	322	307
14	319	309	282	312	312	307
18	290	296	302	302	344	307
31	319	306	302	312	296	307
68	434	261	274	299	266	307
142	299	296	319	306	315	307
32	309	306	306	319	302	308
61	541	251	246	249	251	308
104	312	293	309	315	312	308
197	306	312	287	315	322	309

146	315	319	312	322	282	310
189	312	293	306	333	306	310
171	312	312	312	312	312	312
130	312	329	329	302	296	314
1	349	319	306	302	299	315
10	282	326	306	326	336	315
45	253	355	336	326	306	315
193	319	312	322	315	306	315
199	428	274	285	290	296	315
26	223	293	376	351	336	316
51	322	312	302	326	319	316
203	326	299	319	333	306	316
9	326	312	326	312	315	318
166	306	315	319	329	319	318
168	329	322	302	306	329	318
3	340	329	326	296	306	319
28	351	340	322	293	290	319
155	336	319	302	326	312	319
190	299	312	344	312	329	319
2	333	329	312	309	319	320
76	499	282	276	282	261	320
105	319	306	315	344	319	320
150	340	326	306	326	306	320
200	309	315	306	319	351	320
20	287	293	344	340	351	323
145	333	359	315	322	285	323
30	351	329	315	302	322	324
204	322	355	296	336	309	324
75	606	261	237	251	268	325
177	336	329	315	322	322	325
78	344	329	326	322	309	326
33	326	326	333	322	329	327
186	329	340	322	340	306	327
209	322	347	312	329	326	327
101	333	309	329	340	336	329
48	359	322	302	326	340	330

Média: 297,35 ± 16,04KHN

Quadro 2 – Valores de rugosidade ( $R_a$ ) inicial dos blocos selecionados para o estudo *in situ/ex vivo*.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
152	0,0402	0,0495	0,043	0,0407	0,0526	0,0452
93	0,0665	0,0421	0,0379	0,043	0,0421	0,0463
98	0,0428	0,0492	0,0497	0,0442	0,0466	0,0465
163	0,0478	0,0426	0,0502	0,0452	0,0478	0,0467
97	0,0625	0,0453	0,0407	0,0436	0,0419	0,0468
114	0,048	0,0471	0,0491	0,046	0,0446	0,047
191	0,0508	0,0437	0,0434	0,0487	0,0485	0,047
143	0,0454	0,0536	0,0463	0,0441	0,046	0,0471
112	0,047	0,0466	0,0439	0,053	0,0474	0,0476
61	0,0483	0,0466	0,0469	0,0442	0,0524	0,0477
157	0,0427	0,0427	0,0608	0,0483	0,0491	0,0487
149	0,0569	0,0579	0,0511	0,0393	0,0404	0,0491
57	0,0527	0,0491	0,0476	0,0483	0,0518	0,0499
85	0,0441	0,0584	0,0437	0,0472	0,0569	0,0501
177	0,064	0,0499	0,0396	0,0474	0,0492	0,0501
45	0,0407	0,0422	0,0548	0,0416	0,073	0,0505
138	0,0482	0,0494	0,0524	0,0564	0,049	0,0511
187	0,0449	0,0503	0,0552	0,0506	0,0573	0,0516
140	0,0538	0,0562	0,0474	0,0488	0,0525	0,0517
16	0,0449	0,0628	0,0594	0,052	0,042	0,0522
207	0,0644	0,0533	0,0469	0,0551	0,0451	0,053
44	0,0618	0,0511	0,0577	0,0431	0,0519	0,0531
165	0,0518	0,0585	0,0469	0,0603	0,0482	0,0531
73	0,0516	0,0521	0,0526	0,058	0,0519	0,0533
69	0,0527	0,051	0,0582	0,0584	0,0485	0,0537
68	0,0448	0,0454	0,055	0,0724	0,052	0,0539
199	0,0614	0,0492	0,0537	0,0509	0,0564	0,0543
89	0,0496	0,0632	0,0541	0,0536	0,0515	0,0544
94	0,054	0,0581	0,0542	0,0534	0,0533	0,0546
183	0,0384	0,0535	0,049	0,0594	0,0725	0,0546
63	0,0458	0,0411	0,0442	0,0839	0,0585	0,0547
153	0,0551	0,0555	0,0539	0,0532	0,0556	0,0547
179	0,0536	0,055	0,0627	0,0596	0,0429	0,0548
41	0,0529	0,0492	0,0558	0,0615	0,0557	0,055
50	0,0496	0,0483	0,063	0,0458	0,0701	0,0554
66	0,0581	0,0598	0,0503	0,0551	0,0547	0,0556
83	0,0548	0,0524	0,0571	0,0558	0,0578	0,0556
137	0,0488	0,0552	0,0627	0,0636	0,0494	0,0559
47	0,0581	0,0502	0,0632	0,0564	0,054	0,0564
49	0,0584	0,0534	0,0533	0,0587	0,0584	0,0564

139	0,0609	0,0546	0,0579	0,0591	0,0495	0,0564
79	0,0634	0,054	0,0502	0,0519	0,0654	0,057
75	0,0607	0,0627	0,056	0,0544	0,0522	0,0572
76	0,0595	0,0546	0,0581	0,0582	0,0554	0,0572
148	0,0431	0,0533	0,0395	0,0954	0,0548	0,0572
104	0,0571	0,0576	0,0546	0,0608	0,0572	0,0574
105	0,0516	0,063	0,0569	0,0606	0,0561	0,0576
131	0,0517	0,0413	0,0779	0,0541	0,0635	0,0577
164	0,0555	0,0612	0,0536	0,0543	0,064	0,0577
48	0,0563	0,0579	0,0622	0,0585	0,0543	0,0578
64	0,0598	0,0622	0,0529	0,0516	0,0641	0,0581
87	0,0543	0,0608	0,0667	0,056	0,0535	0,0582
189	0,0467	0,0792	0,0514	0,0598	0,0545	0,0583
210	0,063	0,0615	0,0601	0,0534	0,0545	0,0585
101	0,0565	0,0524	0,0501	0,05	0,0842	0,0586
91	0,0637	0,0552	0,0509	0,0633	0,0605	0,0587
78	0,0609	0,0608	0,0541	0,0583	0,0606	0,0589
142	0,0551	0,0641	0,0553	0,0528	0,0676	0,059
115	0,0616	0,0554	0,0586	0,0593	0,0611	0,0592
166	0,0557	0,0519	0,0757	0,0537	0,0588	0,0592
194	0,058	0,056	0,0803	0,0585	0,0438	0,0593
150	0,0519	0,0607	0,0563	0,0563	0,0718	0,0594
19	0,0455	0,0523	0,0636	0,0695	0,0664	0,0595
106	0,0598	0,0602	0,0558	0,0693	0,0582	0,0607
190	0,0396	0,0626	0,0618	0,0993	0,0402	0,0607
203	0,062	0,0601	0,0575	0,0624	0,0615	0,0607
95	0,0504	0,0753	0,0587	0,0584	0,0619	0,0609
74	0,0492	0,0618	0,0579	0,0537	0,0822	0,061
209	0,0711	0,0641	0,0604	0,0557	0,0545	0,0612
22	0,0444	0,0663	0,068	0,0664	0,064	0,0618
72	0,0624	0,0576	0,0618	0,0663	0,0616	0,062
169	0,0809	0,0565	0,0536	0,0634	0,0556	0,062
168	0,0671	0,0588	0,0694	0,0543	0,0609	0,0621
144	0,0613	0,0671	0,0615	0,0591	0,0618	0,0622
31	0,0567	0,0852	0,0524	0,0647	0,0548	0,0628
32	0,0733	0,0574	0,056	0,0654	0,0621	0,0628
90	0,0762	0,0586	0,0495	0,0759	0,0548	0,063
67	0,0598	0,0645	0,0623	0,0647	0,0658	0,0634
21	0,0579	0,0829	0,0727	0,0619	0,0432	0,0637
151	0,062	0,0591	0,0753	0,0612	0,0656	0,0646
208	0,0742	0,0633	0,0729	0,0619	0,0513	0,0647
71	0,0855	0,0576	0,0607	0,0593	0,0617	0,065
9	0,0799	0,0792	0,0789	0,047	0,0411	0,0652
24	0,0595	0,0515	0,0422	0,0802	0,0927	0,0652
141	0,057	0,0882	0,0554	0,0605	0,0666	0,0655
126	0,0543	0,0697	0,0715	0,071	0,0618	0,0657
197	0,0666	0,0628	0,0659	0,0637	0,0708	0,066

60	0,0592	0,0603	0,06	0,0649	0,0862	0,0661
108	0,0655	0,0731	0,0422	0,0754	0,0752	0,0663
155	0,068	0,0734	0,0667	0,0527	0,0719	0,0665
11	0,075	0,0638	0,0614	0,0659	0,0686	0,0669
29	0,0559	0,0534	0,0399	0,1456	0,0406	0,0671
38	0,0701	0,0592	0,0748	0,0698	0,062	0,0672
10	0,0603	0,0943	0,0569	0,0378	0,0884	0,0675
201	0,0668	0,074	0,0678	0,074	0,057	0,0679
2	0,0521	0,0609	0,0608	0,0597	0,1072	0,0681
119	0,0631	0,074	0,0701	0,0713	0,0667	0,069
200	0,0645	0,0327	0,0752	0,099	0,0757	0,0694
175	0,0357	0,0898	0,0925	0,0948	0,0358	0,0697
204	0,0549	0,0547	0,0525	0,1247	0,0639	0,0701
18	0,0619	0,0802	0,0876	0,0509	0,0721	0,0705
35	0,0852	0,06	0,0474	0,0975	0,0623	0,0705
158	0,074	0,0771	0,0515	0,074	0,0794	0,0712
202	0,0521	0,0718	0,0746	0,0861	0,072	0,0713
14	0,041	0,0651	0,0694	0,0625	0,1193	0,0715
26	0,0726	0,0713	0,0635	0,0822	0,0699	0,0719
145	0,0603	0,074	0,0906	0,0724	0,0642	0,0723
27	0,076	0,071	0,0652	0,0745	0,0758	0,0725
103	0,0697	0,0407	0,1701	0,0461	0,0373	0,0728
58	0,0506	0,0458	0,0772	0,1284	0,0655	0,0735
122	0,0798	0,0847	0,0782	0,0724	0,0551	0,074
134	0,0558	0,0626	0,0777	0,0901	0,0928	0,0758
30	0,1405	0,0637	0,064	0,0551	0,0564	0,0759
52	0,0927	0,078	0,0781	0,0613	0,07	0,076
65	0,0592	0,0585	0,1021	0,1011	0,0603	0,0762
77	0,1244	0,0812	0,0593	0,0614	0,0591	0,0771
4	0,0929	0,0686	0,0802	0,0787	0,0659	0,0772
146	0,0753	0,085	0,0836	0,0769	0,0659	0,0773
123	0,0915	0,0565	0,0949	0,0758	0,0681	0,0774
20	0,0635	0,0711	0,0751	0,087	0,0947	0,0783
193	0,1168	0,0757	0,0682	0,0671	0,0669	0,0789
59	0,1633	0,0592	0,0649	0,0639	0,0461	0,0795
37	0,0844	0,0752	0,0775	0,0918	0,0712	0,08
130	0,0713	0,0843	0,0771	0,0844	0,0849	0,0804
186	0,0904	0,0816	0,0772	0,0769	0,0761	0,0804
135	0,0687	0,0777	0,0843	0,0929	0,0875	0,0822
102	0,0658	0,1263	0,0786	0,1341	0,0697	0,0832
15	0,0526	0,122	0,0899	0,0566	0,0956	0,0833
133	0,0637	0,0889	0,0937	0,1021	0,0763	0,0849
13	0,0552	0,1023	0,0549	0,1315	0,081	0,085
109	0,0471	0,0595	0,0642	0,0677	0,1987	0,0874
1	0,0557	0,0631	0,2163	0,0602	0,0644	0,0912
28	0,0852	0,0994	0,1066	0,0831	0,088	0,0925
3	0,0961	0,0932	0,0951	0,0842	0,0963	0,093

211	0,0691	0,0637	0,0629	0,0694	0,2322	0,0994
25	0,07	0,0895	0,1154	0,129	0,0938	0,0995
23	0,0629	0,2435	0,0832	0,0766	0,0779	0,1088
127	0,1177	0,1126	0,1154	0,1095	0,1112	0,1133
116	0,0492	0,3697	0,0508	0,0518	0,0467	0,1136
51	0,0787	0,0881	0,0942	0,1086	0,2004	0,114
33	0,3204	0,0707	0,065	0,0665	0,0629	0,1171
5	0,0803	0,0756	0,2874	0,0748	0,0835	0,1203
171	0,392	0,0512	0,0596	0,0575	0,0502	0,1221
205	0,4076	0,0647	0,0634	0,0599	0,0577	0,1307

Média:  $0,07 \pm 0,02\mu\text{m}$

Quadro 3 – Valores de microdureza inicial dos blocos utilizados no grupo experimental do estudo *in vitro*.

30	329	296	276	299	302	301
16	244	293	329	319	333	304
44	315	306	322	290	287	304
34	336	290	299	293	312	306
17	351	287	309	306	293	309
33	279	309	329	336	326	316
45	271	329	344	309	329	316
42	315	322	306	333	315	318
31	319	322	299	315	340	319
8	372	299	315	315	329	326
29	351	326	329	312	329	329
35	399	296	322	309	319	329
14	380	319	290	312	347	330
10	336	333	351	326	336	336
49	326	336	315	363	340	336
21	299	329	351	363	351	339
7	344	326	347	340	359	343
39	333	336	347	359	351	345
9	355	322	333	363	355	346
1	336	359	336	367	340	348
13	279	363	380	355	363	348
24	372	340	336	351	340	348
2	408	363	363	276	340	350
22	340	355	351	333	376	351
23	376	363	340	351	326	351
11	351	347	363	340	359	352
20	367	351	363	351	372	361
41	355	355	385	359	372	365
48	376	351	355	367	385	367

Média: 334,24 ± 19,33KHN



Quadro 4 – Valores de rugosidade ( $R_a$ ) inicial dos blocos utilizados no grupo experimental do estudo *in vitro*.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
16	0,0426	0,0506	0,0468	0,0429	0,0425	0,0451
23	0,0599	0,0379	0,0426	0,0554	0,0565	0,0504
44	0,0486	0,052	0,0487	0,0516	0,0513	0,0504
9	0,0576	0,0605	0,0435	0,0493	0,055	0,0532
13	0,0513	0,0507	0,0617	0,0526	0,0574	0,0547
7	0,0469	0,0556	0,0526	0,0682	0,0504	0,0548
34	0,0593	0,053	0,0514	0,052	0,0599	0,0551
21	0,0542	0,05	0,0517	0,0546	0,0673	0,0556
49	0,0503	0,0574	0,0572	0,0576	0,056	0,0557
41	0,0581	0,0543	0,0568	0,0567	0,0529	0,0558
30	0,0635	0,0512	0,0603	0,0478	0,0581	0,0562
17	0,0549	0,0605	0,0568	0,0594	0,0534	0,057
2	0,0574	0,0584	0,0639	0,0639	0,0555	0,0598
14	0,0525	0,0594	0,0731	0,0571	0,0609	0,0606
11	0,0579	0,0605	0,0592	0,0655	0,0607	0,0608
48	0,0506	0,0494	0,0524	0,0987	0,0538	0,061
29	0,0764	0,0629	0,0536	0,06	0,0582	0,0622
1	0,0488	0,0637	0,0603	0,0683	0,0724	0,0627
45	0,0521	0,0698	0,0729	0,0606	0,065	0,0641
8	0,0628	0,0641	0,052	0,0637	0,0797	0,0645
10	0,1128	0,0537	0,0546	0,055	0,0567	0,0666
31	0,0596	0,0913	0,0605	0,068	0,0611	0,0681
42	0,0668	0,0712	0,0711	0,0657	0,0799	0,0709
35	0,1764	0,0614	0,0458	0,0427	0,0494	0,0751
24	0,0659	0,1358	0,1187	0,2238	0,0673	0,1223
22	0,0631	0,0615	0,0616	0,6007	0,0556	0,1685
33	0,0605	0,2482	0,1049	0,4785	0,0561	0,1896
39	0,0715	0,1426	0,0556	0,0625	0,8558	0,2376
20	0,0518	0,0683	0,9356	0,9426	0,064	0,4125

Média:  $0,09 \pm 0,08\mu\text{m}$

Quadro 5 – Valores de microdureza inicial dos blocos utilizados no grupo controle do estudo *in vitro*.

Amostra	Dureza 1	Dureza 2	Dureza 3	Dureza 4	Dureza 5	Média
37	340	235	253	282	271	276
18	213	290	302	309	296	282
38	266	282	296	290	290	285
36	276	282	306	276	293	287
3	237	287	309	312	302	290
32	188	285	322	336	347	296
47	309	312	312	282	268	297
15	351	376	367	367	389	370
25	359	389	376	359	367	370
27	363	376	389	363	359	370
26	376	372	376	351	380	371
40	376	367	363	380	376	373
4	408	347	333	413	367	374
51	385	376	367	359	380	374
50	359	367	394	403	359	377
156	263	309	268	266	285	278
55	274	312	279	306	336	301
121	399	293	279	274	268	303
178	322	302	309	306	296	307

Média: 325,32 ± 41,99KHN

Quadro 6 – Valores de rugosidade ( $R_a$ ) inicial dos blocos utilizados no grupo controle do estudo *in vitro*.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
40	0,0512	0,0542	0,0489	0,05	0,0549	0,0519
36	0,051	0,0586	0,0495	0,052	0,0509	0,0524
26	0,0619	0,0556	0,0596	0,0463	0,0554	0,0557
15	0,0535	0,058	0,0603	0,0541	0,0582	0,0568
32	0,06	0,0412	0,0638	0,0695	0,054	0,0577
37	0,053	0,0569	0,0677	0,0623	0,0492	0,0578
38	0,0578	0,052	0,0573	0,0649	0,0618	0,0588
51	0,0797	0,0635	0,0536	0,0558	0,0531	0,0611
25	0,0631	0,0724	0,0575	0,0678	0,0622	0,0646
27	0,0746	0,0602	0,068	0,0796	0,0601	0,0685
3	0,0596	0,0517	0,1236	0,063	0,0532	0,0702
4	0,0778	0,0716	0,0653	0,0872	0,0557	0,0715
18	0,0576	0,0508	0,0573	0,1562	0,052	0,0748
50	0,0795	0,0753	0,0728	0,077	0,0882	0,0785
47	0,06	0,0431	0,0491	0,2075	0,0634	0,0846
55	0,0286	0,035	0,0261	0,0292	0,0417	0,0321
178	0,0445	0,0346	0,0529	0,0303	0,0318	0,0388
121	0,0635	0,0725	0,0871	0,2239	0,3092	0,1512
156	0,0746	0,1454	0,1442	0,1952	0,2982	0,1715

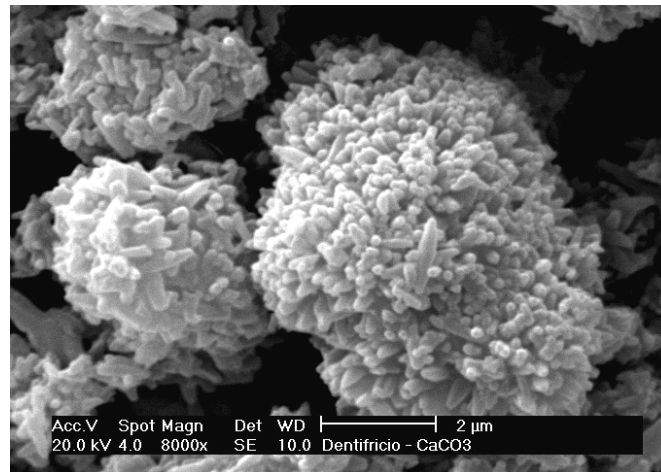
Média:  $0,07 \pm 0,03\mu\text{m}$

**APÊNDICE H – Medidas de pH do refrigerante do tipo cola.**

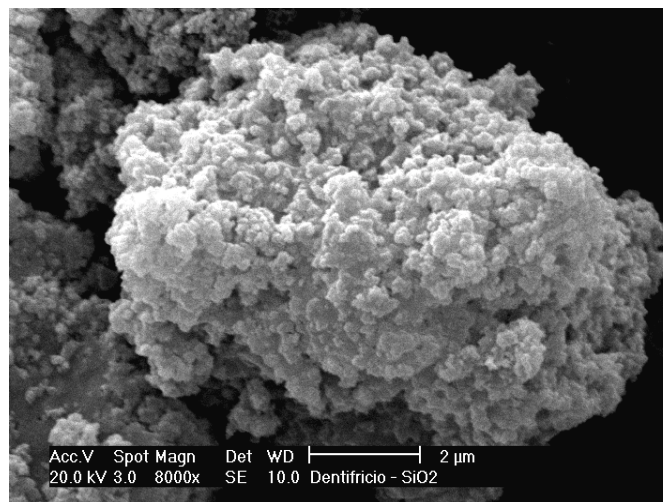
---

Refrigerante do tipo Cola	pH
Alíquota 1	2,8
Alíquota 2	2,9
Alíquota 3	3,0
Alíquota 4	3,1
Alíquota 5	3,2
Média	3,0

---

**APÊNDICE I – Fotomicrografias das partículas abrasivas dos dentifrícios.**

Partículas do abrasivo carbonato de cálcio.



Partículas do abrasivo sílica.

**APÊNDICE J – Valores absolutos da velocidade de secreção e pH final determinado pela cor na escala comparativa do DentoBuff®.**

Voluntário	Velocidade de Secreção (ml/min)	pH final
1	1,2	7,0
2	1,16	7,0
3	1,4	7,0
4	0,9	7,0
5	1,2	5,5
6	1,1	4,5
7	1,8	7,0
8	0,7	5,5
9	1,8	5,5
10	1,6	7,0
11	1,6	7,0
12	1,0	7,0

Fluxo salivar estimulado: Baixo – menos que 1,0ml/min  
 Intermediário – entre 1,0 e 1,5ml/min  
 Normal – entre 1,6 e 2,3ml/min

Capacidade tampão salivar: Baixa – pH final < 4,5  
 Intermediária – pH final entre 4,5 e 5,5  
 Normal – pH final > 5,5

Fonte: Manual do DentoBuff® (Inodon).

**APÊNDICE K – Valores de rugosidade ( $R_a$ ) final dos blocos de esmalte utilizados no estudo *in situ/ex vivo* e *in vitro*.**

Quadro 1 – Rugosidade ( $R_a$ ) final dos blocos utilizados no estudo *in situ/ex vivo*.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
152	0,1095	0,1273	0,117	0,4134	0,1294	0,1793
93	0,2997	0,3484	0,3272	0,2433	0,2679	0,2973
98	0,1775	0,2177	0,1832	0,1823	0,5628	0,2647
163	2,468	0,1359	0,1171	0,1573	0,1683	0,6093
97	0,1925	0,1527	0,1241	0,1492	0,1289	0,1495
114	0,6333	0,2206	0,5842	0,1975	0,1282	0,3528
191	0,3221	0,2745	0,1681	0,233	0,2061	0,2408
143	0,3811	0,3052	0,0978	0,2338	0,0941	0,2224
112	0,4259	0,6222	0,5438	0,7623	0,4774	0,5663
61	0,1412	0,1658	0,1658	0,1197	0,1472	0,1479
157	0,5283	0,3976	0,6932	1,169	1,099	0,7774
149	0,1107	0,1315	0,1387	0,1446	0,1234	0,1298
57	0,5695	0,3792	0,5805	0,2611	0,1243	0,3829
85	0,4184	0,3907	0,3669	0,3947	0,5153	0,4172
177	0,3549	0,365	0,4583	0,5682	0,4413	0,4375
45	0,312	0,3335	0,2763	0,2755	0,3195	0,3034
138	0,3558	0,5029	0,2534	0,3262	0,3964	0,3669
187	0,2394	0,2035	0,1647	0,1785	0,2221	0,2016
140	0,1937	0,151	0,1592	0,1731	0,1829	0,172
16	0,3297	0,3669	0,2992	0,4087	0,2827	0,3374
207	0,365	0,3105	0,3105	0,3678	0,3094	0,3326
44	0,1749	0,2081	0,199	0,1351	0,1826	0,1799
165	0,3458	0,3012	0,3311	0,3134	0,2885	0,316
73	0,2276	0,2857	0,308	0,3324	0,2655	0,2838
69	0,2984	0,313	0,36	0,3721	0,3384	0,3364
68	0,268	0,3977	0,4901	0,3165	0,4439	0,3832
199	0,3517	0,3464	0,3262	0,4164	0,3415	0,3564
89	0,3464	0,6311	0,2837	0,3467	0,5513	0,4318
94	0,2624	0,3515	0,3248	0,2939	0,2422	0,295

183	0,329	0,2454	0,2153	0,2152	0,2998	0,261
63	0,2624	0,259	0,3235	0,2922	0,275	0,2824
153	0,2377	0,3179	0,413	0,344	0,2477	0,3121
179	0,2243	0,2441	0,2416	0,2409	0,2335	0,2369
41	0,7675	0,5893	0,6744	0,8795	0,4563	0,6734
50	0,2386	0,213	0,3537	0,3128	0,3868	0,301
66	0,3538	0,2441	0,2984	0,1889	0,2365	0,2643
83	0,4346	0,3685	0,3406	0,322	0,5611	0,4054
137	0,3813	0,2482	0,4326	0,4388	0,6867	0,4375
47	0,6051	0,6118	0,4613	0,5607	0,4914	0,546
49	0,3716	0,3921	0,4449	0,4927	0,4109	0,4225
139	0,3437	0,2883	0,3835	0,3175	0,3216	0,3309
79	0,3492	0,3819	0,3838	0,2721	0,2695	0,3313
75	0,2323	0,2493	0,1836	0,1631	0,1795	0,2016
76	0,1613	0,197	0,1471	0,198	0,1659	0,1739
148	0,1064	0,2342	0,1462	0,1149	0,1275	0,1459
104	0,4831	0,5045	0,9636	0,4056	0,5988	0,5911
105	0,2085	0,2052	0,2294	0,1883	0,1759	0,2015
131	0,3737	0,2997	0,3194	0,4075	0,4025	0,3606
164	0,1733	0,232	0,2079	0,2067	0,1562	0,1952
48	0,3104	0,4658	0,3587	0,332	0,3735	0,3681
64	0,6969	0,7417	0,7638	0,8943	0,944	0,8082
87	0,643	0,5232	0,4283	0,3881	0,414	0,4793
189	0,1518	0,1889	0,1974	0,1764	0,2095	0,1848
210	0,2951	0,3925	0,4097	0,3347	0,3348	0,3534
101	0,2116	0,1991	0,2652	0,1889	0,2338	0,2197
91	0,2046	0,576	0,2817	0,2275	0,2293	0,3038
78	0,2235	0,2563	0,2973	0,2618	0,2859	0,2649
142	0,5612	0,4633	0,4277	0,4966	0,5894	0,5077
115	0,2987	0,2282	0,3205	0,2992	0,2337	0,2761
166	0,5143	0,2285	0,2669	0,3802	0,2461	0,3272
194	0,4816	0,4619	0,5043	0,514	0,4287	0,4781
150	0,2737	0,6977	0,6097	0,3007	0,7874	0,5338
19	0,2924	0,2513	0,2537	0,2331	0,2534	0,2568
106	0,6341	0,57	0,6461	0,5173	0,7303	0,6196
190	0,8344	0,3535	0,2185	0,2528	0,2057	0,373
203	0,358	0,3393	0,33	0,3766	0,4263	0,366
95	0,3506	0,2673	0,2722	0,2431	0,366	0,2999
74	0,4696	0,3179	0,348	0,4561	0,2454	0,3674



209	0,3335	0,2522	0,2679	0,1949	0,2793	0,2656
22	0,2822	0,3508	0,2675	0,6082	0,3563	0,373
72	0,643	0,4133	0,3628	0,4727	0,3421	0,4468
169	0,208	0,5706	0,3417	0,1845	0,1985	0,3007
168	0,3784	0,3439	1,515	2,327	0,3824	0,9893
144	0,3582	0,3404	0,3113	0,3775	0,1822	0,314
31	0,5537	0,45	0,442	0,2927	0,3297	0,4136
32	0,2723	0,3255	0,2357	0,2763	0,2423	0,2704
90	0,5151	0,3661	0,2732	0,3616	0,5991	0,423
67	0,4682	0,6619	0,4602	0,6089	0,5369	0,5472
21	0,3797	0,3829	0,3956	0,3616	0,3642	0,3768
151	0,243	0,1744	0,1739	0,3662	0,173	0,4261
208	0,3366	0,2718	0,303	0,2895	0,3002	0,3002
71	0,6363	0,6474	0,4831	0,5993	0,5316	0,5796
9	0,1491	0,1575	0,1921	0,3202	0,182	0,2002
24	0,4607	0,372	0,4288	0,5686	0,3235	0,4307
141	0,5353	0,5419	0,4286	0,5149	0,4756	0,4993
126	0,2587	0,2282	0,3583	0,3597	0,2525	0,2915
197	0,3471	0,4154	0,2838	0,2874	0,333	0,3333
60	0,3941	0,371	0,3608	0,4116	0,4372	0,3949
108	0,2486	0,287	0,2956	0,3556	0,3159	0,3006
155	0,7503	0,6739	0,7681	0,6364	0,5422	0,6742
11	0,1769	0,3785	0,2259	0,2108	0,1979	0,238
29	0,2613	0,273	0,2062	0,2127	0,2756	0,2458
38	0,2653	0,7717	1,13	0,9775	0,9055	0,8101
10	0,303	0,3139	0,2739	0,3621	0,3504	0,3206
201	0,1896	0,2269	0,1493	0,2099	0,1645	0,188
2	0,3853	0,4067	0,4064	0,4634	0,3872	0,4098
119	0,293	0,3445	0,2814	0,3069	0,3358	0,3123
200	0,1625	0,1559	0,152	0,1478	0,1653	0,1567
175	0,2695	0,2803	0,2497	0,2839	0,2578	0,2682
204	0,1848	0,4306	0,2368	0,3196	0,3304	0,3004
18	0,4088	0,3812	0,138	0,1046	0,6308	0,3327
35	0,2518	0,2858	0,3464	0,3309	0,3295	0,3089
158	0,2829	0,244	0,2838	0,2612	0,2448	0,2712
202	0,3998	0,2581	0,2355	0,2039	0,1603	0,2515
14	0,0995	0,0951	0,0882	0,0813	0,0796	0,0887
26	0,138	0,1263	0,1367	0,1833	0,1177	0,1404
145	0,1515	0,2082	0,0748	0,1186	0,0738	0,1254

27	0,4264	0,4929	0,4019	0,5005	0,6649	0,4973
103	0,1834	0,1635	0,1857	0,1751	0,1609	0,1737
58	0,4448	0,4283	0,3992	0,6253	0,4125	0,462
122	0,3475	0,3801	0,4001	0,3672	0,3872	0,3764
134	0,3092	0,3122	0,9586	0,3518	0,2702	0,4404
30	0,1305	0,1392	0,1556	0,1514	0,3625	0,1878
52	0,1508	0,2117	0,3235	1,048	0,2271	0,3923
65	0,2603	0,3509	0,2613	0,2246	0,2277	0,265
77	0,2167	0,1675	0,2249	0,9946	0,1694	0,3546
4	0,4834	0,3103	0,3757	0,4575	0,5389	0,4331
146	0,6811	0,4516	0,4257	0,465	0,4194	0,4886
123	0,3276	0,3489	0,2066	0,2338	0,3873	0,3008
20	0,5596	0,5511	0,715	0,5866	0,7559	0,6336
193	0,3808	0,517	0,4475	0,4949	0,5052	0,4691
59	0,5126	0,355	0,3519	0,3607	0,3736	0,3908
37	0,4921	0,3987	0,2578	0,2103	0,3032	0,3324
130	0,1752	0,1755	0,1523	0,2652	0,2629	0,2062
186	0,142	0,0972	0,2246	0,1022	0,135	0,1402
135	0,2315	0,6094	0,2016	0,2001	0,157	0,2799
102	0,1659	0,1518	0,1504	0,1466	0,1591	0,1548
15	0,1424	0,485	0,3757	0,3407	0,3044	0,3296
133	0,6468	0,4919	0,2783	0,4944	0,263	0,4349
13	0,2243	0,3181	0,2817	0,1644	0,1568	0,2291
109	0,2571	0,2885	0,2501	0,2227	0,2967	0,263
1	0,2306	0,1898	0,2143	0,2227	0,2025	0,212
28	0,3064	0,2382	0,2652	0,3059	0,2554	0,2742
3	0,4325	0,4482	0,3973	0,3317	0,3234	0,3866
211	0,1157	0,1284	0,1406	0,1035	0,4009	0,1778
25	0,1085	1,921	0,1234	0,414	0,1752	0,5484
23	0,1536	0,2411	0,1779	0,1752	0,1868	0,1869
127	0,4474	0,6916	0,491	0,703	0,5463	0,5759
116	0,2428	0,2869	0,2483	0,1982	0,2784	0,2509
51	0,1267	0,1372	0,1212	0,1137	0,149	0,1296
33	0,3059	0,2071	0,428	0,3105	0,3953	0,3293
5	0,143	0,1598	0,1352	0,1585	0,1398	0,1473
171	0,1045	0,0893	0,0989	0,2694	0,0868	0,1298
205	0,1351	0,1376	0,1354	0,1686	0,1835	0,152

Média: 0,34 ± 0,15µm

Quadro 2 – Rugosidade ( $R_a$ ) final dos blocos utilizados no grupo experimental do estudo *in vitro*.

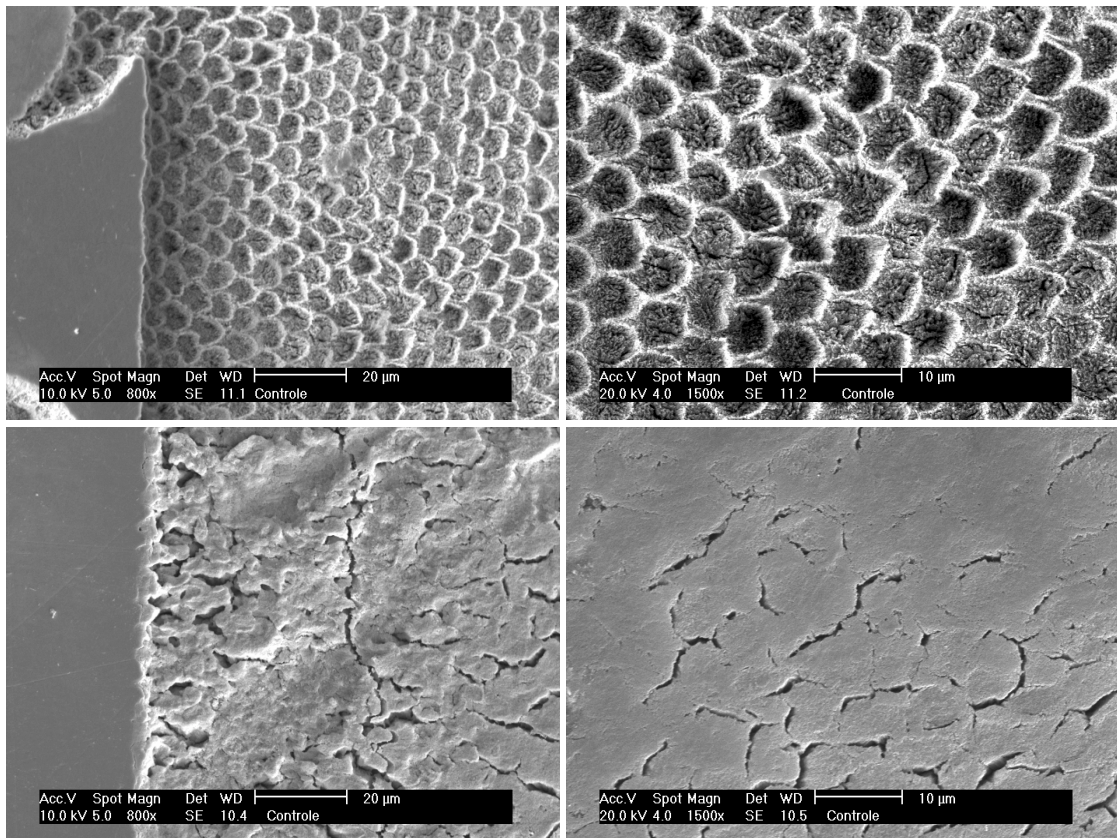
Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
16	0,1892	0,2118	0,2	0,219	0,2393	0,2119
23	0,221	0,2279	0,2099	0,2538	0,2403	0,2306
44	0,3173	0,312	0,291	0,3251	0,2718	0,3034
9	0,2712	0,2601	0,2902	0,2171	0,3492	0,2776
13	0,1786	0,171	0,2488	0,2211	0,2559	0,2151
7	0,2446	0,2031	0,2189	0,2127	0,2421	0,2243
34	0,305	0,3203	0,2974	0,2846	0,2571	0,2929
21	0,1815	0,1817	0,1825	0,1818	0,1506	0,1756
49	0,2376	0,2739	0,2769	0,2943	0,2332	0,2632
41	0,3065	0,2749	0,3406	0,3013	0,2872	0,3021
30	0,2854	0,2618	0,2167	0,2161	0,2564	0,2473
17	0,1662	0,1728	0,1623	0,166	0,1303	0,1595
2	0,2139	0,2155	0,1837	0,1777	0,2065	0,1995
14	0,2523	0,2068	0,2064	0,2523	0,2048	0,2245
11	0,1511	0,175	0,1973	0,2006	0,1783	0,1804
48	0,2547	0,3231	0,2863	0,2989	0,271	0,2868
29	0,1329	0,1529	0,157	0,1789	0,1501	0,1544
1	0,23	0,2254	0,2155	0,218	0,2132	0,2204
45	0,3547	0,3427	0,2351	0,2988	0,354	0,3171
8	0,2943	0,3434	0,3518	0,348	0,4432	0,3562
10	0,2138	0,1837	0,1683	0,2228	0,1856	0,1944
31	0,3	0,2849	0,2287	0,2834	0,3531	0,29
42	0,2055	0,2271	0,2206	0,1732	0,2067	0,2066
35	0,6463	0,1676	0,1709	0,3478	0,4842	0,3634
24	0,3342	0,2691	0,23	0,2801	0,257	0,2741
22	0,2491	0,2817	0,3337	0,2515	0,3176	0,2867
33	0,1958	0,2194	0,4511	0,1846	0,1982	0,2498
39	0,1877	0,173	0,1779	0,2054	0,1923	0,1872
20	0,2751	0,2516	0,2903	0,2488	0,2635	0,2659

Média:  $0,25 \pm 0,06\mu\text{m}$

Quadro 3 – Rugosidade ( $R_a$ ) final dos blocos utilizados no grupo controle do estudo *in vitro*.

Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5	Média
40	0,0768	0,0669	0,0635	0,0843	0,0783	0,074
36	0,1028	0,1183	0,0701	0,1021	0,1034	0,0993
26	0,0973	0,0787	0,1139	0,0997	0,1419	0,1063
15	0,0799	0,088	0,0679	0,0551	0,0712	0,0724
32	0,066	0,0635	0,045	0,0597	0,0429	0,0554
37	0,0884	0,0943	0,0896	0,2667	0,0948	0,1267
38	0,0724	0,0745	0,0814	0,077	0,0808	0,0772
51	0,0801	0,0755	0,07	0,0696	0,0737	0,0738
25	0,1552	0,638	0,1564	0,1157	0,1602	0,2451
27	0,0809	0,1195	0,0673	0,0802	0,0853	0,0866
3	0,0964	0,0892	0,0737	0,0583	0,0725	0,078
4	0,0675	0,0775	0,0808	0,0795	0,0903	0,0791
18	0,0682	0,0561	0,0596	0,0725	0,0785	0,067
50	0,0531	0,09	0,0733	0,0694	0,0744	0,072
47	0,0725	0,1669	0,0534	0,0528	0,0463	0,0784
55	0,0697	0,0566	0,0557	0,0626	0,0769	0,0643
178	0,0316	0,0341	0,0462	0,041	0,046	0,0398
121	0,0786	0,1483	0,1407	0,2751	0,0867	0,1459
156	0,0713	0,2432	0,368	0,392	0,2459	0,2641

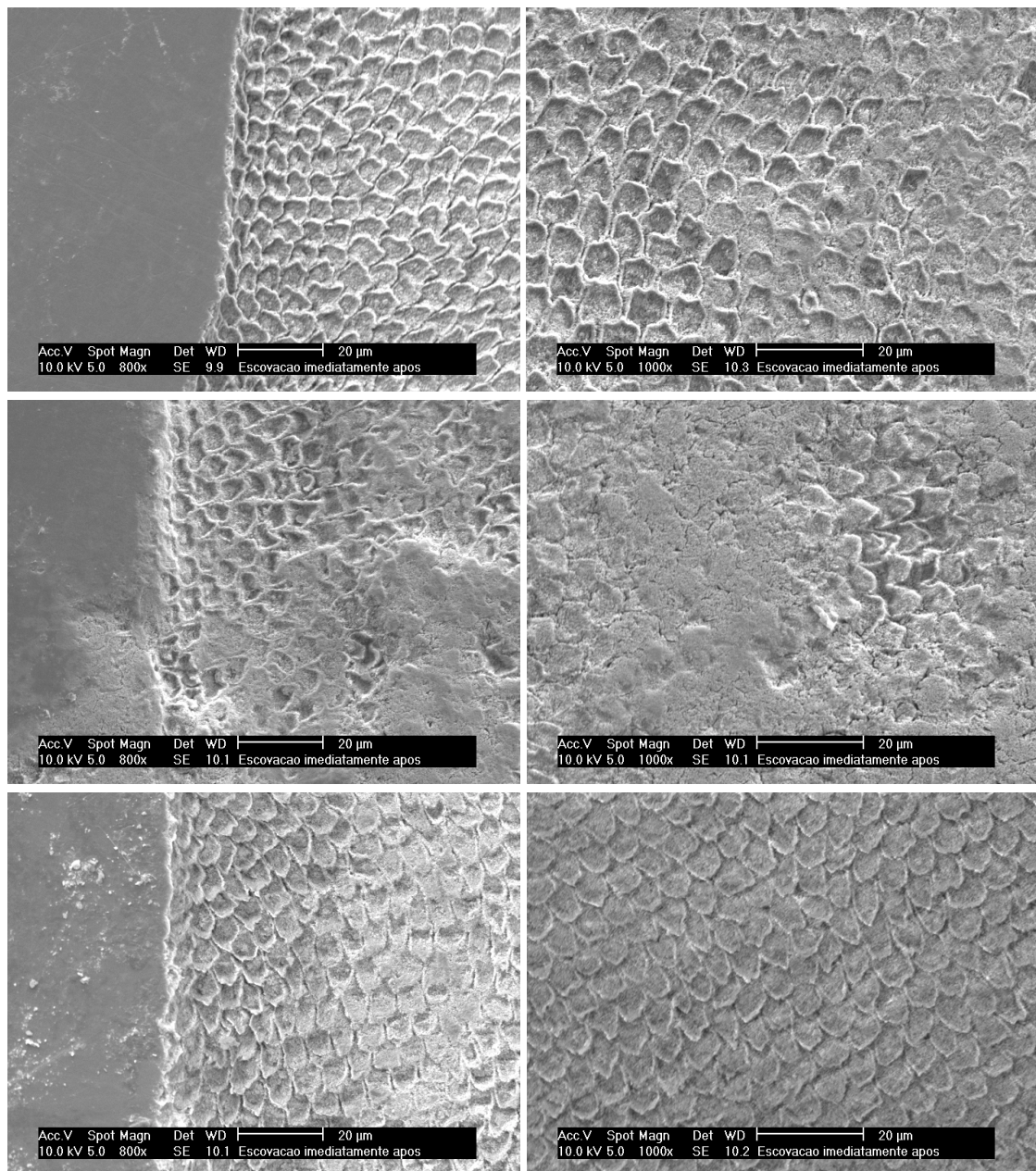
Média:  $0,1 \pm 0,06\mu\text{m}$

**APÊNDICE L – Fotomicrografias do estudo *in situ/ex vivo*.****Grupo controle CaCO<sub>3</sub>**

Fotomicrografias representativas do grupo controle CaCO<sub>3</sub>.



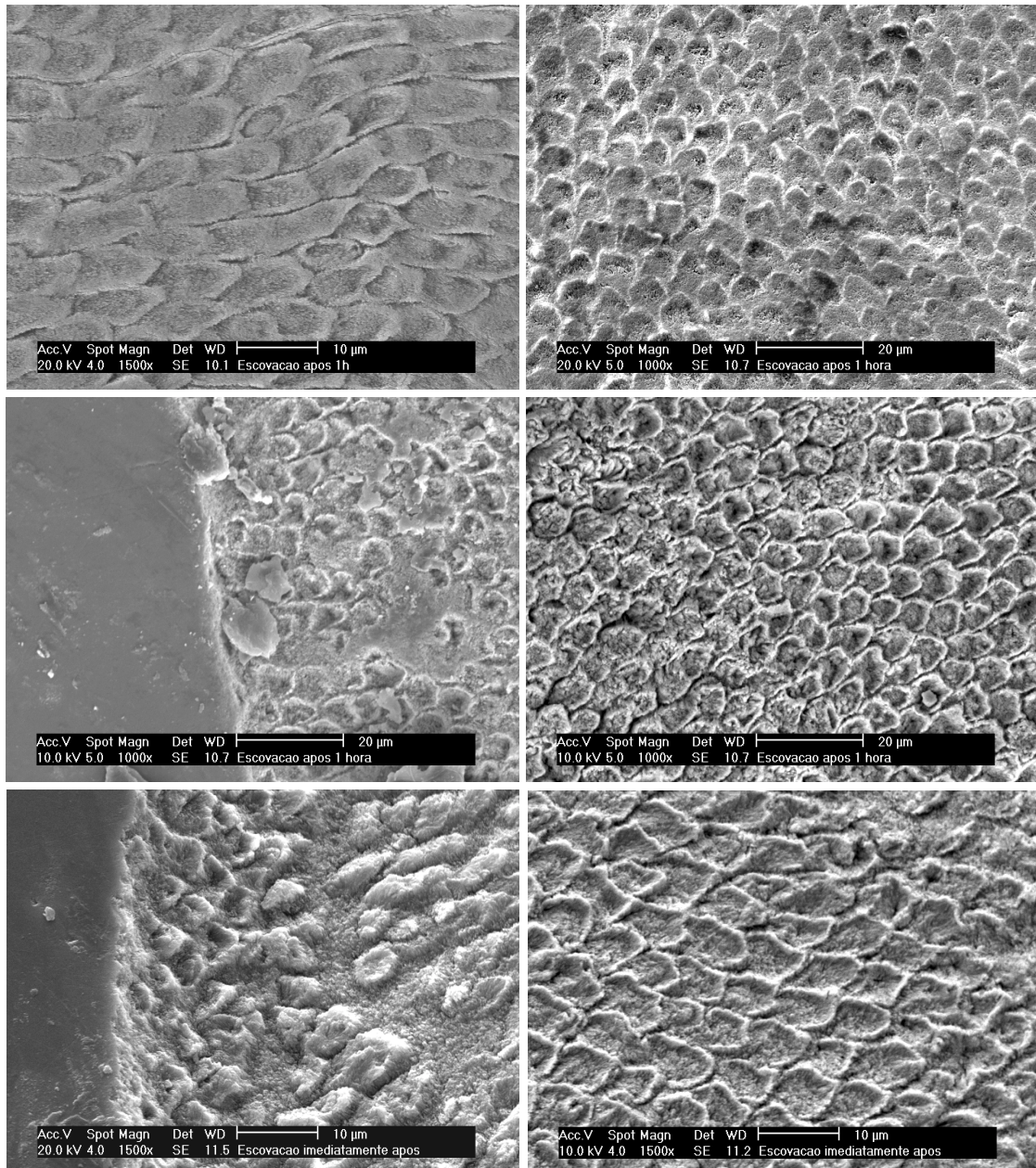
## Grupo CaCO<sub>3</sub> imediatamente após



Fotomicrografias representativas do grupo CaCO<sub>3</sub> imediatamente após.

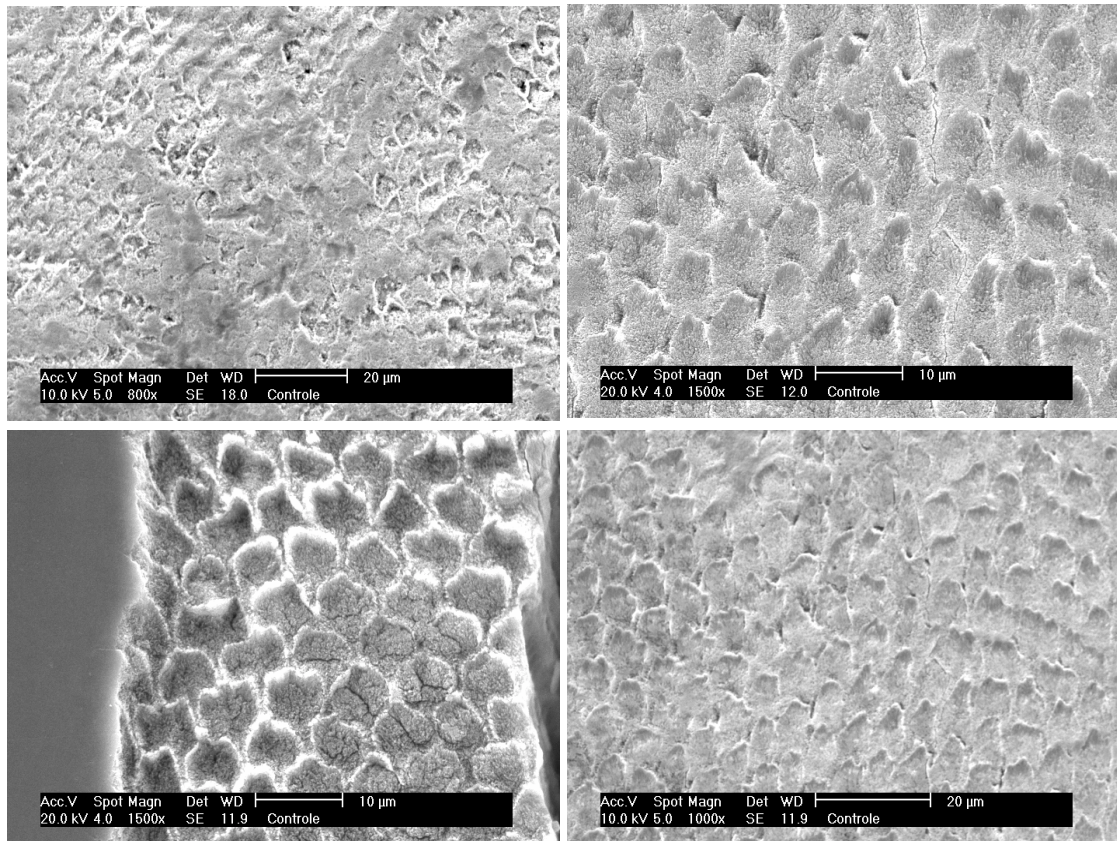


## Grupo $\text{CaCO}_3$ após 1h



Fotomicrografias representativas do grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h.

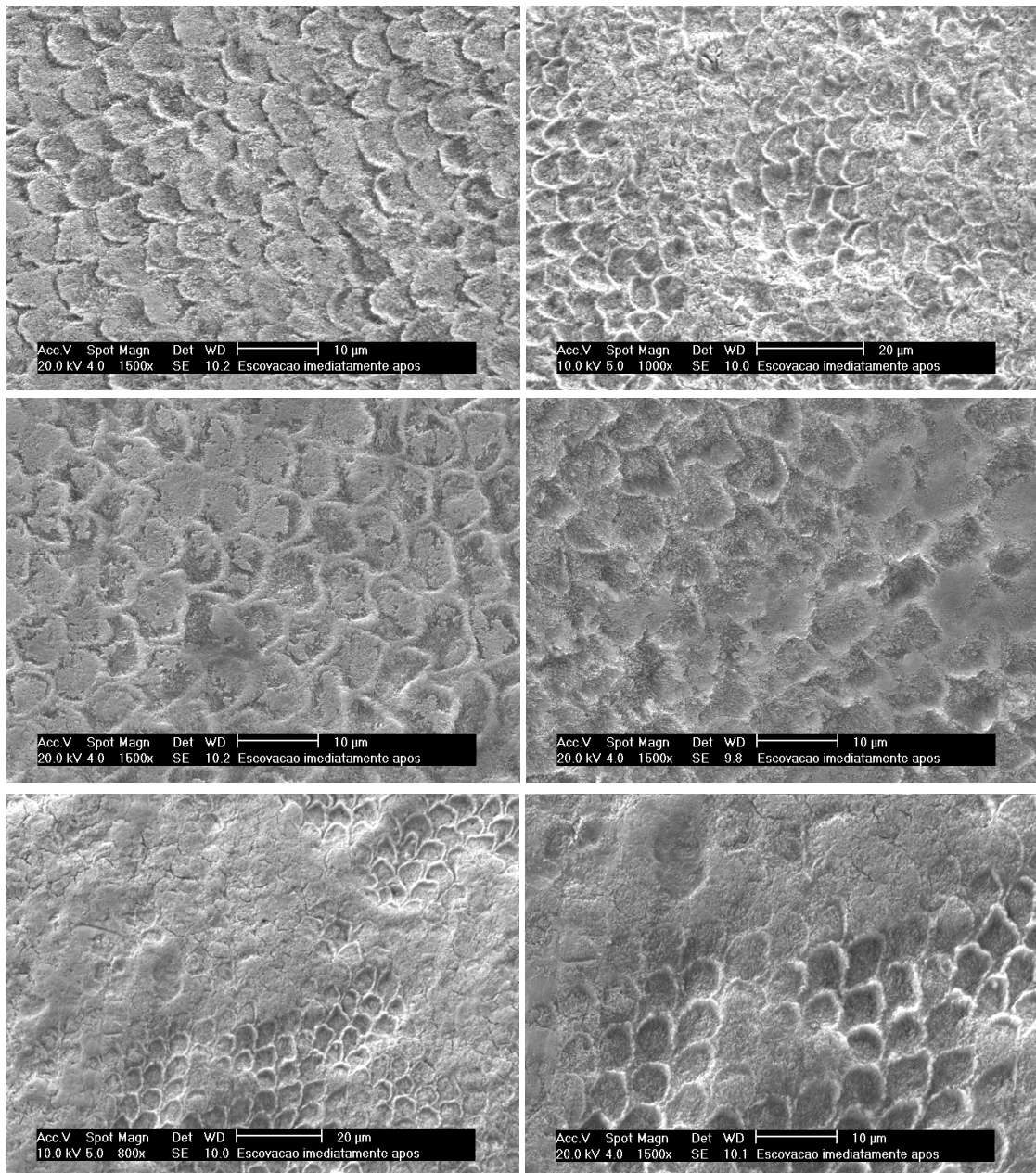
## Grupo controle SiO<sub>2</sub>



Fotomicrografias representativas do grupo controle SiO<sub>2</sub>.



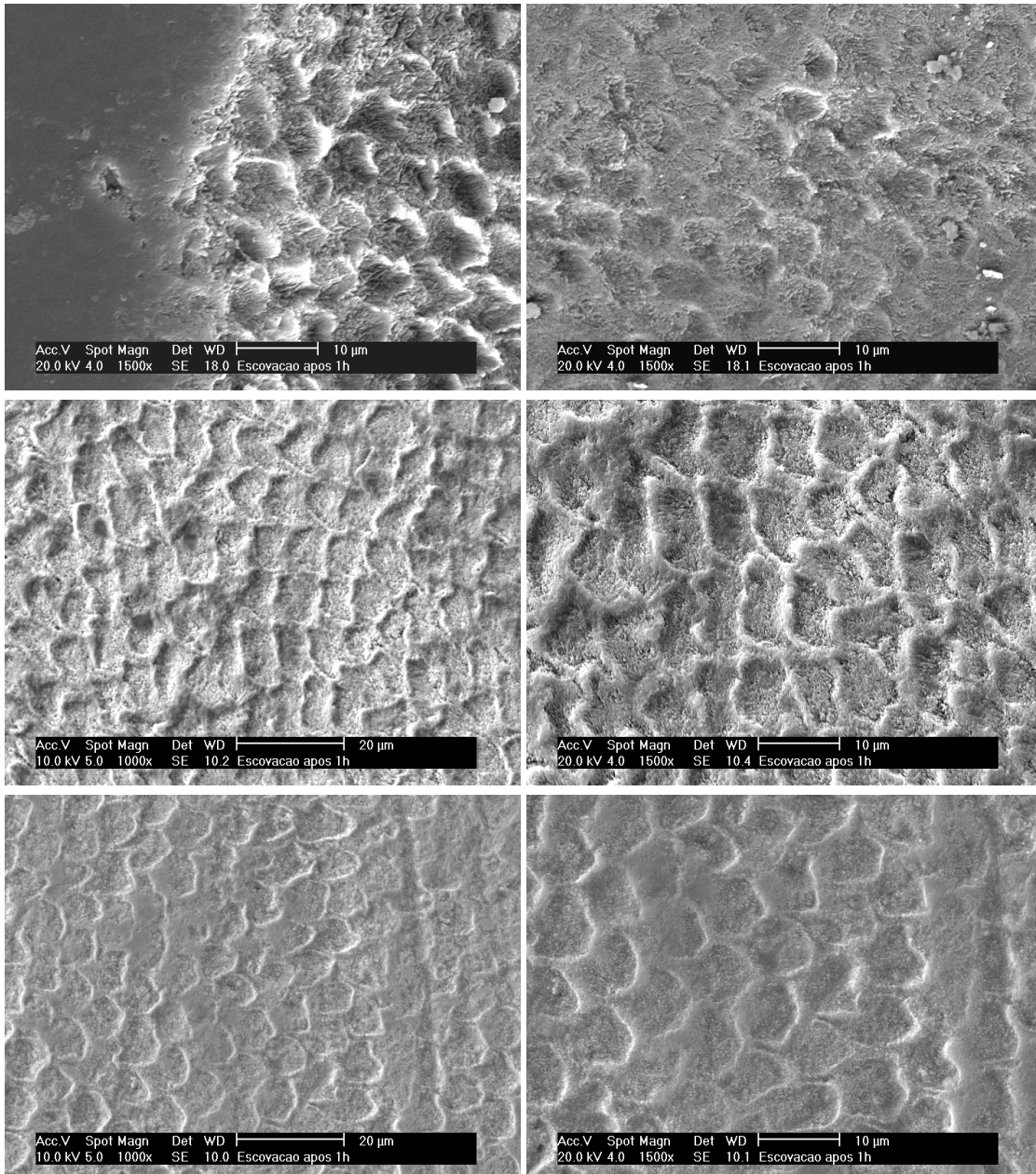
## Grupo SiO<sub>2</sub> imediatamente após



Fotomicrografias representativas do grupo SiO<sub>2</sub> imediatamente após.



## Grupo SiO<sub>2</sub> após 1h



Fotomicrografias representativas do grupo SiO<sub>2</sub> após 1h.

**APÊNDICE M – Gráficos do tipo *box-plot* representativos da mediana de microdureza e rugosidade dos blocos de esmalte utilizados no estudo *in situ/ex vivo*.**

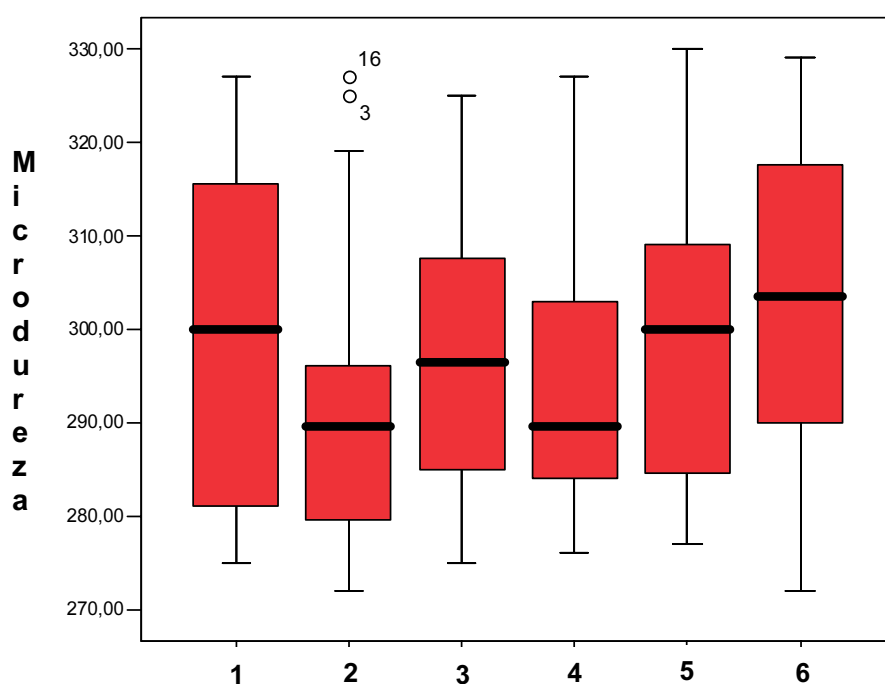


Gráfico 1 - *Box-plot* representativo da microdureza inicial (mediana) dos grupos.

- 1 – Controle  $\text{CaCO}_3$
- 2 –  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após
- 3 –  $\text{CaCO}_3$  após 1h
- 4 – Controle  $\text{SiO}_2$
- 5 –  $\text{SiO}_2$  imediatamente após
- 6 –  $\text{SiO}_2$  após 1h

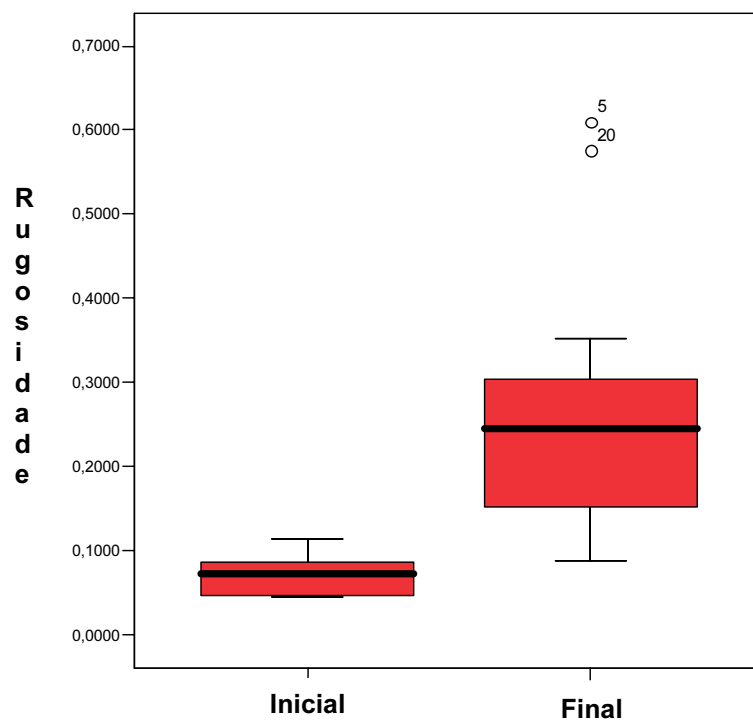


Gráfico 2 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo controle  $\text{CaCO}_3$ . Mediana.

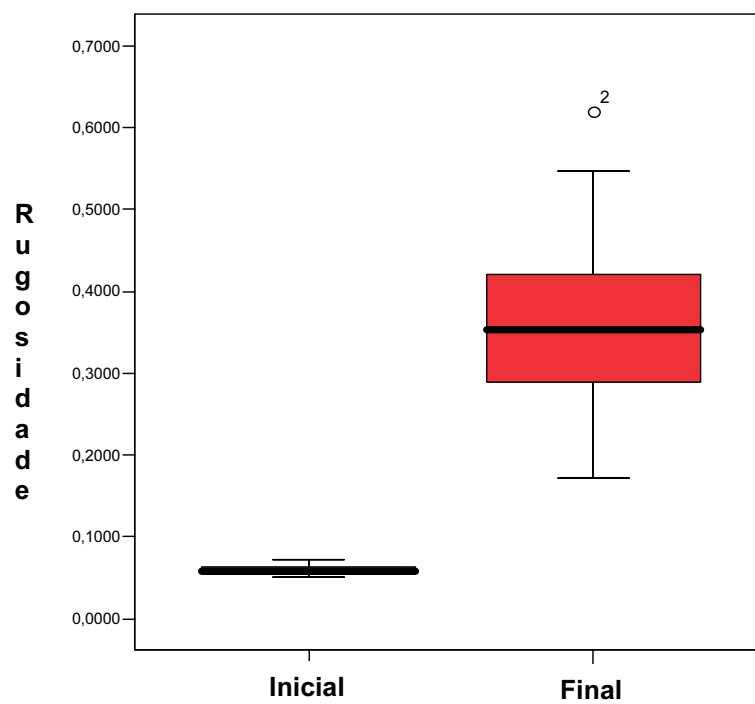


Gráfico 3 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após. Mediana.

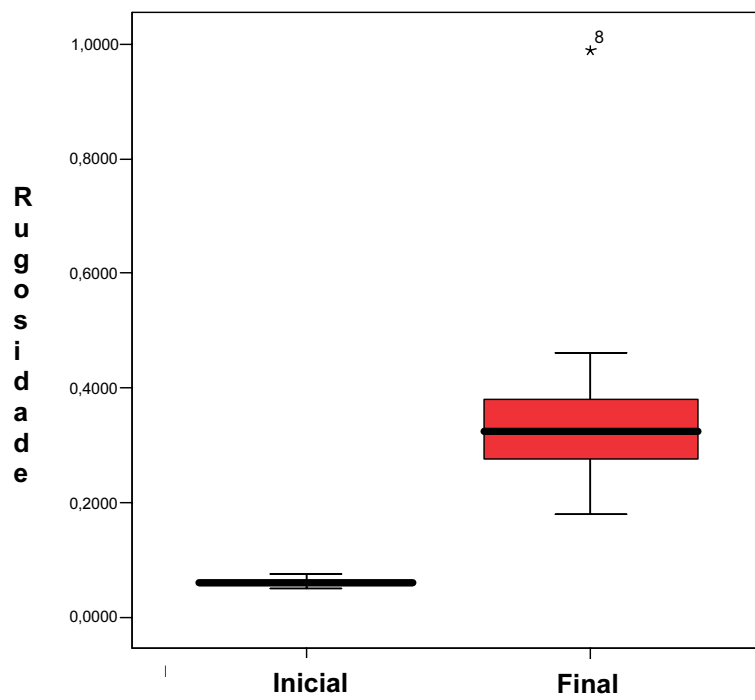


Gráfico 4 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h. Mediana.

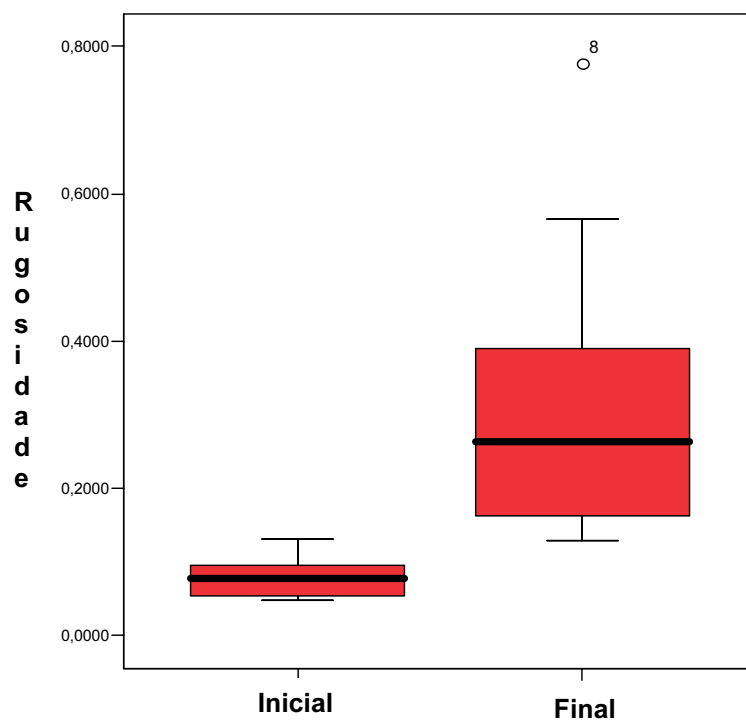


Gráfico 5 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo controle  $\text{SiO}_2$ . Mediana.

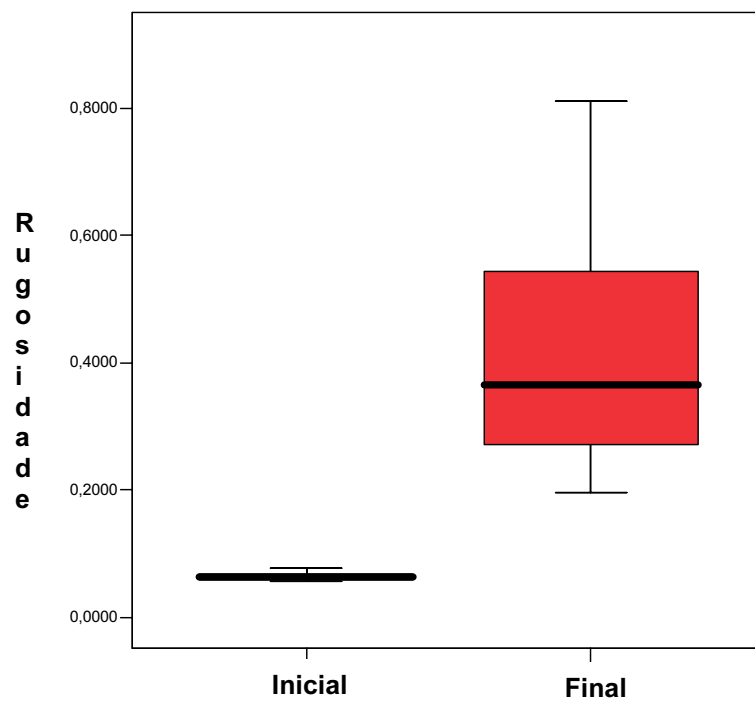


Gráfico 6 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após. Mediana.



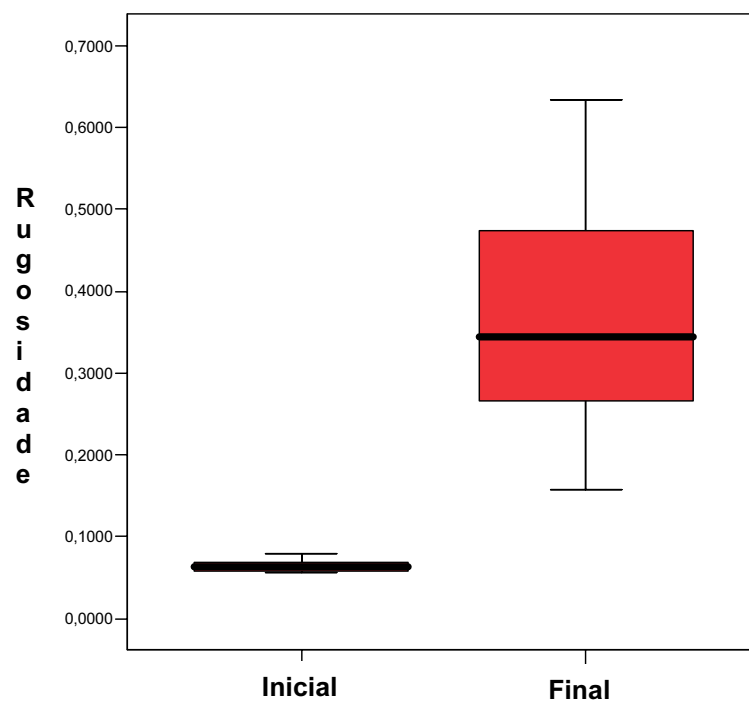


Gráfico 7 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h. Mediana.

**APÊNDICE N – Gráficos do tipo *box-plot* representativos da mediana de microdureza e rugosidade dos blocos de esmalte utilizados no estudo *in vitro*.**

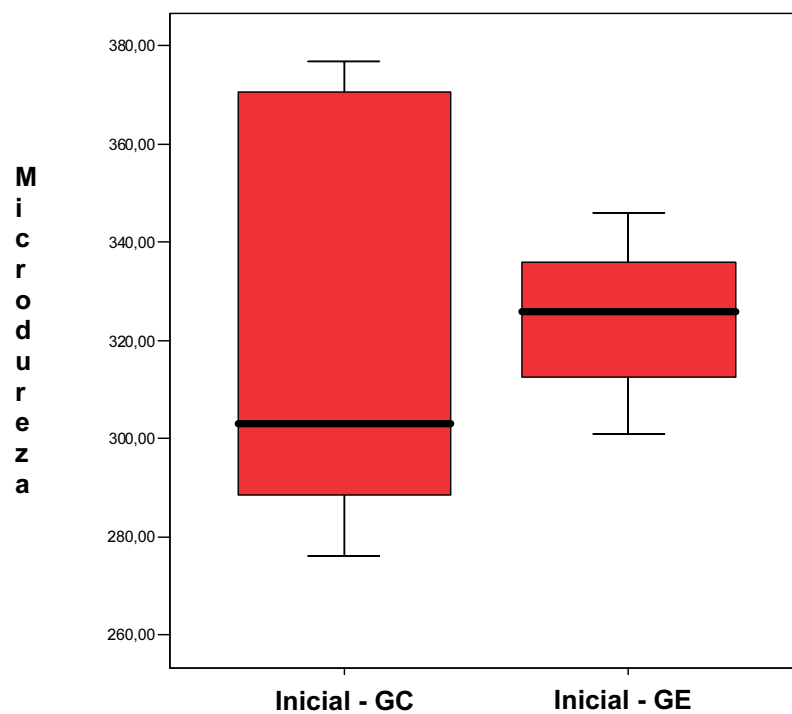


Gráfico 1 - *Box-plot* representativo da microdureza inicial (mediana) dos grupos controle (GC) e experimental (GE).

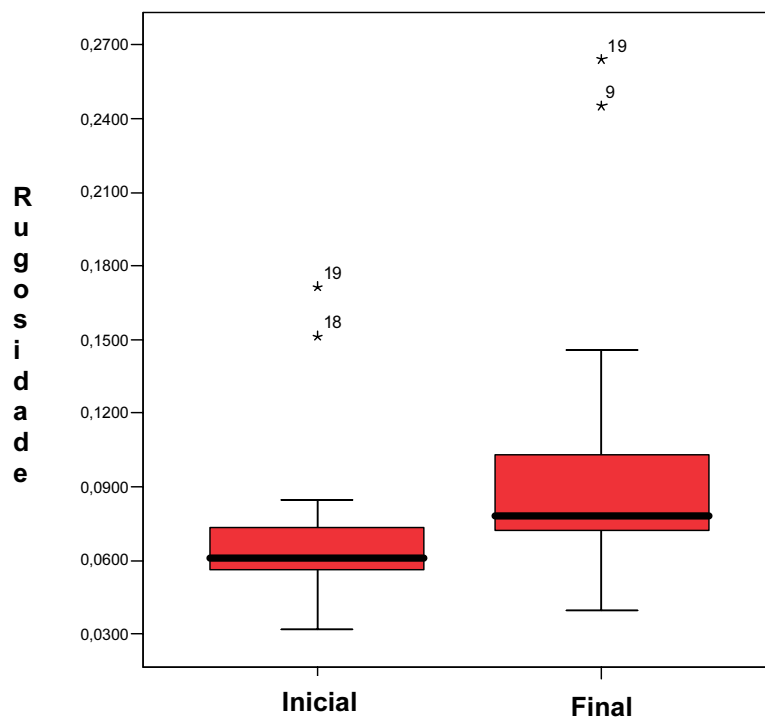


Gráfico 2 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do GC. Mediana.

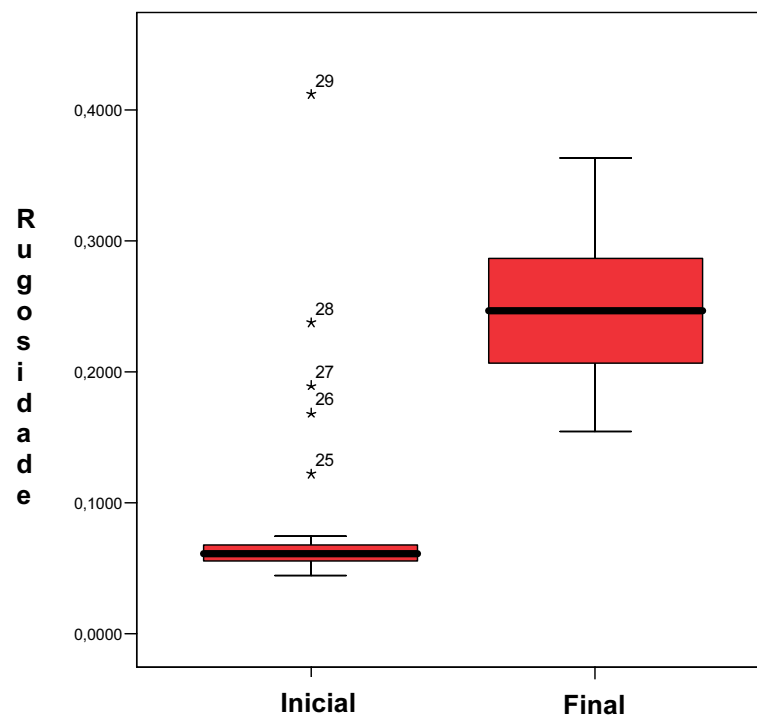


Gráfico 3 - *Box-plot* representativo da rugosidade ( $R_a$ ) inicial e final do GE. Mediana.

## APÊNDICE O – Estatística descritiva do estudo *in situ/ex vivo*.

Tabela 1 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) inicial e final dos grupos.

	Estatística descritiva						Valor de p*
	Mediana		Mínimo		Máximo		
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
<b>Grupos CaCO<sub>3</sub></b>							
Controle CaCO <sub>3</sub>	0,07	0,25	0,04	0,09	0,11	0,61	<0,001
CaCO <sub>3</sub> imediatamente após	0,06	0,35	0,05	0,17	0,07	0,62	<0,001
CaCO <sub>3</sub> após 1h	0,06	0,32	0,05	0,18	0,07	0,99	<0,001
<b>Grupos SiO<sub>2</sub></b>							
Controle SiO <sub>2</sub>	0,08	0,26	0,05	0,13	0,13	0,78	<0,001
SiO <sub>2</sub> imediatamente após	0,06	0,36	0,06	0,20	0,08	0,81	<0,001
SiO <sub>2</sub> após 1h	0,06	0,34	0,06	0,16	0,08	0,63	<0,001

Nota: Grupos CaCO<sub>3</sub>: Controle CaCO<sub>3</sub> (erosão); CaCO<sub>3</sub> imediatamente após (erosão/abrasão); CaCO<sub>3</sub> após 1h

(erosão/abrasão) – 24 blocos de esmalte/grupo

Grupos SiO<sub>2</sub>: Controle SiO<sub>2</sub> (erosão); SiO<sub>2</sub> imediatamente após (erosão/abrasão); SiO<sub>2</sub> após 1h

(erosão/abrasão) – 24 blocos de esmalte/grupo

\*Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

Tabela 2 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após e controle  $\text{CaCO}_3$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,35	0,17	0,62	0,001
Controle $\text{CaCO}_3$	0,25	0,09	0,61	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 3 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após e  $\text{CaCO}_3$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,35	0,17	0,62	0,439
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,32	0,18	0,99	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 4 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  após 1h e controle  $\text{CaCO}_3$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,32	0,18	0,99	0,003
Controle $\text{CaCO}_3$	0,25	0,09	0,61	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

\* Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas



Tabela 5 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{SiO}_2$  imediatamente após e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,36	0,20	0,81	0,025
Controle $\text{SiO}_2$	0,26	0,13	0,78	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 6 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{SiO}_2$  imediatamente após e  $\text{SiO}_2$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,36	0,20	0,81	0,523
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,34	0,16	0,63	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte

Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 7 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{SiO}_2$  após 1h e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,34	0,16	0,63	0,073
Controle $\text{SiO}_2$	0,26	0,13	0,78	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 8 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  imediatamente após.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,35	0,17	0,62	0,578
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,36	0,20	0,81	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte

Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 9 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,32	0,18	0,99	0,433
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,34	0,16	0,63	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 10 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
Controle $\text{CaCO}_3$	0,25	0,09	0,61	0,312
Controle $\text{SiO}_2$	0,26	0,13	0,78	

Nota: Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 11 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final menos inicial ( alteração da rugosidade) entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após e controle  $\text{CaCO}_3$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,30	0,10	0,56	<0,001
Controle $\text{CaCO}_3$	0,16	0,02	0,56	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 12 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após e  $\text{CaCO}_3$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,30	0,10	0,56	0,386
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,27	0,13	0,93	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas



Tabela 13 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  após 1h e controle  $\text{CaCO}_3$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,27	0,13	0,93	0,001
Controle $\text{CaCO}_3$	0,16	0,02	0,56	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 14 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{SiO}_2$  imediatamente após e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,31	0,14	0,75	0,014
Controle $\text{SiO}_2$	0,18	0,01	0,73	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 15 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{SiO}_2$  imediatamente após e  $\text{SiO}_2$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,31	0,14	0,75	0,496
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,28	0,09	0,56	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte  
 Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 16 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{SiO}_2$  após 1h e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,28	0,09	0,56	0,039
Controle $\text{SiO}_2$	0,18	0,01	0,73	

Nota: Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 17 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  imediatamente após.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ imediatamente após	0,30	0,10	0,56	0,665
$\text{SiO}_2$ imediatamente após	0,31	0,14	0,75	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte

Grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 18 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  após 1h.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
$\text{CaCO}_3$ após 1h	0,27	0,13	0,93	0,592
$\text{SiO}_2$ após 1h	0,28	0,09	0,56	

Nota: Grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 24 blocos de esmalte

Grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 19 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre os grupos controle  $\text{CaCO}_3$  e controle  $\text{SiO}_2$ .

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
Controle $\text{CaCO}_3$	0,16	0,02	0,56	0,398
Controle $\text{SiO}_2$	0,18	0,01	0,73	

Nota: Grupo Controle  $\text{CaCO}_3$  – 24 blocos de esmalte

Grupo Controle  $\text{SiO}_2$  – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 20 – Análise descritiva do estudo *in situ/ex vivo*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos de tratamento.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
CaCO <sub>3</sub> imediatamente após	0,35	0,17	0,62	0,687
CaCO <sub>3</sub> após 1h	0,32	0,18	0,99	
SiO <sub>2</sub> imediatamente após	0,36	0,20	0,81	
SiO <sub>2</sub> após 1h	0,34	0,16	0,63	

Nota: Grupos: CaCO<sub>3</sub> imediatamente após – 24 blocos de esmalte

CaCO<sub>3</sub> após 1h – 24 blocos de esmalte

SiO<sub>2</sub> imediatamente após – 24 blocos de esmalte

SiO<sub>2</sub> após 1h – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Kruskal-Wallis para amostras não pareadas



## APÊNDICE P – Estatística descritiva do estudo *in vitro*.

Tabela 1 – Análise descritiva do estudo *in vitro*. Rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) inicial e final dos grupos.

	Estatística descritiva						Valor de $p^*$
	Mediana		Mínimo		Máximo		
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
<b>GE</b>	0,06	0,25	0,05	0,15	0,41	0,36	<0,001
<b>GC</b>	0,06	0,08	0,03	0,04	0,17	0,26	0,003

Nota: Grupo experimental (GE) – 29 blocos de esmalte

Grupo controle (GC) – 19 blocos de esmalte

\*Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

Tabela 2 – Análise descritiva do estudo *in vitro*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre os grupos.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,25	0,15	0,36	<0,001
<b>GC</b>	0,08	0,04	0,26	

Nota: GE – 29 blocos de esmalte

GC – 19 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 3 – Análise descritiva do estudo *in vitro*. Comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final menos inicial (alteração da rugosidade) entre os grupos.

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,16	0,05	0,29	<0,001
<b>GC</b>	0,02	0,001	0,18	

Nota: GE – 29 blocos de esmalte

GC – 19 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

## APÊNDICE Q – Estatística descritiva comparando estudo *in vitro* e *in situ/ex vivo*.

Tabela 1 – Análise descritiva e comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre GE (*in vitro*) e controle  $\text{CaCO}_3$  (*in situ/ex vivo*).

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,25	0,15	0,36	0,655
<b>Grupo controle <math>\text{CaCO}_3</math></b>	0,25	0,09	0,61	

Nota: Grupo experimental (GE – *in vitro*) – 29 blocos de esmalte  
Grupo controle  $\text{CaCO}_3$  (*in situ/ex vivo*) – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 2 – Análise descritiva e comparação da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final entre GE (*in vitro*) e controle  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*).

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,25	0,15	0,36	0,567
<b>Grupo controle <math>\text{SiO}_2</math></b>	0,26	0,13	0,78	

Nota: Grupo experimental (GE – *in vitro*) – 29 blocos de esmalte  
 Grupo controle  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*) – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 3 – Análise descritiva e comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre GE (*in vitro*) e controle  $\text{CaCO}_3$  (*in situ/ex vivo*).

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,16	0,05	0,29	0,748
<b>Grupo controle <math>\text{CaCO}_3</math></b>	0,16	0,02	0,56	

Nota: Grupo experimental (GE – *in vitro*) – 29 blocos de esmalte  
 Grupo controle  $\text{CaCO}_3$  (*in situ/ex vivo*) – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 4 – Análise descritiva e comparação da alteração da rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) entre GE (*in vitro*) e controle  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*).

	Estatística descritiva			Valor de $p^*$
	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>GE</b>	0,16	0,05	0,29	0,538
<b>Grupo controle <math>\text{SiO}_2</math></b>	0,18	0,01	0,73	

Nota: Grupo experimental (GE – *in vitro*) – 29 blocos de esmalte  
 Grupo controle  $\text{SiO}_2$  (*in situ/ex vivo*) – 24 blocos de esmalte

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

## APÊNDICE R – Estatística descritiva relativa ao fluxo salivar estimulado.

Tabela 1 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo controle  $\text{CaCO}_3$ , entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,21	0,05	0,18	0,25	0,542
Fluxo normal	0,26	0,11	0,11	0,45	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2  
Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10  
Nº de blocos, por voluntário, para o grupo controle  $\text{CaCO}_3$  – 2 blocos

\*Teste t de student para amostras independentes



Tabela 2 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após, entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,28	0,10	0,22	0,36	0,275
Fluxo normal	0,37	0,09	0,25	0,52	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2

Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10

Nº de blocos, por voluntário, para o grupo  $\text{CaCO}_3$  imediatamente após – 2 blocos

\*Teste t de student para amostras independentes

Tabela 3 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h, entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,45	0,29	0,24	0,65	1
Fluxo normal	0,33	0,05	0,24	0,40	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2  
 Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10  
 Nº de blocos, por voluntário, para o grupo  $\text{CaCO}_3$  após 1h – 2 blocos

\*Teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas

Tabela 4 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo controle  $\text{SiO}_2$ , entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,34	0,20	0,20	0,48	0,613
Fluxo normal	0,30	0,10	0,16	0,50	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2  
 Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10  
 Nº de blocos, por voluntário, para o grupo controle  $\text{SiO}_2$  – 2 blocos

\*Teste t de student para amostras independentes

Tabela 5 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após, entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,40	0,13	0,31	0,49	0,899
Fluxo normal	0,42	0,19	0,22	0,81	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2

Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10

Nº de blocos, por voluntário, para o grupo  $\text{SiO}_2$  imediatamente após – 2 blocos

\*Teste t de student para amostras independentes

Tabela 6 – Análise descritiva e comparação dos dados de rugosidade ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) final do grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h, entre voluntários com fluxo salivar estimulado baixo e voluntários com fluxo salivar estimulado normal.

	Estatística descritiva				Valor de $p^*$
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Fluxo baixo	0,32	0,12	0,23	0,40	0,529
Fluxo normal	0,37	0,12	0,19	0,56	

Nota: Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado baixo (< 1ml/min) – 2  
 Nº de voluntários com fluxo salivar estimulado normal (> 1ml/min) – 10  
 Nº de blocos, por voluntário, para o grupo  $\text{SiO}_2$  após 1h – 2 blocos

\*Teste t de student para amostras independentes

**APÊNDICE S – Diagramas de dispersão representativos da correlação de rugosidade final entre GE (*in vitro*) e grupos controle CaCO<sub>3</sub> e controle SiO<sub>2</sub> (*in situ/ex vivo*).**

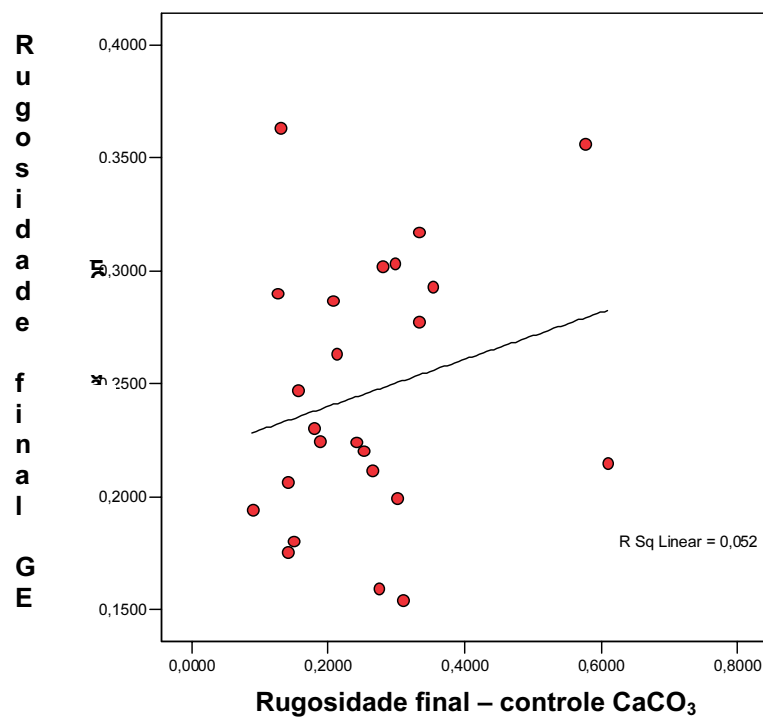


Gráfico 1 - Diagrama de dispersão representativo da correlação de rugosidade final entre GE (*in vitro*) e grupo controle CaCO<sub>3</sub> (*in situ/ex vivo*).

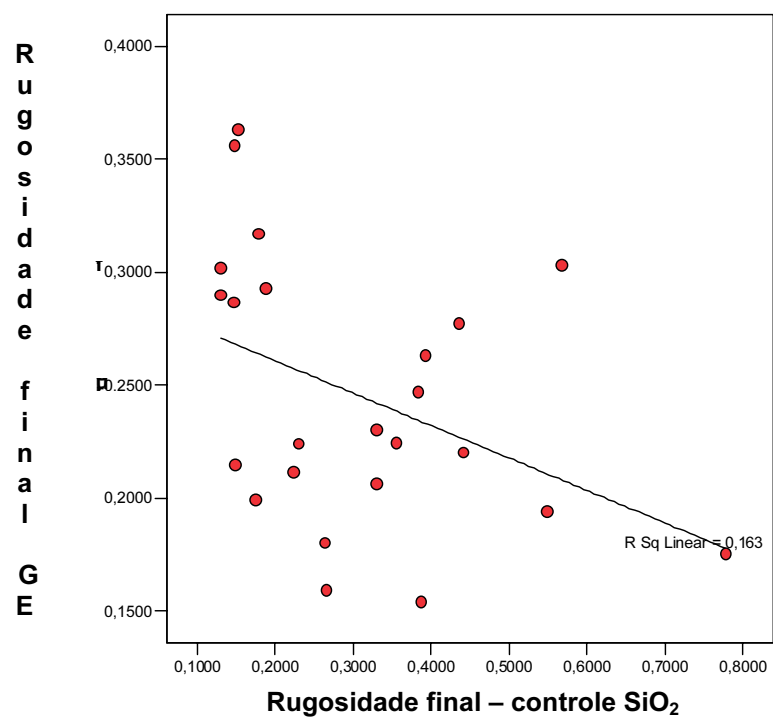


Gráfico 2 - Diagrama de dispersão representativo da correlação de rugosidade final entre GE (*in vitro*) e controle SiO<sub>2</sub> (*in situ/ex vivo*).

## **ANEXO**



## ANEXO A – Parecer do CEP SH.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS -CEPSH  
PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº195/05

No seu conjunto, o projeto cumpre com as determinações protocolares. Porém, na ilustração do delineamento experimental, consta o nome e o logo da "Coca-Cola" como identificação de elemento corrosivo que será utilizado para os testes. Muito embora o restante do projeto mencione apenas refrigerante tipo cola, entendo que a identificação explícita da marca "Cola-Cola", na página ilustrativa, é incompatível com a ética da pesquisa. Recomendo que esse elemento seja alterado.

O currículo dos pesquisadores demonstra que têm formação e produção na área da odontologia; apresentam, portanto, qualificação para executarem essa pesquisa.

Embora os pesquisadores tenham apresentado todos os documentos necessários exigidos pelo CEP SH, meu parecer indica pendência motivada pela presença do logo da "Cola-Cola" no projeto.

**V – Parecer CEP:**

- aprovado
- aprovado ad- referendum
- reprovado
- com pendência (detalhes pendência)\*
- retirado
- aprovado e encaminhado ao CONEP

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 27 de junho de 2005.


**V – Parecer Final CEP:**

- aprovado
- aprovado ad- referendum
- reprovado
- com pendência (detalhes pendência)\*
- retirado
- aprovado e encaminhado ao CONEP

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 08 de agosto de 2005.

*Sera Lúcia Basso*

## ANEXO B – Laudo da esterilização com óxido de etileno.



**LAUDO MICROBIOLÓGICO**

LOTE esterilizado:	6570	Máq.:	3	Carga:	1
Início da esterilização:	27.04	Hora:	15:00		
Fim da esterilização:	27.04	Hora:	20:00		
Início de teste:	27.04	Hora:	20:05		
Fim de teste:	29.04	Hora:	20:05		

**1-OBJETIVO:**  
Avaliar a eficiência do processo de esterilização a ETO através de bio-indicadores.

**2-MATERIAL ANALIZADO:**  
Foi(ram) analisado(s) :  
Indicador(es) biológico(s), com ampola contendo no seu interior um disco de papel filtro impregnado com ESPOROS DE BACILUS SUBTILIS.  
O meio de cultura contém um indicador de pH chamado vermelho fenol.

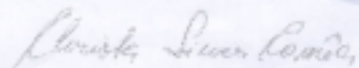
**3-PROCEDIMENTOS ADOTADOS:**  
3.1-Na esterilização  
Foi (ram) colocado(s):  
2 IB na auto clave conforme posição descrita no controle de carga de esterilização ( RQ-3017 ). O período de exposição foi de 3,5 horas, com aeração de 1,5 horas.  
3.2-O indicador foi incubado a 37°C durante 48,0 horas.

**4-RESULTADO:**  
Observou-se que no indicador biológico não houve mudança de cor ; logo, não houve crescimento de microorganismos.  
OBS: Foram utilizados também:  
4 Integradores Químicos distribuídos na carga, os quais comprovaram a existência de parâmetros normais durante o processo, em várias partes da câmara.

**5-COMENTÁRIOS TÉCNICOS:**  
A ausência de crescimento de microorganismos no indicador biológico é característica de eficiência do processo de esterilização nos pontos analisados.

**6-RESPONSÁVEL TÉCNICO:**  
Ronaldo Torma Bernardo - CRQ-05201249

Porto Alegre, 29 de abril 2008

  
 P/Christa Steves Correa  
 Mic Serviços de Esterilizações Ltda  
 Supervisora

Av. Saturnino de Brito, 847  
 Porto Alegre RS

Tel./Fax: (51) 3334.3300  
 CEP 91320-000

http://www.micsteriliza.com.br  
 E-mail: mic@micsteriliza.com.br

## **ANEXO C – Normas da Caries Research.**

Guidelines for Authors  
[www.karger.com/cre\\_guidelines](http://www.karger.com/cre_guidelines)

### Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal.

---

### Submission

Manuscripts written in English should be submitted at Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

Dr. R.P. Shellis  
[r.p.shellis@bris.ac.uk](mailto:r.p.shellis@bris.ac.uk)  
Tel. +44 (0)117 928 4328  
Fax +44 (0)117 928 4778

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

---

### Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of 'Caries Research' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications.

---

### Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

---

### Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages should be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous.

**Title page:** The first page of each manuscript should show, in order:

the title, which should be informative but concise; the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;  
a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;  
a list of 3-10 key words, for indexing purposes;  
the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

**Declaration of Interests:** Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares). The fact that a study is conducted on behalf of a commercial body using funds supplied to the investigators' institution by the sponsor does not in itself involve a conflict of interest. Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

**Abstract:** The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

**Introduction:** This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

**Materials and Methods (or Subjects and Methods):** All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489-93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

**Results:** Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

**Discussion:** This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

**Acknowledgements:** Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and also acknowledge the source of funding for the project. The position(s) of author(s) employed by commercial firms should be included.

**Legends:** The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

**Tables:** Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

### **Illustrations:**

Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.

Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.

Figures with a screen background should not be submitted.

When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

---

### Color Illustrations

Up to 6 colour illustrations per page can be included, at the special price of CHF 660.–/USD 545.00 per page. Colour illustrations are reproduced at the author's expense. Colour figures must have a final resolution of 300 dpi after scaling and must be in CMYK format (not RGB screen format).

---

### References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by

the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

#### Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at [www.doi.org](http://www.doi.org)

#### Examples

(a) Papers published in periodicals: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) Edited books: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) Patents: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) World Wide Web: Chaplin M: Water structure and behavior. [www.lsbu.ac.uk/water](http://www.lsbu.ac.uk/water), 2004.

---

#### Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.–/USD 540.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

---

#### Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs,



other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

---

### Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.

© 2006 S. Karger AG, Basel