

JACKELINE GALLO DO AMARAL

**Avaliação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto
associado ao glicerofosfato de cálcio na desmineralização do
esmalte dentário *in situ***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica – Área Saúde Bucal da Criança.

**Orientadora: Profa. Dra. Cleide Cristina
Rodrigues Martinhon**

**Coorientador: Prof. Dr. Alberto Carlos
Botazzo Delbem**

Araçatuba

2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

| | |
|-------|--|
| A485a | <p>Amaral, Jackeline Gallo do. Avaliação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto associado ao glicerofosfato de cálcio na desmineralização do esmalte dentário <i>in situ</i> / Jackeline Gallo do Amaral. - Araçatuba : [s.n.], 2011 68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientadora: Profa. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem</p> <p>1. Dentifrícios 2. Fluoretos 3. Glicerofosfatos 4. Desmineralização 5. Placa dentária</p> <p>Black D27 CDD 617.645</p> |
|-------|--|

DADOS CURRICULARES

JACKELINE GALLO DO AMARAL

| | |
|--------------------|--|
| Nascimento | 08.05.1987 – São José do Rio Preto – SP |
| Filiação | Luis Carlos Paulo do Amaral Aida Maria Gallo do Amaral |
| 2005/2008 | Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. |
| 2009/2010 | Curso de Pós Graduação em Ciência Odontológica – Área Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. |
| Associações | CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica |

DEDICATÓRIA

Dedico à realização deste trabalho,

Aos meus pais, *Luis Carlos e Aida*, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, sempre me incentivando a persistir na busca dos meus ideais. Agradeço por tudo que me ensinaram, pelo exemplo de determinação, simplicidade, honestidade, felicidade e amor. Por todos os momentos em que podemos estar juntos e pelas palavras de conforto que sempre trazem segurança e tranqüilidade. Não há palavras que expressem meu amor e admiração por vocês.

Ao meu irmão, *Rodolfo*, pelos incentivos durante a minha vida, dando forças nos momentos em que precisava. Por me fazer compreender como é bom ter uma família. Agradeço pelos momentos de alegria, pelo apoio e torcida.

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, *Profa. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon*, muito obrigada por toda dedicação, paciência e seriedade com que conduziu este estudo. Agradeço imensamente a confiança e o carinho depositados ao longo destes anos e o privilégio de sua amizade. Pela compreensão, todos os momentos de convivência e por ter contribuído para a minha formação. Minha eterna gratidão e admiração.

Ao meu coorientador, *Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem*, pela disponibilidade, paciência e atenção dada na realização deste trabalho, por todas as oportunidades oferecidas, minha eterna gratidão e admiração. Exemplo de dedicação, responsabilidade, humildade e determinação com a pesquisa.

*“Um bom professor educa seus alunos para uma profissão,
um professor fascinante os educa para a vida”.*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, por sua proteção e por guiar os meus passos rumo às minhas realizações. Devo a Ele todos os meus momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa dos professores Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Diretor, e Profa. Dra Ana Maria Pires Soubhia, Vice-Diretora, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado nesta instituição.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da UNESP-Araçatuba, Dr. Alberto, Dr. Robson, Dra. Rosângela, Dr. Célio e Dra. Sandra. Obrigada por todos os ensinamentos e valiosa contribuição na minha formação acadêmica. Vocês proporcionaram oportunidades muito importantes para minha vida profissional. Não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos.

Ao curso de pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia Araçatuba – UNESP, na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem. Só tenho que admirar pessoas como você pela competência e dedicação que tens para com o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Robson por seu exemplo de dedicação ao ensino da Odontopediatria. Obrigada pelos momentos valiosos de aprendizado durante as disciplinas teóricas e durante os atendimentos na Bebê Clínica. Pouco tempo ao seu lado é suficiente para grandes aprendizados. Tenho muita admiração pela forma como orienta seus alunos.

Aos funcionários da biblioteca e da seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelos serviços prestados sempre com muita competência.

Aos amigos que participaram como voluntários deste estudo, vocês foram essenciais para realização deste trabalho. Muito obrigada pela paciência e responsabilidade que vocês tiveram.

Às amigas da turma de mestrado em Odontopediatria, Danielle Camara, Daniele Picco, Marcelle, Maria Cristina e Michele, muito obrigada pela convivência sempre agradável, companheirismo e pela amizade durante esses anos. Desejo muito sucesso e realizações para cada uma de vocês!

Às amigas Fernanda e Janaína, pela amizade que construímos no decorrer do curso de graduação, e que durante esses anos continuaram presentes mesmo com a distância, transmitindo palavras de fortalecimento e coragem. É muito bom poder contar com pessoas como vocês sempre. Obrigada pelo carinho e amizade! Fico muito feliz em ver as conquistas de vocês a cada dia!

Aos meus amigos de graduação, Maria Luiza, Marielle, Beatriz e Alexandre, pessoas que mesmo com a distância continuam sempre meus amigos.

Mariéllen, pela amizade construída durante a pós-graduação. Muito obrigada pelos momentos de descontração, pelas conversas e risadas.

Aos amigos do curso de doutorado, Carolina, Adélisa, Marcello, Isabelle, Simone, Diurianne, Adriana, Tatyana e Paulo, pela convivência sempre alegre.

Eliana e Ana Carolina, pelos ensinamentos prestados no laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade e pelo excelente convívio durante este período.

À Profa. Dra. Kikue, pela ajuda, paciência e disponibilidade com que sempre me atendeu, principalmente durante as dosagens. Aprendi muito ao seu lado. Muito obrigada.

À funcionária da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pelo auxílio indispensável na parte laboratorial deste trabalho, além da amizade e convivência, sou muito grata por tudo.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação e do laboratório de Odontopediatria. Obrigada pela convivência e momentos divertidos que passamos juntos.

Ao frigorífico Friboi de Andradina, pela disponibilidade e ajuda durante a fase de obtenção dos dentes bovinos.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial aos professores do programa em Odontopediatria, pelo exemplo que são e pela convivência sempre agradável.

A CNPq, pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Mestrado.

A todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

... Meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação,
mas como uma oportunidade invejável
para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino
do espírito,
para seu próprio prazer pessoal e
para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Amaral JG. Avaliação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto associado ao glicerofosfato de cálcio na desmineralização do esmalte dentário *in situ* [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Resumo

O uso do fluoreto tem sido considerado um importante fator na redução da incidência da cárie dentária, porém tem-se verificado um aumento da fluorose dentária quando associado ao uso deste elemento. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de um dentifrício com concentração reduzida de fluoreto suplementado com glicerofosfato de cálcio (GPCa) em inibir o processo de desmineralização e sobre a placa dental formada *in situ*. Voluntários (n=10) participaram de 4 fases experimentais de 7 dias de duração cada, em cada fase utilizaram um dispositivo palatino contendo 4 blocos de esmalte dental bovino. O desafio cariogênico foi realizado por meio de solução de sacarose 30%, 6 vezes ao dia. Os dentifrícios utilizados neste estudo foram: placebo, 500 µg F/g, 500 µg F/g com 0,25% de GPCa e 1100 µg F/g. Decorrido o período experimental, a placa dental foi coletada, processada, a concentração iônica (fluoreto, cálcio e fosfato) e de polissacarídeos extracelulares (PEC) determinadas. Analisou-se a dureza de superfície inicial e final e em secção longitudinal. Determinou-se a concentração de fluoreto, cálcio e fosfato no esmalte. O uso de dentifrícios contendo 1100 µg F/g e 500 µg F/g com 0,25% de GPCa levou a concentrações semelhantes de fluoreto, cálcio e fosfato na placa, as quais foram maiores que as obtidas após o uso dos demais dentifrícios. A concentração de PEC e a perda mineral foram menores nos dentifrícios 1100 µg F/g e 500 µg F/g com 0,25% de GPCa, seguido pelo 500 µg F/g e placebo, o qual apresentou os menores valores. As concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato no esmalte foram menores no grupo placebo, sendo os maiores valores encontrados nos grupos 500 µg F/g com 0,25% de GPCa e 1100 µg F/g ($p < 0,05$). De acordo com os resultados o dentifrício com baixa concentração associado ao GPCa, apresentou resultado semelhante ao controle positivo com 1100 µg F/g na desmineralização *in situ*, podendo ser uma alternativa na melhora da relação risco-benefício entre fluorose e cárie dentária.

Palavras-chave: Dentifrícios. Fluoretos. Glicerofosfatos. Desmineralização. Placa dentária.

ABSTRACT

Amaral JG. Evaluation of dentifrices with low fluoride concentration associated with calcium glycerophosphate on demineralization of dental enamel *in situ* [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Abstract

The use of fluoride has been considered as an important factor for decrease in the incidence of dental caries, however dental fluorosis increase associated with the use of this element. This *in situ* study aims to evaluate the effect of low fluoride concentration dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate (CaGP) in inhibiting the demineralization process and on the dental plaque formed *in situ*. Ten volunteers wore palatal devices containing 4 blocks of bovine dental enamel over 3 periods of 7 days each. In each phase, treatment was accomplished with a nonfluoride dentifrice (placebo), a 500 µg F/g, a 500 µg F/g with 0.25% CaGP and a 1,100 µg F/g dentifrice, under cariogenic challenge with 30% sucrose solution 6 times a day. After that, the dental plaque was collected and processed, and the ionic (fluoride, calcium, and phosphate) and insoluble extracellular polysaccharide (EPS) concentrations were appraised. To evaluate mineral loss, we determined both the initial and final surface hardness and cross-sectional hardness (Δ KHN). The fluoride, calcium, and phosphate concentration in the enamel were determined. The use of dentifrices containing 1100 µg F/g and 500 µg F/g with 0.25% CaGP led to similar concentrations of fluoride, calcium and phosphate in dental plaque, but higher than those obtained after the use of the placebo and 500 µg F/g dentifrices. The concentration of EPS and mineral loss was lower in 500 µg F/g with 0.25% of CaGP e 1,100 µg F/g. The concentration of fluoride, calcium, and phosphate in enamel was higher in groups 500 µg F/g with 0.25% of CaGP e 1,100 µg F/g ($p < 0.05$). It was concluded that the low fluoride concentration dentifrice with 0.25% CaGP, showed similar efficacy to the positive control (1,100 µg F / g) in demineralization *in situ*, could be an alternative to improve the risk-benefit relationship between fluorosis and dental caries.

Keywords: Dentifrices. Fluorides. Glycerophosphates. Demineralization. Dental Plaque

Lista de Abreviaturas

%SH= Surface hardness (Porcentagem de alteração de dureza superficial)

°C= Graus Celsius

μ= Micro

μm= Micrometros

μg F/g= Microgramas de fluoreto por grama

μg/mm³ = Micrograma por milímetro cúbico

ΔKHN= Δ Knoop hardness number (Perda integrada de dureza de subsuperfície)

Ca= Cálcio

cm= Centímetro

dp= Desvio padrão

ep= Erro padrão

FOA= Faculdade de Odontologia de Araçatuba

F= Fluoreto

FT= Fluoreto total

FI= Fluoreto iônico

GPCa= Glicerofosfato de cálcio

g= Gravidade

h= horas

HCl= Ácido Clorídrico

H₂O= Água

KHN= Knoop hardness number

mL= Mililitros

mL/mm²= Mililitros por milímetro quadrado

mm= Milímetros

mm²= Milímetros quadrados

mol L⁻¹= Molaridade

MLP= Microscopia de luz polarizada

MFP= Monofluorofosfato de Sódio

NaF= Fluoreto de Sódio

NaOH= Hidróxido de sódio

P= Fosfato

pH= Potencial hidrogeniônico

PEC= Polissacarídeos extracelulares

s= segundos

SH_i= Initial Surface Hardness (Dureza de superfície inicial)

SH_f= Final Surface Hardness (Dureza de superfície após o tratamento)

TISAB= Total ionic strength adjustment (Tampão ajustador de força iônica)

Sumário

| | |
|------------------------|----|
| Introdução | 23 |
| Material e Método..... | 24 |
| Resultados | 30 |
| Discussão..... | 31 |
| Referências | 34 |
| Anexos | 45 |

Avaliação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto associado ao glicerofosfato de cálcio na desmineralização do esmalte dentário *in situ.**

Amaral JG, Delbem ACB, Sasaki KT, Martinhon CCR.

Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

Título curto: Dentifrício suplementado com glicerofosfato de cálcio.

Palavras chave: Dentifrícios. Fluoretados. Glicerofosfatos. Desmineralização. Placa dentária.

Correspondência:

Cleide Cristina Rodrigues Martinhon

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua : José Bonifácio 1193

Araçatuba – SP - Brasil

CEP: 16015-050

Tel: (55) (18) 3636 3235

Fax : (55) (18) 3636 3332

Email: cleidecristina@foa.unesp.br ou pityccrm@gmail.com

* De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research, exceto idioma (Anexo A).

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto suplementado com glicerofosfato de cálcio (GPCa) em inibir o processo de desmineralização e sobre a placa dental formada *in situ*. Voluntários (n=10) participaram de 4 fases experimentais, de 7 dias de duração cada. Em cada fase, utilizaram um dispositivo palatino contendo 4 blocos de esmalte dental bovino. O desafio cariogênico foi feito por aplicação da solução de sacarose 30% sobre os blocos de esmalte, 6 vezes ao dia. Os dentifrícios utilizados neste estudo foram: placebo, 500 µg F/g, 500 µg F/g com 0,25% GPCa e 1100 µg F/g. Decorrido o período experimental, a placa dental foi coletada, processada, a concentração iônica (fluoreto, cálcio e fosfato) e de polissacarídeos extracelulares (PEC) determinadas. Analisou-se a dureza de superfície inicial e final e em secção longitudinal. Determinou-se a concentração de fluoreto, cálcio e fosfato no esmalte. Observou-se que após o tratamento, os dentifrícios 1100 µg F/g e 500 µg F/g com 0,25% de GPCa apresentaram concentrações semelhantes de fluoreto, cálcio e fosfato na placa dental. A concentração de PEC e perda mineral foram maiores no grupo placebo e menores nos demais dentifrícios. As concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato no esmalte foram menores no grupo placebo, sendo os maiores valores encontrados nos grupos 500 µg F/g com 0,25% de GPCa e 1100 µg F/g ($p < 0,05$). De acordo com os resultados, o dentifrício com baixa concentração associado ao GPCa, apresentou resultado semelhante ao controle positivo com 1100 µg F/g na desmineralização *in situ*.

Introdução

O fluoreto (F) tem sido um grande aliado no controle da cárie dentária. Este fato nas últimas décadas se deve principalmente a fluoretação da água de abastecimento público e aos dentifrícios [Browne et al., 2005]. Porém, a utilização deste agente necessita cada vez mais atenção, pois a expansão de seu uso provocou um aumento da fluorose dentária [Narvai, 2000; Mascarenhas, 2000; Tavener et al., 2006]. Crianças menores de seis anos podem ingerir em média 57% (variando de 17 a 98%) de dentifrício colocado na escova, na faixa etária de 20 a 30 meses considerada a fase crítica para o desenvolvimento da fluorose dentária [Lima e Cury, 2001].

A redução da concentração de F nos dentifrícios é a alternativa proposta mais viável para reduzir a incidência de fluorose dentária, entretanto estudos mostram que dentifrícios com concentrações reduzidas de F são menos efetivos [Koch et al., 1982; Mitropoulos et al., 1984; Lima et al., 2008, Cury et al., 2010]. Assim, um dos recursos que poderia ser empregado para aumentar a eficácia do dentifrício é a suplementação com cálcio (Ca) e/ou fosfato (P), uma vez que o processo da remineralização, embora seja intensificado pelo F, depende primariamente da presença desses íons na saliva [Schemehorn et al., 1999 a,b]. Se uma concentração suplementar de íons Ca e P fossem acrescidos aos íons já presentes na saliva sem insolubilizar o F, a eficiência do F poderia ser aumentada. Estudos têm demonstrado as propriedades anti-cariogênicas do glicerofosfato de cálcio (GPCa). Diversos mecanismos de ação tem sido sugeridos para o GPCa, como interação direta com o esmalte, tamponamento do pH da placa e elevação dos níveis de Ca e P da placa, entretanto ainda é indefinido [Lynch, 2004]. Lynch e Ten Cate [2006] observaram uma diminuição na desmineralização do esmalte, sendo mais eficiente quando GPCa foi aplicado antes do desafio cariogênico. Outro estudo avaliou a adição de 0,13% de GPCa aos dentifrícios associados ao MFP (monofluorofosfato de sódio) contendo 1000 µg F/g, e mostraram um efeito anti-cariogênico [Mainwaring e Naylor, 1983]. Vogel et al. [2006] mostraram que o uso prévio de um enxaguatório com Ca e o dentifrício associado ao Ca (0,084g de GPCa/g do dentifrício) utilizado imediatamente antes de um enxaguatório com 228 µg F/g por 1 minuto, produziu um aumento de 4,6x ou 3,6x respectivamente da concentração de fluoreto salivar uma hora após o uso, comparado a utilização apenas do enxaguatório fluoretado. Foi analisado em estudo *in vitro*, dentifrícios experimentais com baixa concentração de

fluoreto associados ao GPCa em diferentes concentrações, observando menor perda mineral quando associado a 0,25% de GPCa. Este dentifrício foi testado em estudo de remineralização *in situ* pelos mesmos autores e mostrou resultados semelhantes ao um dentifrício de 1100 µg F/g [Zaze, 2009]. Desta maneira, seria importante verificar esta formulação no processo de desmineralização formado sob a placa dental. Dentifrícios com concentração reduzida de fluoreto que promovam uma efetividade semelhante a um dentifrício padrão seria uma medida para a redução da ingestão de F em crianças, que poderia oferecer maior segurança em relação à intoxicação crônica.

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo verificar o efeito de um dentifrício fluoretado de baixa concentração suplementado com GPCa em inibir o processo de desmineralização no esmalte e sobre as variáveis bioquímicas da placa dental formada *in situ*.

Material e Método

Delineamento experimental

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Processo FOA n. 2007–00895) (Anexo B). Foram selecionados 14 voluntários com idade entre 21 e 31 anos, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A partir de um estudo piloto, uma amostra de 14 voluntários foi calculada considerando erro- α de 5% e erro- β de 10%, [DSS, 2010] e uma perda de 20%. O estudo avaliou a eficácia de dentifrícios em um delineamento *in situ* cego do tipo cruzado de quatro períodos experimentais. Os voluntários utilizaram um dispositivo palatino contendo 4 blocos de esmalte dental bovino (4 × 4 × 2 mm), com dureza entre 330-370 KHN (SHi) para cada fase. Foi utilizada como desafio cariogênico, solução de sacarose 30%, gotejada sobre os blocos de esmalte bovino. O tratamento foi realizado duas vezes ao dia com os diferentes dentifrícios: placebo (sem fluoreto), 500 µg F/g, 500 µg F/g com 0,25% de GPCa e 1100 µg F/g. Após cada período experimental, foi realizada a coleta da placa dentária para análise do conteúdo de F, Ca e P além de PEC. Nos blocos de esmalte, foram realizadas análises de dureza superficial, para o cálculo da porcentagem de variação de dureza superficial (%SH). Foi determinada também a dureza do esmalte em secção

longitudinal para obter a perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) e a concentração de F, Ca e P no esmalte.

Formulação e determinação de flúor e cálcio dos dentifrícios experimentais

Os dentifrícios experimentais foram manipulados em laboratório, utilizando a mesma fórmula básica (exceto para as concentrações de F e GPCa) com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarinato de sódio, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foi utilizada uma formulação sem F (Placebo). A concentração de Fluoreto de sódio (NaF, Merck®) nos dentifrícios experimentais foi 500 μ g F/g. Em uma das formulações do dentifrício com 500 μ g F/g foi acrescentado glicerofosfato de cálcio na concentração de 0,25% (GPCa, Sigma® - Aldrich). Foi utilizado também um dentifrício de 1100 μ g F/g (Crest®).

Para a dosagem de F utilizou-se um eletrodo específico para íon F (9409 BN – Orion) e microeletrodo de referência (Analyser) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A⁺), previamente calibrado com 5 padrões (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,2 μ g F/mL). Foi pesado aproximadamente 0,1 g de cada dentifrício ao qual foram adicionados 10,0 mL de água deionizada, em tubo de polipropileno graduado para centrífuga. Após homogeneização, para a dosagem do fluoreto total (FT), foi pipetado 0,25 mL da suspensão em tubo de ensaio de polipropileno ao qual foi acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Esta solução permaneceu sob agitação durante 1h a 45°C, após o qual foi adicionado 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Para a dosagem de fluoreto iônico (FI), a suspensão de dentifrício foi submetida à centrifugação a 906×g durante 20 minutos. Alíquotas de 0,25 mL do sobrenadante foram acrescidas com 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹ e 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Nas amostras (FT e FI), acrescentou-se 1 mL de TISAB II (tampão ajustador de força iônica) e os resultados foram expressos em μ g F/g [Delbem et al., 2002]. (Anexo C)

Preparo dos blocos de esmalte e dispositivo palatino

Para realização do estudo, dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol neutra a 2% (pH 7.0) por um mês foram utilizados. Blocos de esmalte bovino (4 × 4 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da face vestibular das coroas (Anexo D). Em seguida, realizou-se ajuste da dentina para obtenção de

superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm) com auxílio da politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 320. O esmalte foi polido com lixas de granulação seqüencialmente mais finas (600, 800, 1200). Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), em água deionizada durante dois minutos. Após, o esmalte foi polido com papel feltro para polimento e suspensão de diamante 1μ e submetido ao ultra-som, durante dois minutos, imersos em água deionizada (Anexo E). Os blocos foram selecionados através da determinação da dureza de superfície (SH) (330-370 KHN) e divididos em 4 grupos. A dureza de superfície (SH_i) foi realizada como descrito por Takeshita et al. [2009] (Anexo F). Um espaço com 4,0 mm de profundidade foi criado no dispositivo palatino, deixando espaço de 1,0 mm para acúmulo da placa dentária sobre os blocos de esmalte. Os blocos de esmalte foram protegidos de distúrbios mecânicos através de uma tela plástica fixada na resina acrílica para permitir o acúmulo da placa [Lodi et al., 2010]. (Anexo G)

Seleção dos voluntários

Foram selecionados voluntários sem distinção ao gênero, residentes em Araçatuba, área com água de abastecimento fluoretada ($0,07 \mu\text{g F/g}$), que apresentaram bom estado de saúde geral e bucal [Delbem et al., 2005; Kielbassa et al., 2003; Tenuta et al., 2005]. Os critérios de exclusão durante o experimento foram: desistência voluntária, alteração do quadro de saúde com conseqüente alteração do fluxo salivar ou necessidade de uso de medicamentos como antibióticos, antidepressivos, narcóticos, diuréticos e anti-histamínicos, uso de bochechos orais ou dentifrícios fluoretados e o não cumprimento do desenho experimental. Foram excluídos da amostra também os fumantes, portadores de lesões de cárie ativa, aqueles que receberam aplicações de flúoreto 2 semanas antes do experimento, os que utilizaram os medicamentos citados acima nos últimos 2 meses ou ainda os que sofreram irradiação, que tinham atividades aquáticas, que trabalham em ambientes poluídos por compostos de baixo pH (indústrias) e que possuem doenças sistêmicas (xerostomia, diabetes, doenças auto-imunes, má nutrição, problemas gastresofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito).

Procedimentos intrabucais

Foi utilizada uma solução de sacarose 30% como desafio cariogênico, a qual era trocada a cada 48 h. Os voluntários removeram o dispositivo da boca e sobre cada bloco de esmalte dispensaram 2 gotas, quantidade suficiente para preencher o espaço de 1,0 mm, 6x ao dia em horários previamente estabelecidos (8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 19:00, 21:00 h). Após o gotejamento da sacarose, os dispositivos foram deixados por 5 minutos em repouso antes de retornarem à cavidade bucal, a fim de que a sacarose fosse difundida pela placa. O tratamento foi realizado 2 vezes ao dia (7:30, 21:30 h), durante 7 dias, com os diferentes dentifrícios, gotejando uma suspensão de dentifrício/água deionizada (1:3 – peso:peso) sobre cada bloco de esmalte, esperou-se o tempo de 1min e enxaguou-se com água deionizada, antes de levar a cavidade bucal novamente. Os voluntários escovaram seus dentes 3 vezes ao dia (após as principais refeições) com o mesmo dentifrício que estavam utilizando para cada período experimental. Durante o intervalo de 7 dias entre as fases e uma semana antes de iniciar o estudo os voluntários utilizaram o dentifrício placebo. Não foram feitas restrições quanto à dieta dos voluntários, entretanto eles foram instruídos a remover o dispositivo durante as refeições e higiene oral. Eles não fizeram uso de antimicrobianos e produtos fluoretados durante o experimento. (Anexo H)

Análise da placa dental

Após o período experimental de cada fase, a placa dental formada sobre os blocos foi pesada em tubos de microcentrífuga pré-pesados. Em cada tubo, HCl 0,5 M foi adicionado na proporção 0,5 mL/10,0 mg placa (peso úmido) e homogeneizou-se as amostras durante 1 min no vórtex. Após 3 h sob agitação constante em temperatura ambiente, o mesmo volume de NaOH 0,5 M foi adicionado no tubo. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 11000×g e o sobrenadante foi extraído para determinação das concentrações de F, Ca e P. Ao precipitado foi adicionado 0,1 mL/mg de NaOH 1 M (peso úmido da placa). As amostras foram homogeneizadas por 1 min no vórtex e mantidas sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. Após esse período foram centrifugadas novamente e o segundo sobrenadante coletado para análise da concentração de PEC [Nobre dos Santos et al., 2002]. A concentração de fluoreto foi realizada utilizando um eletrodo íon-específico – Orion 9409-BN (Orion Research, Inc. Beverly, MA, USA) e um

analisador de íons - Orion 720 A⁺ (Orion Research, Inc. Beverly, MA, USA), calibrados com padrões contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 µg F/mL, e solução TISAB II (tampão ajustador de força iônica) nas mesmas condições das amostras. A análise da concentração de cálcio foi determinada pelo método da cresolftaleína (Espectrofotômetro - Hitachi Lts, Tokyo, Japan) utilizando o Kit Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brazil). Fosfato foi medido através de método colorimétrico e espectrofotômetro HITACHI U-2000, conforme descrito por Fiske e Subbarow, [1925]. Análise de PEC foi realizada através do método fenol-sulfúrico [Dubois, 1956]. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos em µg/mg de placa. (Anexos I e J)

Determinação da dureza

Após o período experimental os blocos de esmalte foram removidos dos dispositivos e a dureza de superfície foi determinada (SH_f) novamente através do microdurômetro Shimadzu Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation – Kyoto – Japan), com penetrador tipo Knoop (KHN), carga estática de 25 g com tempo de 10 seg, acoplado ao programa de computador para análise de imagem Cams-Win (NewAge Industries, USA). Foram realizadas cinco impressões eqüidistantes entre si e, em relação a SH, 100 µm, sendo a porcentagem de variação de dureza de superfície (% SH) calculada ($\%SH = 100(SH_f - SH_i)/SH_i$). Para realizar os testes de dureza em secção longitudinal, foram feitas secções longitudinais no centro dos blocos e uma das metades incluídas em resina acrílica e polidas. Utilizou-se microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) e o software Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, USA). Três seqüências de 14 impressões distantes a 100 µm foram realizadas a diferentes distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte sob carga de 5-g por 10s (1000×) [Delbem et al., 2010]. Os valores médios das três impressões em cada distância foram calculados. A área de dureza integrada (KHN × µm) para a lesão dentro do esmalte hígido foi calculada pela regra trapezoidal (Prism, versão 3.02) e subtraída da dureza integrada do esmalte hígido para obter a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) [Takeshita et al., 2009]. (Anexo K)

Após isso, secções cerca de 600 µm de espessura foram feitas da metade de cada bloco incluído em resina acrílica utilizando um disco diamantado. As secções

dos blocos foram polidas até uma espessura de 100 μm utilizando a politriz BETA (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). As secções de esmalte foram montadas em lâminas de vidro em filme de água deionizada, cobertos por uma lamínula de vidro e selados com resina Enthellan®. As secções foram examinadas através de microscópio de Luz Polarizada (AxioPhot; Zeiss DSM-940 A, Oberkochen Germany) sob aumento de 200 \times . Através de uma máquina fotográfica digital (Canon, modelo Powershot A620), devidamente acoplada ao microscópio óptico e a um computador, foi possível o armazenamento e a observação das imagens. Três áreas na região central das secções foram analisadas verificando a presença e a espessura da camada de superfície de esmalte e a profundidade da desmineralização (μm) usando o Software Axiovision Software Rel. 4.3. (Anexo L)

Determinação de F, Ca e P no esmalte

Blocos (2 \times 2 mm) obtidos de uma das metades dos blocos seccionados no sentido longitudinal foram fixados com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte (\sim 50 μm) foi removida [Weatherell et al., 1985; Takeshita et al., 2009]. Utilizou-se uma base de microscópio modificada com manômetro acoplado (Pantec, São Paulo, Brasil) e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de carbureto de sílica, granulação 400 (Buelher) em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Os frascos, após a adição de 0,8 mL de HCl 1,0 M, foram mantidos sob agitação constante durante 1 hora sendo por fim adicionado 0,8 mL de NaOH 1,0 M [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. (Anexo M)

Para análise de F utilizou-se eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720 A⁺, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Os eletrodos foram previamente calibrados com padrões contendo 0,08 a 1,28 $\mu\text{g F}/\text{mL}$, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas em duplicata, com alíquotas de 40 μL da solução da amostra acrescidas com o mesmo volume de TISAB II. O Ca foi determinado pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, como descrito por Vogel et al. [1983]. Para calibração foram utilizados padrões contendo 40 a 200 $\mu\text{g Ca}/\text{mL}$. Alíquotas de 3 μL (duplicata) foram dispostas em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo

92096 – TPP, Switzerland) acopladas em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), utilizando comprimento de onda de 650 nm. O P foi determinado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow [1925]. As leituras foram realizadas em duplicata em espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) no comprimento de onda de 660 nm. (Anexo N)

Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o software GMC [Campos, 2003] e o limite de significância estabelecido foi de 5%. Dez voluntários de quatorze concordaram e seguiram o delineamento experimental corretamente o que possibilitou 97% de força estatística [DSS, 2010]. Cada voluntário foi considerado como “n” em todas as análises (n=10). Dados de análise do biofilme (Ca) e análises do esmalte (SH_f, %SH, F e P) não mostraram distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov) e homogênea (teste Bartlett). Então os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis. Os dados de SH_i, MLP superficial e MLP profundidade e Ca no esmalte apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos a análise de variância (1 critério) seguida pelo teste de Tukey. Os dados de F, P e PEC presentes no biofilme também se mostraram homogêneos, sendo submetidos à análise de variância, seguida pelo teste Bonferroni. Os resultados de ΔKHN, após transformação de raiz cúbica, mostraram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância (2 critérios), seguido pelo teste de Tukey.

Resultados

A análise da concentração de F mostrou-se dentro do esperado para todos os dentifrícios experimentais, e os valores médios para o F total e F iônico foram respectivamente: 10,1 (± 0,5) e 9,1 (± 0,2) (Grupo placebo); 538,5 (± 20,2) e 514,3 (± 30,1) (Grupo 500 µg F/g); 536,7 (± 49,1) e 477,2 (± 5,0) (Grupo 500 µg F/g com 0,25% GPCa); 1201,0 (± 92,7) e 1079,5 (± 43,8) (Grupo 1100 µg F/g). Todos os grupos experimentais mostraram valores médios similares para a SH_i (p>0,05), e variaram entre 353,6 (± 0,9) e 354,9 (± 1,2) Kg/mm², sendo diferentes quando comparados com os valores de SH_f. Após os tratamentos, os grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa apresentaram os maiores valores para a SH_f, seguido pelo

grupo 500 µg F/g e placebo ($p < 0,05$). Os menores valores de % alteração de dureza superficial foram observados nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa e o maior valor no grupo placebo ($p < 0,05$) (figura 1). A profundidade da lesão, na MLP (Microscopia de Luz Polarizada), foi maior no grupo placebo, seguida pelo grupo 500 µg F/g e semelhante nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa. A espessura da camada superficial de esmalte foi maior nos grupos 500 µg F/g e placebo ($p < 0,05$) (tabela 1). A perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) foi maior no grupo placebo seguida pelo 500 µg F/g e 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa, sendo semelhantes estatisticamente nos últimos dois grupos (figura 1).

Com relação à concentração de íons na superfície do esmalte, o F apresentou maior concentração no grupo 1100 µg F/g seguido por 500 µg F/g com GPCa, 500 µg F/g, e placebo. Já a concentração de Ca não apresentou diferença estatística entre os grupos 500 µg F/g com GPCa e 1100 µg F/g. Quanto ao P foram semelhantes entre si os grupos 500 µg F/g, 500 µg F/g com GPCa e 1100 µg F/g diferindo estatisticamente do placebo (figura 3).

Quanto a análise da composição iônica na placa dental, as maiores concentrações de F, Ca e P foram encontradas nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa, seguidos pelos grupos 500 µg F/g e placebo, que apresentou os menores valores ($p < 0,05$). A concentração PEC foi significativamente menor nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g com GPCa quando comparados ao 500 µg F/g e placebo, mostrando diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$) (figura 2).

Discussão

Dentre as formas de reduzir o risco de desenvolvimento da fluorose dentária e não comprometer o controle da cárie dentária, a diminuição da concentração de F nos dentifrícios disponíveis no mercado tem sido avaliada. Este estudo verificou a eficácia de um dentifrício com concentração reduzida de F (500 µg F/g) associado ao GPCa no processo de desmineralização, analisando as variáveis bioquímicas da placa dental formada *in situ*.

Para isso, utilizou-se um modelo de desmineralização *in situ* com período experimental de 7 dias e a sacarose a 30% como desafio cariogênico. Após o período experimental, foi observada significativa perda mineral no período de 7 dias quando feito uso do dentifrício placebo. Baseado nos estudos de Paes Leme et al.

[2004] e Aires et al. [2006], que utilizaram sacarose a 20% 8x ao dia sobre o esmalte dental bovino os resultados para alteração de dureza de superfície se mostraram semelhantes ao observado em nosso estudo para o grupo placebo, (%SH) de -50,4% (\pm 26,7) e -58,2% (\pm 32,6), respectivamente. Em nosso estudo o grupo placebo mostrou uma alteração de %SH de -51,7% (\pm 12,3), sendo observada diferença na dureza entre os dentífricos placebo, 500 μ g F/g e 1100 μ g F/g. No estudo realizado por Vale et al. [2007], demonstrou-se, com o uso de esmalte humano a perda mineral é detectada no 7º dia de acúmulo de placa dental, uma vez que o esmalte bovino possui maior porosidade [Featherstone e Mellberg, 1981; Edmunds et al., 1988], a desmineralização ocorre mais rapidamente neste substrato, o que permitiu promover perda mineral no período de 7 dias com o uso da solução de sacarose a 30%.

Assim, quando analisamos os dentífricos de baixa concentração o acréscimo de 0,25% de GPCa ao dentífrico com 500 μ g F/g promoveu uma desmineralização semelhante ao dentífrico com 1100 μ g F/g (figura 1). A adição de 0,25% de GPCa aumentou a capacidade do dentífrico de 500 μ g F/g em reduzir perda mineral em 44%, quando se analisa os resultados de %SH. O aumento da concentração de fluoreto de 500 para 1100 μ g F/g produziu um incremento de 43% na redução da perda mineral. De acordo com a faixa de equivalência para estudos intra-orais [Proskin et al., 1992; ADA, 1999, 2005] e que varia entre 0,90 a 1,10 (razão entre dentífrico teste e controle positivo), o dentífrico com 500 μ g F/g suplementado com GPCa demonstrou ser equivalentes ao controle positivo, pois apresentou um valor de 1,01 utilizando os dados de %SH. Com relação à capacidade do dentífrico suplementado em reduzir a área da lesão de subsuperfície (Δ KHN) encontrou-se valores semelhante ao controle positivo (1100 μ g F/g) (figura 1). Na análise de MLP observamos através das fotomicrografias o perfil semelhante entre o dentífrico de 1100 μ g F/g e o dentífrico de 500 μ g F/g suplementado com 0,25% de GPCa, e lesões mais profundas nos dentífricos placebos e 500 μ g F/g, dados que confirmam os resultados de dureza (figura 4).

Estes resultados podem estar associados à concentração dos íons presente na placa dentária, e o aumento da concentração desses íons em determinados grupos pode estar associado à maior concentração de F ou à suplementação do dentífrico. O aumento de íons na placa dentária quando se utilizou o dentífrico com GPCa foi decorrente da suplementação, quando se compara com o dentífrico de 500 μ g F/g,

produzindo um meio saturado em Ca e P, reduzindo assim a perda mineral. O composto utilizado no presente estudo é uma formulação insolúvel em meio aquoso, mas que sofre hidrólise [Imai e Hayashi, 1993; Vilorio et al, 2000] no meio bucal liberando Ca e P em quantidades suficientes quando na concentração de 0,25% [Zaze, 2009]. O aumento de Ca pode aumentar a concentração de F presente no biofilme [Vogel et al., 2006], mas o aumento da concentração do F (1110 µg F/g) também produziu um aumento de Ca no biofilme, mostrando a relação de dependência entre os íons Ca e F [Whitford et al., 2002]. Paes Leme et al. [2004] observaram que o aumento da concentração de F na placa causada pelo dentifrício fluoretado (1100 µg F/g), produziu um aumento de Ca.

As concentrações de PEC encontradas na placa dental estão de acordo com estudos anteriores e mostram o papel deste tipo de polissacarídeo no desenvolvimento de lesões de cárie [Paes Leme et al., 2006, Vale et al., 2007]. A menor concentração de PEC encontrada na placa dental ocorre quando há uso dos dentifrícios fluoretados está relacionada com a maior concentração de F e Ca na placa. Na literatura encontramos que o cálcio está relacionado com a redução dos PEC [Boyd, 1978]. No dentifrício associado ao GPCa comparado ao 500 µg F/g a menor concentração dos PEC pode estar relacionada à maior concentração de Ca, promovida pela liberação deste íon através do composto. Dados esses que podem ser relacionados com o aumento da dureza de superfície no dentifrício suplementado (Figura 1). Uma menor concentração de F, Ca e P na placa dental foram observadas quando se utilizou o dentifrício não fluoretado e sacarose para promover o desafio cariogênico, o que está de acordo com estudos anteriores [Vale et al., 2007; Paes Leme et al., 2006].

Com relação aos íons encontrados no esmalte, observou-se que a concentração de F foi similar ($p < 0,05$) entre os grupos 500 µg F/g e 500 com 0,25% CaGP. No estudo *in vitro* de desmineralização conduzido por Zaze [2009], os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo. Entretanto, em nosso estudo observou-se uma concentração de Ca estatisticamente semelhante ao dentifrício 1100 µg F/g ($p < 0,05$), dados que também se assemelham ao estudo de Zaze [2009]. Esses resultados podem estar relacionados à maior concentração de Ca encontrada na placa dental quando se utilizou o dentifrício associado ao GPCa. Já a concentração de P foi semelhante entre todos dentifrícios fluoretados, e foram semelhantes ao estudo *in vitro* de Zaze [2009]. No estudo *in situ* também realizado

por Zaze [2009] foi avaliado o processo de remineralização e no presente de desmineralização do esmalte, e ambos mostraram um aumento da dureza quando se utilizou o dentifrício associado ao GPCa em relação ao dentifrício com 500 µg F/g apenas.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o dentifrício com baixa concentração associado a 0,25% GPCa, apresentou eficácia semelhante ao controle positivo com 1100 µg F/g na desmineralização *in situ*, podendo ser uma alternativa na melhora da relação risco-benefício entre fluorose e cárie dentária.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos. Agradecemos aos voluntários pela participação e também à técnica de laboratório do Departamento de Odontologia Social e Infantil, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pela colaboração nos procedimentos laboratoriais durante o desenvolvimento do trabalho.

Referências

- Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res* 2006;40:28-32.
- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
- American Dental Association. Council on Scientific Affairs: Acceptance program guidelines: determination of efficacy in product evaluation. Chicago:ADA; 1999.
- American Dental Association. Council on Scientific Affairs. Acceptance program guidelines: fluoride-containing dentifrices. Chicago:ADA; 2005.
- Boyd RF: The effect of some divalent cations on extracellular polysaccharide synthesis in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res* 1978;57:380-383.
- Browne D, Whelton H, O'Mullane D: Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent* 2005;33:177-186.

-
- Campos GM: GMC 2002 (computer program) Ribeirao Preto: School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.
- Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP: Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci* 2010;118:370-375.
- Delbem AC, Vieira AE, Cury JA: Cariostatic potencial evaluation of the most popular Brazilian dentifrice. *Rev Bras Odontol* 2002;59:14-18.
- Delbem AC, Carvalho LP, Morihisa RK, Cury JA: Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization *in situ*. *Caries Res*, 2005;39:258-260.
- Delbem AC, Danelon M, Sasaki KT, Vieira AE, Takeshita EM, Brighenti FL, Rodrigues E: Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: An *in situ* study. *Arch Oral Biol* 2010;55:913-918.
- DSS Research: Tools and Resources for Marketing Researches: <http://www.dssresearch.com/toolkit/default.asp>, 2010.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analyt Chem* 1956;28:350-356.
- Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM: Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988;22:327-336.
- Featherstone JDB, Melberg JR: Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15:109-114.
- Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
- Imai M, Hayashi Y: Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium- β -glycerophosphate (Ca-BGP). *J Oral Pathol Med* 1993;22:411-417.
- Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H: Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. *Oper Dent* 2003;28:765-772.
- Koch G, Petersson LG, Kling E, Kling L: Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries: a three-year clinical study. *Swed Dent J* 1982; 6: 233-238.
- Lima YBO, Cury JA: Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifício. *Rev Saúde Pública* 2001;35:576-581.
-

-
- Lima TJ, Ribeiro CC, Tenuta LM, Cury JA: Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. *Caries Res* 2008;42:46-50.
- Lodi CS, Manarelli MM, Sasaki KT, Fraiz FC, Delbem AC, Martinhon CC: Evaluation of fermented milk containing probiotic on dental enamel and biofilm: in situ study. *Arch Oral Biol* 2010;55:29-33.
- Lynch RJ. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J* 2004;54:310-314.
- Lynch RJ, Ten Cate JM: Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res* 2006;40:142-147.
- Mainwaring PJ, Naylor MN: A four year clinical study to determine the caries inhibiting effect of calcium glycerophosphate and sodium fluoride in calcium carbonate base dentifrices containing sodium monofluorophosphate. *Caries Res* 1983;17:267-276.
- Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; 22:269–277.
- Mitropoulos CM, Holloway PJ, Davies TG, Worthington HV: Relative efficacy of dentifrices containing 250 or 1000,ppm F in preventing dental caries – report of a 32 month clinical trial. *Community Dent Health* 1984;1:193-200.
- Narvai PC: Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciênc Saúde Coletiva* 2000;5:381-92.
- Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA: Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 2002;36:347-352.
- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004;83:71-75.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* 2006;85:878-887.
- Proskin HM, Chilton NW, Kingman A: Interim report of the ad hoc committee for the consideration of statistical concerns related to the use of intra-oral models in submissions for product claims approval to the American Dental Association. *J Dent Res* 1992;71:949-952.

-
- Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE: Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamelon dentifrice. J Clin Dent 1999a;10:9-12.
- Schemehorn BR, Orban IC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. J Clin Dent 1999b;10:13-16.
- Takehita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. Caries Res 2009;43: 50-56.
- Tavener JA, Davies GM, Davies RM, Ellwood RP: The prevalence and severity of fluorosis in children who received toothpaste containing either 440 or 1,450 ppm F from the age of 12 months in deprived and less deprived communities. Caries Res 2006;40:66-72.
- Tenuta LM, Ribeiro C C, Goncalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, Tagliaferro EP, Pecharki GD, Napimoga MH, Tabchoury CP, Cury JA: The short-term *in situ* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. J Dent 2005;33:491-497.
- Vale GC, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA: Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. Caries Res 2007;41:406-412.
- Viloria IL, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Structure and chemical composition of na experimentally formed apical barrier after the application of calcium-glycerophosphate. J Endod 2000; 26:605-609.
- Vogel GL, Chow LC, Brown WE: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. Caries Res 1983;17:23-31.
- Vogel GL, Shim D, Schumacher GE, Carey CM, Chow LC, Takagi S: Salivary fluoride from fluoride dentifrices or rinses after use of a calcium pre-rinse or calcium dentifrice. Caries Res 2006;40:449-454.
- Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H: Micro-sampling by abrasion. Caries Res 1985;19:97-102.
- Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. Caries Res 2002; 36:256-265.

Zaze ACSF. Efeito da incorporação de cálcio e fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie. [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

Legendas de figuras

Figura 1. Representação gráfica dos dados de dureza superficial, % alteração de dureza superficial e perda integrada de dureza de subsuperfície. Letras distintas indicam significância estatística (Kruskal-Wallis: SHf – $p < 0,001$; %SH – $p < 0,001$, Student-Newman-Keuls. ANOVA: SHi - $p = 0,133$; Δ KHN – $p < 0,001$).

Figura 2. Representação gráfica da concentração de F, Ca, P e PEC na placa dental. Letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis: Ca - $p < 0,001$, Student-Newman-Keuls; ANOVA: F – $p < 0,001$ (tranf log), Bonferroni; Pi – $p < 0,001$, Bonferroni; EPS – $p < 0,001$, Bonferroni;.

Figura 3. Representação gráfica da concentração de F, Ca e P no esmalte. Letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$). (Kruskal-Wallis: F – $p < 0,001$; Pi – $p = 0,002$; ANOVA: Ca $p < 0,001$).

Figura 4. Fotomicrografia de luz polarizada da lesão formada após os tratamentos realizados com: (a) Placebo, (b) 500 μ g F/g, (c) 500 μ g F/g com 0,25% GPCa, (d) 1100 μ g F/g;

Legenda de tabela

Tabela 1 – Média (\pm DP) das medidas de profundidade da lesão e camada de esmalte superficial obtidas por microscopia de luz polarizada.

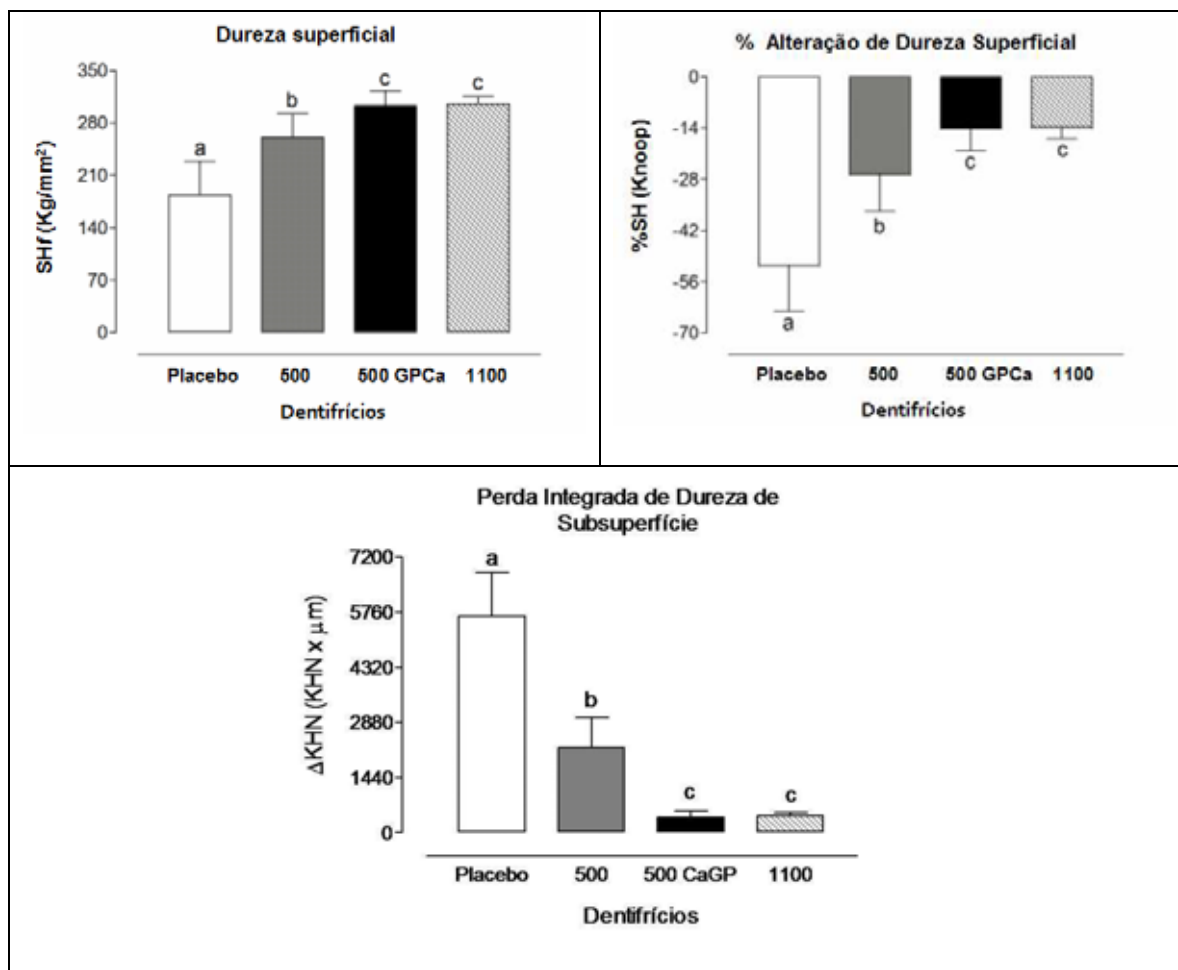


Figura 1. Representação gráfica dos dados de dureza superficial, % alteração de dureza superficial e perda integrada de dureza de subsuperfície. Letras distintas indicam significância estatística (Kruskal-Wallis: SHf – $p < 0,001$; %SH – $p < 0,001$, Student-Newman-Keuls. ANOVA: SHi - $p = 0,133$; Δ KHN – $p < 0,001$).

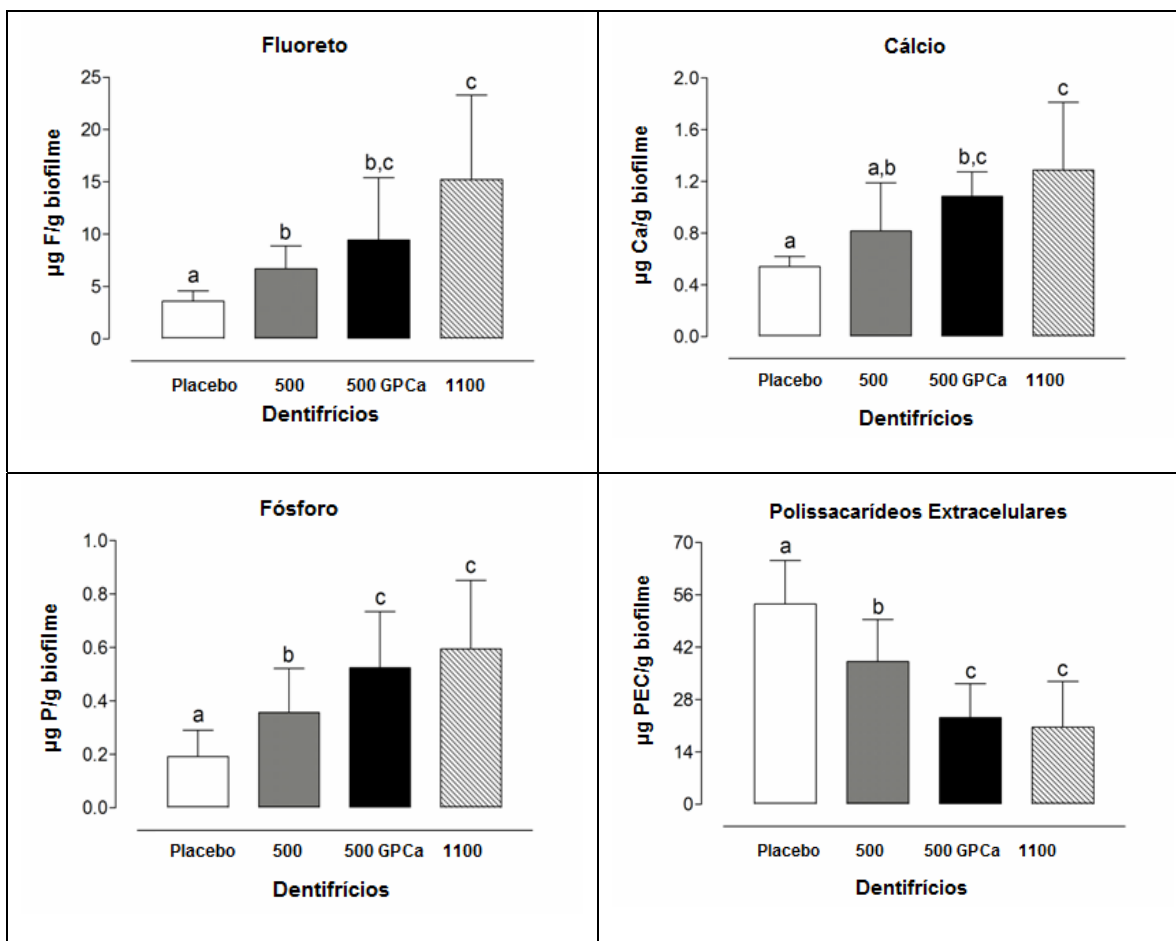


Figura 2. Representação gráfica da concentração de F, Ca, P e PEC no biofilme. Letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis: Ca - $p < 0,001$, Student-Newman-Keuls; ANOVA: F - $p < 0,001$ (tranf log), Bonferroni; Pi - $p < 0,001$, Bonferroni; EPS - $p < 0,001$, Bonferroni;.

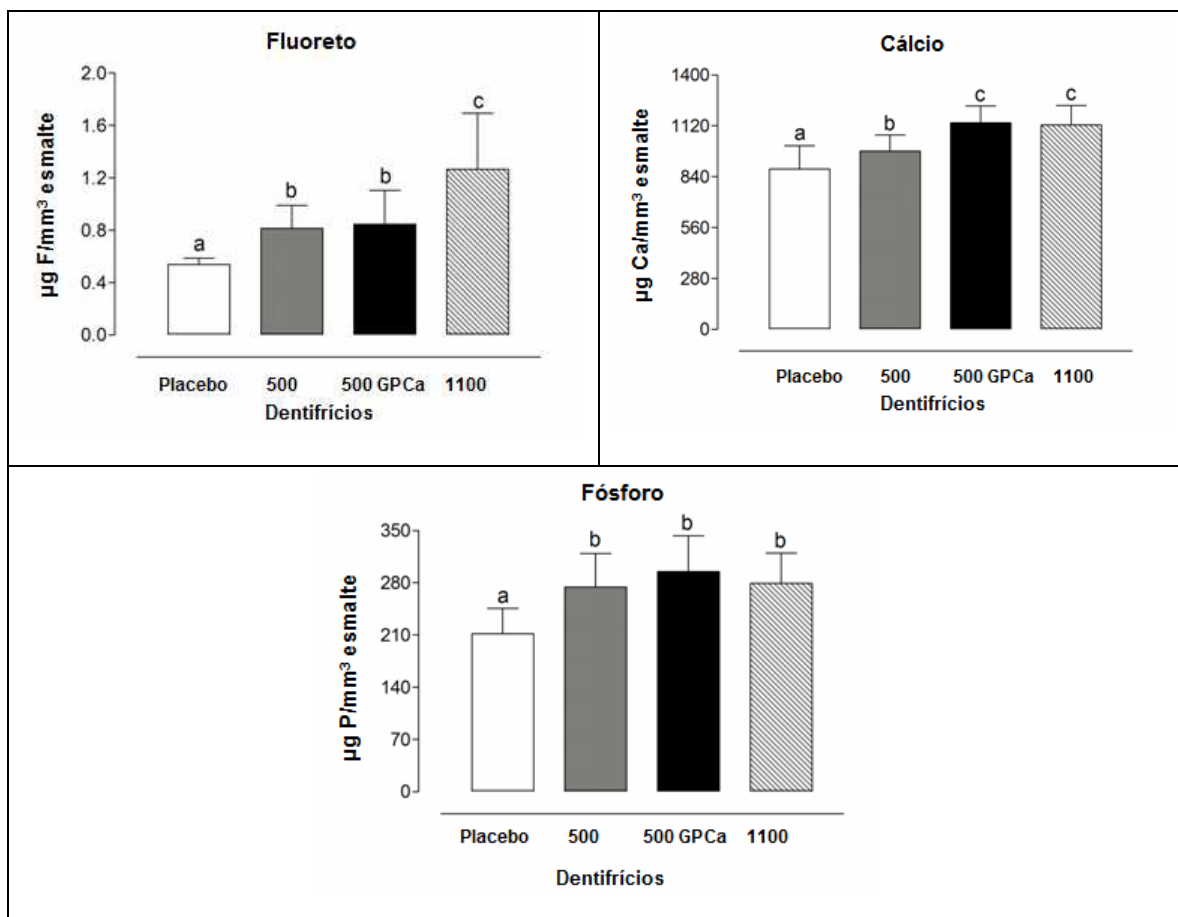


Figura 3. Representação gráfica da concentração de F, Ca e P no esmalte. Letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$). (Kruskal-Wallis: F – $p < 0,001$; Pi – $p = 0,002$; ANOVA: Ca $p < 0,001$).

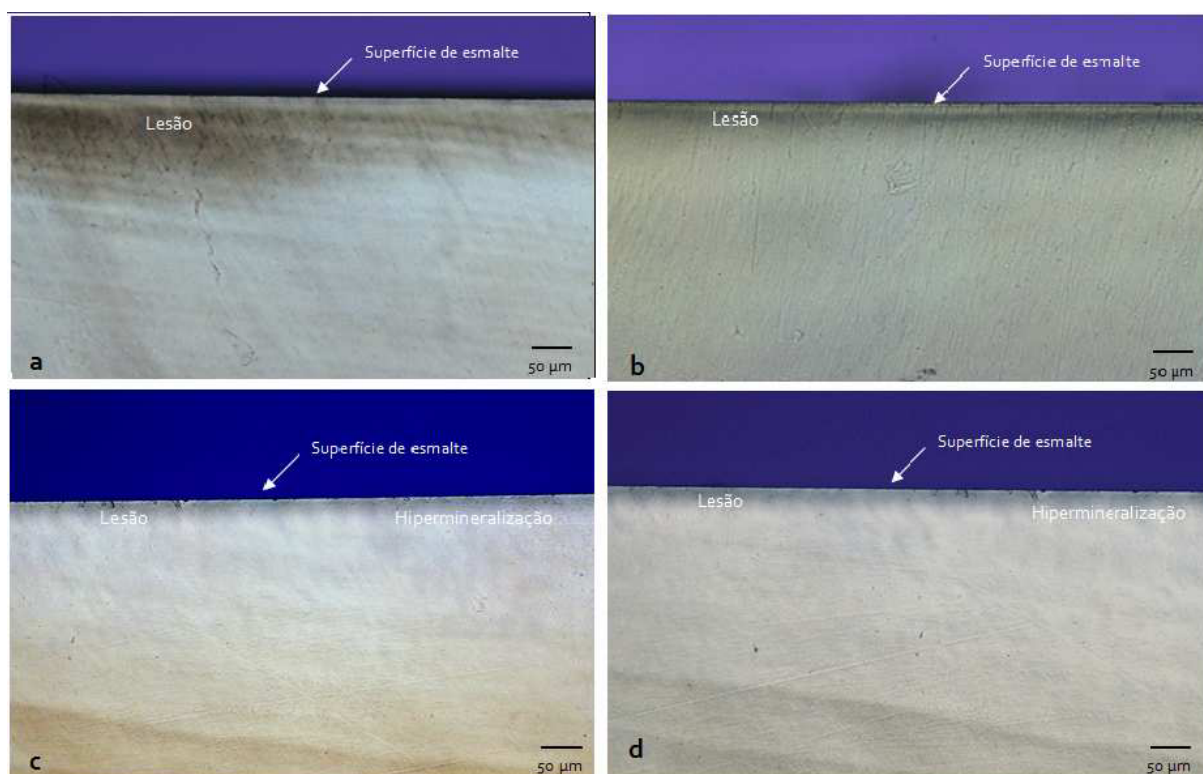


Figura 4. Fotomicrografia de luz polarizada da lesão formada após os tratamentos realizados com: (a) Placebo, (b) 500 μg F/g, (c) 500 μg F/g com 0,25% GPCa, (d) 1100 μg F/g. (Aumento: 200 \times)

Tabela 1 – Média (\pm DP) das medidas de profundidade da lesão e camada de esmalte superficial obtidas por microscopia de luz polarizada.

| Grupos | Profundidade da lesão (μm) | Camada superficial esmalte (μm) |
|---------------|---|--|
| Placebo | 68,0 (12,7) ^a | 4,4 (1,7) ^a |
| 500 | 55,2 (12,3) ^b | 5,9 (1,2) ^b |
| 500 GPCa | 15,2 (16,8) ^c | 2,2 (1,9) ^c |
| 1100 | 9,7 (16,8) ^c | 1,2 (1,9) ^c |

Letras minúsculas sobrescritas indicam significância estatística (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

ANEXOS

ANEXO A

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Caries Research

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. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton
(Editor-in-Chief, Caries Research)
Department of Microbiology
The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research
KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower
London Bridge SE1 9RT (UK)
Tel. +44 2071887465
Fax +44 2071887466
david.beighton@kcl.ac.uk

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

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 and all lines must 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. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

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 if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

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.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

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 provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

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

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

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.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gyax 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, 2004.

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional information which is directly pertinent to the content and conclusion of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The editors reserve the right to reject or limit the scope and length

of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. Acceptable file formats are word or pdf, excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a pdf file), video files (.mov, .avi, .mpeg), and audio files (.wav), either free standing or incorporated into html or ppt files in each case to illustrate the sound.

Accepted supplementary material will be published as submitted and no proofs will be provided to the authors.

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

Author's Choice[™]

Karger's Author's Choice[™] service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits the final version of your article on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publishing. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium *Author's Choice*[™] service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's *Author's Choice*[™] feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 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.

ANEXO B
COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP–

OF. 098/2007
CEP
SFCDB/bri


Araçatuba, 03 de agosto de 2007.

Referência Processo FOA 2007-00895

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **“O EFEITO DOS DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR SUPLEMENTADOS COM CÁLCIO E FOSFATO SOBRE O BIOFILME DENTAL FORMADO “IN SITU”**” expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, **deverá ser enviado o relatório final em 02/08/2008.**


Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon
 Coordenador do CEP

Ilma. Senhora
Drª. CLEIDE CRISTINA R. MARTINHON
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.

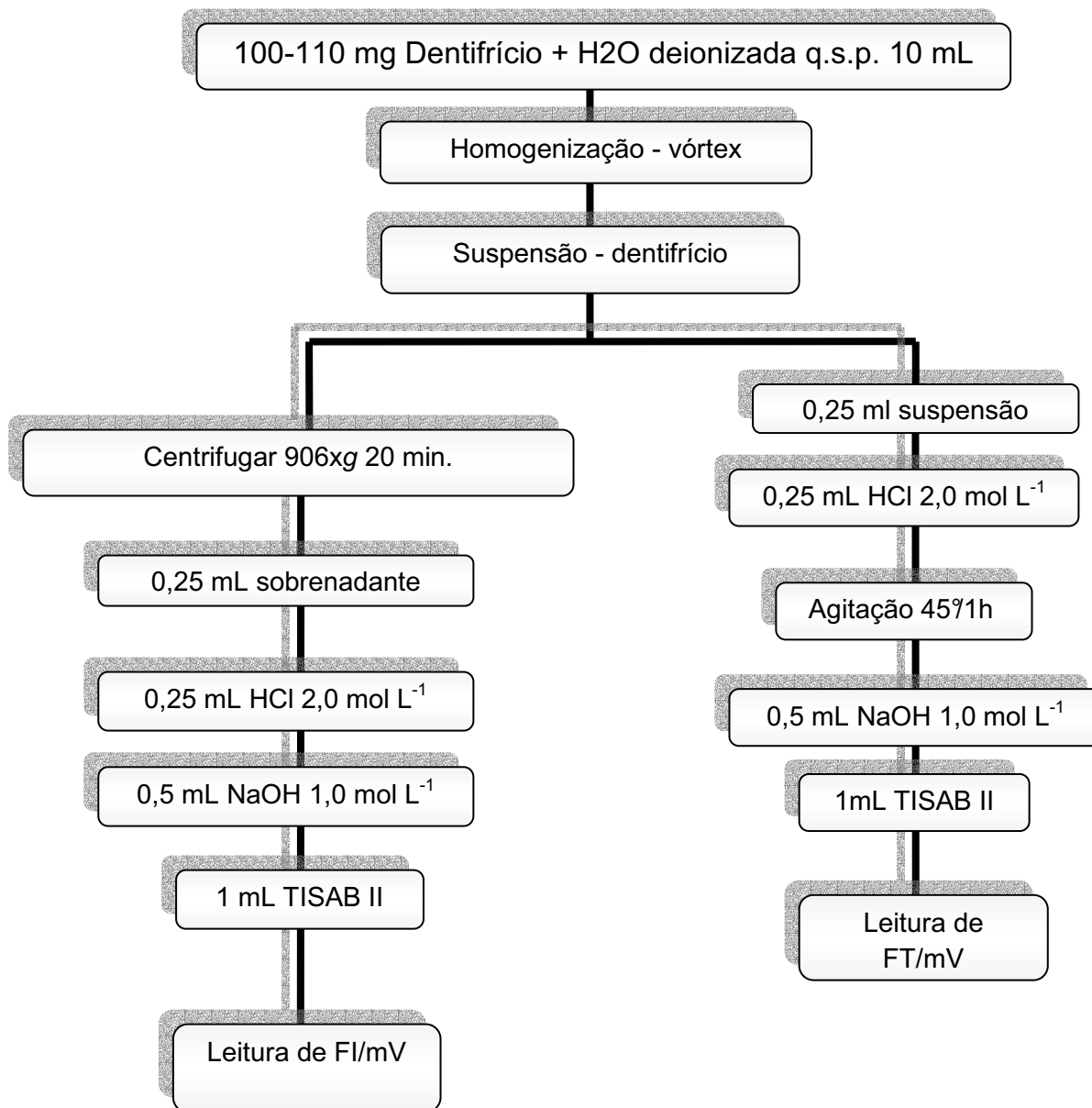
16/08/07


Drª. Cleide C. Rodrigues Martinhon

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO C

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DE F DOS DENTIFRÍCIOS



ANEXO D**CONFEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO (4×4mm)**

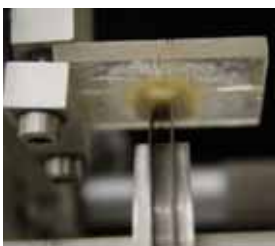
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz por meio de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água deionizada).



2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal seguido pelo corte no sentido transversal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond -n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.



5. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

ANEXO E

PLANIFICAÇÃO DA DENTINA E POLIMENTO DO ESMALTE



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 11 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), 2 pesos, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima para serem polidos.



Seqüência do polimento de esmalte:

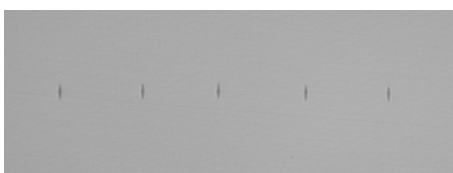
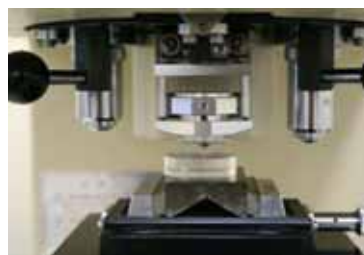
- ✓ Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
- ✓ Lixas de granulação 600 (30 segundos), 800 (30 segundos) e 1200 (30 segundos) com refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
- ✓ Acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) durante 1 minuto com suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
- ✓ Lavagem durante 30 segundos com jato de água deionizada;
- ✓ Limpeza em lavadora ultrassônica Modelo 2110 (Branson, Danbury CT,USA) com água destilada/ deionizada (2minutos).

ANEXO F**ANÁLISE DA DUREZA DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE**

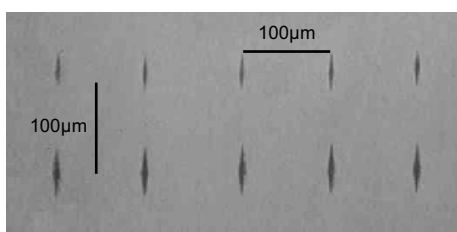


1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMSWIN (NewAge Industries, USA).

-
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos.



3. Fotomicrografia das impressões (SHi). (Aumento: 100×)



4. Fotomicrografia das impressões (SHi, SHf). (Aumento: 100×)

ANEXO G

DISPOSITIVO PALATINO



1. Dispositivo palatino confeccionado em resina acrílica (Jet – Artigos Odontológico Clássico, São Paulo), com espaço para a inserção dos blocos de esmalte de dente bovino.

2. Blocos fixados com cera pegajosa e cobertos com tela plástica, deixando um espaço (de 1 mm) entre o bloco e a tela para permitir o acúmulo do biofilme e protegê-lo da perturbação mecânica.



ANEXO H

LISTA DE INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

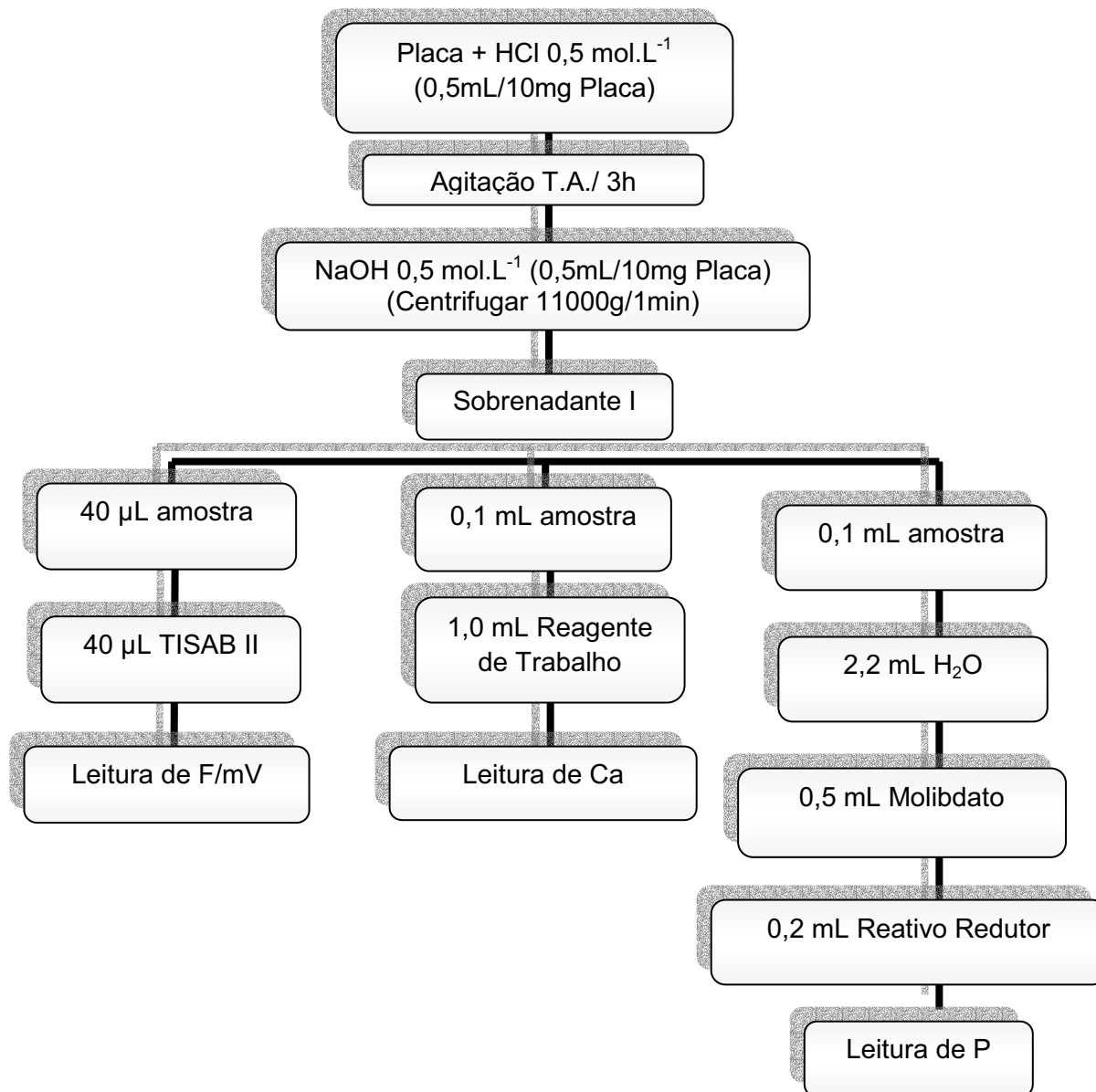
1. O dispositivo intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, sendo removido da boca apenas durante às refeições ou quando o voluntário for ingerir algo, inclusive água.
2. Quando estiver fora da boca, em nenhum momento o dispositivo deve ser deixado à seco. Guarde-o no porta-aparelho, com uma gaze úmida na água deionizada fornecida, sobre a área dos blocos de esmalte.
3. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação (máximo de 1 hora).
4. Durante toda a fase experimental, utilize o dentifrício fornecido pela pesquisadora.
5. Realize a higiene bucal normalmente.
6. Escove **apenas** a porção do dispositivo que **não** contém os blocos de esmalte; para isso, utilize o **dentifrício** e enxágüe com a **água deionizada** fornecida.
7. **Não** utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza durante a fase experimental.
8. **Não** utilize vitaminas ou suplementos sistêmicos que contenham flúor durante a fase experimental.
9. Quando o dentifrício, gaze ou água deionizada estiverem acabando, entre em contato com a pesquisadora responsável para que sejam repostos.
10. Qualquer dúvida entre em contato.

Fase de desmineralização

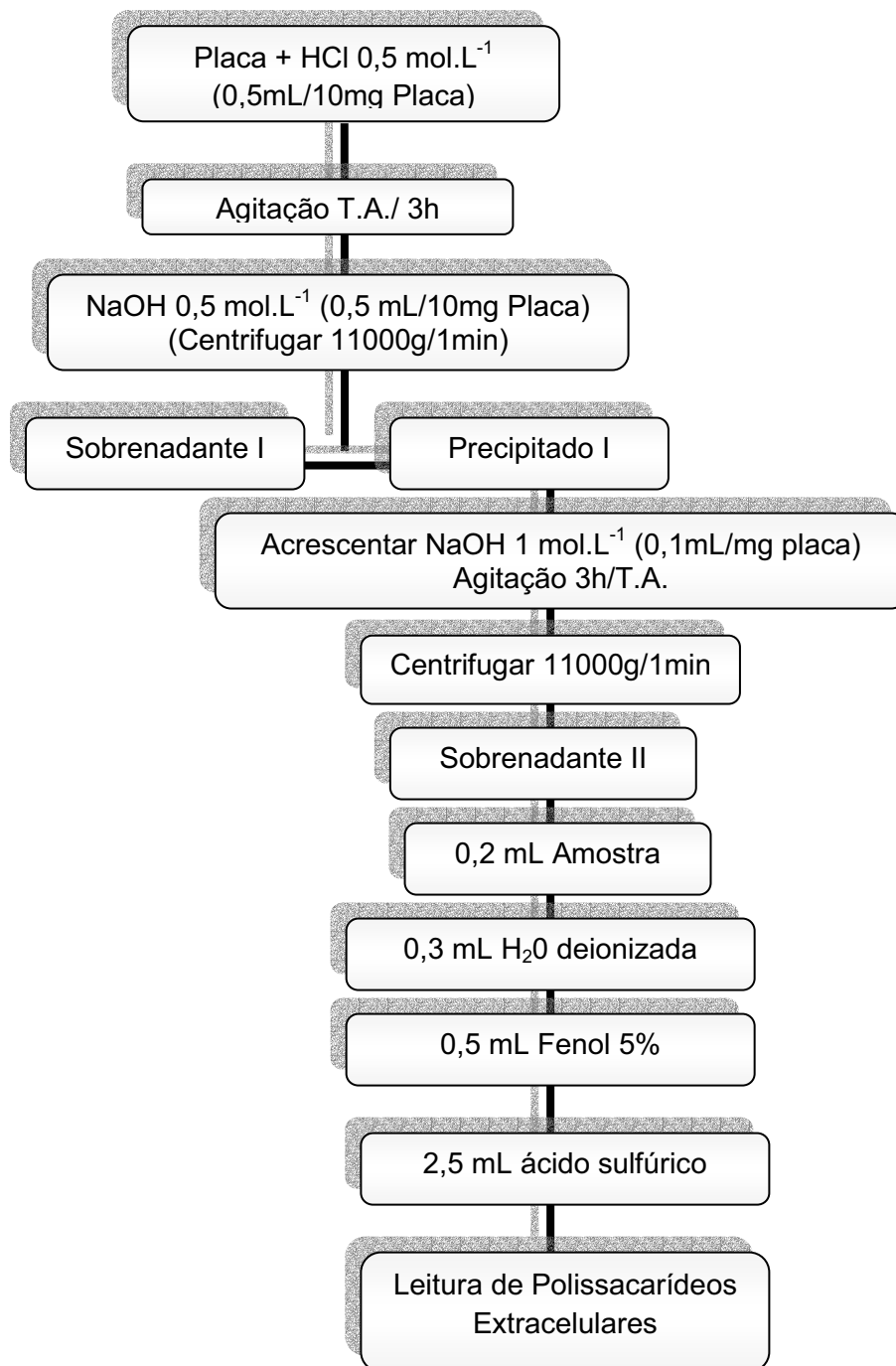
1. Gotejar a sacarose nos horários descritos: 8:00/ 11:00/14:00/17:00/19:00/21:00.
2. Para fazê-lo, remova o dispositivo da boca, coloque sobre o porta-aparelho e goteje duas gotas da solução sobre cada bloco de esmalte, sem tocar a ponta do conta-gotas no dispositivo para evitar a contaminação da solução. Aguarde 5 minutos, para que a sacarose se difunda pela placa bacteriana, e retorne à cavidade bucal.
3. Para realizar o tratamento com dentifrício, diluir o dentifrício em água deionizada já dosados nos frasco. Homogeneizar por **2 minutos** e gotejar uma gota em cada bloco. Aguardar **1 minuto** e lavar os blocos com água deionizada. Enquanto isso, realizar a escovação bucal. (Tratamento - 7:30/ 21:30)
4. Quando o horário de gotejamento coincidir com um período em que o dispositivo estiver fora da boca, realize o gotejamento 5 minutos antes de retornar o dispositivo para a boca. Os gotejamentos seguintes devem ser realizados no horário pré-determinado. **Não** goteje a sacarose e deixe por mais de 5 minutos sem colocar o dispositivo na boca.
5. A solução de sacarose será trocada a cada 48h, o voluntário devolverá o frasco, e receberá um novo com sacarose.
6. O acúmulo de placa bacteriana sob a tela plástica nesta fase é desejável; **não** tente removê-la de forma alguma.

Qualquer dúvida entrar em contato com a pesquisadora responsável (Jackeline- tel: 3301-0940/ 8142-8700).

ANEXO I
ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE F, CA E P NA PLACA DENTAL



ANEXO J
ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE PEC NA PLACA DENTAL



ANEXO K

ANÁLISE DA DUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL



1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 gramas de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, USA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 minutos e mais 7 minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola adesiva (Super Bonder – Loctite).



2. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.



3. Microdurômetro Micromet 5114 Hardness Tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem Buehler OminMet (Buehler, Lake Bluff, USA).

Seqüência do polimento de esmalte:

- ✓ Lixas de granulação 320 (1 minuto), 600, 800 e 1200 (2 minutos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
- ✓ Acabamento final com disco de papel feltro Microcloth Supreme PSA (Buehler) durante 2 minutos com suspensão de diamante 1/4 micron base-água (Buehler);
- ✓ Lavagem durante 30 segundos com jato de água deionizada;
- ✓ Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando água destilada/deionizada (2 minutos).

ANEXO L

MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA



1. Secção de esmalte com espessura de aproximadamente 100 μm montado em lâmina microscópica para análise.



2. Microscópio de Luz Polarizada (AXIOPHOT - ZEISS DSM-940 A, Oberkochen, Germany), câmera fotográfica digital (Canon, modelo Powershot A620) devidamente acoplada e microcomputador.



3. Fotomicrografia de Luz Polarizada do esmalte bovino após indução de desmineralização *in vitro*. (Aumento: 200 \times).

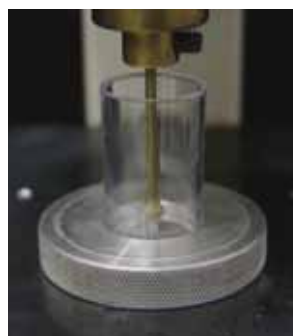
ANEXO M

ANÁLISE DOS CONTEÚDOS DE F, Ca E P NO ESMALTE



1. Bloco fixado em mandril para peça reta e montado em um microscópio modificado com um micrometro (Pantec, São Paulo, Brasil).

-
2. Bloco de esmalte adaptado ao mandril, sendo submetido à microabrasão, com desgaste de 50 μm , para análise do F, Ca e P.



3. Após desgaste, pó de esmalte presente na lixa adaptada em frascos de poliestireno cristal (J - 10, Injeplast, Brasil).
-



4. Para análise do conteúdo de F no esmalte utilizou-se:

A- Eletrodo específico Orion 9409-BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA).

B- Microeletrodo de referência (Analyser Comércio e Indústria LTDA, São Paulo, SP).

C- Analisador de íons Orion 720A (Orion Research, Inc.).



5. A concentração de cálcio no esmalte foi determinada através de método colorimétrico em placas de 96 poços, (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 – TPP, Switzerland).

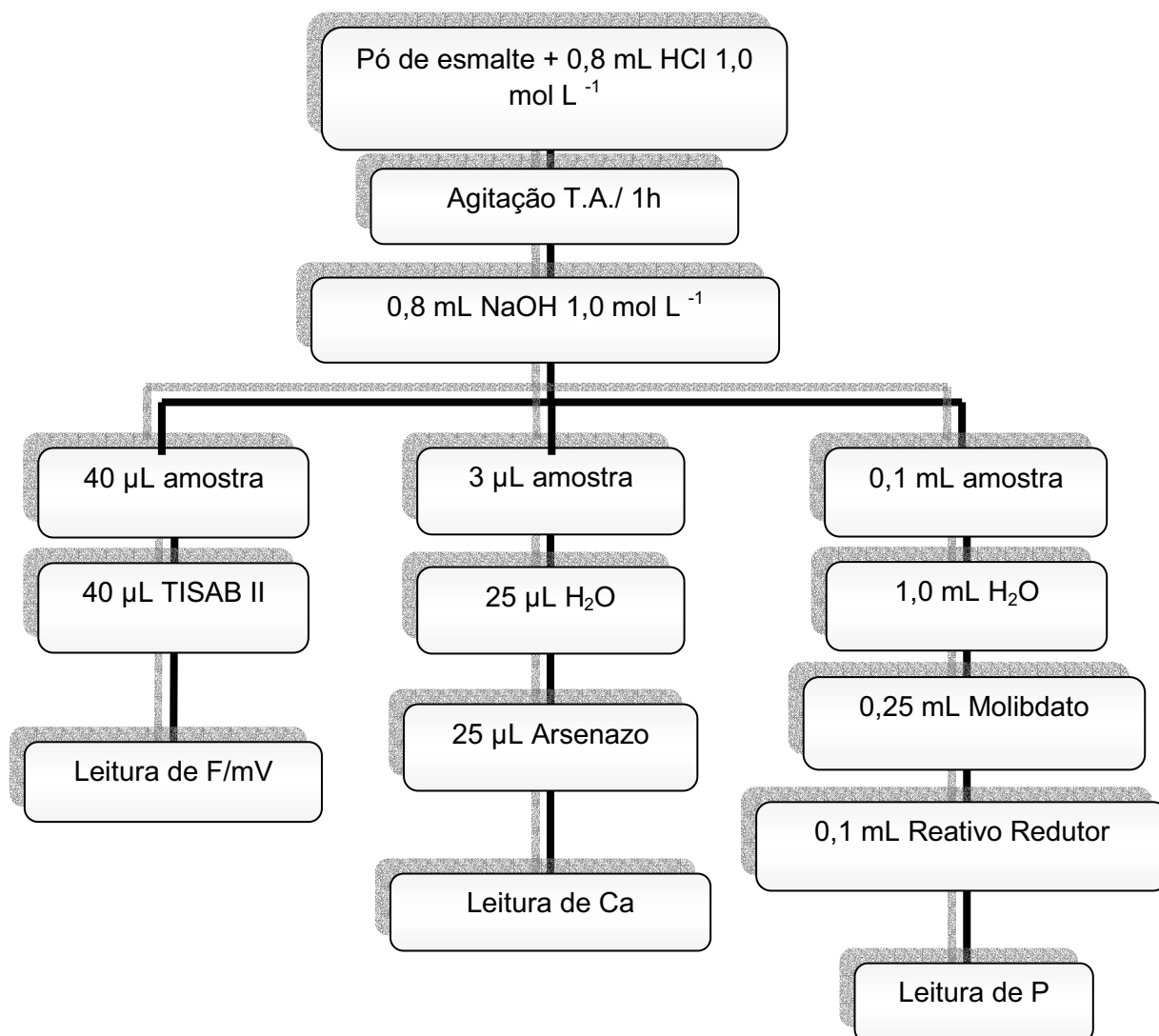


6. As leituras de absorvância na análise da concentração de cálcio no esmalte foram realizadas em leitor de placas, (PowerWave 340, Biotek a 650 nm).



7. As leituras de absorvância na determinação da concentração de fósforo do esmalte foram realizadas a 660 nm, no espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1100 (Hitachi High Technologies, Minato-ku, Tokyo, Japan).

ANEXO N
ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE F, CA E P NO ESMALTE



ANEXO O
PESO DA PLACA DENTAL FORMADA

Tabela – Peso total do biofilme (mg) de cada voluntário por tratamento e valores médios, desvio-padrão e erro-padrão de acordo com os dentifrícios experimentais.

| Voluntários | Peso Biofilme (mg) | | | |
|--------------|--------------------|------|----------|-------|
| | Placebo | 500 | 500 GPCa | 1,100 |
| 1 | 61,4 | 61,6 | 37,4 | 28,9 |
| 2 | 58,3 | 30,4 | 52 | 38,5 |
| 3 | 47,8 | 14,1 | 41,8 | 22,7 |
| 4 | 43,2 | 51,2 | 46,3 | 39,9 |
| 5 | 27,8 | 25,1 | 21,7 | 16,1 |
| 6 | 71,5 | 36,8 | 34,3 | 58,6 |
| 7 | 16,3 | 11,2 | 24,6 | 7,1 |
| 8 | 52,4 | 48,4 | 38 | 26,1 |
| 9 | 35,4 | 23,4 | 12,2 | 37,9 |
| 10 | 79,5 | 57 | 81,7 | 52,8 |
| Média | 49,4 | 35,9 | 39 | 32,9 |
| DP | 19,5 | 17,9 | 19,2 | 15,9 |
| ep | 6,2 | 5,7 | 6,1 | 5 |

ANEXO P

MÉDIA DA DUREZA DE SUPERFÍCIE INICIAL E FINAL

Tabela – Média da dureza de superfície inicial e final dos voluntários em cada tratamento

| Voluntários | Análise - SMH | | | | | | | |
|--------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Inicial | | | | Final | | | |
| | Placebo | 500 | 500 GPCa | 1,100 | Placebo | 500 | 500 GPCa | 1,100 |
| 1 | 354,0 | 354,4 | 354,0 | 352,8 | 217,4 | 239,1 | 317,1 | 305,1 |
| 2 | 352,8 | 354,0 | 354,8 | 353,4 | 129,0 | 242,5 | 280,1 | 295,1 |
| 3 | 352,9 | 354,0 | 353,2 | 354,3 | 205,9 | 301,1 | 312,6 | 318,2 |
| 4 | 353,8 | 352,0 | 353,1 | 356,2 | 106,4 | 214,3 | 253,2 | 296,6 |
| 5 | 351,9 | 353,5 | 353,1 | 355,2 | 224,3 | 280,3 | 308,8 | 312,1 |
| 6 | 354,5 | 353,7 | 354,5 | 356,1 | 231,2 | 292,8 | 309,2 | 311,7 |
| 7 | 355,5 | 352,1 | 353,9 | 356,3 | 230,9 | 271,9 | 302,5 | 312,0 |
| 8 | 354,9 | 353,8 | 355,8 | 354,3 | 177,1 | 278,9 | 312,9 | 286,4 |
| 9 | 353,8 | 355,1 | 356,9 | 355,8 | 150,5 | 273,1 | 314,4 | 313,0 |
| 10 | 357,3 | 354,1 | 356,0 | 355,4 | 160,7 | 212,3 | 313,3 | 299,9 |
| Média | 354,3 ^{a†} | 353,6 ^a | 354,5 ^a | 354,9 ^a | 183,4 ^{a‡} | 260,6 ^b | 302,4 ^c | 305,0 ^c |
| DP | 1,5 | 0,9 | 1,3 | 1,2 | 42,9 | 29,9 | 19,2 | 9,6 |

*Não há diferença entre as médias calculadas (ANOVA, $p=0,133$). †Letras distintas mostram diferença entre as médias calculadas (Kruskal-Wallis, $p<0,0001$).

ANEXO Q

CONCENTRAÇÃO DE F, Ca, P E PEC NA PLACA E F, Ca E P NO ESMALTE DENTAL

Tabela 1– Valores (média \pm DP, n=10) da concentração (μ g/g) de fluoreto (F), cálcio (Ca), fosfato (P) e polissacarídeos extracelulares (PEC) presente na placa dentária de acordo com os dentifrícios.

| Dentifrícios | Análise | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | F | Ca | P | PEC |
| Placebo | 3,6 \pm 1,0 ^{a*} | 0,54 \pm 0,08 ^a | 0,19 \pm 0,10 ^a | 53,6 \pm 11,6 ^a |
| 500 | 6,7 \pm 2,2 ^b | 0,82 \pm 0,37 ^b | 0,36 \pm 0,16 ^b | 38,2 \pm 11,2 ^a |
| 500 GPCa | 9,4 \pm 6,0 ^b | 1,09 \pm 0,19 ^c | 0,52 \pm 0,21 ^c | 20,6 \pm 12,2 ^a |
| 1100 | 15,2 \pm 8,0 ^{c*} | 1,29 \pm 0,52 ^c | 0,59 \pm 0,26 ^c | 19,9 \pm 12,8 ^a |

*Letras distintas mostram diferença entre as médias calculadas em cada análise (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

Tabela 2– Valores (média \pm DP, n=10) da concentração (μ g/g) de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fosfato (P) presente no esmalte dentário de acordo com os dentifrícios.

| Dentifrícios | Análise | | |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | F | Ca | P |
| Placebo | 0,54 \pm 0,05 ^{a*} | 883 \pm 127,3 ^a | 211,7 \pm 33,8 ^a |
| 500 | 0,82 \pm 0,17 ^b | 979,9 \pm 89,2 ^b | 274,3 \pm 44,8 ^b |
| 500 GPCa | 0,84 \pm 0,26 ^b | 1137,0 \pm 92,7 ^c | 294,9 \pm 47,7 ^b |
| 1100 | 1,27 \pm 0,43 ^c | 1124,0 \pm 107,7 ^c | 279,3 \pm 40,1 ^b |

*Letras distintas mostram diferença entre as médias calculadas em cada análise (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

ANEXO R

PERDA INTEGRADA DE DUREZA DE SUBSUPERFÍCIE

Tabela – Média de dureza integrada de subsuperfície por voluntários, de acordo com cada tratamento.

| Voluntários | Δ KHN | | | |
|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| | Placebo | 500 | 500GPCa | 1100 |
| 1 | 4024,5 | 1723,3 | 588,4 | 557,4 |
| 2 | 5452,9 | 1270,6 | 279,6 | 398,4 |
| 3 | 7066,9 | 1852,1 | 313,5 | 301,0 |
| 4 | 5885,5 | 1415,4 | 331,3 | 381,1 |
| 5 | 6523,4 | 1929,6 | 284,9 | 508,5 |
| 6 | 5959,8 | 2659,8 | 423,5 | 490,4 |
| 7 | 6845,5 | 1986,6 | 711,9 | 460,4 |
| 8 | 3633,0 | 3651,0 | 310,4 | 452,5 |
| 9 | 5022,3 | 2719,5 | 586,9 | 558,8 |
| 10 | 6111,8 | 3127,2 | 212,5 | 281,9 |
| média | 5652,6 | 2233,5 | 404,3 | 439,1 |
| dp | 1140,6 | 773,3 | 167,1 | 97,3 |