

Rebeca Afonso Devides de Oliveira

MODELO *IN SITU* DE REMINERALIZAÇÃO PARA
DETERMINAR DOSE-RESPOSTA COM DENTIFRÍCIOS DE
BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO UTILIZANDO
ESMALTE BOVINO.

ARAÇATUBA – SP

2009

Rebeca Afonso Devides de Oliveira

MODELO *IN SITU* DE REMINERALIZAÇÃO PARA DETERMINAR DOSE-RESPOSTA COM DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO UTILIZANDO ESMALTE BOVINO.

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

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

ARAÇATUBA - SP

2009

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Oliveira, Rebeca Afonso Devides

A257d Modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto utilizando esmalte bovino.

Araçatuba : [s.n.], 2009

60 f. : il. ; tab. + 1 cd-rom

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Dentifrícios 2. Esmalte dentário 3. Flúor 4. Dureza
5. Remineralização dentária

Black D27
CDD 617.645

*Dados Curriculares***Rebeca Afonso Devides de Oliveira**

Nascimento	02.09.1979 – São Paulo - SP
Filiação	Paulo Reinaldo Afonso Celina Lima Afonso
1997/2000	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Franca, UNIFRAN – Campus Franca - SP.
2001/2002	Curso de Especialização em Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2003/2004	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2005/2009	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Agradecimentos |
Especiais

À DEUS,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo e guiando os meus passos. Agradeço todas as bênçãos concedidas a mim e à minha família, fazendo com que, cada vez mais, acreditemos que com fé nada impossível.

"A força mais potente do universo é a fé."

(Madre Teresa de Calcutá)

À MINHA FAMÍLIA,

Pelo apoio e confiança em mim depositados em todos os momentos de minha vida.

AOS MEUS PAIS, PAULO E CELINA,

Vocês são exemplos de determinação, dedicação, honestidade, felicidade e amor. Agradeço por todos os momentos em que estamos juntos e todos os esforços feitos em nome da nossa família. Não há palavras que expressem meu amor e admiração por vocês.

AO MEU MARIDO GUSTAVO,

Obrigada pelo imenso amor e carinho e por dividir comigo todos os momentos, desde o início da Pós-Graduação, fazendo com que a caminhada até aqui se tornasse menos árdua. Sou muito feliz em tê-lo ao meu lado!

À MINHA IRMÃ PAULA,

Você me ajudou em vários momentos de minha vida, somos irmãos e colegas de profissão. Admiro seu caráter, sua alegria de viver e contagiar a todos que estão ao seu redor. Além de ótima profissional, você tem um coração enorme, é meiga e minha melhor amiga.

“A única amizade que vale é aquela que nasce sem nenhum motivo.”

(Van Shendel)

AO MEU ORIENTADOR,

Profº Drº Alberto Carlos Botazzo Delbem, pelo exemplo de dedicação, humildade e perseverança. Agradeço pela amizade, confiança e, sobretudo por ter atendido e compreendido todas as dificuldades que tivemos para a realização desse trabalho.

“O professor é aquele que faz duas idéias crescerem onde antes só crescia uma.”

(Elbert Hubbard)

Agradecimentos

Aos meus queridos tios Fábio e Rosa,

Presentes em todos os momentos de minha vida sempre torcendo por mim, como se fosse uma filha! Por tudo o que já fizeram por mim, minha eterna gratidão. Minha admiração por vocês é imensa, assim como a alegria de tê-los sempre por perto.

À minha avó Célia,

Mesmo distante sinto seu carinho. Obrigada por sempre estar rezando e torcendo por todos da família. Seus telefonemas e suas palavras carinhosas nos confortam e melhoram nosso dia! Meu amor sempre!

À minha prima Carla,

É muito bom poder contar com pessoas como você, seja qual for a ocasião. Obrigada pelo carinho e disponibilidade de sempre! Admiro sua força de vontade e fico muito feliz em ver suas conquistas a cada dia que passa.

Às alunas Bruna Babler e Camila Cantagallo,

Pela grande ajuda na realização da fase laboratorial deste trabalho.

À aluna de mestrado Marcelle Danellon,

Sua amizade e colaboração foram essenciais para a conclusão desta pesquisa. Admiro sua determinação e torço pelo seu sucesso.

À Profª Danda,

Sem dúvida conviver com você todos esses anos foi um presente para mim. Saiba que aumenta a cada dia minha admiração por você, não só como profissional, mas também como pessoa. Assim como sei que posso contar contigo em todos os momentos, conte com meu carinho e amizade sempre!

Ao Prof. André Luiz Fraga Briso,

Que com seus conhecimentos contribuiu para a conclusão de parte dos resultados. Muito obrigada pela atenção e amizade.

À Profª Kikue,

Sempre tão simpática e disposta a ajudar, minha gratidão pelas várias vezes em que me ajudou no laboratório.

À Profª Pitty,

Sua energia e alegria contagiam todos no departamento. Obrigada pela disponibilidade e carinho.

À Maria dos Santos Ferreira Fernandes,

Saiba que sua ajuda foi fundamental para a conclusão desta pesquisa. Agradeço de coração toda ajuda e carinho.

Aos voluntários desta pesquisa: Bruna, Camila, Daniela, Gustavo, Janaína, Karina, Luana, Max Douglas e Tathiane,

Sem vocês não seria possível completar mais esta etapa, agradeço muito pela enorme paciência e responsabilidade que vocês tiveram, assim como, a amizade demonstrada, pois sei que não é fácil fazer parte de um estudo “in situ”. Vocês foram excelentes, que bom poder contar com amigos assim!

*“Para cada esforço disciplinado há múltiplas recompensas”
(Jim Rohn)*

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do professor *Dr. Pedro Barnabé*, digníssimo Diretor.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP, na pessoa de seu coordenador *Prof. Dr. Robson Frederico Cunha*.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, *Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profª Dra. Rosângela dos Santos Nery, Profª Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar*, pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos.

A *Mario Luis da Silva*, pelo auxílio indispensável e momentos de descontração.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria (Mestrado e Doutorado) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela convivência carinhosa.

A todos os amigos de turma de doutorado: *Ana Carolina, Denise, Fernanda, Juliano, Kélio e Mariana*, pela convivência sempre agradável.

Aos amigos do Laboratório que sempre incentivaram, ajudaram e compreenderam o esforço na realização desse trabalho, *Eliana Rodrigues, Ana Carolina (Tuca), Karina Mirela, Emilene, Adelisa, Luciene, Jaqueline, Michele e Marcelo*.

À *Ana Elisa de Mello Vieira*. Sempre atenciosa, deixou seus inúmeros afazeres para me auxiliar com a tradução. Muito obrigada pelo carinho.

À *Eliana Takeshita* pela ajuda e paciência, me explicando várias vezes os procedimentos laboratoriais e também pela convivência sempre alegre, resultando em boas risadas durante nossos dias de trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, pela atenção e disponibilidade que nos recebem.

À *Marina, Valéria e Diogo*, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Ao meu cunhado *João Luiz Gasparini*, pela convivência sempre agradável. Saiba que dentre as inúmeras qualidades que você tem, admiro uma em especial: o carinho que você tem por nossa família em especial pela minha irmã.

Aos meus primos, pela amizade e torcida constante.

À *Zenir e Dr. José Devides*, pelo imenso carinho que sempre dedicaram a mim.

Ao casal *Karina e Pedro Ivo*. Nossa amizade significa muito para mim e sei que posso contar com vocês sempre. Admiro a alegria de viver e como vocês a transmitem para todos que os cercam.

Aos queridos amigos de Araçatuba, *Lilian, Xande, Letícia, Vitor, Carol, João, Roberta, Luciano, Juliana, Jorge, Ana Carolina e Juliano*. Nossa turma é com certeza muito unida e animada. Conviver com vocês é uma alegria constante.

Às amigas *Cinthia, Elaine Cristina e Joseana*. Nem mesmo a distância abala uma verdadeira amizade.

À querida amiga *Ana Carolina A. P. D. Alves*, pelo auxílio na revisão ortográfica. Agradeço muito seu carinho e disponibilidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

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

Minha eterna gratidão...

Epígrafe

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

(Cora Coralina)

Resumo |

OLIVEIRA, R.A.D. **Modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto utilizando esmalte bovino.** Araçatuba, 2009. 60 f. Tese (Doutorado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Estudos realizados em diferentes países apontam o uso de dentifrícios fluoretados como o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie bem como pelo aumento na incidência da fluorose dentária. Um dos recursos para a promoção da saúde bucal e reparo das lesões cariosas, sem causar danos aos indivíduos, seria a diminuição da concentração de fluoreto no dentifrício mantendo a efetividade anticariogênica comparável a de um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g) em situações de baixa ou alta atividade de cárie. O objetivo do presente estudo foi avaliar um modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto. O estudo foi duplo-cego linear, dividido em 8 oito períodos experimentais com intervalos de 7 dias. Participaram da pesquisa 10 voluntários que utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte bovino desmineralizados. Foram estabelecidos dois regimes experimentais de 3 e 7 dias e 4 tratamentos com dentifrícios: placebo, 275, 550 e 1100 µg F/g. Foi realizada a análise da profundidade da desmineralização e decorridos os tempos experimentais realizaram-se as análises: de dureza (Knoop) de superfície e em secção longitudinal e da concentração de fluoreto presente no esmalte (µg F/mm³). Os dados apresentaram-se homogêneos e foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$). A desmineralização apresentou uma profundidade média de 47,7 µm com característica de lesão de subsuperfície. As análises de dureza mostraram aumento na remineralização com o aumento da concentração de fluoreto nos dentifrícios com o regime experimental de 3 dias ($p < 0,05$). O aumento no tempo de permanência na cavidade bucal e exposição aos dentifrícios fluoretados não aumentaram a concentração de fluoreto presente no esmalte para um mesmo dentifrício fluoretado ($p > 0,05$). Somando-se a isto, o dentifrício 550 µg F/g (7 dias) apresentou resultados de remineralização semelhante ($p > 0,05$) aos dentifrícios 1100 µg F/g (3 e 7 dias). Concluiu-se que o modelo de remineralização *in situ* apresentou capacidade de verificar dose-resposta com regime experimental de 3 dias, e que este tipo de modelo é mais apropriado para testar dentifrícios de baixa concentração de fluoreto.

Abstract

OLIVEIRA, R.A.D. In situ remineralization model for dose-response establishment using low fluoride concentration dentifrices and bovine enamel. Araçatuba, 2009. 60 f. Tese (Doutorado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Studies developed in different countries indicate F dentifrices as the main reason for the decrease in caries prevalence as well as for the increase of dental fluorosis. One of the resources for oral health promotion and repair of carious lesions, with no damage to individuals, would be the reduction of F concentration in dentifrice with preservation of the anti-caries effect similar to a Gold Standard dentifrice (1100 µg F/g), during conditions of low or high caries activity. The aim of this study was to evaluate an in situ remineralization model for dose-response establishment using low fluoride concentration dentifrices. This randomized controlled double-blind study was performed according to the volunteers' availability and had 8 experimental periods with 7-day intervals. The volunteers (n=10) wore palatal appliances containing demineralized bovine enamel blocks. Two experimental regimens (3 and 7 days) and dentifrices treatments (placebo, 275, 550 and 1100 µg F/g) were set. Demineralization depth using polarized light microscopy, surface and cross-sectioned hardness (Knoop) and F concentration in enamel (µg F/mm³) were determined. Data were homogeneous and submitted to analysis of variance (p<0.05). Demineralization areas presented a mean depth of 47.7 µm with traits of subsurface lesion. Hardness analysis showed a remineralization improvement as F concentration in dentifrices increased, for the 3-day experimental regimen (p<0.05). The augment of time in the oral cavity and of exposure to F dentifrices did not increase F concentration in enamel, considering similar F dentifrices (p>0.05). In addition, the dentifrice with 550 µg F/g (7 days) showed similar results of remineralization (p>0.05) when compared to dentifrices with 1100 µg F/g (3 and 7 days). It may be concluded that the in situ remineralization model showed the ability to verify dose-response with a 3-day experimental regimen; this model is more suitable for testing low F concentration dentifrices.

**MODELO *IN SITU* DE REMINERALIZAÇÃO PARA DETERMINAR DOSE-
RESPOSTA COM DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE
FLUORETO UTILIZANDO ESMALTE BOVINO.**

Afonso R.L, Igreja B.B., Cantagallo C.F., Danellon M., Delbem A.C.B.

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

Título curto: Modelo in situ de remineralização para dentifrícios de baixa
concentração de fluoreto.

Palavras-chave: dentifrícios, esmalte dentário, flúor, remineralização dentária,
dureza.

Correspondência:

Alberto Carlos Botazzo Delbem
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Departamento de Odontologia Infantil e Social
Rua José Bonifácio 1193, Araçatuba,
Cep 16015-050, SP (Brasil).
Tel. +55 18 3636 3235
Fax +55 18 3636 3332
Email: adelbem@foa.unesp.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar um modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto. O delineamento foi duplo cego linear, onde 10 voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte bovino desmineralizados artificialmente. Foram estabelecidos dois regimes experimentais de 3 e 7 dias e 4 tratamentos com dentifrícios: placebo, 275, 550 e 1100 µg F/g. Foi realizada a análise da profundidade da desmineralização e decorridos os tempos experimentais realizaram-se as análises: de dureza (Knoop) de superfície e em secção longitudinal e da concentração de fluoreto presente no esmalte (µg F/mm³). A desmineralização apresentou uma profundidade média de 47,7 µm com características de lesão de subsuperfície. As análises de dureza mostraram aumento na remineralização com o aumento da concentração de fluoreto nos dentifrícios com o regime experimental de 3 dias (ANOVA, $p < 0,05$). O aumento no tempo de permanência na cavidade bucal e exposição aos dentifrícios fluoretados não aumentaram a concentração de fluoreto presente no esmalte para um mesmo dentifrício fluoretado (ANOVA, $p > 0,05$). Somando-se a isto, o dentifrício 550 µg F/g (7 dias) apresentou resultados de remineralização semelhante (ANOVA, $p > 0,05$) aos dentifrícios 1100 µg F/g (3 e 7 dias). Concluiu-se que o modelo de remineralização *in situ* apresentou capacidade de verificar dose-resposta com regime experimental de 3 dias, e que este tipo de modelo é mais apropriado para testar dentifrícios de baixa concentração de fluoreto.

Introdução

Ao longo do século XX, o fluoreto foi o principal agente utilizado na prevenção da cárie dentária em todo o mundo, sendo oferecido à população de maneiras diversas. Em estudos realizados em diferentes países, o uso de dentifrícios fluoretados tem sido apontado como o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie (Narvai, 2000; Cury et al., 2004; Stookey et al., 2004) bem como pelo aumento na incidência da fluorose dentária (Mascarenhas, 2000; Cochran et al., 2004). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas diretrizes para a promoção da saúde bucal e o reparo das lesões cariosas, sem causar danos aos indivíduos. Um dos recursos seria a diminuição da concentração de fluoreto no dentifrício (Horowitz, 1992) contanto que mantenha efetividade anticariogênica comparável a de um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g) em situações de baixa ou alta atividade de cárie (Lima et al., 2008). Estudos *in vitro* mostram que é possível aumentar a eficácia de dentifrícios com baixa concentração de fluoreto (500-400 µg/g) acidulando-os (pH 5,5 ou 4,5) (Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007) ou suplementando-os com trimetafosfato de sódio (Takeshita et al., 2009). Para validar o uso clínico, testes *in situ* verificando a capacidade dos dentifrícios reduzirem a perda mineral ou ativarem a remineralização devem ser realizados para confirmação dos achados.

A literatura apresenta alguns modelos de protocolos *in situ* que avaliam a capacidade remineralizadora do fluoreto veiculado através de dentifrícios, soluções ou géis. A maioria avalia produtos com alta concentração de fluoreto (Lagerweij and ten Cate, 2002; Reynolds et al., 2008; Altenburger et al., 2008; Jardim et al., 2008), outros avaliam produtos com baixa concentração (Chow et al., 2000; Nobre-Dos-Santos et al., 2007), comparando-o com agentes remineralizantes (de Freitas et al., 2001; Magalhães et al., 2007; Reynolds et al., 2008; Takatsuka et al., 2008) ou somente com placebo (Koo and Cury, 1998; Cury et al., 2001; Buchalla et al., 2002). De acordo com as recomendações mais recentes, os delineamentos dos protocolos *in situ* devem determinar dose-resposta para atestar a eficácia de dentifrícios já existentes, como também, validar novas formulações (Ammari et al., 2003; Nobre-Dos-Santos et al., 2007; Jardim et al., 2008). Para o desenvolvimento e a avaliação de dentifrícios com baixa concentração de fluoreto torna-se difícil a eleição de um protocolo que atenda as recomendações acima. Os protocolos mostram variações nos períodos dos experimentos (7 a 60 dias), substrato (esmalte humano ou bovino),

freqüência de tratamento (2 a 4 vezes ao dia), se a aplicação é *in vivo* ou *ex vivo*, além de não verificarem diferenças entre os grupos com a variação na concentração de fluoreto.

Não há relatos na literatura de que estes protocolos tenham sido testados e tenham capacidade de verificar dose-resposta, principalmente em dentifrícios com baixa concentração de fluoreto. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar um modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto (placebo, 275, 550 e 1100 µg/g) utilizando esmalte bovino desmineralizado artificialmente.

Material e Método

Delineamento Experimental

O estudo foi duplo-cego e cruzado aleatório, dividido em 8 oito períodos experimentais com intervalos de 7 dias. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia – campus de Araçatuba previamente ao início do estudo (Processo: FOA 2007/02270 – Anexo A). Participaram desse projeto 10 voluntários com idade entre 20 e 30 anos, com boa saúde geral e bucal e com fluxo salivar normal. Blocos de esmalte (3x3 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol a 2% neutra em temperatura ambiente (Anexo B). As superfícies de esmalte dos blocos foram seqüencialmente polidas (Anexo C), permitindo sua seleção através da determinação da dureza de superfície (SH). Após a desmineralização artificial, os blocos de esmalte foram submetidos ao teste de dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁) e análise em microscopia de Luz Polarizada (n=10). Foram confeccionados dispositivos para a arcada superior, nos quais se fixaram 4 blocos de esmalte bovino desmineralizados. Foram estabelecidos 2 regimes experimentais de 3 e 7 dias e 4 tratamentos com dentifrícios: placebo, 275, 550 e 1100 µg F/g. Decorridos os tempos experimentais realizaram-se as análises de dureza de superfície (SH₂), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), de dureza em secção longitudinal, para o cálculo da perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) e da concentração de fluoreto presente no esmalte (µg F/mm³). Foram considerados como fatores de variação os dentifrícios e os tempos dos regimes experimentais e, como variáveis, a dureza de

superfície (SH, SH₁ e SH₂), perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) e a concentração de fluoreto presente no esmalte ($\mu\text{g F/mm}^3$).

Formulação e Dosagem de Fluoreto dos Dentifrícios Experimentais

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, laurilsulfato de sódio e água. O fluoreto (F) foi acrescido às formulações para obter as seguintes concentrações finais: 275, 550 e 1100 $\mu\text{g F/g}$ (na forma de NaF- Merck®). Foi preparado também um dentifrício sem fluoreto (placebo). A determinação do flúor total (FT) e do flúor iônico (FI) foi realizada através do método descrito por Delbem *et al.* (2002) (Anexo D) utilizando eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A+), previamente calibrado com cinco padrões (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g F/mL}$).

Seleção dos voluntários

Foram selecionados 10 adultos jovens, sem distinção ao gênero, residentes em área com água de abastecimento fluoretada, que apresentaram bom estado de saúde geral e bucal (Delbem *et al.* 2005; Kielbassa *et al.* 2003; Tenuta *et al.* 2005).

Foram excluídos da amostra, os fumantes, portadores de lesões de cárie ativa, aqueles que receberam aplicações de fluoreto pelo menos até 2 semanas antes do experimento, os que utilizaram nos últimos 2 meses ou ainda utilizam medicamentos, tais como: antidepressivos, narcóticos, diuréticos e anti-histamínicos, os que sofreram irradiação, aqueles que tinham atividades aquáticas (o cloro presente nas piscinas leva o indivíduo em contato com ambientes de baixo pH), os que trabalham em ambientes poluídos por compostos de baixo pH (indústrias) e os que possuem doenças sistêmicas (xerostomia, diabetes tipo 1, doenças autoimunes, má nutrição, problemas gastresofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito). Os critérios de exclusão durante o experimento foram: desistência voluntária, alteração do quadro de saúde com conseqüente alteração do fluxo salivar ou necessidade de uso de antibióticos, uso de bochechos orais ou dentifrícios fluoretados e o não cumprimento do desenho experimental.

Desmineralização da superfície de esmalte

Após determinação da dureza de superfície inicial (SH) utilizando um modelo modificado a partir de Queiroz et al. (2008), foi realizada a desmineralização das superfícies de esmalte. Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha com exceção da superfície externa de esmalte (área = 9 mm²) e colocados individualmente em solução desmineralizante (1,3 mmol/L Ca, 0,78 mmol/L P em tampão acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03 ppm F; - 18 mL/bloco) por um período de 16 horas, a 37°C. A seguir os blocos foram submetidos à determinação de dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁).

Análise da profundidade da lesão – Microscopia de Luz Polarizada

Secções de 600 µm de espessura foram removidas de blocos (n=10) submetidos à indução de lesão de cárie, utilizando disco de corte diamantado (11-4243 série 15 HC, Diamond Buehler). As secções dos blocos foram desgastadas e polidas até uma espessura de 100 µm utilizando a politriz Phoenix Beta-Vector (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). As secções de esmalte foram montadas em lâminas de vidro em filme de água destilada/deionizada, cobertos por uma lamínula de vidro e selados com resina ethelan. As secções foram examinadas através de microscópio de Luz Polarizada (AXIOPHOT - ZEISS DSM-940 A, Oberkochen, Germany) sob aumento de 400X (Anexo E). Com o emprego de uma máquina fotográfica digital (Canon, modelo Powershot A620), devidamente acoplada ao microscópio óptico e a um computador, foi possível o armazenamento e a observação detalhada das estruturas de interesse. Três áreas na região central das secções foram analisadas verificando a presença e a espessura da camada de superfície de esmalte e a profundidade da desmineralização (µm), usando o Software (Axiovision Software Rel. 4.3).

Protocolo do estudo in situ e instrução aos voluntários

Antes de iniciar a fase experimental, os voluntários receberam e, nos casos de aceitação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Código de Ética Profissional e Orientações contidas na Resolução 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde para experimentos envolvendo humanos. Orientações por escrito foram fornecidas aos voluntários antes de iniciar a

pesquisa, instruindo-os a utilizar os dispositivos diariamente, inclusive para dormir, removendo-os unicamente durante as refeições principais. Indicações a respeito da não utilização de produtos contendo flúor, com exceção da água fluoretada, assim como de medicamentos e/ou enxagüatórios antibacterianos, também foram fornecidas.

Cada voluntário selecionado foi submetido a uma moldagem do arco superior com alginato para confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo palatino em resina acrílica (Delbem et al. 2005). Foram fixados nos dispositivos palatinos quatro blocos de esmalte desmineralizados (dois de cada lado), os quais ficaram na mesma altura da resina (Anexo F). O estudo contou com 2 regimes experimentais (3 e 7 dias) de tratamento com os dentifrícios: placebo, 275, 550, 1100 µg F/g. Uma semana antes do início do experimento e entre as etapas, os voluntários utilizaram dentifrício sem fluoreto. Os voluntários foram orientados a realizar 3 escovações diárias com o dispositivo em posição e somente removê-lo durante as principais refeições. Após o término de cada período experimental o voluntário fez uso de dentifrício placebo durante 7 dias (wash-out) para, a seguir, iniciar uma nova fase.

Análise da dureza do esmalte

Para os testes de dureza (SH) nos blocos de esmalte foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation - Kyoto - Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA). Após preparo e polimento dos blocos de esmalte, foram realizadas 5 impressões na região central do bloco de esmalte, separadas entre si por uma distância de 100 µm (Anexo G). Seguido a produção da desmineralização do esmalte, os blocos foram novamente submetidos ao teste de dureza de superfície (SH₁), com impressões 100 µm distantes das iniciais. Decorridos os regimes experimentais, determinou-se dureza de superfície pós-regime experimental (SH₂), realizaram-se 5 impressões equidistantes entre si e a 100 µm das impressões iniciais (SH) e calculou-se a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R) de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH_R = ((SH_2 - SH_1)/(SH - SH_1)) \times 100$.

Na seqüência, os blocos de esmalte foram seccionados longitudinalmente na região central do bloco e uma das metades de cada bloco foi incluída em resina acrílica e seqüencialmente polida. Para análise da dureza em secção longitudinal

foram realizadas três seqüências de oito impressões distantes 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte, sendo uma na região central do bloco e, outras duas, 100 μm umas das outras, com carga de 25 g durante 10s (Anexo H). Os valores médios dos três pontos medidos foram calculados em cada distância. A área integrada da microdureza (KHN x μm) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (GraphPad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) (Takeshita et al., 2009).

Determinação de flúor presente no esmalte dentário

A biopsia no esmalte foi realizada de acordo com a técnica de Weatherell *et al.* [1985]. Blocos de esmalte medindo 1,5x1,5 mm foram obtidos das metades das secções longitudinais, fixados em mandril para peça reta e montados em um microscópio modificado com um micrometro (Pantec, São Paulo, Brasil) para medir a profundidade (Anexo I). Removeu-se uma camada de (50 μm) utilizando disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de granulação 400 (silicon-carbide, Buelher) fixada em frascos de poliestireno cristal (J-7, Injeplast, Brasil). Em cada frasco acrescentou-se 0,5 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹. Eles foram mantidos sob agitação constante por 15 minutos e em seguida foi adicionado 0,5 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ (Alves et al., 2007). Para análise de F utilizou-se o eletrodo Orion 9409 e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A⁺) e TISAB III (“tampão ajustador de força iônica total”, Orion Research Inc, Beverly, MA, USA), previamente calibrado com 5 padrões (0,045 a 0,720 μg F/mL), nas mesmas condições das amostras. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GMC versão 2002 (Campos, 2003) com limite de significância de 5%. Foram considerados como fatores de variação os regimes de tratamento (3 e 7 dias) e os dentifrícios experimentais e, como variáveis, os valores de SH, SH₁, SH₂ e %SH_R, ΔKHN e μg F/ mm^3 presentes no esmalte. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e

homogeneidade, Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Os dados de SH, SH₁, SH₂, ΔKHN e μg F/mm³ apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância (two-way) seguida pelo teste de Tukey.

Resultado

Os valores (media ±dp, n=3) da concentração de fluoreto total e iônico nos dentifrícios experimentais (placebo, 275, 550 and 1100 μgF/g) foram, respectivamente: 8,2 ±0,7 e 5,5 ±0,2; 263,9 ±3,6 e 280,1 ±3,6; 544,3 ±8,2 e 567,2 ±7,6; 1129,6 ±15,4 e 1150,4 ±6,9 μgF/g (Anexo J). O valor médio ±dp da dureza de superfície (SH) de todos os blocos dos voluntários foi 362,5 ±4,2 KHN. As médias ±dp dos valores de dureza de superfície de acordo com os tratamentos com dentifrícios variou entre 359,7 ±3,2 e 366,2 ±4,2 KHN (Anexo K). Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos do experimento (p=0,492). O valor médio ±dp da dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁) foi 74,8 ±13,4 KHN e as medias ±dp dos regimes experimentais (tempo e dentifrícios) variou entre 66,0 ±12,5 e 82,5 ±9,0 KHN (p=0,344).

A Figura 1 mostra fotomicrografia de Luz Polarizada do bloco de esmalte após indução de desmineralização *in vitro*. Observa-se uma camada superficial de esmalte seguida de uma área de extrema desmineralização. A profundidade da desmineralização (média ±dp, n=10) foi 47,7 ±12,6 μm e variou entre 36,5 e 66,5 μm. A espessura (média ±dp, n=10) da camada de esmalte superficial foi 9,8 ±0,9 μm (8,3-10,8).

<Figura 1>

A figura 2 mostra a dureza de superfície (SH₂) e os valores da porcentagem de dureza de superfície (%SH_R) pós-regime *in situ* acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento (Anexo M). Em relação ao período de tratamento de 3 dias, todos os grupos experimentais apresentaram diferenças estatisticamente significante entre si. Quanto maior a quantidade de fluoreto, maior foi à de dureza de superfície. Já os grupos experimentais tratados por 7 dias, apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre os grupos (p>0,05): placebo=275 μg F/g; 275 μg F/g=550 μg F/g e 550 μg F/g=1100 μg F/g (figura 2).

Quanto comparados os dois períodos de tempo de tratamento (3 e 7 dias) foi observado que somente o grupo placebo 3 dias foi estatisticamente diferente de

todos os outros grupos. O valor obtido para o grupo placebo 7 dias foi semelhante ao valor apresentado pelo grupo 275 µg F/g – 3 dias e 7 dias ($p>0,05$). Os grupos: 275 µg F/g – 7 dias, 550 µg F/g – 3 dias, 550 µg F/g – 7 dias não apresentaram diferenças significativas entre si. Os grupos com 1100 µg F/g apresentaram resultados semelhantes, para os dois períodos de tempo estudados ($p>0,05$) e foram similares ao 550 µg F/g – 7 dias ($p>0,05$).

<Figura 2>

A Figura 3 mostra os valores da recuperação integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. O grupo placebo 3 dias apresentou maior valor de Δ KHN ($p<0,05$) quando comparado aos demais grupos. Em relação ao período de tratamento de 3 dias, todos os grupos experimentais apresentaram diferenças entre si ($p<0,05$). Quanto maior a quantidade de flúor, menor os valores de Δ KHN e maior o grau de remineralização. O tratamento por 7 dias com os dentifrícios, apresentou valores semelhantes ($p>0,05$) entre os grupos 550 µg F/g e 1100 µg F/g (figura 3). Comparando os dois períodos de tempo de tratamento (3 e 7 dias) observou-se que o grupo placebo 7 dias foi semelhante ao valor apresentado pelo grupo 275 µg F/g – 7 dias ($p>0,05$). Os grupos 275 µg F/g – 7 dias e 550 µg F/g – 3 dias não apresentaram diferenças significativas entre si. Os grupos com 1100 µg F/g apresentaram resultados semelhantes, para os dois períodos de tempo estudados ($p>0,05$) e foram similares ao 550 µg F/g – 7 dias ($p>0,05$).

<Figura 3>

A Figura 4 apresenta os valores (média \pm ep, $n=10$) de dureza de em secção longitudinal em função da distância (μ m) da superfície do esmalte de acordo com os dentifrícios e regime de tratamento (Anexos N e O). O aumento na concentração de fluoreto nos dentifrícios produziu um maior aumento da dureza nas distâncias de 10, 30 e 50 μ m. Na distância de 90 μ m observaram-se menores valores de recuperação de dureza no esmalte, independente da concentração de fluoreto nos dentifrícios e regime de tratamento (3 e 7 dias).

<Figura 4>

A figura 5 mostra os valores de fluoreto (μ g F/mm³) presente no esmalte após remineralização da lesão de cárie artificial de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento (Anexo P). Nos grupos tratados por 3 dias,

obteve-se valores estatisticamente distintos para os dentifrícios placebo e 275 µg F/g, porém grupos 550 e 1.100 µg F/g foram semelhantes. Nos grupos tratados por 7 dias, somente o placebo apresentou-se distinto dos demais. O grupo 275 foi semelhante ao 550 µg F/g, que por sua vez não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo 1.100 µg F/g. (figura 5)

Houve maior semelhança entre os resultados quando foram confrontados os dois períodos de tempos (3 e 7 dias). Os grupos placebo 7 dias e 275 µg F/g – 3 dias, foram estatisticamente semelhantes, sendo este último também semelhante ao grupo 275 µg F/g – 7 dias. Já os grupos 550 – 3 e 7 dias e os grupos 1.100 – 3 e 7 dias não apresentaram diferenças. (figura 5)

<Figura 5>

Discussão

A literatura apresenta alguns modelos de protocolos *in situ* que avaliam a capacidade remineralizadora de produtos contendo fluoreto (Buchalla et al., 2002; Lagerweij and ten Cate, 2002; Magalhães et al., 2007; Nobre-Dos-Santos et al., 2007; Jardim et al., 2008), porém alguns deles deixam de avaliar aspectos importantes, tais como: a profundidade da desmineralização produzida artificialmente, se há remineralização sem tratamento (ação da saliva *in vivo*) e qual tempo necessário para que ocorra a máxima remineralização do esmalte.

O protocolo *in situ* deve permitir que ocorra remineralização pela ação da saliva mostrando que o modelo permite que esta ocorra pela ação dos íons cálcio e fosfato. No presente estudo o modelo permitiu um ganho mineral de 18,4% com o grupo placebo com 3 dias de experimento (Figura 2). Este ganho foi 1,5 vezes maior quando o tempo de permanência na cavidade bucal foi de 7 dias (28,2%). Alguns modelos utilizados mostram perda mineral com o grupo placebo não permitindo observar a ação da saliva no processo (de Freitas et al., 2001) ou não apresentam grupo placebo dificultando verificar se a ação do produto testado foi resultado do tratamento ou da ação da saliva (Lagerweij and ten Cate, 2002; Jardim et al., 2008) devido ao longo tempo que os blocos de esmalte permaneceram na cavidade bucal.

É importante relatar que o processo de desmineralização e remineralização *in vivo* ocorre na dependência dos fatores que envolvem a doença cárie dentária

(Thylstrup and Fejerskov, 1995). Isto implica uma variação temporal difícil de precisar. Desta forma, o produto fluoretado ou agente remineralizador deve apresentar capacidade de remineralizar uma lesão de cárie em um tempo mais breve possível.

O tempo de permanência na cavidade bucal (tempo do regime experimental) é importante no delineamento do protocolo e pode estar relacionado com a profundidade da desmineralização artificial induzida no esmalte e com o tipo de substrato utilizado. Comparando os resultados do dentifrício com concentração de 1100 µg F/g nos regimes experimentais de 3 e 7 dias, verifica-se uma ação máxima do fluoreto em 3 dias. A concentração de 1100 µg F/g produziu uma remineralização 2,3x maior quando comparado ao grupo placebo no período de 3 dias, mas quando comparado ao placebo 7 dias foi 1,5x maior, para os dados de dureza de superfície (Figura 2). O período de tempo de 7 dias permitiu um tempo necessário para o aumento da remineralização pelo grupo placebo. O regime de 7 dias propiciou que os grupos com menor concentração de fluoreto aumentassem a remineralização podendo observar resultados semelhantes entre os grupos 550 µg F/g – 7 dias e os grupos 1100 µg F/g – 3 e 7 dias. Isto é crítico quando se observa protocolos com períodos experimentais de 14 a 60 dias (Lagerweij and ten Cate 2002; Reynolds et al. 2008; Altenburger et al. 2008; Jardim et al. 2008; Chow et al. 2000; Nobre-Dos-Santos et al. 2007; de Freitas et al. 2001; Magalhães et al. 2007; Reynolds et al. 2008; Takatsuka et al. 2008; Koo and Cury 1998; Cury et al. 2001; Buchalla et al. 2002). Goorhuis and Purdell-Lewis (1986) observaram que o processo de remineralização *in situ* no esmalte humano ocorreu rapidamente nos primeiros 9 dias de experimento, mostrando que o padrão é alto nos primeiros dias (Lagerweij and ten Cate, 2002).

O esmalte bovino, substrato utilizado neste estudo, apresenta maior reatividade e maior porosidade o que permite uma maior difusão de íons para o interior da área desmineralizada (Edmunds et al., 1988; Arends and Jongebloed, 1978; Featherstone and Mellberg 1981, Lynch and ten Cate, 2006). Devido a isso, períodos experimentais longos podem comprometer a capacidade do modelo em determinar dose-resposta com o uso do fluoreto. Analisando os resultados de Δ KHN, com regime experimental de 3 dias, observou-se que o dentifrício com 1100 µg F/g apresentou uma redução da área de desmineralização 9,4 e 3,5 vezes maior em relação ao grupo placebo e 550 µg F/g, respectivamente (Figura 3). Esta diferença

reduziu com o regime experimental de 7 dias ocorrendo um aumento ($\pm 33,0\%$) na deposição mineral na área desmineralizada do grupo placebo enquanto que o grupo 1100 $\mu\text{g F/g}$ não apresentou alteração no ganho mineral.

Além do substrato, a profundidade das áreas desmineralizadas no esmalte pode influenciar o tempo necessário para que ocorra uma ampla remineralização. Poucos trabalhos definem a profundidade da área desmineralizada induzida nos seus protocolos (Buchalla et al., 2002; Lagerweij and ten Cate, 2002; Nobre-dos-Santos M et al., 2007;) variando entre 30,0 a 77,3 μm . No presente estudo a profundidade da desmineralização artificial foi ao redor de 47,7 μm , com característica de uma “lesão de cárie” de subsuperfície (Figura 1). A remineralização é mais lenta em lesões mais profundas ($\pm 100 \mu\text{m}$) que a observada em nossos resultados, pois a distância de difusão dos íons é maior para que ocorram os depósitos minerais (Mellberg, 1991). Observou-se que 3 dias foram suficientes para que o tratamento com dentifrício com 1100 $\mu\text{g F/g}$ atingisse o máximo de sua capacidade remineralizadora (Figura 2 e 3). Os demais grupos demandarão um tempo maior, mas atingirão o nível do grupo 1100 $\mu\text{g F/g}$, como é possível observar com o grupo 550 $\mu\text{g F/g}$ – 7 dias que apresentou resultados semelhantes aos grupos 1100 $\mu\text{g F/g}$ – 3 e 7 dias (Figura 2 e 3). Outro fator que permitiu uma rápida mineralização em 3 dias com o dentifrício 1100 $\mu\text{g F/g}$ foi o tipo de lesão formada. A área de desmineralização apresenta uma zona superficial mais mineralizada (avermelhada) do que a zona subsequente escura (corpo da lesão), entretanto a zona superficial é extremamente menos mineralizada que a área de esmalte hígido (amarelo). A Figura 4 mostra valor de dureza de 57,7 $\pm 12,0$ Knoop a uma profundidade no esmalte de 10 μm no grupo placebo – 3 dias após remineralização. Os valores após a desmineralização do esmalte não foram mensuradas em secção longitudinal, mas é possível inferir que foram menores, já que houve 18% de aumento da dureza de superfície em relação aos valores pós-desmineralização (Figura 2). Este tipo de “lesão artificial de cárie” apresenta uma rápida remineralização, pois apresenta poros com diâmetro maiores e próximos, e propicia melhor discriminação e diferenciação entre os tratamentos, sendo mais indicada quando se deseja estudar eficiência entre regimes de remineralização (Lynch et al., 2007).

Foi observado que os resultados de remineralização estiveram relacionados com o aumento da concentração de fluoreto presente no esmalte, havendo uma

relação dose-resposta. Entretanto, o aumento no tempo de permanência na cavidade bucal e exposição aos dentifrícios fluoretados não aumentou a concentração de fluoreto presente no esmalte para um mesmo dentifrício, exceto para o grupo placebo (Figura 5). Considerando os resultados do grupo placebo – 7 dias, o aumento na remineralização observado nos grupos 275 e 550 $\mu\text{g F/g}$ – 7 dias (Figuras 2 e 3) ocorreu provavelmente devido à influência da ação salivar. Apesar de o fluoreto ter ação comprovada no processo de remineralização, existe um limite na reatividade deste com o esmalte, reatividade esta que decresce à medida que se aumenta o tempo.

Além de apresentar capacidade dose-resposta, o modelo *in situ* deve considerar as questões éticas, principalmente em relação ao desconforto dos voluntários. Assim, períodos experimentais curtos apresentam vantagens como melhor adesão ao protocolo e facilidade em realizá-lo, possibilitando a obtenção de resultados mais padronizados.

Baseado nos resultados e discussão, concluiu-se que o modelo de remineralização *in situ* apresentou capacidade de verificar dose-resposta com regime experimental de 3 dias. E que este tipo de modelo é mais apropriado para testar dentifrícios de baixa concentração de fluoreto.

Referências Bibliográficas*

Altenburger MJ, Schirrmester JF, Wrbas KT, Klasser M, Hellwig E. Fluoride uptake and remineralisation of enamel lesions after weekly application of differently concentrated fluoride gels. *Caries Res.* 2008;42(4):312-318. Epub 2008 Jul 29.

Alves KMRP, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FAL, Buzalaf MAR, Sasaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res.* 2007;41(4):263-267.

Ammari AB, Bloch-Zupan A, Ashley PF. Systematic review of studies comparing the anti-caries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride or less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. *Caries Res.* 2003;37:85-92.

Arends J, Jongebloed WL: Crystallites dimensions of enamel. *J Biol buccale* 1978;6:161-171.

Brighenti FL, Delbem ACB, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res.* 2006;40(3):239-244.

Buchalla W, Attin T, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Fluoride uptake, retention, and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. *J Dent Res.* 2002;81(5):329-333.

Campos GM: GMC 2003 (computer program) Ribeirao Preto: School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.

Chow LC, Takagi S, Carey CM, Sieck BA. Remineralization effects of a two-solution fluoride mouthrinse: an in situ study. *J Dent Res.* 2000 Apr;79(4):991-995.

* de acordo com as normas do periódico internacional *Caries Research*

Cochran JA, Ketley CE, Duckworth RM, Van Loverem 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.

Cury JA, Hashizume LN, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. *Caries Res.* 2001 Mar-Apr;35(2):106-110.

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.

de Freitas RR, de Oliveira JA, Taga EM, Buzalaf MA. Effect of sucrose-containing gum and fluoridated dentifrice on in situ remineralization of artificial caries. *Pesqui Odontol Bras.* 2001 Apr-Jun;15(2):98-103.

Delbem ACB, Vieira AEM, Cury JA. Cariostatic potencial evaluation of most popular Brazillian dentifrice. *Rev Bras Odontol.* 2002;59:14-18.

Delbem ACB, Carvalho LP, Morihisa RK, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.*, 2005;39:258-260.

Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM: Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res.* 1988;22:327-326.

Featherstone JDB, Mellberg JR: Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res.* 1981;15:109-114.

Goorhuis J, Purdell-Lewis DJ. 0,25% and 0,4% amine fluoride gel for weekly topical application. *Caries Res.* 1986;20:458-464.

Horowitz HS. The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentration for preschool-aged children. *J Public Health Dent.* 1992;52:216-221.

Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M. Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: an in situ study. *J Dent.* 2008;36:396-401.

Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H. Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. *Oper Dent.* 2003;28:765-772.

Koo RH, Cury JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent.* 1998 Aug;11(4):173-176.

Lagerweij MD, ten Cate JM. Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. *Caries Res.* 2002;36:270-274.

Lima TJ, Ribeiro CCC, Tenuta LMA, Cury JA. Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. *Caries Res.* 2008;42:46-50.

Lynch RJM, ten Cate JM: The Effect of Lesion Characteristics at Baseline on Subsequent De- and Remineralisation Behaviour. *Caries Res.* 2006;40:530-535.

Lynch RJM, Mony U, ten Cate JM: Effect of lesion characteristics and mineralising solution type on enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 2007;41:257-262.

Magalhães AC, Furlani TA, Italiani FM, Iano FG, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Archives Oral Biology* 2007; 52(12):1155-1160.

Mascarenhas AK. Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent.* 2000;22:267-277.

Mellberg JR: Relationship of original mineral loss in caries-like lesions to mineral changes in situ. *Caries Res.* 1991;25:459-461.

Narvai PC. Dental caries and fluoride: a twentieth century relation. *Ciencia e Saúde Coletiva* 2000;5:381-392.

Nobre-Dos-Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel Cury AA, Cury JA. In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. *J Oral Sci.* 2007;49:147-154

Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008;19(1):21-27.

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008 Apr;87(4):344-348.

Stookey GK, Mau MS, Isaacs RL, Gonzales-Gierbolini C, Bartizek RD, Biesbrock AR. The relative anticaries effectiveness of three fluoride-containing dentifrices in Puerto Rico. *Caries Res.* 2004;38:542-550.

Takatsuka T, Exterkate RA, ten Cate JM. Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study. *Clin Oral Investig.* 2008 Jun;12(2):173-177. Epub 2007 Dec 20.

Takehita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB. *In vitro* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res.* 2009; X(X):XXX-XXX. (In Press).

Tenuta LM, Ribeiro C C, Goncalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, Tagliaferro EP, Pecharki GD, Napimoga MH, Tabchoury CP, Cury JA. The short-term *in situ* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. *J Dent.* 2005;33:491-497.

Thylstrup A, Fejerskov O: Cariologia clínica, ed 2. São Paulo, Ed Santos, 1995.

Legendas de figuras

Figura 1 - Fotomicrografia de Luz Polarizada do esmalte bovino após indução de desmineralização artificial do esmalte (Aumento de 400 X).

Figura 2 - Valores médios (n=10) de dureza (Knoop) de superfície pós-regimes experimentais (SH₂) de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, p=0,031). As barras verticais indicam o erro-padrão da média e os valores entre parêntesis referem-se à porcentagem de recuperação da dureza de superfície (%SH_R).

Figura 3 - Valores (média ±ep, n=10) da recuperação integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, p<0,001).

Figura 4 - Valores (média, n=10) de dureza (Knoop) em secção longitudinal em função da distância (μm) da superfície do esmalte de acordo com as concentrações de fluoreto nos dentifrícios e regime de tratamento (3 e 7 dias).

Figura 5 - Valores (média ±ep, n=10) de fluoreto (μg F/mm³) presente no esmalte de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, p=0,032).

Figura 1 - Fotomicrografia de Luz Polarizada do esmalte bovino após indução de desmineralização artificial do esmalte (Aumento de 400 X).

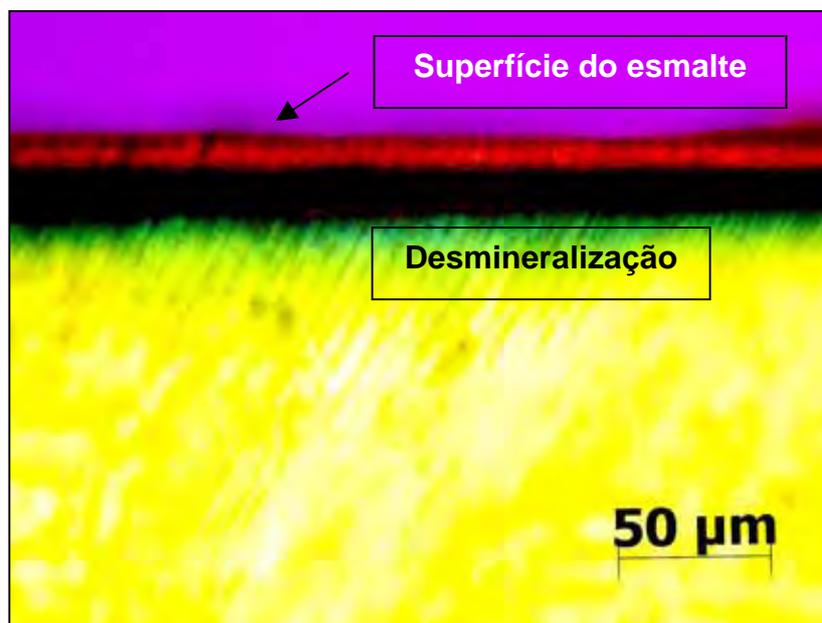


Figura 2 - Valores médios (n=10) de dureza (Knoop) de superfície pós-regimes experimentais (SH₂) de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, p=0,031). As barras verticais indicam o erro-padrão da média e os valores entre parêntesis refere-se à porcentagem de recuperação da dureza de superfície (%SH_R).

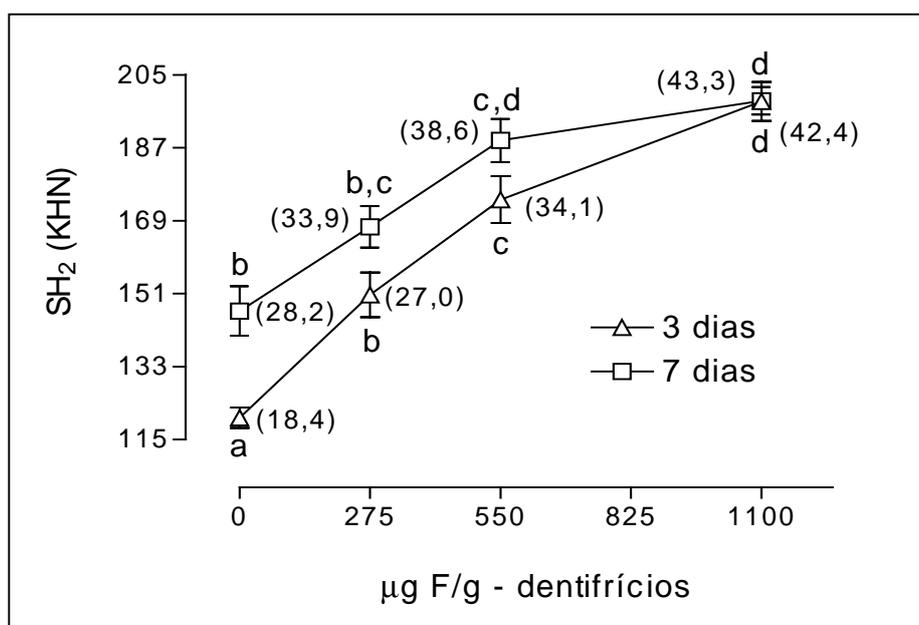


Figura 3 - Valores (média ±ep, n=10) da recuperação integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e

tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, $p < 0,001$).

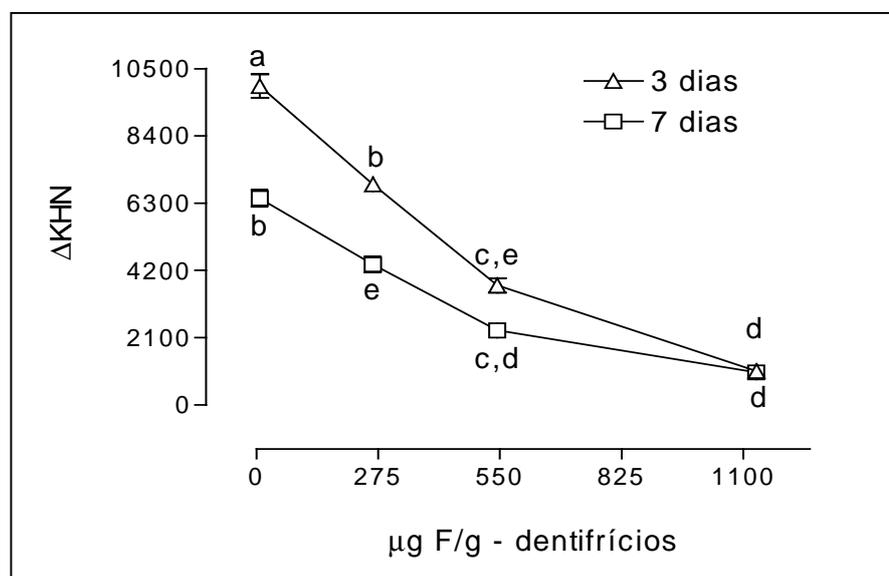


Figura 4 - Valores (média, $n=10$) de dureza (Knoop) em secção longitudinal em função da distância (μm) da superfície do esmalte de acordo com as concentrações de fluoreto nos dentifrícios e regime de tratamento (3 e 7 dias).

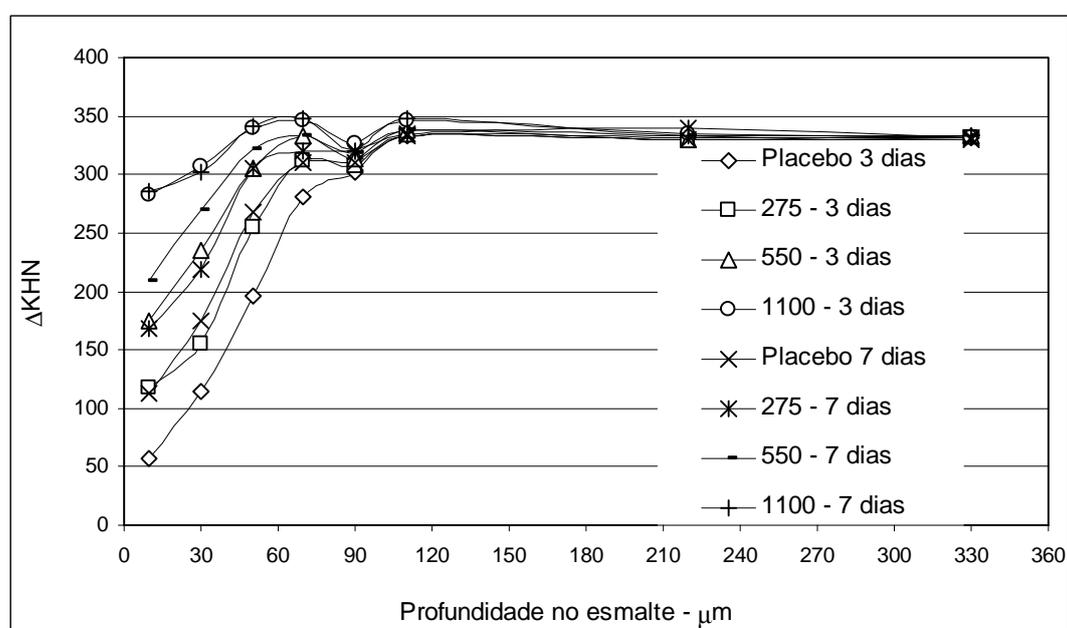
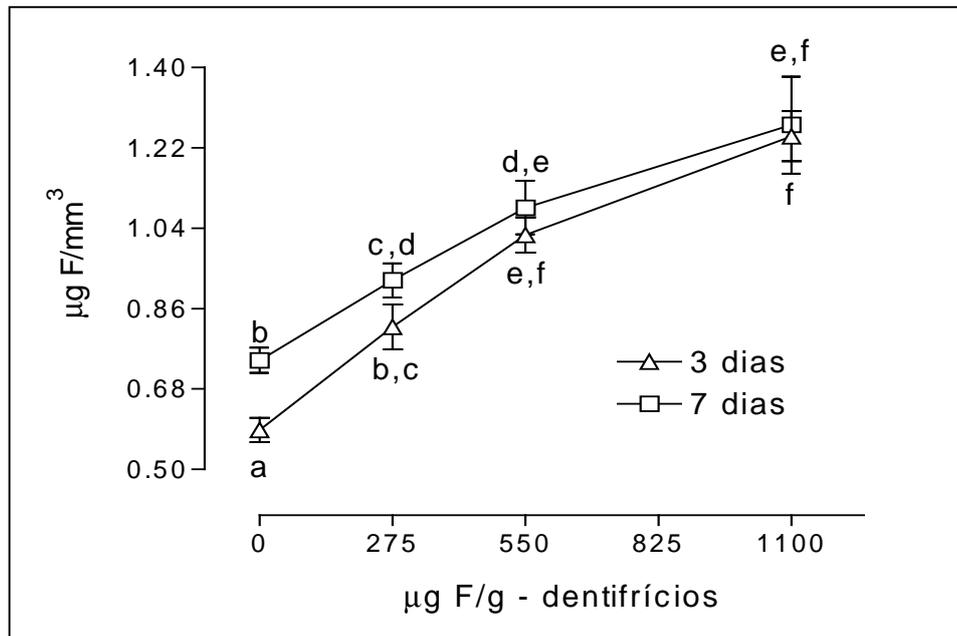


Figura 5 - Valores (média \pm ep, $n=10$) de fluoreto ($\mu\text{g F}/\text{mm}^3$) presente no esmalte de acordo com a concentração de flúor nos dentifrícios e tempo de tratamento. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significante (ANOVA, $p=0,032$).



Anexos

ANEXO A Comitê de ética

unesp

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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 043/2008
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 30 de abril de 2008.

Referência Processo FOA 2007-02270

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **"DETERMINAÇÃO DE DOSE-RESPOSTA DE DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS EM MODELO DE REMINERALIZAÇÃO "IN SITU" UTILIZANDO ESMALTE DENTAL BOVINO"** expede o seguinte parecer:

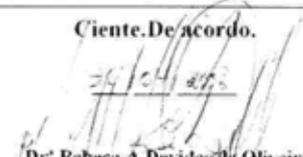
Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado o relatório final em 29/04/2009.

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

Ilma. Senhora
Dr. REBECA AFONSO D. DE OLIVEIRA
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.



Dr. Rebeca A. Devides de Oliveira

ANEXO B

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Confecção dos blocos de esmalte bovino (3 x 3 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).



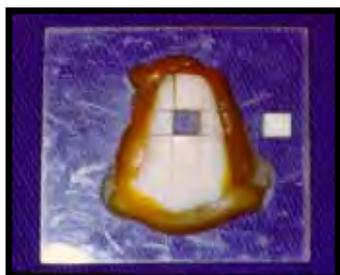
2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, 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 3 mm de espessura. Em seguida, foi realizado o corte no sentido transversal.



5. 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 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



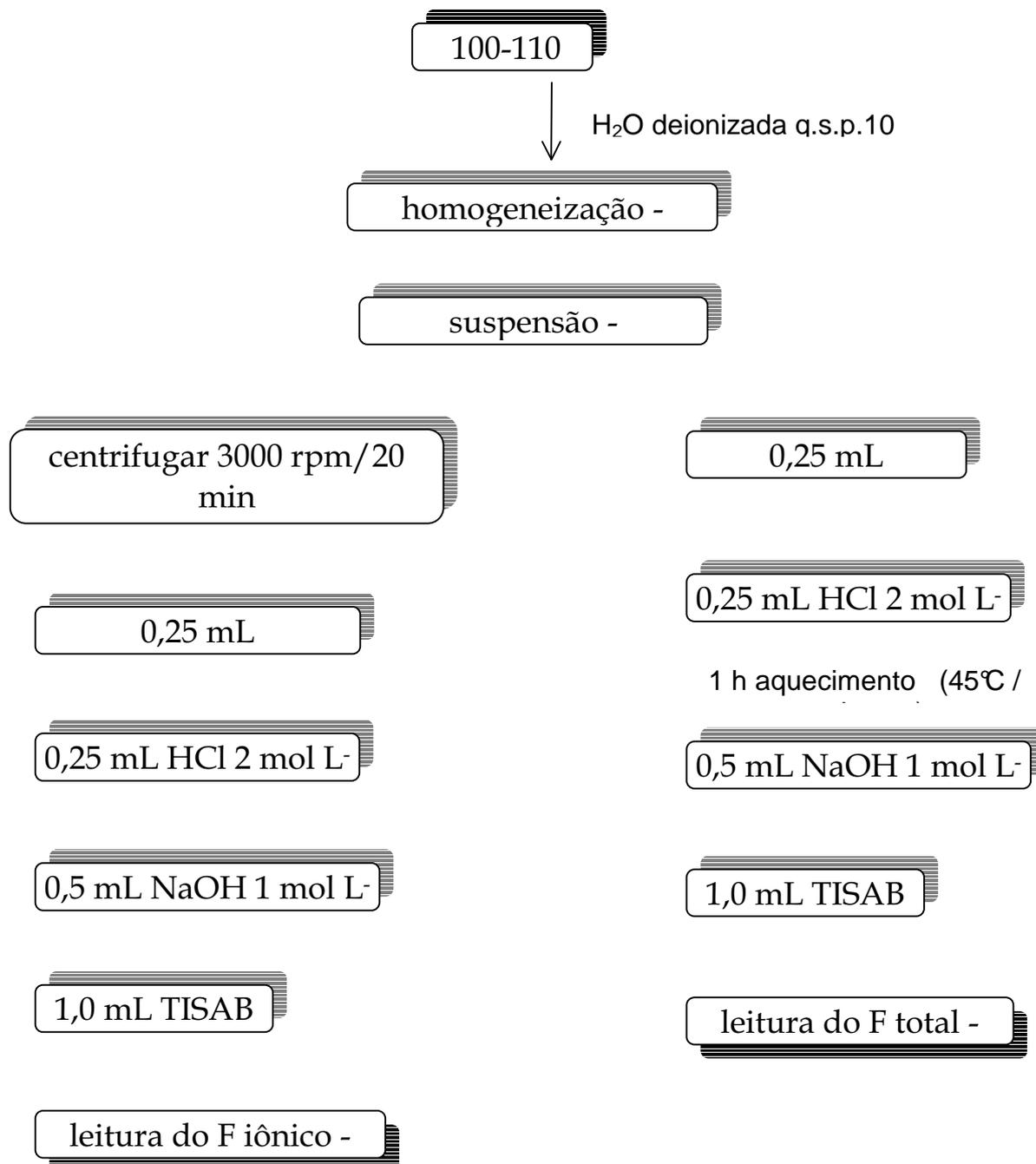
3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual será polida.

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 destilada/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 destilada/deionizada (2 minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

ANEXO D

DOSAGEM DE F NOS DENTIFRÍCIOS



ANEXO E

ANÁLISE DA PROFUNDIDADE DA LESÃO – MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA



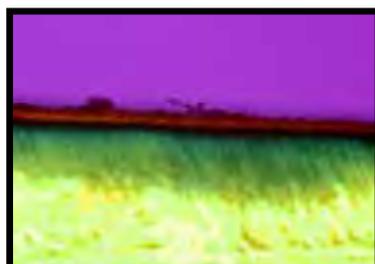
6. Secção de esmalte medindo aproximadamente 100 μm de espessura que foi montado em lâmina microscópica para análise.



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



8. Microscópio de Luz Polarizada e microcomputador.



4. Fotomicrografia de Luz Polarizada do esmalte bovino após indução de desmineralização *in vitro*. Aumento de 400X.
-

ANEXO F

DISPOSITIVO PALATINO



1. Dispositivo palatino, contendo 4 blocos de esmalte bovino desmineralizados artificialmente.

ANEXO G

ANÁLISE DA DUREZA DO ESMALTE



2. 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).

3. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da dureza de superfície.



4. Fotomicrografia das impressões para análise de dureza de superfície inicial (SMH-inicial) (Aumento: 100x).

ANEXO H

DUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 gramas de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, USA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 minutos e mais 7 minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola adesiva (Super Bonder – Loctite).
	<ol style="list-style-type: none"> 2. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.
	<ol style="list-style-type: none"> 3. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMSWIN (NewAge Industries, USA).
	<ol style="list-style-type: none"> 4. Fotomicrografia das impressões para análise da dureza de secção longitudinal nas diferentes distâncias. (Aumento: 100x).

Seqüência do polimento de esmalte:

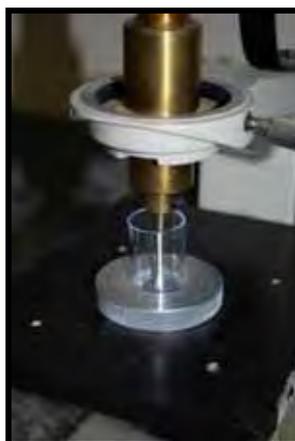
1. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 320 (1 minuto – 2 pesos), 600, 800 e 1200 (2 minutos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
2. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro MICROCLOTH SUPREME PSA (Buehler Polishing Cloth) (2 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1/4 micron base-água (Buehler);

3. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água destilada/deionizada (3 minutos);
4. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

ANEXO I**ANÁLISE DO CONTEÚDO DE FLÚOR NO ESMALTE**

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

2. Bloco de esmalte adaptado ao mandril, sendo submetido à microabrasão, com desgaste de 50 μm , para análise da incorporação de F.



3. Após desgaste, pó de esmalte presente na lixa adaptada em frascos de poliestireno cristal (J - 7, Injeplast).

ANEXO J

VALORES - DOSAGEM DE FLÚOR NOS DENTIFRÍCIOS

Curva de calibração

Data	Primeira	Segunda	Tercera	Média
Blank	178,0			178,00
0,1250	118,4	120,2	119,2	119,27
0,2500	101,7	103,4	103,1	102,73
0,5000	85,8	86,1	86,0	85,97
1,0000	68,5	69,4	69,1	69,00
2,0000	50,3	51,5	50,6	50,80
Teste 1	86,1	86,2	86,2	86,17
Teste 2	87,1	87,0	86,9	87,00

Curva de calibração / Análise de Flúor dos Dentifrícios

TISAB II pH5,2

[padrão] µg/mL	mL do padrão	mL HCl 2N	mL NaOH N	mL de TISAB II	[Mstura] µg/mL	log F	mV	log F calc.	µg F/mL calc.	CV.%
1,00	0,125	0,125	0,250	0,5	0,1250	-0,903089987	119,27	-0,885476107	0,1272	1,74
2,00	0,125	0,125	0,250	0,5	0,2500	-0,602059991	102,73	-0,603954186	0,2489	-0,44
4,00	0,125	0,125	0,250	0,5	0,5000	-0,301029996	85,97	-0,306318044	0,4917	-1,69
8,00	0,125	0,125	0,250	0,5	1,0000	0,000000000	69,00	-0,009155427	0,9791	-2,13
16,00	0,125	0,125	0,250	0,5	2,0000	0,301029996	50,80	0,311753785	2,0500	2,44
									média	-0,02

Curva Total

intercepção 1,207478399

inclinação -0,017632374

Rquad 0,99965

Slope -56,7

Temp: 25°C

	[padrão] µg/mL	mL do padrão	mL HCl 2N	mL NaOH N	mL de TISAB II	[Mstura] µg/mL	mV	log F calc.	µg F/mL calc.	CV.%
Blank	0,000	0,125	0,125	0,250	0,500	0,00	178,00	-1,93108422	0,012	
Teste 1	4,000	0,125	0,125	0,250	0,500	0,50	86,17	-0,31184462	0,4877	-2,52
Teste 2	4,000	0,125	0,125	0,250	0,500	0,50	87,00	-0,32653816	0,47	-6,05

ANEXO K

VALORES – DUREZA DE SUPERFÍCIE INICIAL (SH)

3 dias				
	0	275	550	1100
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	360,70	362,05	361,50	359,40
2	360,30	360,30	362,55	357,45
3	362,70	359,50	359,05	359,35
4	361,85	361,85	363,90	353,07
5	357,60	361,70	367,55	363,50
6	362,90	363,90	367,30	358,80
7	364,05	365,70	370,60	357,90
8	363,35	366,60	361,50	361,65
9	362,55	366,65	359,45	361,80
10	363,95	366,35	359,85	363,80
mean=	362,0	363,5	363,3	359,7
sd=	2,0	2,7	3,9	3,2
n=	10	10	10	10
se=	0,6	0,9	1,2	1,0
	a	a	a	a
7 dias				
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	361,65	361,30	360,05	357,95
2	347,56	361,65	362,87	359,35
3	362,35	360,70	358,90	360,05
4	360,50	365,07	363,75	366,07
5	360,35	367,55	366,90	361,65
6	362,95	369,95	367,25	357,50
7	362,50	369,95	360,10	353,60
8	364,65	371,10	371,65	360,85
9	372,00	363,70	359,60	364,30
10	361,45	371,05	359,05	365,05
mean=	361,6	366,2	363,0	360,6
sd=	6,0	4,2	4,3	3,8
n=	10	10	10	10
se=	1,9	1,3	1,4	1,2
	a	a	a	a

ANEXO L

VALORES – DUREZA DE SUPERFÍCIE APÓS DESMINERALIZAÇÃO
(SH₁)

3 dias				
	0	275	550	1100
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	69,45	50,85	77,20	70,00
2	72,45	56,40	68,80	79,85
3	88,25	61,20	70,85	94,60
4	65,30	89,50	107,35	94,73
5	62,15	70,95	90,45	72,65
6	66,65	84,65	92,40	76,15
7	78,10	92,30	52,50	85,45
8	80,65	76,00	51,35	74,05
9	75,15	84,60	82,35	64,80
10	66,25	80,70	86,65	80,05
mean=	72,4	74,7	78,0	79,2
sd=	8,1	14,4	17,7	9,9
n=	10	10	10	10
se=	2,6	4,6	5,6	3,1
	a	b	c	d
7 dias				
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	47,93	69,95	87,50	71,80
2	58,80	52,35	79,80	69,40
3	61,30	49,00	80,55	69,15
4	67,30	65,73	86,85	78,40
5	82,07	77,15	97,60	70,65
6	54,20	74,40	88,40	89,40
7	89,00	82,40	62,45	91,85
8	73,25	75,15	82,05	57,15
9	64,60	60,40	79,05	56,15
10	61,05	93,85	80,60	104,60
mean=	66,0	70,0	82,5	75,9
sd=	12,5	13,7	9,0	15,4
n=	10	10	10	10
se=	4,0	4,3	2,9	4,9
	b	c	c,d	d

ANEXO M

VALORES – DUREZA DE SUPERFÍCIE FINAL (SH₂)

	3 dias			
	0	275	550	1100
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	111,35	118,95	153,85	209,90
2	115,30	124,87	190,00	194,95
3	131,40	153,15	192,75	212,85
4	117,25	153,25	184,95	184,13
5	128,85	150,20	198,85	198,95
6	114,15	166,55	175,40	229,80
7	134,00	173,30	150,85	197,45
8	116,90	146,10	146,90	181,35
9	120,50	156,45	175,50	188,20
10	114,40	163,80	173,20	186,55
mean=	120,4	150,7	174,2	198,4
sd=	8,0	17,2	18,3	15,2
n=	10	10	10	10
se=	2,5	5,5	5,8	4,8
	a	b	c	d

	7 dias			
	0	275	550	1100
	Placebo	275	550	1100
Voluntário				
1	112,90	149,93	175,40	177,33
2	139,05	146,60	175,47	194,55
3	155,50	163,55	199,35	207,85
4	128,85	170,20	171,35	193,70
5	166,45	172,60	205,80	213,75
6	131,85	195,50	204,50	195,50
7	169,67	150,85	169,35	204,45
8	152,00	164,60	174,80	193,50
9	170,40	174,20	203,90	195,60
10	140,20	187,30	208,05	210,00
mean=	146,7	167,5	188,8	198,6
sd=	19,3	16,0	16,6	10,6
n=	10	10	10	10
se=	6,1	5,1	5,3	3,4
	b	b,c	d,c	d

ANEXO N

VALORES – DUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL

Placebo 3 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	69,4	118,4	218,3	308,4	315,0	339,4	343,8	336,6
2	48,9	116,9	219,4	299,3	318,8	332,4	337,9	338,6
3	65,3	144,8	218,0	289,9	306,5	322,1	329,9	321,1
4	77,0	103,8	197,8	275,8	287,4	305,5	316,9	326,0
5	61,5	119,0	181,0	271,3	304,5	343,5	335,0	339,0
6	51,0	105,0	168,0	238,0	287,0	339,0	331,0	323,0
7	38,0	87,0	162,0	272,5	315,0	331,0	323,0	327,0
8	55,0	113,5	186,0	289,0	301,0	335,0	325,0	327,5
9	65,0	124,0	198,0	266,0	280,0	331,0	323,0	327,0
10	45,5	110,5	212,5	302,5	308,0	345,0	352,0	341,0
média=	57,7	114,3	196,1	281,3	302,3	332,4	331,7	330,7

275 - 3 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	105,6	143,8	241,4	298,8	301,4	323,6	322,5	325,9
2	115,0	158,8	260,0	314,3	306,9	332,0	328,0	327,6
3	121,0	174,0	247,8	302,7	298,5	331,3	335,0	331,7
4	111,0	152,0	252,0	304,0	304,0	335,0	315,0	315,0
5	129,5	150,5	257,0	327,0	311,0	323,0	331,0	335,0
6	109,0	139,0	241,0	297,0	310,0	335,0	331,0	339,0
7	119,0	161,0	244,0	319,0	284,0	343,0	339,0	335,0
8	113,0	169,0	301,0	315,0	319,0	339,0	347,0	335,0
9	128,0	159,0	249,0	315,0	304,0	331,0	331,0	347,0
10	118,5	147,0	257,5	329,0	325,0	335,0	325,0	331,0
média=	117,0	155,4	255,1	312,2	306,4	332,8	330,5	332,2

550 - 3 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	169,7	206,0	299,8	323,2	299,3	333,0	330,3	333,0
2	158,5	222,3	310,8	319,3	320,3	340,0	331,3	331,5
3	176,0	236,5	319,0	334,0	309,5	332,5	335,0	343,0
4	171,5	246,0	281,0	331,0	304,0	323,0	323,0	323,0
5	187,0	261,3	305,0	337,0	313,5	335,0	335,0	333,0
6	177,5	241,5	304,5	341,0	329,0	346,0	327,0	329,0
7	187,5	212,0	335,0	346,0	335,5	360,5	339,5	337,5
8	176,0	240,0	300,5	333,0	292,5	332,5	323,0	337,0
9	164,3	236,3	291,5	331,0	307,5	343,0	331,5	333,0
10	177,0	248,0	311,5	335,0	324,0	341,5	329,0	335,0
média=	174,5	235,0	305,9	333,0	313,5	338,7	330,5	333,5

1100 - 3 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	261,0	274,0	323,0	347,0	328,0	340,5	335,0	327,0
2	287,8	298,0	336,8	340,0	320,5	342,5	327,0	325,0
3	270,0	282,5	333,3	331,3	321,8	345,0	331,0	335,0
4	291,5	291,8	339,3	349,5	351,5	337,0	345,5	339,0
5	297,0	301,0	365,0	380,0	356,0	352,0	339,0	331,0
6	287,5	295,0	333,0	339,0	290,0	370,0	335,0	331,0
7	283,3	300,3	351,5	331,0	321,5	335,0	331,0	339,0
8	284,0	343,0	352,0	343,0	339,0	347,0	339,0	323,0
9	281,0	343,0	323,0	352,0	327,0	347,0	339,0	339,0
10	279,0	299,0	330,0	339,0	304,0	343,0	331,0	331,0
média=	282,2	302,8	338,7	345,2	325,9	345,9	335,3	332,0

ANEXO O

VALORES – DUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL

Placebo 7 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	107,0	166,5	243,8	288,8	314,7	333,7	329,7	331,0
2	106,2	173,0	267,7	331,8	306,5	329,7	332,3	337,7
3	112,8	191,0	292,5	304,5	321,3	334,5	335,0	327,0
4	103,0	172,5	256,0	301,0	301,0	335,0	327,0	323,0
5	136,5	201,0	246,0	311,0	304,0	327,0	323,0	339,0
6	113,0	160,0	274,0	310,0	308,0	339,0	335,0	331,0
7	123,0	208,0	290,0	323,0	308,0	335,0	335,0	335,0
8	111,0	156,0	274,0	304,0	304,0	331,0	323,0	327,0
9	111,0	168,0	257,0	315,0	311,0	331,0	319,0	315,0
10	111,0	143,0	271,0	319,0	323,0	335,0	343,0	327,0
média=	113,4	173,9	267,2	310,8	310,1	333,1	330,2	329,3

275 - 7 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	150,7	198,2	286,7	313,3	315,8	334,3	337,0	337,0
2	164,3	224,8	323,0	327,7	302,2	342,0	330,0	329,7
3	177,0	211,3	322,3	328,3	336,3	337,7	339,7	333,3
4	179,3	244,0	291,0	313,5	327,0	327,0	352,0	327,0
5	167,0	225,0	289,0	319,0	323,0	335,0	347,0	335,0
6	166,8	220,0	297,0	324,0	314,5	335,0	329,0	325,0
7	185,0	187,0	266,0	331,0	268,5	323,0	327,0	327,0
8	164,0	202,0	278,0	327,0	331,0	343,0	331,0	335,0
9	170,0	224,5	319,0	343,0	304,0	347,0	339,0	335,0
10	171,0	200,0	289,5	331,0	308,0	327,0	343,0	323,0
média=	169,5	213,7	296,2	325,8	313,0	335,1	337,5	330,7

550 - 7 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	196,5	233,0	344,2	333,3	326,2	337,5	331,0	332,3
2	215,2	284,0	336,3	341,8	325,7	337,7	329,7	332,3
3	198,0	290,0	339,0	339,0	327,0	331,0	335,0	335,0
4	208,0	319,0	335,0	335,0	315,0	343,0	339,0	327,0
5	207,3	296,0	317,0	341,5	319,0	346,0	333,0	333,0
6	205,0	256,0	323,5	331,0	331,0	331,0	323,0	335,0
7	220,0	263,0	323,0	327,0	311,0	343,0	347,0	331,0
8	214,0	267,5	324,3	332,3	313,5	343,0	329,0	335,0
9	208,0	271,0	294,0	327,0	301,0	331,0	327,0	327,0
10	212,0	275,5	318,5	329,0	319,0	343,0	339,0	335,0
média=	208,4	275,5	325,5	333,7	318,8	338,6	333,3	332,3

1100 - 7 dias								
vol.	10	30	50	70	90	110	220	330
1	297,0	290,0	343,0	330,0	317,0	323,0	331,0	323,0
2	272,0	311,0	340,3	348,0	325,0	347,5	337,0	339,0
3	287,5	309,5	339,0	337,5	318,0	349,5	337,0	335,0
4	262,5	289,5	341,0	339,0	315,0	345,0	337,0	337,0
5	289,0	295,5	341,0	365,5	323,5	366,0	329,0	341,0
6	295,5	315,0	343,0	343,0	335,0	352,0	335,0	330,0
7	297,0	300,0	337,0	343,0	301,0	341,5	327,0	320,0
8	281,0	311,0	347,0	365,0	335,0	365,0	331,0	339,0
9	278,5	297,0	339,0	343,0	347,0	352,0	331,0	327,0
10	297,0	269,0	329,0	329,0	298,5	331,0	331,0	339,0
média=	285,7	298,8	339,9	344,3	321,5	347,3	332,6	333,0

ANEXO P

VALORES – FLUORETO ($\mu\text{g F/mm}^3$) PRESENTE NO ESMALTE

3 dias				
	0	275	550	1100
Voluntário	Placebo	275	550	1100
1	0,673	0,722	0,939	1,461
2	0,601	0,691	1,184	1,108
3	0,492	0,686	1,245	1,377
4	0,736	1,037	1,035	1,415
5	0,451	0,955	0,845	0,989
6	0,594	0,978	0,992	1,460
7	0,656	0,737	0,986	1,250
8	0,527	0,755	0,885	1,219
9	0,582	0,615	1,072	1,161
10	0,567	1,009	1,063	1,018
média=	0,588	0,819	1,025	1,246
dp=	0,086	0,157	0,124	0,177
ep=	0,027	0,050	0,039	0,056
	a	b,c	d,e	f

7 dias				
	0	275	550	1100
Voluntário	Placebo	275	550	1100
1	0,979	0,906	1,250	1,78
2	0,669	0,788	1,274	1,64
3	0,731	1,167	1,250	1,64
4	0,718	0,838	0,986	0,85
5	0,761	0,794	1,247	1,52
6	0,741	0,891	0,994	1,23
7	0,684	1,036	1,045	1,14
8	0,671	0,947	0,858	0,92
9	0,766	1,010	0,744	0,97
10	0,723	0,852	1,212	1,02
média=	0,744	0,923	1,086	1,271
dp=	0,089	0,120	0,188	0,346
ep=	0,028	0,038	0,060	0,109
	b	c,d	e,f	e,f