

Edo Hirata

**POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO
DO CÁLCIO E FOSFATO
REVISÃO DE LITERATURA E
ESTUDO LABORATORIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para a
obtenção do título de Doutor em

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

**Araçatuba
2006**

Dados Curriculares

Edo Hirata

Nascimento	25 de janeiro de 1966
Filiação	Noemi Milazzo Hirata Kiuro Hirata
1984/1987	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2002	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
2000/2006	Professor da Disciplina de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Unipar, Umuarama, PR.
2001/2006	Professor Assistente da Disciplina de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR.

A Deus,

A Deus, responsável pela existência, presente entre nós, por me ter dado condições de alcançar este momento inesquecível.

Dedico este trabalho também a meus pais, Kiuro e Noemi, exemplos do que é um alicerce dentro da família, que tudo fizeram nesta vida para que nunca me faltasse nada, com muito amor, respeito, dignidade. Sem eles, eu não teria chegado até aqui.

Aos meus queridos irmãos, Enzo e Denise, mesmo estando tão distantes, admiro-os e respeito. Sinto saudades.

À minha querida esposa, Francielle, companheira, namorada, amiga, amor da minha vida. Presente de Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Não tenho palavras para expressar minha gratidão. Grande amigo e mestre, agradeço pelo convívio, pela disponibilidade, paciência, compreensão e apoio quando me deparei com minhas dificuldades. Exemplo de pesquisador e pai dedicado, sempre solícito a ajudar a todos que o procuram com sinceridade. Obrigado pelo privilégio de ser seu orientado. Daqui somente levo lições e momentos positivos.

À família do Prof. Alberto, quando teve que se ausentar, até em fins de semana, para darmos continuidade aos trabalhos. Sem sua orientação isto não seria possível.

À Profa. Kikue Takebayashi Sasaki, docente responsável pela disciplina de Bioquímica, pessoa a quem admiro muito, extremamente capaz, pela disponibilidade, auxílio, atenção e paciência a mim dispensada em todos os momentos necessários, e que não foram poucos.

Aos meus amigos **professores Maria Daniela, Denise Davidoff, Adriano T. Hoshi, Fátima Tomazinho, Roberto Bombonati, Juliana Mugnai e Fabiola,** pela compreensão, disponibilidade.

À família da minha esposa, **Sr. Manoel e Sra. Valdeci,** pela torcida, apoio e incentivo.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do seu Diretor, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin, e Vice-Diretor, Prof. Dr. Célio Percinoto, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery, Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar, pela convivência e incentivo constantes.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por ter me oferecido muito dos seus conhecimentos.

Ao ex-aluno Maurício Bergamaschi, por ter me auxiliado no laboratório e por estar sempre disponível para me ajudar.

Aos amigos do Laboratório, Ana Elisa de Mello Vieira, Ana Valéria Pagliari, Carlos Eduardo Shimabucoro, Eliana Rodrigues, Fernanda Lourenço Brighenti, Felipe Alberto Lino Oliveira, Gilberto Carlos Tiano, Kélio Garcia Silva, Marcelle Danelon, pela ajuda muitas vezes oferecida e pelos momentos felizes que vivemos juntos.

Aos amigos da turma de pós-graduação, Kélio Garcia Silva, Karine Takahashi, Karina Gerhardt Bianco, Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa, Rebeca Lima Afonso, e da turma seguinte, Ana Carolina Soares Fraga Zaze, Antonio Hernandez Chaves Neto, Gracieli Prado Elias, Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves, Luciana Reichert da Silva Assunção e Marcio José Possari dos Santos, Ana Elisa de Melo Vieira, Daniela Maria Carvalho Pugliesi, Eduardo Antonio de Souza, Fátima Ioko Mochidome, Sueli Satomi Murata, Alessandra Maia de Castro, Cíntia Megid Barbieri, Fabíola Lemos Melhado, Karina Silva Moreira Macari, Leila Maria Casario Pereira Pinto e Mauricio Bergamaschi, pelo relacionamento durante o curso.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva, pela disposição em ajudar sempre que necessário.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Alexandra Bento, Ana Cláudia Grieger Manzatti, Cláudia de Souza Frare, Cláudio Hideo Matsumoto, Helena Sumika Sanomiya Otsuki, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez, Marina Alves dos Santos, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Francisco Inácio Pinheiro, Adélia Barreto Claro da Silva, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria de Queiroz Zagatto, pela disposição, atenção e paciência que nunca deixaram de faltar.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelos ensinamentos transmitidos e pela convivência.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da Unipar, Prof. Dr. Laerte Brehm, pelo apoio e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação e Cultura, pela concessão de Bolsa de Estudo.

Àqueles que contribuíram com a minha formação mas que não tiveram seus nomes citados,

Meu muito obrigado!

**Lembra-te do teu Criador nos dias da tua mocidade, antes que venham os maus dias, e cheguem os anos dos quais dirás: Não tenho neles prazer; antes que se escureçam o sol, a lua e as estrelas do esplendor da tua vida , e tornem a vir as nuvens depois do aguaceiro; no dia em que tremerem os guardas da casa, os teus braços, e se curvarem os homens outrora fortes, as tuas pernas, e cessarem os teus moedores da boca, por já serem poucos, e se escurecerem os teus olhos nas janelas; e os teus lábios, quais portas da rua, se fecharem; no dia em que não puderes falar em alta voz, te levatares à voz das aves, e todas as harmonias, filhas da música, te diminuírem ; como também quando temeres o que é alto, e te espantares no caminho , e te embranqueceres, como floresce a amendoeira, e o gafanhoto te for um peso, e te perecer o apetite; porque vais à casa eterna, e os pranteadores andem rodeando pela praça; antes que se rompa o fio de prata, e se despedace o copo de ouro, e se quebre o cântaro junto à fonte, e se desfaça a roda junto ao poço, e o pó volte à terra, como o era, e o espírito volte a Deus, que o deu.
Vaidade de vaidade, diz o Pregador, tudo é vaidade.**

Potencial de remineralização do cálcio e fosfato. Revisão de literatura e estudo laboratorial. [Tese. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2006].

RESUMO GERAL

A descoberta do efeito preventivo do flúor* transformou esse material, ao longo do século XX, no principal agente responsável pela queda de prevalência de cárie, em vários países. Existem fortes evidências de que produtos fluoretados são os principais responsáveis pelo declínio observado na prevalência da cárie, e também pelo aumento na incidência de fluorose dental. Se pudéssemos diminuir sua concentração, sem perder efeito cariostático, sua margem de segurança seria maior ainda. O cálcio e fosfato fazem parte, juntamente com o flúor, do processo de equilíbrio mineral entre esmalte e saliva. A busca dos efeitos anticárie do cálcio e fosfato datam da década de 1960, quando alimentos foram enriquecidos com estes elementos. Experimentos com compostos contendo cálcio e/ou fosfato vêm sendo estudados, com o objetivo de compreendermos melhor os efeitos do cálcio e fosfato e a possibilidade do aumento de seu uso em produtos fluoretados. Na primeira parte do trabalho, realizamos uma revisão com tópicos relevantes para a compreensão de seu potencial anticariogênico. Na segunda parte, realizamos experimento *in vitro* para avaliar o potencial de remineralização de um dentífrico de baixa concentração de flúor suplementado com cálcio e fosfato. Pode-se concluir que a suplementação de dentífricos fluoretados, com cálcio e fosfato, é mais um recurso na prevenção da cárie.

Palavras-chave: Cálcio. Fosfato. Dentífrico. Esmalte dental. Flúor. Cárie dental. Prevenção

*Termo genérico para definir as formas químicas iônicas (fluoreto ou íon solúvel), ionizáveis e não ionizável (ligado covalentemente) do elemento flúor.

Cálcio e fosfato na prevenção da cárie.**

Edo Hirata

Araçatuba, SP, Brasil

Resumo:

O uso de flúor* foi o grande responsável pela queda na prevalência da cárie nos últimos anos, porém, grande parte da população ainda sofre com consequências e seqüelas desta doença. A busca por um aliado no combate à cárie tem impulsionado pesquisas em várias direções, incluindo uso de antimicrobianos, substitutos do açúcar e agentes remineralizantes.

Os efeitos da suplementação de alimentos (pão, cereais, geléia, gomas de mascar, leite, mel) e outros produtos, como dentifrícios fluoretados, com combinações de cálcio e fosfato, têm sido estudados com o objetivo de reduzir a incidência de cárie tanto em animais como em humanos. Com o objetivo de compreender melhor os efeitos do cálcio e fosfato e a possibilidade do aumento de seu uso em produtos fluoretados, realizamos uma revisão com tópicos relevantes para a compreensão de seu potencial anticariogênico. Verificou-se que o uso do cálcio e fosfato fazem parte, juntamente com o flúor, do processo de equilíbrio mineral: esmalte e biofilme; considerações teóricas indicam que cálcio e fosfato, em quantidades adequadas, podem diminuir a dissolução do esmalte; experimentos com compostos contendo cálcio e/ou fosfato vêm estudando a supersaturação na saliva e biofilme destes elementos com objetivo de aumentar a proteção do esmalte. Pode-se concluir que cálcio e fosfato têm grande importância nos eventos de desmineralização e remineralização do esmalte dental, e a possibilidade de aplicação da ação preventiva destes dois elementos tornou possível o desenvolvimento de novos produtos, alimentares e de uso odontológico, fornecendo opções para o tratamento e a prevenção da cárie.

Palavras-chave: Cálcio. Fosfato. Dentifrício. Esmalte dental. Flúor. Cárie dental. Prevenção

**Termo genérico para definir as formas químicas iônicas (fluoreto ou íon solúvel), ionizáveis e não ionizável (ligado covalentemente) do elemento flúor. **Formato de publicação para “The Journal of Clinical Dentistry” anexo N.*

Calcium and phosphate in caries prevention

Edo Hirata

Araçatuba, SP, Brazil

Abstract:

The use of fluoride* was largely responsible for the drop in caries prevalence over the last few years, however, a great part of the population still suffers from its consequences and sequelae. The search for an ally to combat caries has impelled research in several directions, including the use of antimicrobial agents, sugar substitutes, food supplements and remineralizing agents.

The effects of food supplements (bread, cereals, jellies, chewing gums, milk, honey) and other products, such as fluoridated dentifrices, with combinations of calcium and phosphates have been studied with the object of reducing caries incidence in animals and humans. With the object of having a better understanding of the effects of calcium and phosphate and the possibility of increasing their use in fluoridated products, a review was made of relevant topics to understand their anticariogenic potential. It was found that the use of calcium and phosphate, together with fluoride, forms part of the mineral balance process: enamel X saliva and/or biofilm; theoretical considerations indicate that calcium and phosphate, in adequate amounts in the biofilm, may diminish enamel dissolution; experiments with calcium- and/or phosphate-containing compounds have been studying supersaturation of these elements in saliva and biofilm, with the object of increasing enamel protection. It may be concluded that calcium and phosphate are of great importance in tooth enamel demineralization and remineralization events, and the possibility of applying the preventive action of these two elements, has made it possible to develop new products, both food and for use in dentistry, providing more treatment and caries prevention options.

Key Words: Calcium. Phosphate. Dentifrice. Tooth enamel. Fluoride. Dental caries. Prevention

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível que acompanha a humanidade desde tempos imemoriais, e ainda hoje é problema de saúde pública¹. A descoberta do efeito preventivo do flúor transformou esse material, ao longo do século XX, no principal agente utilizado no enfrentamento da doença em todo o mundo. Em vários países produtos fluoretados tem sido apontados como os principais responsáveis pelo declínio na prevalência da cárie^{2,1,3,4} e também pelo aumento na incidência de fluorose dental.^{5,6,7,8}

Entretanto, a manifestação da doença cárie ainda é alta em alguns indivíduos. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma porcentagem de crianças com muitos dentes atacados pela cárie^{9,10,3}. Além das crianças, ela atinge também a população adulta, principalmente lesões de superfície radicular, pois a recessão gengival acompanha o processo de envelhecimento da população¹¹. Nestes grupos que ainda sofrem com a doença cárie, novos recursos para tratamento e prevenção são extremamente importantes para o seu controle.

O efeito anticárie do flúor tem limites. Embora ele tenha capacidade de interferir tanto na desmineralização como na remineralização, ele não impede totalmente a desmineralização, e, ao mesmo tempo, a remineralização pode ser limitada pela quantidade de cálcio e fosfato¹². A busca por um aliado no combate à cárie tem impulsionado pesquisas em várias direções, incluindo uso de antimicrobianos, substitutos do açúcar, suplementação de alimentos e agentes remineralizantes^{13, 14}. O flúor apresenta mais vantagens do que desvantagens, mas com o risco de ingestão crônica e o conseqüente aumento da fluorose dental, seria interessante reduzir sua concentração nos produtos, mantendo seu efeito anticárie.

O uso do cálcio e fosfato pode tornar isto possível, pois fazem parte, juntamente com o flúor, do processo de equilíbrio mineral: esmalte e biofilme. Considerações teóricas indicam que cálcio e fosfato, em quantidades adequadas no biofilme, podem diminuir a dissolução do esmalte¹⁵. Com objetivo de aumentar a proteção do esmalte dental, tem sido estudado compostos ricos em cálcio e

fosfato, na tentativa de aumentar a supersaturação destes elementos na saliva e/ou biofilme.^{15, 16,17,18,19}

Com o objetivo de compreender melhor os efeitos do cálcio e fosfato e a possibilidade do aumento de seu uso em produtos fluoretados, realizamos uma revisão de literatura com tópicos relevantes sobre sua ação. Abordou-se assuntos como: conteúdo mineral do esmalte dental, processo da cárie e sua dinâmica, flúor e o equilíbrio mineral, cálcio e fosfato ampliando a ação do flúor, fontes de cálcio e/ou fosfato e dentifrícios com fontes de cálcio e fosfatos solúveis ou dentifrícios suplementados.

CONTEÚDO MINERAL DO ESMALTE

O esmalte dentário é um tecido acelular altamente mineralizado, no qual cristais microscópicos de fosfato de cálcio compreendem 99% do peso seco. Os cristais assemelham-se à hidroxiapatita(HAP) [Tabela 1], de forma que o cálcio, fosfato e anions de hidroxila estão organizados num padrão repetitivo na estrutura do cristal. Inclusões de carbonato, sódio, flúor e outros íons fazem dele uma forma impura de mineral. Assim os cristais de esmalte diferem da hidroxiapatita pura, pois eles contêm vários íons inorgânicos contaminantes. Por exemplo, nos cristais de esmalte alguns íons fosfato podem ser substituídos por íons carbonato e, os íons hidroxila, pelo flúor²⁰.

Enquanto a apatita geralmente é encontrada nos tecidos biológicos duros, tais como esmalte dental, os fosfatos de cálcio podem existir em outras formas de mineral, cada um com suas propriedades [Tabela 1], por exemplo, bruchita- $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, β fosfato tricálcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e o fosfato octacálcio – $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)2.5\text{H}_2\text{O}$ ^{21,22}.

<Tabela 1 (página 42)>

No pH 7,4 a hidroxiapatita pura (HAP) é o mineral de fosfato de cálcio mais estável. Entretanto, depois da erupção do dente, o esmalte mais externo fica exposto a uma grande variação do pH através dos efeitos da dieta e do biofilme,

na presença ou não de flúor, o que causa as alterações iônicas na estrutura mineral²².

Se flúor estiver disponível, é possível que ocorra a substituição de todos os grupos hidroxila por F no cristal, formando fluorapatita pura (FAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$. Entretanto, as substituições geralmente são parciais, formando fluorhidroxiapatita (FHAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{FOH})_2$. Estas alterações fisicoquímicas na HAP, por substituição parcial ou completa dos grupos hidroxila, resultam num aumento da estabilidade do cristal e diminuem sua suscetibilidade à dissolução ácida durante os desafios cariogênicos²⁰.

O PROCESSO DA CÁRIE: UM PROCESSO DINÂMICO

O processo da cárie envolve perda mineral da superfície do dente e depende das características de solubilidade do esmalte e de outros fatores relacionados ao meio ambiente bucal²³. A destruição de parte do tecido dental mineralizado (esmalte ou dentina) é provocada pela dissolução mineral do dente por ácidos orgânicos produzidos pela ação dos microorganismos do biofilme sobre o carboidrato da dieta. Na medida em que o açúcar é convertido em ácidos pelas bactérias (bioprodutos), ocorre uma redução do pH, tornando o meio subsaturado em relação ao mineral dentário.

O esmalte é uma superfície porosa e uma aparente falta de atividade na sua superfície “esconde” uma constante troca de elementos entre o esmalte e o meio bucal. Como o esmalte é composto principalmente por cálcio e fosfato¹⁷, o pH e a atividade iônica de cálcio e fosfato no fluido do biofilme são determinantes da estabilidade da superfície mineral. Com a queda no pH a fase mineral torna-se instável causando a dissolução do esmalte, processo este chamado desmineralização. Nessa situação, os ácidos orgânicos difundem-se para o interior do esmalte, via espaços interprismáticos e dissolvem os cristais de apatita. Tal processo é caracterizado pela perda de cálcio e de fosfato do esmalte para o

meio. A desmineralização irá prosseguir até que o pH e a atividade de força iônica do cálcio e fosfato alcancem níveis que tornem a fase mineral estável.

O fluido do biofilme, sob condições normais, tem o pH próximo ao neutro e contém excesso de íons cálcio e fosfato, criando condições de supersaturação com relação à fase mineral do esmalte¹². Durante estas condições, ocorre precipitação de minerais para reparar o dano causado durante períodos de desmineralização. Este processo é chamado por *remineralização*.

A formação de uma lesão de cárie e o seu progresso ocorre quando os períodos de desmineralização são mais freqüentes do que os de remineralização. Desta forma a doença se caracteriza por um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização que ocorrem de forma localizada no esmalte. No início deste processo, pequenas perdas minerais no esmalte não são visíveis clinicamente, porém a lesão existe. À medida que a desmineralização prevalece, o esmalte dental continua perdendo mineral formando-se uma mancha branca opaca.

As lesões iniciais de cárie podem ser reparadas com elementos presentes no meio oral, que são a supersaturação com relação ao fosfato de cálcio na saliva e fluido do biofilme e o flúor¹⁷. Portanto uma estratégia da prevenção e/ou tratamento da cárie é criar condições que minimizem o dano causado pela desmineralização favorecendo a remineralização.

FLÚOR E O EQUILÍBRIO MINERAL

No passado acreditava-se que quanto mais flúor fosse incorporado ao esmalte dental, durante a sua formação e mineralização, na forma de fluorapatita, maior seria sua resistência aos ácidos. A submissão de dentes de tubarão e humanos sob um mesmo desafio cariogênico mostra a formação de lesão de cárie com menor intensidade no esmalte de tubarão²⁴. O esmalte de tubarão é um substrato interessante, pois é composto principalmente por FAP. Porém, quando o esmalte humano é submetido à terapêutica com solução de fluoreto de sódio a 0,2%, a desmineralização é menor do que no esmalte de tubarão²⁵. Comparando

os resultados, percebe-se que o flúor presente no meio é mais importante que o ligado estruturalmente ao esmalte.

Durante a desmineralização, na presença de baixa concentração de flúor no meio, o cálcio e fosfato liberados reagem com o flúor tornando o meio supersaturado em relação à FAP, levando à reprecipitação do mineral (remineralização) na forma de FAP e/ou fluorhidroxiapatita (FHAP). Este mecanismo diminui a perda mineral e torna a superfície externa do esmalte mais resistente aos ácidos, pois o pH crítico para a FAP ($\text{pH} < 4,5$) é significativamente menor do que o da HAP ($\text{pH} < 5,5$). Em pH fisiológico, a força de precipitação da FAP é maior do que da HAP, mesmo em concentrações de 0,01 ppm F²⁶. Por ser um agente eficaz tanto na desmineralização quanto na remineralização, o flúor é muito utilizado^{27,28,29,30,26,23}.

Quando se aplica flúor sobre os dentes por métodos tópicos profissionais (gel, verniz ou espuma) ou caseiros (dentifrícios ou soluções para bochecho) formam-se depósitos de flúor adsorvidos às estruturas, isto é, ocorre formação de fluoreto de cálcio (CaF_2). O composto é estável no meio bucal devido à presença de uma “película protetora”, rica em fosfato e proteínas, advindo da saliva. Nesta situação, a liberação de flúor é pH dependente, ou seja, quando ocorre queda do pH a “película protetora” se dissolve e libera flúor e cálcio para o meio. Conseqüentemente, o flúor torna-se disponível em momentos de maior necessidade, isto é, durante os desafios cariogênicos^{26,20}. Além disso, fluoreto de cálcio, durante desafios cariogênicos, será exposto a fosfatos ácidos, o que pode resultar na conversão do fluoreto de cálcio para FHAP²³.

O CÁLCIO E O FOSFATO AMPLIANDO A AÇÃO DO FLÚOR

Por ser uma fonte natural de cálcio e fosfato para a remineralização, a saliva age como uma defesa natural contra a doença cárie^{31, 15}. Entretanto, a propriedade defensiva da saliva depende das variações de pH e da concentração de cálcio e fosfato no meio, que determinarão o limite de sua capacidade de proteção dos dentes^{32, 20}. A saliva só consegue manter suas propriedades defensivas do esmalte desde que o pH igual e/ou maior que 5,5 (pH crítico para o

esmalte)³³. Assim, na ausência de flúor, a capacidade da saliva em promover uma boa remineralização fica limitada^{15, 22}. Pequenas concentrações de flúor são efetivas em promover a formação de HAP quando a solução está supersaturada com cálcio e fosfato³⁴. Como as estruturas minerais dos dentes são formadas principalmente por cálcio e fosfato, estes têm papel importante nos eventos físico-químicos que ocorrem entre o biofilme em contato com o tecido duro³¹.

O cálcio é um íon bivalente excretado junto com as proteínas salivares, com concentração dependente do fluxo salivar. O cálcio livre ou ionizado tem papel importante nos eventos de des- e remineralização, pois é esta fração que toma parte no equilíbrio de fosfatos de cálcio entre o tecido dental duro e o biofilme. Esta porção ionizada constitui cerca de 50% do cálcio total e é dependente do pH da saliva. Cerca de 10-25% do fosfato inorgânico na saliva está agregado a íons inorgânicos como o cálcio dependendo de fatores como o pH³¹. Altos níveis de fosfato têm sido associados com baixas taxas de cárie³⁵.

O flúor é mais efetivo em inibir a dissolução da HAP quando cálcio e fosfato estão presentes no meio. As reações químicas que ocorrem durante a desmineralização são determinadas pela supersaturação de cálcio e fosfato e a presença ou não de flúor no biofilme.²³ O flúor aumenta a remineralização, mas depende da supersaturação do meio por cálcio e fosfato¹⁶. Com a manutenção de níveis elevados de cálcio e fosfato durante períodos de desafio cariogênico, a dissolução do esmalte poderia ser inibida e a remineralização aumentada³⁶, potencializando a defesa natural da saliva.

Concentrações diferentes de cálcio promovem supersaturação de formas diferentes de fosfato de cálcio no meio bucal. Uma solução contendo 1mmol/L cálcio aumenta em 2,3 vezes a remineralização, reduzindo a área da lesão, quando comparado a uma solução remineralizante contendo 3 mmol/L cálcio. A solução com 3 mmol/L cálcio fica supersaturada em relação a várias fases minerais (DCPD, OCP, HAP, TCP) [Tabela 1] com rápida precipitação destas fases minerais na superfície da lesão. A solução de 1 mmol/L cálcio promove supersaturação em relação à HAP, penetrando em profundidade na lesão com redução de 25% da área desmineralizada. Com a adição de 1 ppm de flúor na

solução de 1 mmol/L cálcio, ocorreu uma redução de 72% da área desmineralizada²³.

FONTES DE CÁLCIO E/OU FOSFATO E MECANISMO DE AÇÃO

Os efeitos dos derivados de fosfato de cálcio têm sido estudados desde a década de 1930. A hipótese é que o aumento na incidência da cárie dentária tem uma relação com o consumo de alimentos industrializados. O processamento de alimentos acarretou a diminuição do “efeito protetor natural” dos alimentos, especificamente com a perda do fosfato de cálcio^{37, 38,39}. Assim, voltou o interesse em estudar o efeito anticariogênico dos fosfatos de cálcio. Suas características de grande solubilidade sugerem que estas associações podem servir de fonte adicional de cálcio e fosfato e um possível efeito cariostático⁴⁰. Vários tipos de fosfatos têm sido testados em relação a seu potencial anticariogênico e segurança⁴¹.

Na busca por um aditivo cariostático aos alimentos, surgiu a hipótese de que o DCPD adicionado aos alimentos poderia ter tal efeito.

Seria apropriado introduzir cálcio e fosfato exatamente durante o desafio cariogênico. Tal efeito cariostático poderia ser via biofilme, isto é, o DCPD provocaria um aumento nas concentrações de cálcio e fosfato durante a mastigação, afetando os gradientes de difusão entre o esmalte, biofilme e saliva^{42, 43}. Os efeitos da suplementação de alimentos (pão, cereais, geléia, gomas de mascar, leite, mel) com várias combinações de cálcio e fosfato têm sido estudados com o objetivo de reduzir a incidência de cáries em experimentos animais e humanos^{44,45,40,46}.

Os fosfatos de cálcio estudados na literatura podem ser divididos em dois grupos: inorgânicos e orgânicos. Tatevossian, Edgar e Jenkins⁴⁷ (1975) avaliaram a influência de vários tipos de fosfatos, e apenas os fosfatos orgânicos provocaram maior aumento da concentração de fosfato no biofilme formado.

Talvez isto explique os resultados negativos de alguns trabalhos utilizando fosfatos de cálcio adicionados à dieta.

As fontes mais estudadas de cálcio e/ou fosfatos são: Lactato de Cálcio^{48,49,38,51}, Glicerofosfato de Cálcio^{52,5,53,54,55,56,57,58,59}, Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP^{62,63,64,65,20,66,67,68}, Trimetafosfato de Cálcio – TMP^{69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,16,81,82,83,17,84,85,86,87,39,67}, Fosfato-Tricálcico (α e β) – TCP⁸⁸, Carbonato de Cálcio^{59,89,90} e Cloreto de Cálcio¹⁶. Estes são adicionados em alimentos, gomas de mascar, soluções de bochechos, gel tópico fluoretado e dentifrícios fluoretados.

Os fosfatos de cálcio agem fornecendo íons cálcio e fosfato [Whitford et al., 2002], que interagem diretamente com o aumento da incorporação de flúor no interior da lesão de cárie durante a remineralização^{85,70,17} reduzindo a solubilidade do esmalte^{57,85,70,71}, aumentando a capacidade tampão do biofilme⁹¹, reduzindo a quantidade de biofilme⁵³, modificando o metabolismo da biofilme através da elevação das concentrações de cálcio e fosfato^{55,54} e potencializando a remineralização^{89,90}.

A importância da concentração de íons minerais no biofilme tem sido observada por alguns autores^{47,78,59}. O biofilme funciona como um reservatório de cálcio, fosfato e flúor quando ocorre queda de pH^{83,92}. Os estudos mostram que o aumento destes íons no biofilme está associado à redução da porosidade do esmalte e aumento da remineralização, com o uso de soluções para bochecho e dentifrícios fluoretados com fosfato de cálcio^{75, 16,85}.

Além de o cálcio participar ativamente do processo de des/remineralização (equilíbrio dinâmico entre a fase mineral e saliva), parece que ele tem relação direta na retenção de flúor pelo biofilme. Publicações recentes⁹³ encontraram evidências de que a retenção de flúor no biofilme é dependente da concentração de cálcio presente. Outras pesquisas têm fornecido evidências que suportam esta relação direta^{94,95,96} sugerindo que o flúor é atraído pelo cálcio fixando-o no biofilme. Rose et al.^{97, 98,99} [1994, 1996,1997] relatam que o cálcio pode estar ligado a várias espécies de microorganismos presentes no biofilme. Kato et al.¹⁰⁰

[1997] relataram que existe forte relação direta entre cálcio, fósforo e flúor, em várias secções do biofilme.

Apesar do mecanismo anticárie ser semelhante às demais fontes de fosfato de cálcio, o fosfato de cálcio amorfo (ACP), estabilizado por um fosfopeptídeo da caseína derivada do leite (CPP), tornou a ideia de fornecer cálcio e fosfato mais racional⁶¹. Seu efeito cariostático é devido à ação química da fosfoproteína caseína, que tem capacidade de estabilizar fosfato de cálcio na solução através de ACP. Isto leva à formação de pequenos “clusters” de CPP-ACP⁶⁸. Os fosfopeptídeos de caseína são peptídeos multifosforilados, derivados do leite de vaca. Assim o CPP estabiliza os íons cálcio e fosfato em solução como um fosfato de cálcio amorfo. O CPP pode reter até 25 íons cálcio, 15 íons fosfato e 5 íons flúor por molécula²⁰. O CPP-ACP fica ligado à superfície do dente e, durante desafios cariogênicos pode liberar cálcio, fosfato e flúor, mantendo a supersaturação dos íons nas proximidades, diminuindo a desmineralização e aumentando a remineralização^{101,102,68}, resultando em um esmalte remineralizado mais resistente a ataques ácidos^{63,66,67}.

O CPP-ACP promove aumento dos pontos de adesão na película do biofilme e à superfície de bactérias, para o cálcio e fosfatos inorgânicos^{103,104}, tornando a difusão dos íons mais lenta, reduzindo a perda mineral.

Estudos de dissolução *in vitro* têm demonstrado que pequena alteração na concentração de cálcio tem um efeito bem maior quando comparado ao fosfato na desmineralização. Embora o cálcio e o fosfato diminuam a desmineralização, é necessário vinte vezes mais fosfato do que cálcio para se conseguir efeitos semelhante¹⁰⁵. Estruturalmente um fosfato contém um átomo de fósforo rodeado por um tetraedro de um, dois ou três átomos de oxigênio que podem ser divididos com outros grupos fosfato próximos uns aos outros. Quando os átomos de oxigênio são ligados a outros grupos fosfato formam-se condensações mais complexas. Como resultado, suas propriedades podem ser diferentes umas das outras. Assim, Harris, Nizel e Walsh⁶⁹ (1967) avaliaram o efeito cariostático de cinco tipos de anions de fosfato: simples (orto), cadeias (piro, tripoli e hexameta) e cíclicos (trimeta). O trimetafosfato apresentou o maior potencial cariostático

comparado a outros fosfatos, sendo que a sua ação se deve à capacidade tampão e age diretamente sobre o esmalte dental⁶⁹.

DENTIFRÍCIOS COM FONTES DE CÁLCIO E FOSFATO SOLÚVEIS

Embora o flúor tenha capacidade de interferir nos fenômenos de des- e remineralização, ele não é capaz de impedir totalmente a desmineralização. Por outro lado, a remineralização pode ser limitada pela disponibilidade de cálcio e fosfato no meio^{12,84,15}. Com a adição de cálcio e fosfato solúvel em dentifrícios e colutórios fluoretados pode-se esperar um aumento na eficácia do flúor na remineralização. Foi demonstrado anteriormente que a taxa de remineralização do esmalte aumenta com a quantidade de íons cálcio e fosfato na solução¹⁰⁶.

Entretanto, nem todas as fontes de cálcio e fosfato são compatíveis com o flúor do dentifrício. O DCPD não pode ser utilizado com fluoreto de sódio, pois DCPD utilizado como abrasivo dental é instável na presença de íon fluoreto, F⁻. Se esta reação ocorrer no dentifrício, a estabilidade e biodisponibilidade do flúor na formulação ficam comprometidas. No entanto, o MFP pode ser associado ao DCPD, pois são compatíveis⁷⁹.

A associação entre DCPD e fluoreto de sódio (NaF) é mais crítica, e a única forma de associação foi separando os dois produtos, isto é, duas fórmulas de dentifrício em um único tubo dispensador. Os dois dentifrícios não se misturam, pois ficam separados por uma membrana plástica que divide o tubo (embalagem) em dois compartimentos distintos. Numa das fórmulas temos o NaF 1100 ppm, e na outra o abrasivo DCPD, funcionando como fonte de cálcio, em torno de 48%. As duas fórmulas se misturam apenas no momento da utilização do dentifrício. Experimentos laboratoriais *in vitro* e com ratos demonstraram que tal “sistema” aumentou a absorção de flúor pelo esmalte, melhorou a remineralização, diminuiu a incidência de cárie, e foi demonstrado que o cálcio proveniente do abrasivo DCPD foi encontrado no esmalte remineralizado¹⁰⁷. Outros estudos clínicos e longitudinal, acompanhando, durante dois anos, escolares que utilizaram este tipo

de sistema, verificaram sua superioridade em relação ao dentifrício convencional, 1100 ppm sem suplementação e associado com sílica como abrasivo^{108,109}.

Inicialmente a inclusão do DCPD na composição de dentifrícios tinha uma função abrasiva, porém observou-se uma ação mais ampla deste produto. Estudos *in vivo* relatam que o dentifrício fluoretado 1100 (MFP) associado ao DCPD aumentou a remineralização de lesões de cárie em profundidade, quando comparado a um dentifrício placebo, com mesma concentração de flúor, mas utilizando a sílica como abrasivo^{77,83,84,85,86}. Observou-se, também, que o carbonato de cálcio (CaCO_3), utilizado como agente abrasivo em dentifrícios, associado ao MFP (1100 ppm), produz um aumento significativo na remineralização, e diminui a desmineralização, *in situ*, quando comparado a outro dentifrício com a mesma concentração de flúor, mas com sílica como abrasivo^{89,90}. Parece que o cálcio proveniente do carbonato de cálcio potencializou a remineralização, quando comparado ao dentifrício com sílica.

Estudos *in vitro*, demonstraram que a adição de cálcio, na forma de cloreto de cálcio (CaCl_2) ou DCPD, ao monofluorfosfato 1100 ppm (MFP) aumenta significativamente a remineralização^{110, 111} e a incorporação de flúor no esmalte¹¹⁰. Posteriormente, resultados semelhantes foram alcançados *in vivo*⁷⁷ quando foram comparados três dentifrícios 1100 ppm de flúor: com MFP; com MFP e CaCl_2 , um placebo sem flúor, e um grupo não tratado. O dentifrício com MFP: CaCl_2 promoveu 46% maior incorporação de flúor no esmalte que o grupo tratado apenas com MFP e maior remineralização da lesão de cárie. Segundo os autores, a diferença entre os grupos só não foi maior porque a saliva forneceu cálcio e fosfato para o grupo tratado apenas com MFP. Entretanto, a concentração de cálcio iônico na saliva e no fluido do biofilme não foi suficiente para alcançar a relação molar Ca:MFP 0,5 necessária para conseguir o máximo efeito¹¹¹.

Ainda assim, novas tecnologias têm desenvolvido produtos diferenciados. É o caso dos dentifrícios fluoretados com cálcio e fosfato solúveis, assegurando a disponibilidade destes íons para a remineralização. Schemehorn et al.¹⁵ (1999) testaram um dentifrício designado para aumentar a remineralização através da suplementação de cálcio e fosfato. No caso, são dois tipos de dentifrícios contidos

em um tubo que se misturam apenas no momento de seu uso. Um contém o fluoreto de sódio 1100 ppm (NaF) e fosfato, e o outro contém o cálcio. Uma vez aplicado e misturado, a supersaturação das concentrações dos íons cálcio, fluoreto e fosfatos são temporariamente estabilizados na solução até que ocorra a penetração destes nos poros do esmalte desmineralizado. Os pesquisadores encontraram resultados satisfatórios, pois o dentifrício remineralizante aumentou a dureza superficial do esmalte quatro vezes mais que o controle (dentifrício com flúor sem suplementação). O conteúdo de flúor no esmalte tratado com o dentifrício experimental foi 100% maior do que o controle. Efeito semelhante foi encontrado em dentifrícios com MFP/NaF com DCPD e um dentifrício MFP/NaF com um abrasivo a base de sílica⁸³. O MFP apresenta a vantagem de ser compatível com o cálcio contido nos abrasivos existentes nos dentifrícios, incluindo o DCPD. O cálcio proveniente do abrasivo ativa a absorção de flúor tanto pelo esmalte como pela dentina. No dentifrício em que o DCPD está ausente, há formação de fluorapatita, mas a mesma é limitada, pois o flúor é subutilizado devido ao limite de cálcio disponível para a formação de apatita.

Com as observações de que o cálcio e fosfato solúveis, associados ao flúor, aumentam a remineralização e incorporação de flúor, foram desenvolvidos novos dentifrícios com este objetivo. Até então não havia dentifrícios combinando NaF com formas solúveis de cálcio e fosfato, provavelmente por causa da grande instabilidade dos íons, reação química que ocorre entre cálcio e flúor formando sais insolúveis, tornando o flúor indisponível. Assim, uma nova formulação foi realizada a fim de combinar íons cálcio, fosfato e flúor, de modo que as suas propriedades fossem conservadas. Na realidade são dois tipos de fórmulas de dentifrício em um tubo dispensador. Uma delas contém sulfato de cálcio (2941 ppm Ca), a outra, fosfato de amônia diidratado (9278 ppm PO₄), mais flúor na forma de NaF [1130 ppm F]. Estas duas fórmulas não entram em contato até o momento de sua utilização. O nome comercial é Enamelon[®] (Cranbury, NJ). A fórmula foi baseada na idéia de que o flúor só não é mais efetivo porque a disponibilidade de cálcio e fosfato no meio são limitadas, e se suplementações destes dois íons pudessem ser fornecidos à saliva, sem insolubilizá-los, os efeitos

do flúor podem ser aumentados¹¹². Este novo dentifrício foi testado em experimentos animais, e foi comprovada uma grande capacidade de remineralização de lesões iniciais de cárie, maior do que os dentifrícios denominados “convencionais”^{113,114,115,15}. O NaF foi o tipo de flúor escolhido, em detrimento do MFP, devido à sua aparente superioridade na remineralização¹⁵ [Schemehorn e Winston, 1999]. Portanto, parece que o cálcio na saliva e/ou fluido do biofilme está envolvido nos mecanismos *in vivo* de reações do MFP com o esmalte desmineralizado [Mellberg e Chomiki, 1985].

Conclusões

A remineralização do esmalte nem sempre foi reconhecida na odontologia. Na realidade, até a década de 1960 não se conhecia o conceito de desmineralização-remineralização. Os estudos submetiam o esmalte ao ataque ácido e ao tratamento com produtos fluoretados. Só a partir da década de 1980 é que o conceito foi desenvolvido e reconhecido. A grande maioria dos pesquisadores desenvolvia os seus trabalhos verificando o efeito do flúor em inibir a desmineralização. A partir da década de 1990 o enfoque mudou e os trabalhos avaliavam a efetividade de vários agentes em ambos os processos, desmineralização e remineralização.

A remineralização envolve a difusão de íons cálcio, fosfato e fluoreto na lesão de cárie incipiente, seguido pela precipitação de fosfatos de cálcio. O uso de soluções com alta concentração destes íons poderia criar um gradiente de concentração elevado, o que aumentaria a difusão dos íons envolvidos. Ao mesmo tempo, a maior concentração de cálcio e fosfato aumentaria a precipitação de fosfatos de cálcio em diferentes fases (DCPD, TCP, ACP), precursores da apatita.

É muito provável que o mecanismo anticárie do cálcio e fosfato esteja relacionado ao aumento dos níveis de cálcio e fosfatos no biofilme, reduzindo assim o efeito da subsaturação durante os desafios cariogênicos. Ao mesmo

tempo, o cálcio e o fosfato adicionais aumentam o efeito do flúor presente, aumentando assim o efeito anticárie. Podemos concluir que fontes extras de cálcio e fosfato, adicionadas aos produtos utilizados para prevenção e tratamento da doença cárie e suas seqüelas vêm para potencializar o efeito remineralizante do flúor. A adição de fosfato de cálcio em dentifrício padrão (1000-1500 ppm F) reduz a desmineralização e potencializa a remineralização e incorporação de flúor, aumentando a resistência do esmalte. Isto pode estimular a adição de fosfato de cálcio em dentifrícios com menor concentração de flúor, mantendo a efetividade do produto semelhante a um padrão. Isto traria vantagens para o uso em crianças, reduzindo a ingestão de flúor e melhorando a relação dose-resposta-benefício.

Os sistemas e compostos apresentados aqui fornecem várias opções para o tratamento e prevenção da doença cárie. A capacidade de se fornecer materiais remineralizadores na forma de gel, dentifrícios, colutórios, gomas de mascar, e até mesmo pastilhas, fornecerá ao clínico uma grande variedade de produtos para a remineralização. No futuro, pode-se imaginar que os clínicos irão prescrever ou aplicar produtos altamente efetivos, que não irão apenas prevenir a formação de novas lesões de cárie, mas também reparar as lesões incipientes, até mesmo aquelas em estágio subclínico.

Referências Bibliográficas

1. Narvai PC: Dental caries and fluorine: a twentieth century relation. *Ciência e Saúde Coletiva* 2000; 5: 381-392.
 2. Rolla G, Saxegaard E: Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. *J Dent Res* 1990; 69 Spec No: 780-785.
 3. Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Paes Leme, AF: The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J* 2004; 15: 167-174.
 4. Stookey GK, Mau MS, Isaacs RL, Gonzalez-Gierbolini C, Bartizek RD, Biesbrock AR: The relative anticaries effectiveness of three fluoride-containing dentifrices in Puerto Rico. *Caries Res* 2004; 38: 542-550.
 5. Horowitz HS: The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentrations for preschool-aged children. *J Public Health Dent* 1992; 52: 216-221.review.
 6. Pang DT, Vann WF Jr: The use of fluoride-containing toothpastes in young children: the scientific evidence for recommending a small quantity. *Pediatr Dent* 1992; 14:384-7.
 7. Mascarenhas AK: Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; 22: 269-77.
 8. Cochran JA, Ketley CE, Duckworth RM, van Loveren C, Holbrook WP, Seppa L, Sanches L, Polychronopoulou A, O'Mullane DM: Development of a standardized method for comparing fluoride ingested from toothpaste by 1.5-3.5-year-old children in seven European countries. Part 2: ingestion. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004; 32 suppl: 47-53.
 9. Micheelis W, Bauch J: Oral health of representative samples of Germans examined in 1989 and 1992. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1996; 24: 62-67.
-

-
10. Featherstone, JDB: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27:31-40.
 11. Beck JD: The epidemiology of root caries: North American studies. *Adv Dent Res* 1993; 7:42-51.
 12. Larsen MJ, Fejerskov, O: Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 1989; 97: 285-96.
 13. Clarkson BH, Rafter ME. Emerging methods used in the prevention and repair of carious tissues. *J Dent Educ* 2001; 65: 1114-1120.
 14. Fejerskov O, Kidd, EAM: Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Editora Santos, 2005, 388p.
 15. Schemehorn BR, Orban BS, Wood GD, Fischer GM: Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent* 1999; 10 SpecNo: 13-6.
 16. Pearce EIF, Nelson DGA: In vivo comparison of caries inhibition by a plaque mineral enriching mouthrinse and a fluoride dentifrice. *Caries Res* 1988; 22: 362-370.
 17. Gaffar A, Blake-Haskins J, Mellberg J: In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. *Int Dent J* 1993; 431 (Suppl):81-8.
 18. Kashket S: Historical review of remineralization research. *J Clin Dent* 1999; 10:56-64.
 19. Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL: Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res* 2005; 39:100-107.
 20. Hicks MJ, Garcia-Godoy F, Flaitz CM: Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part2). *J Clin Ped Dent* 2004b; 28: 119-124.
-

-
21. Dorozhkin SV, Epple M: Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed* 2002; 54: 3130-3146.
 22. Ten Cate J M, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O: Interações químicas entre o dente e os fluidos orais. Cap.4., In: Fejerskov O, Kidd EAM: *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico*. São Paulo: Editora Santos, 2005, 388p.
 23. Hicks MJ, Garcia-Godoy F, Flaitz CM: Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part3). *J Clin Ped Dent* 2004c; 28: 203-214.
 24. Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Duckma T, Arends J: Microradiographic study of demineralization of shark enamel in human caries model. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 209-211, 1988.
 25. Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Duckma T, Arends J: Effect of fluoride mouthrinsing on caries lesion development in shark enamel: an in situ caries model study. *Scand J Dent Res* 1991; 99: 372-377.
 26. Ten Cate J M: Current concepts on the theories of mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol. Scand* 1999; 57: 325-329.
 27. Mellberg JR: Penetration of fluorine from sodium monofluorophosphate into artificially produced incipient enamel lesions. *Caries Res* 1980; 14: 115-120.
 28. White DJ, Featherstone, JDB: A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res* 1987; 21: 502-512.
 29. White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987; 21: 126-140.
 30. Shellis RP, Duckworth RM: Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *International Dental Journal* 1994; 44: 263-273.
 31. Lagerlof F, Oliveby A: Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res* 1994; 8: 229-238.
-

-
32. Hicks MJ, Garcia-Godoy F, Flaitz CM: Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and -remineralization (part2). *J Clin Ped Dent* 2004a; 28: 47-42.
 33. Larsen MJ: Degrees of saturation with respect to apatites in parotid saliva at various pH values. *Scand J Dent Res* 1975; 83: 7-12.
 34. Gibbs CD, Atherton SE, Huntington E, Lunch RJ, Duckworth R M: Effect of low levels of fluoride on calcium uptake by demineralized enamel. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 879-881.
 35. Shaw L, Murray JJ, CK Burchhell, Best JS: Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res* 1983; 17: 543-548.
 36. Duckworth, R M The science behind caries prevention. *Int Dental J* 1993; 43: suppl 1, 529-539.
 37. Osborn TWB, Noriskin JN, Staz J: A comparison of crude and refined sugar and cereals in the ability to produce in vitro decalcification of teeth. *J Dent Res* 1937a;16:165-171.
 38. Osborn TWB, Noriskin JN, Staz J: Inhibition in vitro of decalcification in teeth. *J Dent Res* 1937b; 16:545-550.
 39. Lingstrom P, Holm AK, Mejare I, Twetman S, Soder B, Norlund A, Axelsson S, Lagerlof F, Nordenram G, Petersson LG, Dahlgren H, Kallestal C: Dietary factors in the prevention of dental caries: a systematic review. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 331-340.
 40. Stralfors A: The effect of calcium phosphate on dental caries in school children. *J Dent Res* 1964; 43: 1137-1143.
 41. Harris RS, Nizel AE: Metabolic significance of the ratio of calcium to phosphorus in foods and diets. *J Dent Res* 1964; 43: 1090-1096.
-

-
42. Ashley FP, Wilson RF: Effect of sweets supplemented with dicalcium phosphate on dental plaque composition. *Caries Res* 1977; 11:336-344.
 43. Rankine CAN, Prihoda TJ, Etzel KR, Labadie D: Plaque fluid ph, calcium and phosphorus responses to calcium food additives in a chewable candy. *Archs Oral Biol* 1989; 34: 821-824.
 44. Nizel AE, Harris, RS: The effects of phosphates on experimental dental caries: a literature review. *J Dent Res* 1964; 43: 1123-1136.
 45. Averill HM, Bibby BG: A clinical test of additions of phosphate to the diet of children. *J Dent Res* 1964; 43:1150-1155.
 46. Reussner GH, Galimidi A, Coccodrilli Jr G: Effects of calcium on smooth surface carious lesion in rats. *Brit Dent J* 1977; 1: 90.
 47. Tatevossian A, Edgar WM, Jenkins GN: Changes in the concentrations of phosphates in human plaque after the ingestion of sugar with and without added phosphates. *Archs Oral Biol* 1975; 20: 617-625.
 48. Shrestha BM, Mundorff SA, Bibby BG: Preliminary studies on calcium lactate as an anticaries food additive. *Caries Res* 1982; 16:12-17.
 49. Van der Hoeven JS. Effect of calcium lactate and calcium lactophosphate on caries activity in programme-fed rats. *Caries Res* 1985; 19:368-370.
 50. Kashket S, Yaskell T: Effectiveness of calcium lactate added to food in reducing intraoral demineralization of enamel. *Caries Res* 1997; 31: 429-433.
 51. Suda R, Suzuki T, Takiguchi R, Egawa K, Sano T, Hasegawa K: The effect of adding calcium lactate to xylitol chewing gum on remineralization of enamel lesions. *Caries Res* 2006; 40: 43-46.
 52. Brook A H, Gawthorpe J, Winter GB: Calcium glycerophosphate and dental plaque. *Caries Res* 1975; 9:156-162.
 53. Nordbo H, Rolla G: Desorption of salivary proteins from hydroxiapatite by phitic acid and glycerophosphate and the
-

-
- plaque-inhibition effect of the two compounds in vivo. *J Dent Res* 1972;51:800-811.
54. Grenby TH, Bull JM: Protection against dental caries in rats by glycerophosphates or calcium salts or mixtures of both. *Archs Oral Biol* 1975; 20: 717-724.
 55. Duke SA, Rees DA, Foward GC: Increased plaque calcium and phosphorus concentrations after using a calcium carbonate toothpaste containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate. *Caries Res* 1979; 13:57-59.
 56. Naylor MN, Glass RL: A three-year clinical trial of a calcium carbonate dentifrice containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate. *Caries Res* 1979; 13:39-46.
 57. Grenby TH, Bull JM: Use of high-performance liquid chromatography techniques to study the protection of hydroxylapatite by fluoride and glycerophosphate against demineralization in vitro. *Caries Res* 1980;14:221-32.
 58. 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.
 59. Sidi AD, Wilson RF: Fluoride, calcium and inorganic phosphorus concentrations in approximal plaque collected from young adults 1 and 24 h after toothbrushing with fluoride toothpastes. *Caries Res* 1991; 25: 330-334.
 60. Tung MS, Markovic M, O'Farrel, TJ: Effects on saliva of chewing gums containing amorphous calcium phosphates. *J. Dent. Res* 1994; 73 SI: 340.
 61. Reynolds EC: Advances in enamel remineralization: casein phosphopeptide – amorphous calcium phosphate. *J Clin Dent* 1999; 10: 8688.
 62. Tung MS, Eichmiller FC: Dental applications of amorphous calcium phosphates. *J Clin Dent.* 1999; 10 Spec No:1-6. Review.
 63. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free
-

-
- chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2001; 80: 2066-2070.
64. Cai F, Morgan MV, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Aust Dent J* 2003; 48: 240-243.
 65. Mazzaoui SA: Incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass-ionomer cement. *J Dent Res* 2003; 82:914-918.
 66. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC: Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004; 38: 551-6.
 67. Itthagarun A, King NM, Yiu C, Dawes C: The effect of chewing gums containing calcium phosphates on the remineralization of artificial caries-like lesions in situ. *Caries Res* 2005; 39 :251-4.
 68. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK: Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006; 34:230-236.
 69. Harris RS, Nizel, AE, Walsh NB: The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 1967; 46: 290-294.
 70. Gonzalez M: Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *J Dent Res* 1971; 50: 10565-1064.
 71. Gonzalez M, Jeansonne, BG, Feagin FF: Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. *J Dent Res* 1973; 52: 261-266.
 72. Finn SB, Frew RA, Leibowitz, F, Morse W, Manson-Hing L, Brunelle, J: The effect of sodium trimetaphosphate (TMP) as a chewing gum additive on caries increments on children. *JADA* 1978; 96: 651-655.
-

-
73. Ingram GS, Best JS: Studies on the anticaries action of sodium trimetaphosphate. *J Dent Res* 1982; 91:556.
 74. Tatevossian A, Jenkins GN, Edgar WM: Local effect of therapeutic agents on plaque composition. *J Dent Res* 1975; 54 Special Issue: B34-B39.
 75. Pearce EIF: Effect of plaque mineralization on experimental dental caries. *Caries Res* 1982; 16: 460-471.
 76. Hong YC, Chow LC, Brown, WE: Enhanced fluoride uptake from mouthrinses. *J Dent Res* 1985; 64: 82-84.
 77. Mellberg JR, Chomiki WG, Mallon DE, Castrovince, LA: Remineralization in vivo of artificial caries lesions by a monofluorophosphate dentifrice. *Caries Res* 1985; 19: 126-135.
 78. Pearce EIF, Moore AJ: Remineralization of softened bovine enamel following treatment of overlying plaque with a mineral-enriching solution. *J Dent Res* 1985; 64: 416-421.
 79. Aponte-Merced L, Navia JM, Gaffar A, Fine N: Uptake of ⁴⁵Ca from a topically-applied monofluorophosphate sodium fluoride calcium hydroxide dentifrice by rat enamel. *Archs Oral Biol* 1987;32:17-20.
 80. Takagi S, Chow LC, Yamada EM, Brown WE. Enhanced enamel F uptake by monocalcium phosphate monohydrate gels. *J Dent Res* 1987; 66:1523-1526.
 81. Wefel JS, HAarless JD: The use of saturated DCPD in remineralization of artificial caries lesions in vitro. *J Dent Res*: 66: 1640-1643.
 82. Margolis HC, Moreno EC: Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res* 1992; 71: 1176-1184.
 83. De Paola PF: Clinical studies on MFP/calcium containing abrasive. *Int Dent J* 1993; 43 Suppl 1:89-96.
-

-
84. Zhang YP, Din CS, Miller S, Nathoo SA, Gaffar A. Intra-oral remineralization of enamel with a MFP/DCPD and MFP/silica dentifrice using surface microhardness. *J Clin Dent* 1995; 6: 148-153.
 85. Sullivan RJ, Charig A, Blake-Haskins J, Zhang YP, Miller SM, Strannick M, Gaffar A, Margolis HC: In vivo detection of calcium from dicalcium phosphate dihydrate dentifrices in demineralized human enamel and plaque. *Adv Dent Res* 1997; 11: 380-387.
 86. Koo RH, 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: 245-249.
 87. Takagi S, Liao H, Chow LC: Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/ remineralization in vitro. *Caries Res* 2000; 34: 281-288.
 88. Vogel GL et al.: Composition of plaque and saliva following a sucrose challenge and use of an α -tricalcium-phosphate-containing chewing gum. *J Dent Res* 1998; 77: 518-524.
 89. Cury JA, Francisco SB, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2003; 37: 194-199.
 90. Cury JA, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Goncalves NC, Tabchoury CP: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on in situ enamel remineralization. *Caries Res*. 2005; 39: 255-257.
 91. Bowen WE: The cariostatic effect of calcium glycerophosphate in monkeys. *Caries Res* 1972; 6: 43-51.
 92. Mellberg, JR: Remineralization. A status report for the American Journal of Dentistry. Part 1. *Am J Dent* 1988; 1: 39-43.
 93. Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* 2002; 36: 256-265.
 94. Schamschula RG, Bunzel M, Agus HM, Adkins BL, Barmes DE, Charlton G: Plaque minerals and caries experience: associations and interrelationships. *J Dent Res* 1978; 57: 427-432.
-

-
95. Rølla G: Effects of fluoride on initiation of plaque formation. *Caries Res* 1977;11(suppl 1):243–261.
 96. Rolla G, Bowen WH: Concentration of fluoride in plaque, a possible mechanism. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 149-151.
 97. Rose RK, Hogg SD, Shellis RP: A quantitative study of calcium binding by isolated streptococcal cell walls and lipoteichoic acid: Comparison with whole cells. *J Dent Res* 1994;73:1742–1747.
 98. Rose RK, Shellis RP, Lee AR: The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996;30:458–464.
 99. Rose RK, Turner SJ, Dibdin GH: Effect of pH and calcium concentration on calcium diffusion in streptococcal model-plaque biofilms. *Arch Oral Biol* 1997;42:795–800.
 100. Kato K, Nakagaki H, Takami Y, Tsuge S, Ando S, Robinson C: A method for determining the distribution of fluoride, calcium and phosphorus in human dental plaque and the effect of a single in vivo fluoride rinse. *Archs Oral Biol* 1997; 42: 521-525.
 101. Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 1997; 76: 1587-1595.
 102. Reynolds EC: Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Special Care Dentistry* 1998; 18: 8-16.
 103. Rose RK: Effects of an anticariogênico casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 569-575.
 104. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD: Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003; 82: 206-211.
 105. Tanaka M, Kadoma Y: Comparative reduction of enamel demineralization by calcium and phosphate in vitro. *Caries Res* 2000; 34: 241-245.
-

-
106. Feagin F, Patel PR, Koulourides T, Pigman W Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces Arch Oral Biol 1971; 16: 535-548.
 107. Sullivan RJ, Masters J, Cantore R, Roberson A, Petrou I, Stranick M, Goldman H, Guggenheim B, Gaffar A. Development of an enhanced anticaries efficacy dual component dentifrice containing sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate. Am J Dent 2001; 14: 3A-11A.
 108. Silva, M. F. A. et al., The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in Brazil. Am J Dent 2001; 14: 19A-23A.
 109. Boneta, A. E. et al., The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in the United States of America. Am J Dent 2001; 14: 13A-16A.
 110. Mellberg JR, Chomiki WG: Effect of soluble calcium on fluoride uptake by enamel from sodium monofluorophosphate. J Dent Res 1982; 61:1394-6.
 111. Mellberg JR, Mallon, DE: Soluble calcium-enhanced remineralization of artificial caries lesion with monofluorophosphate. Caries Res 1984; 18: 416-420.
 112. Winston AE. The origins of Enamelon remineralizing fluoride toothpaste. J Clin Dent. 1999;10(1 Spec No):7-8.
 113. Thompson, A., Grant, L. P., Tanzer, J. M. Model for assessment of carious lesion remineralization, and remineralization by a novel toothpaste. J Clin Dent 1999; 10: 34-39.
 114. Grant, L. P., Thompson, A., Tanzer, J.M Caries inhibition in rats by a remineralizing toothpaste. J Clin Dent 1999; 10: Spec No, 30-3.
 115. Mundorff-Shrestha S. A., Proskin H. M., Winston A. E., Triol, C. W., T.Sharpe G. C. Cariostatic effect of a two-part fluoride dentifrice in rats. J Clin Dent. 1999;10(1 Spec No):26-9.
-

Tabela 1 - Propriedades físicas relevantes do ortofosfatos de cálcio^[a].

Relação molar Ca/P	composto	fórmula	Solubilidade a 25° C	Solubilidade a 37° C	Ph estabilidade Solução a 25° C
0,5	Fosfato de cálcio monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	Sem dados	0,0-2,0
0,5	Fosfato de cálcio anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	Sem dados	[d]
1,0	Fosfato dicálcio dihidratado (DCPD, brushita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	6,63	2,0-6,0
1,0	Fosfato dicálcio anidro (DCPA, monotita)	CaHPO_4	6,90	7,02	[d]
1,33	Fosfato octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,9	95,9	5,5-7,0
1,5	α - fosfato tricálcio (α TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	25,5	[b]
1,5	β - fosfato tricálcio (β TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	29,5	[b]
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_n \cdot \text{nH}_2\text{O}$	[c]	[c]	[e]
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \quad (0 < x < 1)$	85,1	85,1	6,5-9,5
1,67	Hidroxiapatita (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	117,2	9,5-12
2,0	Fosfato tetra cálcio (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38-44	37-42	[b]

[a] a solubilidade é dada como logaritmo do produto do íon com concentrações em mol L^{-1} . [b] estes compostos não podem ser precipitados de soluções aquosas. [c] Não pode ser medido com precisão. Entretanto os seguintes valores são reportados: $25,1 \pm 0,1$ (pH 7,40), $29,9 \pm 0,1$ (pH 6,0), $32,7 \pm 0,1$ (pH 5,28). [d] estável a temperaturas acima de 100° C. [e] A composição do precipitado depende do pH e composição da solução. Fonte: Dorozhkin e Eppler, 2002.

Avaliação do efeito de um dentifrício com flúor (450 ppm) suplementado com cálcio e fosfato, na remineralização “in vitro” do esmalte bovino utilizando saliva artificial e água como meios de diluição*.

Edo Hirata

Araçatuba, SP, Brasil

Resumo:

O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de um dentifrício de baixa concentração (450 µg F/g, NaF) suplementado com cálcio e fosfato, sobre a remineralização. Blocos de esmalte bovino tiveram sua superfície de esmalte polida seqüencialmente para determinação da microdureza de superfície (SMH). Lesões artificiais de cárie foram produzidas e os blocos selecionados através da microdureza de superfície (SMH₁). Estes foram submetidos à ciclagem de pH (Re>Des) e tratamento diário (2x) com suspensões de dentifrícios (diluição em água destilada/deionizada ou saliva artificial): placebo, 275, 450S, 550 e 1100 µg F/g e com dentifrício comercial (controle positivo, 1100 µg F/g). Ao término, determinou-se a microdureza da superfície (SMH₂) e em secção longitudinal para cálculo da recuperação da microdureza de superfície (%SMH) e do conteúdo mineral (ΔZ). Os resultados de SMH₂, %SMH e ΔZ dos blocos tratados com dentifrícios diluídos em saliva apresentaram-se maiores quando comparados aos diluídos em água (p<0,05), exceto para o dentifrício suplementado 450 µg F/g (p>0,05). Em relação aos valores de ganho mineral (ΔZ), os dentifrícios 450S e controle positivo apresentaram resultados semelhantes (p>0,05). Conclui-se que é possível potencializar a capacidade remineralizadora de um dentifrício de baixa concentração de flúor através da suplementação com fontes de cálcio e fosfato.

Palavras-chave: Dentifrício. Esmalte dentário. Flúor. Cálcio. Fosfato. Prevenção. Cárie dentária

*Formato de publicação para “Caries Research”, anexo M.

Assessment of a dentifrice with fluoride (450 ppm), calcium and phosphate for “*in vitro*” remineralization of bovine enamel, using artificial saliva and water as means of dilution*.

Edo Hirata

Araçatuba, SP, Brazil

Abstract:

The aim of this study was to make an “*in vitro*” assessment of the effect of a low concentration (450 µg F/g, NaF) dentifrice supplemented with calcium and phosphate, on remineralization. The enamel surfaces of bovine enamel blocks were sequentially polished to determine surface microhardness (SMH). Artificial caries lesions were produced and the blocks were selected by surface microhardness (SMH₁). Next, they were submitted to pH cycling (Re>Dem) and daily treatment (2x<) with dentifrice suspensions (diluted in distilled / deionized water or artificial saliva): placebo, 275, 450S, 550 and 1100 µg F/g and with commercial dentifrice (positive control, 1100 µg F/g). At the end, the surface microhardness was determined (SMH₂) and in longitudinal section, the variation in surface microhardness (%SMH) and mineral content (ΔZ) was calculated. The result of SMH₂, %SMH and ΔZ of the blocks treated with dentifrices diluted in saliva presented higher values in comparison with those diluted in water (p<0.05), except for the dentifrices with 450 µg F/g (p>0.05). With regard to the mineral gain values (ΔZ), the 450S and positive control dentifrices presented similar results (p>0.05). It was concluded that it is possible to potentiate the remineralizing capacity of a low fluoride concentration dentifrice through supplementing it with sources of calcium and phosphate.

Key Words: dentifrice, tooth enamel, fluoride, calcium, phosphate, dental caries and prevention.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que o uso indiscriminado de dentifrícios contendo flúor seja o principal fator na diminuição da incidência da doença cárie dentária em todo o mundo [Thylstrup e Fejerskov, 2001; Ellwood e Fejerskov, 2005]. Desde baixas a altas concentrações de flúor têm sido testadas, mas observou-se que o efeito benéfico do flúor tem limites. Não se podem aumentar indefinidamente as concentrações de flúor dos dentifrícios sob o risco de efeitos adversos como a fluorose dental, nem mesmo diminuir sem o risco de perder seu efeito cariostático [Davies et al., 2003]. Assim, seria interessante a utilização de dentifrício com menor concentração de flúor, porém mantendo a efetividade de um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g) com eficácia comprovada.

Sabe-se que o principal produto responsável pela ação anticariogênica de agentes tópicos de F é o fluoreto de cálcio (“CaF₂”) [Ogaard, 2001] e que a sua formação depende da disponibilidade de cálcio e fosfato presentes no meio bucal. Logo, o flúor não é o único elemento químico favorável para promover a remineralização, sendo este efeito dependente da disponibilidade de cálcio e fosfato no local da lesão [Kardos et al., 1999] ou na saliva [Schemehorn, 1999a].

A pesquisa sistemática sobre a compatibilidade dos compostos de flúor com os constituintes convencionais dos dentifrícios ajudou no desenvolvimento de combinações novas e eficazes. Este desenvolvimento esteve centralizado em (a) mudar a concentração de F, (b) combinar mais de um composto contendo F e (c) adicionar outros agentes ativos, para, por exemplo, potencializar o efeito do F [Thylstrup e Fejerskov, 2001].

É razoável supor que, se uma concentração suplementar de íons cálcio e fosfato pudesse ser fornecida à saliva sem insolubilizar o flúor, a eficiência deste poderia ser aumentada [Cury et al., 2003; Winston, 1999]. A manipulação das concentrações de cálcio e fosfato dos produtos, junto com a do flúor, pode trazer resultados melhores com concentrações de flúor variadas. Assim, um dentifrício com menor concentração de F e rico em cálcio e fosfato poderia ser seguro com

relação à manutenção da prevenção de cáries e à diminuição da quantidade de F ingerido a partir desse produto.

Dentifrícios com fontes de cálcio e fosfato, em estudos *in vitro*, apresentaram desempenho superior quando comparados a outros produtos. Deve-se salientar que tais estudos diluíram os dentifrícios em água [Kardos, et al., 1999; Mellberg e Chomik, 1983; Schemehorn et al., 1999b]. Porém, em estudos *in situ* e *in vivo*, ambos materiais terão disponíveis cálcio e fosfato advindos da saliva, reduzindo a diferença entre os dentifrícios [Biesbrock, 1998].

Bergamaschi et al. (2003) verificaram que dentifrícios suplementados com cálcio e fosfato e concentração baixa de flúor foram efetivos em reduzir a perda mineral em esmalte bovino *in vitro*. O dentifrício com 450 µg F/g suplementado apresentou resultados semelhantes aos dentifrícios com 1100 µg F/g. Entretanto, deve-se verificar a efetividade do produto em promover a remineralização e, após, os dados devem ser confirmados através de estudos *in situ* e clínico.

Foi objetivo deste experimento avaliar, *in vitro*, dentifrício fluoretado (450 µg F/g) contendo fontes de cálcio e fosfato, na capacidade dos produtos em ativar a remineralização, utilizando como meios de diluição água destilada/deionizada ou saliva artificial.

MATERIAL E MÉTODO

Delineamento experimental

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos (Anexo B) estocados em solução de formol a 2% neutra durante 30 dias em temperatura ambiente [White, 1987]. Os blocos tiveram sua superfície de esmalte polida seqüencialmente (Anexo C), para determinação da microdureza de superfície (SMH) inicial (325,6 a 348,0 KHN). Lesões artificiais de cárie foram produzidas nos blocos de esmalte sendo selecionados os que apresentavam microdureza de superfície (SMH₁) entre 22,8 a 130,8 KHN. Estes foram divididos em doze grupos (n=10), de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios utilizados para tratamento (placebo, 275, 450S, 550 e 1100 µg F/g) e meio de diluição (água deionizada e saliva artificial). Um dentifrício disponível no mercado foi utilizado como controle positivo-Crest™. Os blocos foram submetidos a seis ciclagens de pH, para avaliar a capacidade dos dentifrícios em promover a remineralização, e ao tratamento duas vezes ao dia com os dentifrícios diluídos em água ou saliva. Após as ciclagens de pH, determinou-se a microdureza da superfície (SMH₂) e em secção longitudinal para cálculo da variação da microdureza de superfície (%SMH) e do conteúdo mineral (% vol. min.xµm). Considerou-se como fator de variação a concentração dos dentifrícios e o meio de diluição e, como variáveis, a SMH e conteúdo mineral (% vol. min.xµm).

Determinação de flúor nos dentifrícios

Os dentifrícios foram preparados pela Sara Lee Household and Body Care Research (The Netherlands) com a seguinte composição: goma de celulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarinato de sódio, óleo de menta, propilenoglicol, glicerina, sorbitol, olefina sulfonada, sílica hidratada e dióxido de titânio e fluoreto de sódio. Os dentifrícios com 450 µg F/g continham cálcio e

fosfato e os dentifrícios placebos continham os mesmos reagentes descritos acima, exceto fluoreto de sódio.

A determinação de flúor nos dentifrícios foi feita de acordo com Delbem et al. (2002) (Anexo A). Após diluição em água deionizada, uma amostra da suspensão foi tratada com HCl 2 mol L⁻¹ para mensuração do flúor total. Para determinação do flúor iônico, a suspensão foi centrifugada (906xg; 20 minutos) e um mesmo volume de TISAB II ("total ionic strength adjustment buffer", Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) foi adicionada à solução, e em 0,25 mL do sobrenadante acrescentou-se 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II para a dosagem de flúor iônico solúvel. A leitura do flúor foi realizada com eletrodo específico 9609 Orion (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) e analisador de íons 720 A⁺ Orion (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA), calibrado com padrões contendo 0,125 a 4,0 µg F/mL.

Indução da lesão artificial de cárie

Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha com exceção da superfície de esmalte (área = 16 mm²) e colocados individualmente em solução desmineralizante (1,3 mmol L⁻¹ Ca⁺⁺, 0,78 mmol L⁻¹ P em tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, 0,03 µg F⁻/mL, em pH 5,0; - 32 mL/bloco) por um período de 16 horas, a uma temperatura de 37°C, para produção de cárie [Queiroz, et al., 2003](ANEXO E). Os blocos foram submetidos à microdureza de superfície pós-desmineralização (SMH₁), sendo que as indentações distanciaram a 100 µm das impressões iniciais.

Ciclagem de pH (Re>Des) e tratamentos com dentifrícios

Blocos de esmalte bovino foram submetidos a ciclagens de pH simulando o processo de remineralização por seis dias a 37° C, baseado em Vieira et al. (2005). Estes foram divididos em doze grupos (n=10), de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios utilizado para tratamento (placebo, 275, 450S, 550 e 1100 µg F/g) e meio de diluição (água deionizada e saliva artificial). Um dentifrício disponível no mercado foi utilizado como controle positivo-Crest™.

Os blocos foram mantidos em solução remineralizante ("RE": 1,5 mmol L⁻¹ Ca, 0,9 mmol L⁻¹ P, 0,15 mol L⁻¹ KCl em tampão cacodilato 0,02 mol L⁻¹, em pH 7,0; 0,03 µg F/mL, 0,25 mL/mm²) por 22 horas e em solução desmineralizante (2,0 mmol L⁻¹ Ca e P em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, em pH 4,7; 0,04 µg F/mL, 0,75 mL/mm²) por 2 horas. O regime de tratamento com os dentifrícios consistiu na agitação por 1 minuto em 2,0 mL/bloco da suspensão de dentifrício diluído em água ou saliva (1:3 w/w), duas vezes ao dia (Anexo F). O volume das soluções RE e DES foram trocados uma vez ao dia.

Determinação de microdureza

Microdureza de superfície e em secção longitudinal foi determinada utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HVM-2000 [Zero, 1995], sob carga de 25 gramas/10 segundos. Para a microdureza de superfície inicial (SMH) foram realizadas cinco impressões eqüidistantes entre si 100 µm no centro do bloco (Anexo D), como descrito por Vieira et al. (2005). Após indução de cárie (SMH₁) e ciclagem de pH (SMH₂) realizaram-se cinco impressões a 100 µm da SMH, respectivamente (anexo G). A percentagem de variação da microdureza de superfície (% SMH) foi calculada [%SMH = ((SMH₂ – SMH₁)/ (SMH – SMH₁)) x 100].

Para a realização da microdureza em secção longitudinal, os blocos foram seccionados no centro e uma das metades incluída em resina acrílica e polida seqüencialmente (anexo H). Três seqüências de oito impressões a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte foram

realizadas na região central dos blocos, e outras duas 100 μm acima, 100 μm abaixo e de forma paralela à primeira seqüência (anexo I). As médias foram calculadas em cada distância e os valores convertidos em conteúdo mineral (% vol. min.), de acordo com Featherstone et al. (1983). Calculou-se a área integrada (% vol. min. x μm) do esmalte com lesão de cárie artificial (Z) e pós-ciclagem de pH (Z₁) [Ogaard et al., 1988; Arends and Ten Bosch, 1992; Sullivan et al., 1995] para a determinação do ganho mineral (ΔZ).

Análise estatística

Os dados obtidos de SMH, SMH₁ e SMH₂ (anexo J), o conteúdo mineral (% vol. min.) e ganho mineral (ΔZ) [anexo L], após comprovação de sua homogeneidade, foram submetidos à Análise de Variância seguida do teste de Tukey. Os resultados de %SMH mostraram-se heterogêneos, sendo submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas utilizando o software GMC versão 2002 (Campos, 2002) e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

As médias $\pm$ dp da concentração de flúor total e iônico (μ g F/g) nos dentifrícios placebo, 275, 450S, 550, 1100 e CrestTM foram, respectivamente: 17,4 $\pm$ 3,3 e 17,2 $\pm$ 1,4, 235,9 $\pm$ 12,2 e 235,8 $\pm$ 9,6, 449,9 $\pm$ 36,8 e 411,9 $\pm$ 12,8, 557,9 $\pm$ 21,3 e 558,2 $\pm$ 5,9, 1109,6 $\pm$ 31,4 e 1105,8 $\pm$ 11,1, 1115,1 $\pm$ 71,2 e 1109,4 $\pm$ 29,2. As médias de SMH e SMH₁ para os dentifrícios diluídos em água ou saliva estão dispostas na Figura 1 A e B, respectivamente. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos dentro de cada teste e meio de diluição ($p>0,05$).

Todos os grupos apresentaram aumento da SMH₂ após a ciclagem de pH. O aumento da microdureza foi diferente entre os grupos ($p<0,05$), exceto para os dentifrícios 450S e 1100 μ g F/g e o CrestTM ($p>0,05$), quando diluídos em água deionizada. Quando diluídos em saliva artificial, apenas os dentifrícios 1100 μ g F/g e o CrestTM apresentaram resultados semelhantes ($p>0,05$). Os resultados de %SMH foram semelhantes aos do SMH₂ (Figura 1C), sendo que os dentifrícios diluídos em saliva apresentaram maior %SMH quando comparados aos diluídos em água deionizada ($p<0,05$), exceto para o dentifrícios 450 μ g F/g ($p>0,05$).

Os valores de conteúdo mineral (% vol. min.) em profundidade no esmalte e de ganho mineral (ΔZ) estão descritos na Figura 2. Os dentifrícios 450S e 1100 μ g F/g e CrestTM apresentaram resultados semelhantes ($p>0,05$), independente das profundidades quando diluídos em água, mas não em saliva, diferindo dos demais ($p<0,05$). Os dentifrícios diluídos em saliva apresentaram valores maiores de ΔZ quando comparados aos diluídos em água deionizada ($p<0,05$), exceto para os dentifrícios 450 μ g F/g e CrestTM ($p>0,05$). O dentifrício 450 μ g F/g apresentou capacidade de remineralizadora (ΔZ) semelhante ao 1100 μ g F/g e CrestTM ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos adequados para a avaliação da eficácia anticárie de produtos fluoretados proporciona inúmeros benefícios, desde a identificação de novas formulações até a regulamentação das variações dos produtos já comercializados [White, 1992]. A função dos modelos de cárie *in vitro* é facilitar a geração de dados quantitativos suficientes para que se possam desenvolver pesquisas clínicas com segurança [Cummins, 1995]. A literatura mundial tem recomendado introduzir modificações nos modelos existentes com o objetivo de aprimorar a sensibilidade dos métodos [Cummins, 1995; Duckworth, 1995]. Além disso, as condições dos estudos *in vitro* podem ser cuidadosamente controladas, permitindo modificações na sensibilidade e dinâmica do modelo, aproximando-se do que ocorre na cavidade bucal.

Uma preocupação neste estudo foi comparar dois meios de diluição, água destilada/deionizada e saliva artificial, verificando se isto promoveria melhoras na sensibilidade do modelo. Diluindo os dentifrícios em saliva artificial, o modelo experimental introduz mais uma condição da cavidade bucal, isto é, uma fonte de íons cálcio e fosfato. O produto final de íons cálcio, fosfato e flúor nas suspensões dos dentifrícios diluídos em saliva artificial promoveu uma maior %SMH quando se comparou a concentração similar diluída em água. Os resultados dos dentifrícios 450S diluídos em água confirmam esta hipótese, pois apresentaram %SMH semelhante ($p>0,05$).

A disponibilidade de cálcio e fosfato, além de aumentar a remineralização na superfície do esmalte, promoveu um maior ganho mineral em profundidade (ΔZ), comparado ao controle [Blake-Haskins et al., 1992]. Apesar de a saturação de cálcio, fosfato e flúor na suspensão de saliva ser o fator responsável, o dentifrício CrestTM diluído em saliva não diferiu de sua suspensão em água. Isto pode ser devido à grande quantidade de fosfato disponível na formulação do CrestTM. Brighenti et al. [2006] encontraram 100x mais fosfato neste dentifrício em comparação aos dentifrícios experimentais ou de mercado. Isto sugere que a presença de fosfato nos dentifrícios tem uma participação no processo de remineralização, melhorando a eficácia dos produtos.

O produto final na suspensão aquosa produzido pelo dentifrício com 450S suplementado com cálcio e fosfato promoveu aumento da SMH_1 e %SMH semelhante aos grupos 1100 e Crest™. Entretanto, as suspensões em saliva produziram uma solução saturada de flúor, cálcio e fosfato com melhores resultados nos dentifrícios de maior concentração de flúor. O ganho mineral (ΔZ) produzido pelo dentifrício 450S foi equivalente aos grupos 1100 e Crest™, independente da diluição. Isto indica que a supersaturação de íons na suspensão em saliva promove uma maior precipitação de produtos rico em flúor, cálcio e fosfato na superfície do esmalte. Nestas condições fluorapatita, fluoreto de cálcio, Ca-hidroxiapatita, fosfato de cálcio amorfo ou vários tipos de fosfatos de cálcio e misturas destes sais poderiam precipitar sobre o esmalte dental, tornando-se fontes de cálcio e fosfato [Schemehorn et al., 1999b]. Os dados de conteúdo mineral a 50 μm de profundidade no esmalte (Figura 2B) do dentifrício 450S confirmam uma ação menor no interior do esmalte. A maior disponibilidade de cálcio e fosfato neste grupo foi suficiente para um incremento na atividade cariostática na presença de uma menor quantidade de flúor que a comumente utilizada (1100 μg F/g). É razoável afirmar a possibilidade de se utilizar um dentifrício com baixa concentração de flúor, suplementado com cálcio e fosfato, em crianças menores de 6 anos de idade, sendo mais uma ferramenta para reduzir a ingestão crônica de flúor e, conseqüentemente, a fluorose dental.

Deve-se observar, conforme Kardos, Shi e Sipos(1999), que o experimento *in vitro*, des- e remineralização, pode subestimar o efeito protetor do dentifrício. Isto porque os blocos de esmalte foram lavados com água após cada tratamento, e algum resíduo e/ou produtos da reação do dentifrício podem ter sido levados.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais deste trabalho, conclui-se que é possível potencializar a capacidade remineralizadora de um dentifrício de baixa concentração de flúor através da suplementação com fontes de cálcio e fosfato. O dentifrício 450 µg F/g suplementado apresentou efeito semelhante ao dentifrício com 1100 µg F/g.

REFERÊNCIAS¹

- Bergamaschi, M: Validação do modelo de ciclagem de pH e avaliação da efetividade de dentifrícios suplementados com cálcio e fosfato e baixa concentração de flúor [dissertação]. Faculdade de Odontologia, universidade Estadual Paulista; 2003.
- Biesbrock AR, Faller RV, Bartizek RD, Court LK, McClanahan SF: Reversal of incipient and radiographic caries through the use of sodium and stannous fluoride dentifrices in a clinical trial. J Clin Dent 1998; 9: 5-10.
- Blake-Haskins JC, Mellberg JR, Snyder C. Effect of calcium in model plaque on the anticaries activity of fluoride in vitro. J. Dent. Res. 1992; 71:1482-1486.
- Brighenti LB, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Oliveira FAL, Ribeiro DB, Sasaki KT: In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. Caries Res 2006 (in press).
- Campos GM. GMC 2002 [computer program]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia, 2003. Available from URL <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmv/gmc.html#gmc>, 2003.
- Cummins, D: Working group report 3: role of models in assessing new agents for caries prevention. Adv Dent Res 1995; 9: 338- 339.
- Cury JA, Francisco SB, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. Caries Res 2003; 37: 194-199.
- Davies RM, Ellwood RP, Davies GM: The rational use of fluoride

¹ De acordo com "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals – Vancouver", anexo M.

toothpaste. *Int J Dent Hyg* 2003;1:3-8.

Delbem ACB, Vieira AEM, Cury, JA: Avaliação do potencial cariostático do dentifrício brasileiro de maior participação no mercado. *Rev Bras Odontol* 2002; 59:14-18.

Duckwoth RM: Models for evaluating new fluoride-containing systems: reaction paper. *Adv Dent Res* 1995; 9: 300-303.

Ellwood R, Fejerskov O: Uso clínico do flúor, in: Fejerskov O, Kidd E: Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Ed. Santos, cap. 13, p.189-222.

Featherstone JDB, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983; 17: 385-391.

Kardos S, Shi B, SIPOS T: The in vitro demineralization potential of a sodium fluoride, calcium and phosphate ion-containing dentifrice under various experimental conditions. *J Clin Dent* 1999; 10: 22-25.

Mellberg JR, Chomicki WG. Fluoride uptake by artificial caries lesions from fluoride dentifrices in vivo. *J Dent Res* 1983; 62:540-542.

Oogard, B: CaF_2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001; 35: 40-44.

Queiroz CS, Hara AT, Leme AFP, Cury, JA: Avaliação de um modelo de ciclagem de pH na remineralização do esmalte e no efeito dose-resposta. *Anais da 20ª Reunião Anual da SBPqO*, 2003; 17 suplemento 2: 221.

Schemehorn BR, Orban BS, Wood GD, Fischer GM: Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. J Clin Dent 1999a; 10: 13-16.

Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE: Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamel dentifrice. J Clin Dent 1999b; 10: 9-12.

Thylstrup A, Fejerskov O: Flúor no tratamento da cárie dentária. Implicações clínicas. Uso sistêmico do flúor – Uso tópico do flúor, in: _____. Cariologia clínica. 2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 2001, cap.12, p.259-281.

Vieira AE, Delbem AC, Sassaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. Caries Res 2005; 36: 514-520.

White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. Caries Res 1987; 21: 126-140, 1987.

White DJ: The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. J Dent Res 1992; 7: 884-894.

Winston AE: The origins of Enamelon remineralizing fluoride toothpaste. J Clin Dent 1999; 10: 7-8.

Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res 1995; 9: 214-230.

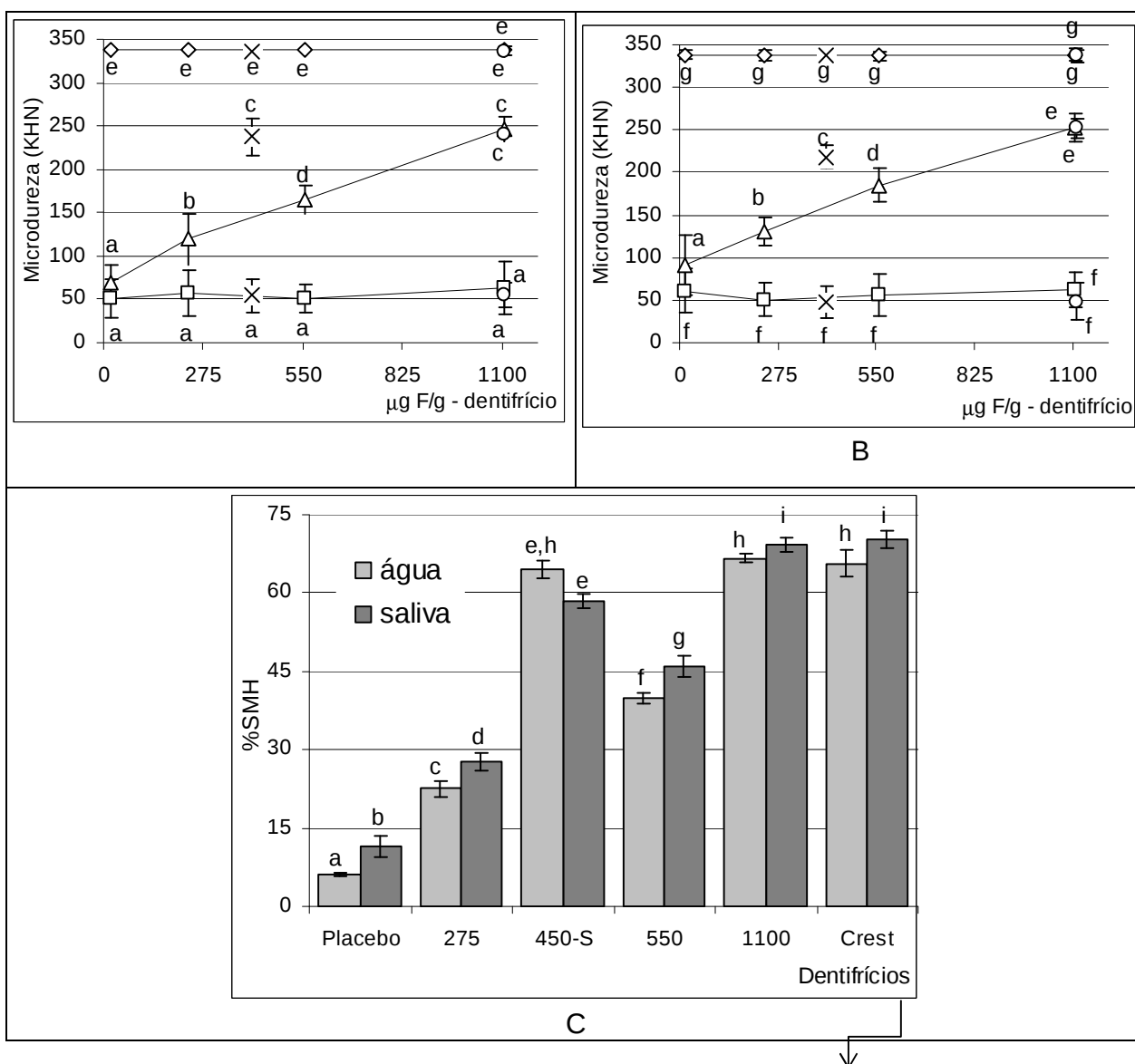


Figura 1 – Microdureza de superfície de acordo com as diferentes concentrações de flúor e meio de diluição dos dentifrícios (Figura 1A: água deionizada; Figura 1B: saliva artificial). “◇” indica SMH; “□” indica SMH₁; “Δ” indica SMH₂ (média $\pm$ dp; n=10). Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente (ANOVA; $p < 0,05$). Figura 1C mostra valores de %SMH (média $\pm$ dp, n=10) para comparação entre as diluições. Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente (Teste “t” emparelhado; $p < 0,05$).

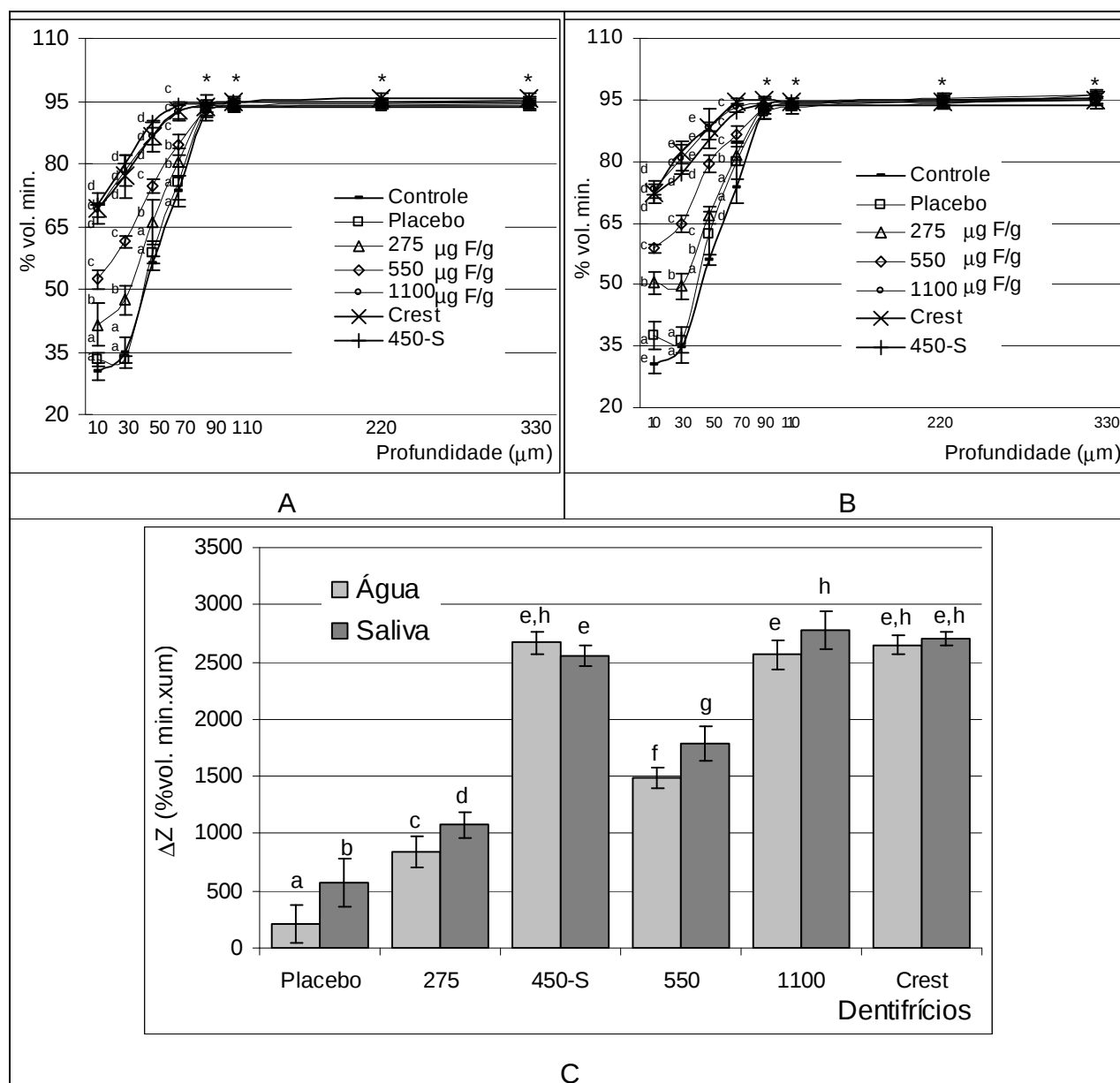
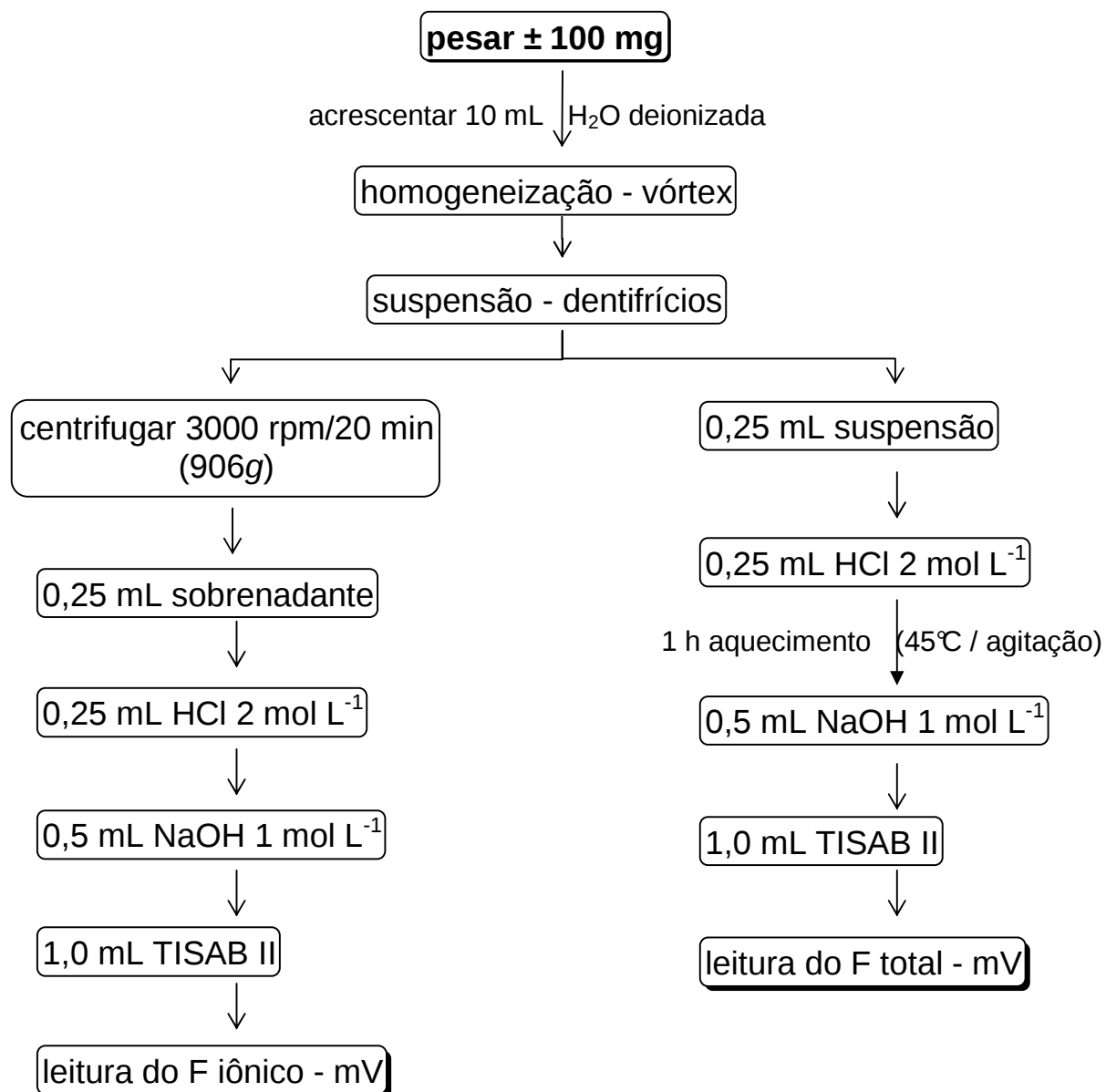


Figura 2 – Conteúdo mineral de acordo com as diferentes concentrações de flúor e meio de diluição dos dentífricos (Figura 1A: água deionizada; Figura 1B: saliva artificial). Médias (média $\pm$ dp; n=10) seguidas de letras distintas diferem estatisticamente (ANOVA; $p < 0,05$). Figura 1C mostra valores de recuperação do conteúdo mineral (ΔZ ; média $\pm$ ep, n=10) para comparação entre as diluições. Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente (Teste “t” não emparelhado; $p < 0,05$).

Anexos

ANEXO A

DOSAGEM DE F NOS DENTIFRÍCIOS*



* Delbem ACB, Vieira AEM, Cury, JA. Avaliação do potencial cariostático do dentifrício brasileiro de maior participação no mercado. Rev Bras Odontol 2002; 59:14-8

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Confecção dos blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm)



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



2. Coroa dentária fixada em placa de acrílico (4x4 cm e 4 mm de espessura) com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA) pela sua face proximal.



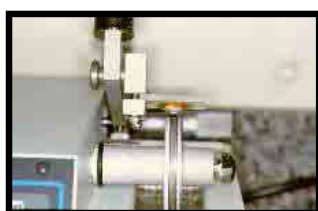
3. Placa montada em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração com água destilada/deionizada.



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



5. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



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



7. Secção da face vestibular 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 destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.

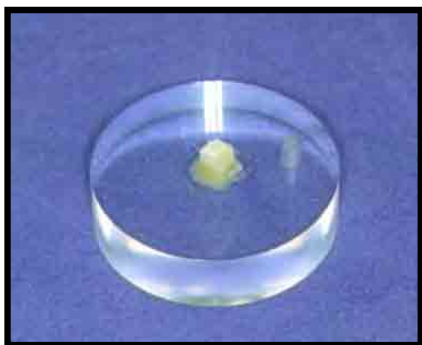


8. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

ANEXO C

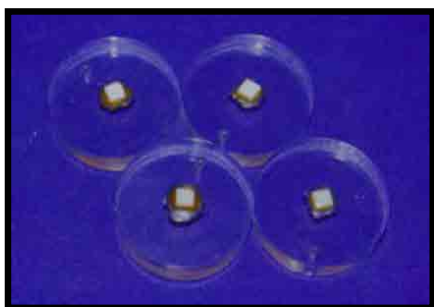
PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Planificação da dentina e polimento do esmalte



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 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 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



-
3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual será polida.
-

Seqüência do polimento de esmalte:

1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
 2. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água deionizada por 2 minutos, entre cada lixa.
 3. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler).
 4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água deionizada (3 minutos).
 5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água deionizada.
-

ANEXO D

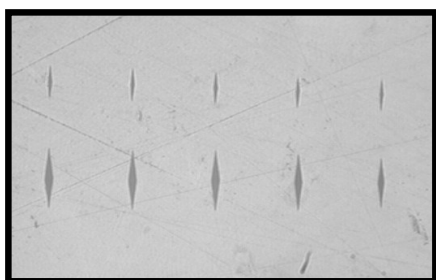
MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (SMH)

Ciclagem RE>DES



1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).

-
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 50 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da microdureza de superfície.



3. Fotomicrografia das indentações das análises de microdureza de superfície inicial e final do esmalte (Aumento: 100x).
-

ANEXO E**PREPARO DA SOLUÇÃO PARA INDUÇÃO DA LESÃO ARTIFICIAL DE CÁRIE**

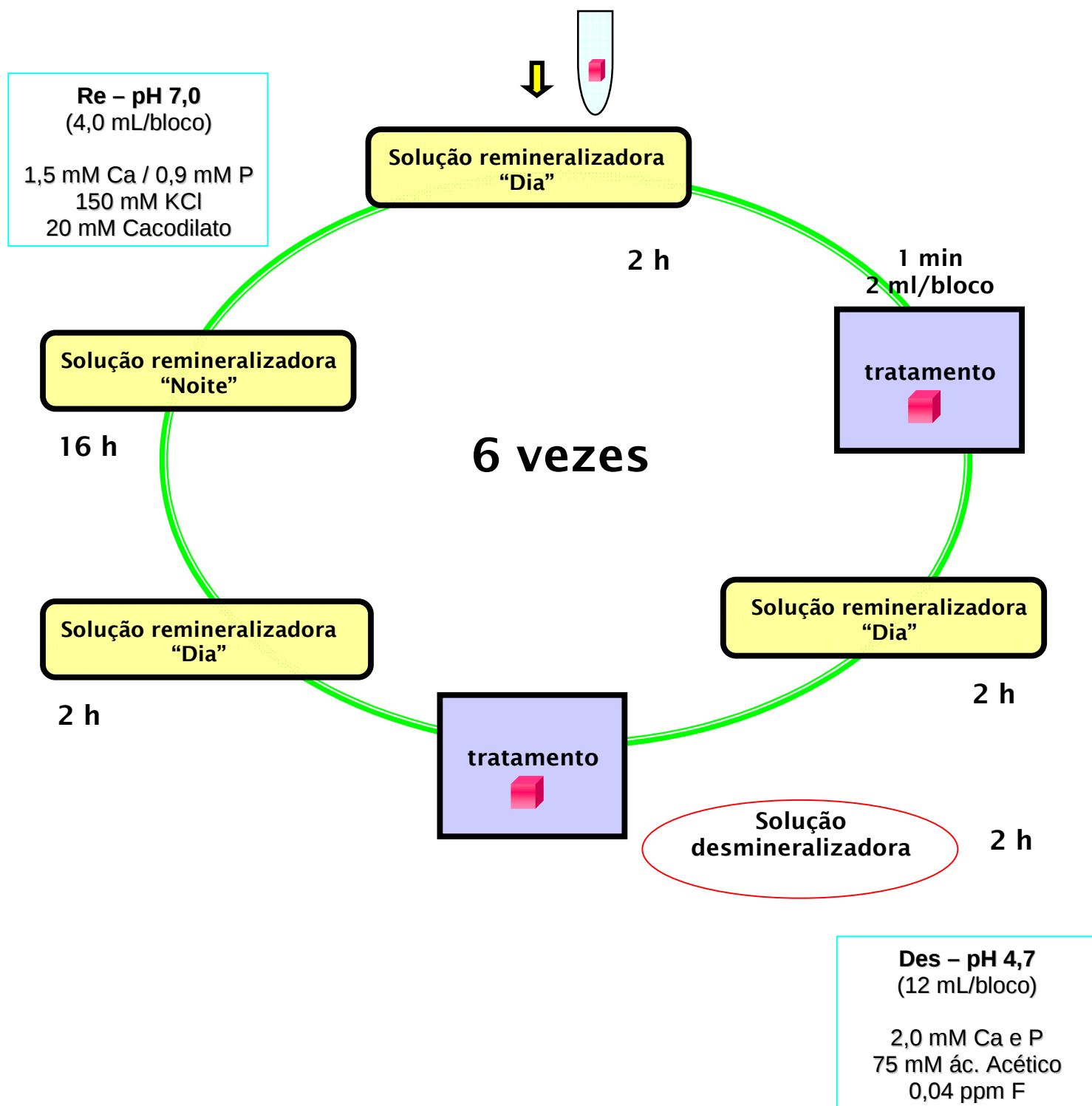
Componentes	Solução 1L
H ₂ O dest/deion.	± 800 mL
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (1,3 mM)	0,3070 g
ácido acético glacial (50 mM)	2,87 mL
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (0,78 mM)	0,1079 g
Fluoreto padrão Orion (100 ppm) [0,03 ppm]	0,3 mL
*pH = 2,95 – acrescentou-se NaOH 4M – pH = 5,0	
H ₂ O dest/deion. q.s.p.	1000 mL

ANEXO F

Ciclagem RE>DES

Duração: 6 dias

Tratamentos: 2x / dia com dentifrícios diluídos; 2,0 ml/bloco

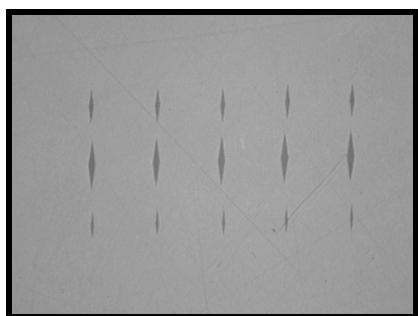
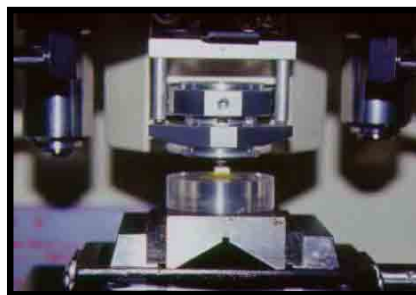


ANEXO G**MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (SMH)***Ciclagem RE>DES*



1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).

-
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 50 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da microdureza de superfície.



-
1. Fotomicrografia das indentações das análises de microdureza de superfície inicial, pós-desmineralização e final do esmalte (remineralização) (Aumento: 100x).
-

ANEXO H**AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL**



1. Blocos de esmalte fixados em lamínula de vidro com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA) para secção no sentido longitudinal no centro da área exposta, utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4243 Buehler) montado em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada.

-
2. 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 sete minutos e mais sete minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola adesiva (Super Bonder – Loctite).



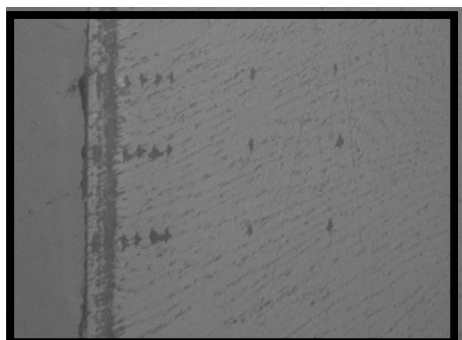
-
3. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.
-

Seqüência do polimento do corpo de prova:

1. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 320 (1 minuto - 2 pesos), 600, 800 e 1200 (2 minutos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água deionizada por dois minutos, entre cada lixa;
2. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro MICROCLOTH SUPREME PSA (Buehler Polishing Cloth) e suspensão de diamante 1/4 micron base-água (Buehler) (2 minutos);
3. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Buehler) diluída 20:1 em água deionizada (3 minutos);
4. Lavagem durante 30 segundos com jato de água deionizada.

ANEXO I**MICRODUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL**

2. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA). Para análise da microdureza em secção longitudinal, utilizou-se carga estática de 25 gramas, tempo de 10 segundos.



3. Fotomicrografia das indentações da análise de microdureza em secção longitudinal do esmalte. (Aumento: 100x)
-

Anexo J

MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (SMH)

Dentifrícios diluídos em saliva

Placebo blocos		SMH inicial					D.P.		SMH cárie					D.P.		SMH Re					D.P.	
79	328	328	331	334	328	329,8	2,7		59	54	41	50	43	49,4	7,8	77	75	64	67	61	68,8	6,9
46	328	350	340	340	350	341,6	9,1		29	27	30	33	33	30,4	2,6	41	48	54	42	77	52,4	14,7
13	342	339	350	325	339	339,0	9,0		100	86	96	108	117	101,4	11,8	140	145	148	145	146	144,8	2,9
59	348	339	337	331	348	340,6	7,4		42	53	81	47	64	57,4	15,5	74	67	66	96	70	74,6	12,4
2	343	340	325	348	328	336,8	9,9		38	41	37	38	29	36,6	4,5	68	83	79	98	73	80,2	11,5
48	336	347	350	348	348	345,8	5,6		37	33	33	33	35	34,2	1,8	49	58	66	50	53	55,2	7,0
100	350	347	350	345	330	344,4	8,3		60	59	68	66	70	64,6	4,9	127	129	126	143	118	128,6	9,1
71	325	327	325	345	328	330,0	6,6		46	44	49	58	60	51,4	12,1	82	54	52	86	63	67,4	15,8
102	330	337	337	350	339	338,6	7,2		90	108	101	111	76	97,2	14,3	137	148	133	140	134	138,4	6,0
88	348	334	331	331	333	335,4	7,2		93	86	63	76	90	81,6	12,2	101	107	105	104	107	104,8	7,5
338,2						60,4		91,5						25,5		34,5						10
5,4						25,5		34,5						10		34,5						10
275 ppm F blocos		SMH inicial					D.P.		SMH cárie					D.P.		SMH Re					D.P.	
87	325	337	337	342	334	335,0	6,3		114	108	70	73	98	92,6	20,1	144	149	150	158	137	147,6	7,8
34	327	325	325	325	327	325,8	1,1		32	32	32	31	32	31,8	0,4	147	119	125	138	125	130,8	11,4
94	337	337	342	339	336	338,2	2,4		40	47	60	51	32	46,0	10,7	105	95	95	99	93	97,4	4,8
6	327	336	342	334	348	337,4	8,0		36	31	30	29	30	31,2	2,8	120	121	124	118	116	119,8	10
33	334	334	339	336	340	336,6	2,8		48	49	45	43	42	45,4	3,0	133	142	123	134	139	134,2	7,3
103	328	350	347	327	347	339,8	11,3		78	70	60	73	76	71,4	7,1	138	131	147	141	146	140,6	6,5
8	328	345	350	348	350	344,2	9,3		34	36	32	37	26	33,0	4,4	144	110	102	97	93	109,2	20,5
76	333	328	325	331	327	328,8	1,2		58	54	50	58	67	57,4	6,3	147	142	135	107	131	132,4	15,5
26	337	339	350	350	348	344,8	6,3		76	45	31	26	28	41,2	20,8	171	136	134	140	166	149,4	17,7
53	333	336	345	348	331	338,6	7,5		56	59	49	45	43	50,4	6,9	145	142	135	130	127	135,8	7,7
336,9						59,0		129,7						19,5		16,5						10
6,0						19,5		16,5						10		16,5						10
550 ppm F blocos		SMH inicial					D.P.		SMH cárie					D.P.		SMH Re					D.P.	
71	327	345	327	328	327	330,8	7,9		57	54	53	35	68	53,4	11,9	177	175	172	167	163	170,8	6,8
23	325	325	336	347	345	335,6	10,5		89	79	71	63	54	71,2	13,6	214	199	202	185	178	195,6	14,3
62	336	328	337	334	336	334,2	1,6		54	49	50	46	50	49,8	2,9	202	199	212	186	191	198,0	10,1
19	328	348	342	333	327	335,6	9,1		84	102	106	100	101	98,6	8,5	228	223	225	200	189	213,0	17,4
10	345	331	350	345	347	343,6	7,3		30	26	32	28	29	29,0	2,2	170	177	185	188	184	180,8	7,3
42	327	340	340	340	327	334,8	7,1		73	74	90	81	65	76,6	8,4	172	193	201	197	199	192,4	11,8
7	327	339	333	331	330	332,0	4,5		36	38	32	38	29	34,6	4,0	156	166	150	163	164	158,8	6,6
17	350	337	342	350	350	345,0	6,0		42	61	36	30	43	42,4	11,6	196	192	194	200	197	195,0	3,0
49	337	350	348	343	348	345,2	5,3		21	25	16	47	22	26,2	12,1	165	167	140	130	131	146,6	18,1
27	345	331	343	325	327	334,2	9,2		52	84	96	45	118	79,0	30,5	190	197	180	210	219	199,2	15,5
337,2						56,1		185,2						24,5		30,5						10
5,5						24,5		30,5						10		30,5						10
450 ppm F + Ca blocos		SMH inicial					D.P.		SMH cárie					D.P.		SMH Re					D.P.	
87	328	345	327	334	340	334,8	7,7		26	24	21	22	29	24,4	3,2	203	202	204	208	204	204,2	2,3
37	330	343	336	334	331	334,8	9,2		77	73	70	62	55	67,4	8,8	214	215	217	214	211	214,2	2,2
54	336	337	350	343	327	338,6	8,6		93	81	57	63	64	71,5	14,9	212	212	210	215	211	212,0	1,9
67	342	339	334	342	350	341,4	5,8		30	29	25	27	37	29,6	4,6	246	233	247	232	260	243,6	11,5
72	348	343	348	348	343	346,0	2,7		75	59	65	46	52	59,4	11,3	214	217	215	219	217	216,4	1,9
14	343	350	350	333	331	341,4	9,1		59	68	101	103	54	77,0	23,4	225	223	225	222	227	224,4	1,9
11	331	342	328	331	348	336,0	8,6		35	36	42	32	30	35,0	4,6	204	200	198	194	195	198,2	4,0
36	333	347	350	350	348	345,6	7,2		53	43	32	33	32	38,6	9,3	220	219	220	223	226	221,6	2,9
94	327	325	327	330	327	327,2	1,8		39	34	32	31	30	33,2	3,6	208	204	207	219	210	209,6	5,7
19	328	337	325	348	339	335,4	9,2		46	34	40	36	49	41,0	6,4	231	243	233	238	221	233,2	8,3
338,1						47,7		217,7						19,2		13,5						10
5,7						19,2		13,5						10		13,5						10
1100 ppm F blocos		SMH inicial					D.P.		SMH cárie					D.P.		SMH Re					D.P.	
26	334	348	350	340	350	344,4	7,1		63	44	43	41	51	48,4	9,0	250	238	241	237	241	241,4	5,1
90	334	331	325	330	327	329,4	3,5		34	39	30	34	38	35,0	3,6	233	243	235	246	269	245,2	14,4
69	330	327	327	331	328	328,6	1,8		87	72	97	87	87	86,0	8,9	254	239	239	237	235	240,8	7,6
25	350	348	347	334	350	345,0	6,7		49	58	55	60	59	56,2	4,4	254	226	243	242	223	237,6	12,9
52	343	334	339	345	350	342,2	6,1		95	63	25	27	17	45,4	32,9	269	251	253	246	241	252,0	10,6
3	350	345	350	345	342	346,4	3,5		66	57	64	52	53	58,4	6,3	250	256	235	212	232	237,0	17,2</

Anexo K

MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (SMH)

Dentifrícios diluídos em água destilada/deionizada

275 ppm F blocos										SMH inicial										SMH cárie										SMH final									
										D.P.																				D.P.									
06	347	345	348	347	350	347,4	1,8	38	52	45	47	48	46,0	5,1	112	113	113	112	106	111,2	2,9																		
11	328	337	331	337	327	332,0	4,8	26	27	27	33	29	28,4	2,8	72	70	68	69	65	68,8	2,6																		
67	348	327	337	336	334	336,4	7,6	143	120	111	110	80	112,8	22,6	171	171	159	158	159	163,6	6,8																		
81	330	342	337	342	343	338,8	9,4	32	27	36	28	22	29,0	5,3	103	89	100	89	87	93,6	7,3																		
101	327	330	340	330	342	333,8	6,7	57	57	60	84	75	66,6	12,3	121	120	124	123	123	122,2	1,6																		
16	325	350	336	350	339	340,0	10,5	73	90	85	59	55	72,4	15,4	147	141	151	156	154	149,8	6,0																		
11	333	342	334	331	334	334,8	4,2	38	39	42	50	49	43,6	5,6	98	95	97	96	96	96,4	1,1																		
45	325	336	345	340	348	338,8	9,0	92	84	81	80	80	83,4	5,1	151	158	154	149	155	153,4	3,5																		
39	345	339	337	347	336	340,8	4,9	42	32	42	31	36	36,6	5,3	113	113	110	119	111	113,2	3,5																		
99	340	339	330	337	340	337,2	4,2	68	49	42	52	37	49,6	11,8	122	123	129	128	128	126,0	3,2																		
338,0						4,3						56,8						119,8																					
4,3						10						26,9						29,7																					
10												10						10																					
450-S blocos										SMH inicial										SMH cárie										SMH final									
										D.P.																				D.P.									
92	337	327	339	350	339	338,4	8,2	28	27	24	21	20	24,0	3,5	270	274	279	268	270	272,2	4,4																		
66	328	336	328	334	340	333,2	5,2	40	43	43	39	41	41,2	1,8	231	238	240	235	240	236,8	3,8																		
58	350	348	340	345	339	344,4	4,8	53	36	100	108	91	77,6	31,4	219	214	219	216	218	217,2	2,2																		
39	350	347	339	337	340	342,6	5,6	53	62	65	56	65	60,2	5,4	236	230	240	241	241	237,6	4,7																		
88	336	334	336	333	339	335,6	2,3	43	43	46	43	45	44,0	1,4	266	260	267	257	267	263,4	4,6																		
56	334	339	334	336	333	335,2	2,4	44	40	41	61	35	44,2	9,9	200	199	210	207	208	204,8	6,0																		
9	327	328	347	340	328	334,0	9,0	20	37	37	63	40	39,4	15,4	227	219	220	222	218	221,2	3,6																		
5	327	328	330	334	330	329,8	2,7	70	72	59	62	66	65,8	5,4	230	234	235	238	230	233,4	3,4																		
85	328	330	334	330	325	329,4	3,3	71	60	74	71	58	66,8	7,3	239	240	230	235	238	236,4	4,0																		
68	343	345	343	345	331	341,4	5,9	84	83	85	85	88	85,0	1,9	241	248	248	250	252	247,8	4,1																		
336,4						5,2						54,8						237,1																					
5,2						10						19,2						30,4																					
10												10						10																					
550 ppm F blocos										SMH inicial										SMH cárie										SMH final									
										D.P.																				D.P.									
91	345	339	331	345	333	338,6	6,6	33	38	35	43	34	36,6	4,0	170	167	164	170	165	167,2	2,8																		
48	327	333	340	337	328	333,0	5,6	62	80	95	63	43	68,6	18,7	147	153	157	157	158	154,4	4,6																		
73	337	339	348	350	337	342,2	6,3	53	21	39	26	22	32,2	13,7	180	179	176	177	180	178,4	1,8																		
52	340	340	330	340	337	337,4	4,3	79	70	73	58	56	67,2	9,9	179	176	179	165	170	173,8	6,1																		
85	333	327	336	339	343	335,6	6,1	53	55	76	79	70	66,6	12,0	175	179	174	171	175	174,8	2,9																		
84	348	337	348	347	350	346,0	5,1	21	28	21	24	25	23,8	2,9	130	133	158	157	134	142,4	11,9																		
46	337	336	327	348	334	336,4	7,6	20	28	62	37	35	36,4	15,8	157	149	152	150	155	152,6	9,4																		
74	328	343	340	328	340	335,8	7,2	62	55	60	66	69	62,4	5,4	202	192	182	182	195	190,6	8,6																		
36	334	339	343	340	331	337,4	4,8	57	54	57	47	57	54,4	4,3	171	174	169	170	170	170,8	1,9																		
61	330	330	339	325	331	331,0	5,0	62	54	46	57	49	53,6	6,3	141	147	154	142	146	146,0	5,1																		
337,3						4,3						50,2						165,1																					
4,3						10						16,6						16,6																					
10												10						10																					
1100 ppm F blocos										SMH inicial										SMH cárie										SMH final									
										D.P.																				D.P.									
76	327	333	327	325	330	328,4	3,1	69	47	56	69	44	57,0	11,8	269	266	223	245	219	244,4	23,3																		
55	339	342	345	340	342	341,6	2,3	37	33	25	35	27	31,4	5,2	211	238	221	212	245	225,4	18,8																		
66	333	347	325	348	342	339,0	9,8	64	65	72	82	76	71,8	7,6	281	211	250	212	250	240,8	29,6																		
4	331	327	337	334	327	331,2	4,4	38	54	69	76	60	59,4	14,6	231	225	250	249	257	242,4	13,7																		
90	342	336	327	348	343	339,2	8,0	130	122	123	145	134	130,8	9,4	266	258	266	260	248	259,6	7,4																		
32	348	339	347	350	343	345,4	4,4	70	61	73	72	67	68,6	4,8	274	263	257	270	273	267,4	2,2																		
82	340	336	342	340	330	337,4	4,8	39	33	28	26	25	30,2	5,8	210	226	230	226	240	225,4	10,8																		
60	325	342	340	328	336	334,2	7,4	29	46	42	31	43	38,2	7,7	255	241	229	252	217	238,8	18,9																		
75	347	340	347	327	327	337,6	10,1	77	96	103	82	83	88,2	10,8	249	260	260	267	257	258,6	6,5																		
69	350	347	348	330	343	343,8	8,0	47	46	46	49	43	46,2	2,2	258	256	263	256	260	258,6	3,0																		
337,8						5,3						62,2						246,2																					
5,3						10						30,5						14,4																					
10												10						10																					
Crest blocos										SMH inicial										SMH cárie										SMH final									
										D.P.																				D.P.									
21	345	328	348	348	343	342,4	8,3	62	63	60	70	56	62,2	5,1	240	238	240	243	241	240,4	1,8																		
13	343	338	348	328	328	333,6	6,9	56	49	43	50	38	47,2	6,9	238	236	240	241	244	239,8	3,0																		
47	330	325	330	328	333	329,2	2,9	43	40	54	49	55	48,2	6,6	230	231	239	230	235	233,0	3,9																		
62	330	339	333	330	330	332,4	3,9	47	45	49	79	82	60,4	18,4	240	241	238	244	240	240,4	2,2																		
70	345	340	347	350	347	345,8	3,7	70	71	100	91	85	83,4	12,9	256	253	256	260	258	256,6	2,6																		
43	325	334	343	340	342	336,8	7,5	53	47	42	49	50	48,2	4,1	243	249	245	236	236	241,8	5,7																		
31	330	348	328	343	340	337,8	8,6	64	63	78	77	54	67,2	10,2	221	231	239	233	235	239,0	5,4																		
36	337	337	337	350	339	338,4	7,2	32	33	40	40	36	36,2	3,8	235	228	238	240	239	236,0	3,8																		
68	337	330	328	330	333	331,6	3,5	51	67	60	57	52	57,4	6,5	241	249	246	250	246	246,4	3,5																		
99	331	334	347	340	340	338,4	6,2	39	38	40	36	38	38,2	1,5	231	233	239	239	236	235,6	3,6																		
336,7						5,1						54,9						240,0																					
5,1						10						14,3						7,5																					
10												10						10																					

Anexo L MICRODUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL
Ciclagem de pH – Diluição em saliva artificial

Placebo									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	39,3	36,7	62,5	81,0	92,2	93,5	94,5	95,1	2979,8
2	32,7	38,2	64,4	77,6	92,9	92,2	95,0	96,0	3008,7
3	38,4	35,2	56,6	70,7	92,4	94,2	95,9	94,2	3190,6
4	34,2	38,2	63,9	77,9	91,0	93,8	96,8	96,7	2703,8
5	38,2	32,1	61,9	78,2	92,4	93,8	95,8	93,4	3086,1
6	37,8	36,1	62,7	85,2	95,2	91,1	96,3	97,1	2710,3
7	37,7	34,5	70,5	83,7	88,3	91,0	92,8	93,0	3371,1
8	42,7	38,3	67,3	84,3	92,5	92,2	92,4	96,1	3007,4
9	32,9	32,9	51,6	83,0	91,5	94,6	96,6	97,7	2873,4
10	41,7	42,8	62,2	78,7	92,8	94,3	94,3	95,7	2808,9
Média=	37,6	36,5	62,3	80,0	92,1	93,1	95,0	95,5	2974,0
dp=	3,4	3,1	5,2	4,4	1,7	1,3	1,5	1,6	210,7

275									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	49,6	46,8	65,4	83,1	94,1	93,7	94,5	96,6	2440,7
2	49,8	49,6	63,2	82,2	95,2	93,6	93,1	96,7	2582,6
3	49,4	45,6	69,3	84,2	93,3	93,4	95,5	96,7	2287,2
4	44,9	49,0	67,4	82,7	92,4	94,5	93,3	96,3	2547,0
5	52,5	54,8	64,4	77,2	93,8	93,5	95,5	96,7	2301,7
6	52,0	52,2	68,2	77,3	92,8	94,1	94,1	95,3	2482,6
7	48,5	49,4	68,6	81,3	92,7	92,4	93,9	96,5	2552,4
8	49,4	50,2	67,1	83,5	91,9	93,9	93,7	95,5	2523,9
9	52,6	45,8	64,9	81,1	92,9	93,7	94,0	95,9	2604,7
10	55,1	52,9	69,2	80,7	93,4	92,3	94,2	96,1	2407,8
Média=	50,4	49,6	66,8	81,3	93,3	93,5	94,2	96,2	2473,1
dp=	2,8	3,1	2,1	2,4	0,9	0,7	0,8	0,5	112,0

550									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	60,0	63,0	81,4	88,1	93,9	93,8	96,0	94,1	1570,1
2	60,3	63,1	78,2	84,9	94,1	94,1	93,2	95,6	1898,1
3	58,7	65,1	81,7	85,9	93,2	94,3	93,9	92,1	1905,0
4	58,0	65,2	80,9	89,8	93,0	92,5	92,9	94,7	1933,1
5	58,9	65,1	80,7	87,6	91,9	94,6	95,0	94,8	1620,2
6	58,9	68,3	79,8	86,0	94,3	94,3	91,8	95,6	1882,8
7	59,8	65,9	76,7	83,7	91,1	94,2	95,2	95,5	1733,6
8	59,3	60,6	81,3	88,9	90,7	93,2	96,1	95,9	1595,0
9	56,9	66,1	75,6	87,7	93,9	94,9	95,7	94,9	1582,2
10	57,7	66,0	79,1	84,8	91,8	93,3	94,6	94,4	1846,2
Média=	58,9	64,8	79,5	86,7	92,8	93,9	94,4	94,7	1756,6
dp=	1,1	2,1	2,1	2,0	1,3	0,7	1,5	1,1	151,9

1100									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	71,9	78,4	89,5	92,7	94,3	94,7	93,7	93,9	1083,3
2	70,7	79,7	93,0	94,0	96,1	94,7	94,5	95,1	785,9
3	71,8	77,0	83,8	92,3	92,8	96,0	95,6	97,0	794,1
4	77,4	78,3	88,6	93,6	93,6	94,8	94,2	96,6	835,5
5	71,2	85,7	93,1	94,0	92,8	93,8	96,3	95,9	545,5
6	73,4	80,1	78,1	90,9	95,3	94,5	96,0	97,2	851,9
7	74,5	83,8	87,9	93,2	93,0	92,1	94,9	96,5	887,3
8	71,8	84,2	87,5	92,8	92,9	93,4	95,6	96,6	762,9
9	76,6	83,3	92,8	93,6	94,6	93,9	95,3	96,1	600,0
10	72,7	78,3	86,0	94,2	95,6	95,6	96,6	97,2	532,6
Média=	73,2	80,9	88,0	93,1	94,1	94,3	95,3	96,2	767,9
dp=	2,3	3,1	4,7	1,0	1,3	1,1	0,9	1,0	169,8

Crest									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	72,4	82,0	88,9	95,6	94,9	94,0	93,2	95,6	952,4
2	70,2	82,2	87,7	92,8	93,5	92,4	95,6	96,2	892,5
3	72,1	80,5	87,7	94,8	95,3	95,2	94,5	95,6	790,9
4	70,0	82,6	88,2	94,9	94,6	94,0	94,5	95,3	879,8
5	72,2	79,7	88,2	94,5	95,7	95,0	94,2	95,9	829,4
6	74,0	84,3	85,9	93,6	94,8	94,4	95,3	94,5	790,6
7	72,6	83,2	88,1	93,8	92,5	95,1	94,4	93,6	936,9
8	69,7	88,2	89,1	93,9	94,8	94,4	94,9	93,5	784,3
9	71,3	79,1	89,5	94,4	96,7	95,5	94,6	94,4	818,7
10	77,5	80,5	89,3	95,5	94,8	95,0	94,0	95,3	788,6
Média=	72,2	82,2	88,3	94,4	94,7	94,5	94,5	95,0	846,4
dp=	2,3	2,6	1,0	0,9	1,1	0,9	0,7	0,9	64,2

450-S									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	71,6	74,9	85,5	88,8	93,8	94,3	95,6	95,1	1078,2
2	70,1	76,2	85,2	94,9	93,5	94,5	94,2	95,3	1079,4
3	71,7	78,8	86,7	90,6	94,3	94,2	95,2	95,6	946,6
4	71,7	78,7	87,7	90,5	93,5	94,6	94,5	93,9	1091,5
5	70,4	76,3	88,5	88,3	94,8	95,2	95,1	95,9	944,9
6	71,5	77,2	86,8	92,8	94,6	94,1	94,6	95,2	1026,9
7	71,3	79,0	83,8	93,3	94,5	95,8	95,8	95,1	801,5
8	74,4	74,2	82,1	91,8	94,1	94,3	95,2	96,0	1055,8
9	71,2	80,4	81,3	93,6	93,7	93,7	95,7	95,3	973,2
10	74,4	74,7	85,0	93,3	94,0	94,8	94,5	96,2	994,0
Média=	71,8	77,0	85,3	91,8	94,1	94,6	95,0	95,4	999,2
dp=	1,4	2,1	2,3	2,2	0,5	0,6	0,6	0,6	88,6

Ciclagem de pH – dentifrício diluído em água destilada/deionizada

Placebo									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	330 μm	ΔZ
1	32,4	32,7	61,8	79,0	94,9	91,7	93,5	92,3	3515,7
2	34,6	33,4	59,3	81,3	92,4	93,1	92,2	93,5	3515,6
3	33,4	32,5	55,6	79,0	92,5	95,0	95,1	93,5	3222,4
4	34,5	34,2	57,0	74,4	93,8	95,0	93,5	94,3	3342,4
5	29,9	32,7	63,0	76,1	93,9	94,9	94,2	94,1	3214,3
8	34,3	33,1	57,2	74,4	93,4	92,4	93,7	95,8	3444,5
9	34,3	34,6	57,7	70,4	93,2	93,5	94,2	93,3	3493,2
10	31,5	32,9	55,7	69,0	92,8	93,5	94,9	95,2	3455,9
11	31,9	32,9	60,9	74,4	92,7	94,6	95,3	95,3	3116,7
	32,9	35,8	58,3	77,1	92,5	95,6	94,6	94,9	3083,4
Média=	33,0	33,2	58,7	75,3	93,3	93,8	94,1	94,1	3369,0
dp=	1,7	0,7	2,7	4,0	0,8	1,2	1,0	1,1	150,6

275									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	330 μm	ΔZ
1	34,5	45,9	56,0	82,9	94,9	95,4	94,9	95,5	2695,4
2	43,0	46,4	64,8	73,9	92,2	95,0	95,2	93,7	2760,1
3	35,1	46,8	66,5	82,9	92,1	94,4	92,6	94,2	2906,5
5	33,5	46,3	66,9	80,1	93,4	93,9	95,1	93,5	2755,2
7	43,7	47,0	75,3	83,7	92,7	93,3	92,7	94,0	2686,5
8	46,2	54,9	68,7	77,3	94,5	91,3	94,6	94,9	2601,4
9	46,7	52,8	70,2	79,6	94,0	94,6	93,3	94,3	2526,8
10	46,2	45,7	67,0	84,9	93,8	94,3	93,5	94,6	2621,6
11	43,3	42,9	66,7	78,9	95,7	94,9	95,0	94,5	2591,8
12	42,4	45,2	58,7	80,1	93,3	94,3	93,5	94,3	2954,9
Média=	41,5	47,4	66,1	80,4	93,7	94,1	94,0	94,4	2710,0
dp=	5,1	3,6	5,5	3,3	1,2	1,2	1,0	0,6	137,9

550									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	330 μm	ΔZ
1	55,2	62,4	75,5	87,4	94,1	93,6	94,3	94,5	1936,0
2	50,2	61,8	77,0	84,5	94,3	92,5	94,0	94,3	2137,5
3	48,4	63,8	75,9	87,9	93,0	93,8	95,1	94,0	1904,0
5	54,3	58,6	74,3	82,6	92,1	94,6	95,0	94,3	2047,5
6	54,2	60,7	74,4	81,9	91,9	94,2	94,2	95,1	2102,0
7	54,2	61,4	75,8	84,7	91,5	94,4	94,5	94,1	2015,8
8	49,4	61,1	73,0	87,4	91,4	95,0	93,6	94,8	2084,7
9	52,8	62,1	77,0	81,3	92,2	93,2	93,8	94,3	2186,2
10	52,6	61,4	73,0	82,1	93,9	93,4	94,6	95,1	2088,0
12	52,0	60,2	72,6	85,9	91,6	93,6	93,6	96,5	2122,1
Média=	52,3	61,4	74,8	84,6	92,6	93,8	94,3	94,7	2062,4
dp=	2,3	1,4	1,6	2,5	1,1	0,8	0,5	0,7	88,6

1100									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	70.7	80.1	87.5	90.9	94.4	94.5	94.8	96.6	884.4
2	69.9	81.4	89.3	94.2	93.2	96.0	94.3	94.8	843.2
3	69.0	82.9	89.3	91.1	94.2	94.6	93.1	94.9	1079.3
6	70.4	79.7	89.4	93.2	93.8	94.4	95.2	94.7	889.8
7	69.0	80.4	85.6	93.0	94.9	96.0	95.0	96.1	786.4
8	71.1	71.3	85.5	93.2	95.0	94.2	95.0	95.6	1091.4
9	67.6	74.9	83.3	88.2	95.3	94.4	95.0	96.0	1150.0
10	67.6	79.6	85.1	94.2	94.6	92.7	95.9	95.2	975.6
11	66.5	77.7	86.2	93.7	95.2	95.0	94.0	93.8	1127.9
12	67.8	75.4	85.0	92.1	94.0	94.9	95.8	94.5	1017.7
Média=	69.0	78.3	86.6	92.4	94.5	94.7	94.8	95.2	984.6
dp=	1.5	3.5	2.1	1.9	0.7	0.9	0.8	0.9	128.1

Crest									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
1	67.6	76.3	78.3	91.2	96.0	95.3	95.7	97.2	947.3
3	74.6	78.4	85.1	91.7	88.2	95.1	96.4	96.3	828.8
4	76.4	85.9	88.0	89.0	95.2	95.7	94.5	93.5	844.6
5	65.9	68.6	89.2	95.1	96.0	92.3	97.1	95.1	977.4
6	71.6	81.9	91.9	95.5	94.9	95.3	94.0	93.2	867.8
7	65.1	81.4	89.1	91.3	91.2	92.7	95.1	96.5	1025.0
8	67.0	70.6	84.9	91.0	95.5	95.7	96.8	96.9	821.5
9	67.2	73.8	85.5	92.0	91.7	95.7	96.5	95.9	888.3
10	67.5	76.0	87.2	95.3	92.6	95.9	94.3	94.6	1023.4
12	70.6	76.9	86.8	93.5	95.9	94.5	95.8	95.9	808.2
Média=	69.4	77.0	86.6	92.6	93.7	94.8	95.6	95.5	903.2
dp=	3.8	5.3	3.6	2.2	2.7	1.3	1.1	1.4	83.6

450-S									
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	ΔZ
2	71.8	81.9	88.5	92.3	93.5	94.2	94.8	94.0	975.3
3	69.8	78.4	82.3	92.7	94.2	92.4	96.3	96.1	991.5
4	69.1	82.7	92.2	93.7	95.7	94.8	94.9	94.6	744.8
5	70.8	84.9	93.5	94.9	95.0	95.2	93.5	93.3	851.8
6	70.3	75.3	86.3	94.5	94.4	95.5	95.1	94.0	970.8
7	70.9	79.2	92.8	94.0	94.6	95.3	94.0	95.2	832.1
8	69.6	86.2	92.3	94.4	93.5	96.1	94.6	93.8	698.3
9	68.9	76.0	88.9	93.9	94.4	95.1	94.9	95.5	895.0
11	70.8	79.5	90.4	94.0	94.0	93.6	94.3	95.1	977.1
12	68.7	76.4	91.4	94.4	94.9	94.9	95.1	94.5	867.2
Média=	70.1	80.0	89.9	93.9	94.4	94.7	94.8	94.6	880.4
dp=	1.0	3.8	3.5	0.8	0.7	1.1	0.8	0.9	102.2

Controle									ΔZ
Blocos	10	30	50	70	90	110	220	μm 330	
1	27.8	31.5	54.7	76.1	93.7	93.7	93.5	94.7	3554.3
2	32.2	43.4	55.0	68.8	89.6	93.8	94.8	94.7	3340.1
3	28.7	34.2	55.8	71.3	88.3	93.8	93.5	95.0	3642.9
4	32.8	34.9	54.0	69.6	91.7	93.8	93.4	94.2	3646.5
6	28.1	30.2	58.7	75.4	93.0	94.1	94.4	93.8	3443.5
7	27.8	33.5	57.3	69.8	93.8	94.2	93.6	91.8	3698.9
8	32.9	34.6	54.9	72.7	93.1	93.5	92.9	93.4	3657.0
9	30.4	33.6	57.2	74.2	93.6	94.9	93.5	91.9	3539.0
10	31.5	37.8	57.7	76.5	93.2	93.8	93.9	94.0	3319.2
11	30.7	33.6	55.6	80.3	92.7	91.3	92.9	94.0	3652.2
Média=	30.3	34.7	56.1	73.5	92.3	93.7	93.6	93.7	3549.4
dp=	2.1	3.6	1.5	3.7	1.9	0.9	0.6	1.1	137.8

ANEXO M**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CARIES RESEARCH****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.

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform with 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. 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

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.

ANEXO N

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA :

The Journal of Clinical Dentistry

The Journal of Clinical Dentistry is intended as a vehicle for the publication of original laboratory and clinical applied research and reviews of issues in oral health care. Acceptance for publication is based upon peer review of the materials and acceptability by the Editorial Board. All work must be previously unpublished, in whole or in part, to qualify for consideration for publication.

Manuscript Submission - Manuscripts can be submitted by e-mail using WordPerfect® for IBM (any version) or in Word® for IBM (any version). *When using e-mail, the whole file must be attached and not appear as text in the e-mail itself.* Forward e-mail and attachments to JCLinDent@AOL.COM.

Manuscripts mailed to *The Journal* must be submitted on 3.5" diskettes, along with a typewritten, double-spaced hard copy. *Manuscripts submitted without a diskette version on either WordPerfect or Word will be delayed in the review process and may incur typing charges.* One original and one copy of the manuscript are required. Research manuscripts should include the following sections, indicated in bold type; Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if appropriate), References and Key Words. Mail diskettes and manuscripts to *The Journal of Clinical Dentistry*, P.O. Box 8, Moorestown, NJ 08057, USA.

Manuscript Format

Abstract - A brief abstract, summarizing purpose, primary findings and conclusions, if necessary.

Tables - Tables are numbered using Roman notation. The table notation, in bold type, and the title are centered above the table.

Figures/Illustrations - These are numbered using Arabic notation. The figure notation, in bold, precedes the title, below the figure or illustration. Black & white, 5" x 7" glossy photographs are the preferred format. Indicate the figure number on the back of the photograph in the upper right hand corner. Illustrations should be submitted as 35 mm transparencies with appropriate identification on the frame mount. *The Journal* publishes its text in black & white. Color figures/illustrations are possible at an additional charge to the author. All illustrations will be returned to the author following publication, if requested.

Indexing - For indexing purposes, 3-10 key words are requested.

Trademarks - Any product or process which has been registered with the Federal Trademark Office and appears in the manuscript should be identified with a TM or ® and the source of the product or process (Malcon® - Evermore Dental Supply Co. Inc., St. Louis, MO). Trademarks should be used the first time the product is cited in the abstract and in the manuscript.

Citations - Any previous work or supporting documentation in the paper must be cited. All references must be noted as a superscript within the text in numerical order of appearance, and in a numbered reference listing at the end of the text. In the manuscript, citations with three or more authors are identified using the first author's last name and *et al*. In the references, all authors are to be listed. Format examples for textbook and journal citations follow:

Book Source

1. Franklin BL: *A History of Dentistry*, 2nd Ed. JL Smith Co., Philadelphia, pp. 50-60, 1776.
2. Land EY, Kohl K, Velahos ME: Calculus and gingival recession. In: *Current Periodontal Therapy*, Teri S, Ed., Andrew Scott Co., New York, pp. 63-71, 1990.

Journal Source

Verratti, S, Morris HY, Rickler S, Scott SB: Periodontal disease in children. *J Clin Dent* 12:3-8, 1999.

Reprints - For reprint information, contact Stephen M. Siegel, Publisher, *The Journal of Clinical Dentistry*, P.O. Box 243, Yardley, PA 19067, USA, or via the e-mail address or phone or fax numbers shown below.

Publication - Articles accepted for publication will be assessed a per page placement fee of US\$650. For academic/NIH-sponsored research where funding is not available for publication purposes, contact Stephen M. Siegel, Publisher, *The Journal of Clinical Dentistry*.
