

ANA CAROLINA SOARES FRAGA ZAZE

**Efeito da incorporação de Cálcio e Fosfato em
dentifrícios fluoretados com baixa concentração na
eficácia anticárie**

Araçatuba

2009

ANA CAROLINA SOARES FRAGA ZAZE

**Efeito da incorporação de Cálcio e Fosfato em
dentifrícios fluoretados com baixa concentração na
eficácia anticárie**

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

**Orientador: Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo
Delbem**

**Co-Orientador: Profa. Dra. Kikue Takebayashi
Sasaki**

**Araçatuba
2009**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Sylvio e Regina, meus maiores incentivadores.

Graças a vocês, me tornei uma pessoa feliz e realizada. Seus ensinamentos e esforços para proporcionar uma vida digna à nossa família estão gravados não só na minha mente, mas também no meu coração. Obrigada pela educação e oportunidades que vocês me deram, e principalmente por serem meus amigos. Desculpem-me por toda a preocupação que causei durante o período em que estive na pós-graduação (devido às viagens semanais) infelizmente este foi um incômodo inevitável, mas creio que recompensador. O resultado está em suas mãos, e espero que seja tão gratificante para vocês como é para mim.

Ao meu irmão Renato. Como já lhe disse em outras oportunidades, você sempre foi o meu maior companheiro. Desde a infância até os bancos da universidade. Nossos caminhos se separaram em busca de melhores oportunidades profissionais, mas saiba que você sempre está comigo, pois por mais distante que estejamos, te carrego na minha lembrança e no coração.

Ao Cesar, meu esposo. Sempre compreensivo com relação à minha ausência, principalmente nos últimos meses. Melhor do que ninguém, você sabe o quanto este trabalho significa para mim. Muitas vezes, deixei de lado nosso relacionamento e vida social, devido às minhas atividades na pós-graduação e à distância que nos manteve afastados durante todos estes anos. Meu cansaço permanente e a falta de tempo para me dedicar

à nossa casa e nossos planos também afetaram a sua vida. Agradeço sua compreensão e apoio, sem eles, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por você fazer parte da minha vida, e consequentemente das minhas conquistas.

Obrigada por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a graça de viver, pelos ensinamentos diários, pelas pessoas que colocou no meu caminho e principalmente, por não me deixar desistir, me dando forças para superar todos os momentos difíceis e me protegendo durante minhas viagens.

Agradeço aos meus avós Antônio, Sylvia, Wilson e Lourdes. Graças a vocês eu tenho pais maravilhosos. A experiência é uma dádiva associada ao tempo, mas podemos aprender muito com as experiências alheias, quando nos são passadas na forma de ensinamentos ou memórias. Obrigada por todos os ensinamentos que vocês me proporcionaram.

A todos os meus tios, tias, primos e primas. Sempre tão presentes na minha vida, incentivando e partilhando de todas as conquistas e dificuldades. Vocês são muito importantes para mim. Nos últimos anos, não pude compartilhar de momentos especiais de nossas famílias, devido ao fato de estar sempre atribulada e com compromissos para cumprir, mas vocês foram compreensivos, mostrando o quanto se importam comigo e com a realização de meus sonhos. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

A Família Passanezi. Sempre tão presentes em todas as etapas da minha vida, partilhando dos meus sonhos e das minhas realizações. Nos momentos de angústia e dificuldades, sempre pude contar com o carinho e ajuda de vocês, e nos momentos felizes, comemoramos juntos. Espero tê-los ao meu lado sempre, para continuarmos nos divertindo juntos, e também nos apoiando nos momentos difíceis, como sempre fizemos.

Aos membros da família Zaze, que desde o primeiro momento me acolheram com muito carinho. Vocês são pessoas especiais. A distância nos separa fisicamente, e por mais que à primeira vista isto seja uma realidade, o que parece impossível acontece, estamos unidos, e isto é mais forte do que qualquer obstáculo que possamos encontrar. Agradeço por toda a compreensão e preocupação que sempre dedicaram a mim.

À minha cunhada Thaís. Obrigada por cuidar do meu irmão e principalmente pelo presente maravilhoso que você deu a toda minha família, o João Pedro. Ter você ao meu lado nestes últimos anos foi especial, pois nos divertimos muito e isto tornou minha caminhada mais gratificante, além do incentivo que sempre me ofereceu.

Aos meus sobrinhos Júlia, João Pedro e Sophia. Acho que nunca vou conseguir demonstrar todo o carinho que tenho por vocês. Acompanhar o desenvolvimento de uma criança é algo mágico, e cria um elo afetivo muito grande. Ver vocês “conhecendo o mundo” é uma experiência muito gratificante para mim, e por mais que a distância esteja sempre presente em nossas vidas, estarei sempre disposta a ampará-los. Amo vocês!!!

Aos amigos da faculdade, Mariana Montenegro Silva, Tatiana Nishioka, Máira Rocha, Juliano Garla, Vinicius Laranjeira, Lucas Zogheib e Tadeu Kirita. Espero que nada seja capaz de destruir nossa amizade. Tenho certeza de que o meu curso de graduação não teria sido tão maravilhoso se vocês não estivessem ao meu lado. Obrigada por fazerem parte da minha história.

À amiga Gracieli Elias. Minha amiga-irmã, sempre ao meu lado nas horas difíceis e uma das minhas maiores incentivadoras. Você me ensinou que as dificuldades servem para nos fortalecer, e a cada momento me prova que isto é uma grande verdade. Sempre se preocupou comigo e procurou fazer tudo o que estava ao seu alcance para me ajudar, me

divertindo e acolhendo quando precisei. Espero ser especial para alguém como você é para mim, e prometo não permitir que a vida nos afaste.

Ao amigo Renato Baldan. Como já lhe disse anteriormente, você é uma pessoa especial, amigos assim não se encontram facilmente. Espero que esta amizade se perpetue e cresça a cada momento.

Aos amigos da turma de mestrado em Odontopediatria de 2004. Nossa convivência durante nosso curso foi intensa, capaz de gerar amizade e admiração. Saibam que torço pelo sucesso e realização de cada um de vocês, que farão parte de um capítulo da minha vida para sempre. Espero que o final da nossa caminhada juntos não seja capaz de acabar com o sentimento que levamos anos para construir. Sucesso a todos.

A amiga Ana Elisa, pelos ensinamentos e toda a ajuda que me prestou durante a realização do meu curso de pós-graduação.

A amiga Eliana Takeshita, pelos ensinamentos prestados no laboratório. Sempre solícita e disposta a ajudar. Sua amizade é muito importante para mim, espero que você continue sendo sempre a pessoa maravilhosa que é, e que todos os seus esforços sejam reconhecidos, pois você merece.

A aluna de iniciação científica Ana Paula Dias, que sempre me auxiliou na realização deste trabalho com muita alegria. Sua ajuda foi primordial para a conclusão deste trabalho.

Ao aluno de iniciação científica José Antônio Santos Souza, pela ajuda prestada.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação e do laboratório de Odontopediatria. Obrigada pela convivência sempre agradável e amigável.

Continuem buscando a realização de seus sonhos, e por mais difícil que pareça o caminho, se for percorrido com alegria e companheirismo, será sempre gratificante. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Aos voluntários participantes de uma das etapas deste trabalho, pela ajuda, disponibilidade e paciência. Serei sempre grata a vocês.

Aos professores da Universidade do Sagrado Coração. Vocês foram os responsáveis pela minha formação acadêmica, portanto, parte das minhas conquistas profissionais sempre serão suas também. Obrigada pelos ensinamentos e carinho que sempre me ofereceram.

À Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP/Araçatuba, pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

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

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da UNESP-Araçatuba, Professor Robson, Professora Rosângela, Professor Célio e Professora Sandra. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades. Vocês me acolheram de maneira gentil e educada, proporcionando oportunidades importantes para minha vida profissional. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim.

A funcionária da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pelo auxílio indispensável e pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

Ao funcionário Mário Luís da Silva, pelo auxílio e momentos de descontração.

Ao Professor Titular do Departamento de Física e Química da UNESP de Ilha Solteira, Dr. João Carlos Silos Moraes. Sua ajuda foi primordial para a realização deste trabalho, obrigada pelos ensinamentos e por toda a ajuda que me foi prestada.

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

Ao departamento de Bioquímica da FOB-USP, pelo auxílio na dosagem de Cálcio.

A Universidade Paranaense, na pessoa da coordenadora do curso de Odontologia Cíntia de Souza Alferez Araújo, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar um sonho, ser uma professora universitária. Agradeço pela confiança e amizade.

Aos professores do curso de odontologia da Universidade Paranaense, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de trabalho, Fabíola Melhado, Sílvia Gil Sossai, Jaqueline Garcia, Suzana Takejima, Veruska Pfau e Lauri Dalmagro Filho. Obrigada pela confiança, ajuda e amizade.

Aos amigos de Umuarama, pela compreensão e apoio que me prestaram. Agora estarei mais próxima de vocês, e espero que nossa amizade se fortaleça a cada dia.

Ao meu primo Marcos Saraceni, que me auxiliou na impressão deste trabalho.

Aos meus alunos, obrigada por me incentivarem e entenderem a minha ausência em alguns momentos. Por vocês, procuro melhorar a cada dia.

Ao CNPq, pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

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

Minha mais sincera gratidão!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus orientadores, Prof. Adjunto Albeto Carlos Botazzo Delbem e Profa. Kikue Takebayashi Sassaki

Além de orientadores e peças fundamentais na elaboração deste trabalho, ensinaram-me muito sobre a vida. Sempre compreensivos e companheiros, exemplos de caráter e profissional.

Acreditaram na minha capacidade, respeitando minhas limitações e incentivando novas descobertas. Me acolheram quando precisei e nunca mediram esforços para me ensinar e auxiliar, proporcionando oportunidades que jamais pude imaginar ter. Saibam que serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim, e tentarei me espelhar em suas condutas, não só em minha vida profissional, mas também na pessoal. Agradeço a paciência que me dispuseram e os ensinamentos que me prestaram, bem como o carinho com o qual sempre me trataram.

Gostaria que soubessem que sentirei saudades de trabalhar com vocês, e que esta experiência ficará guardada para sempre em um lugar bem especial da minha lembrança.

Zaze ACSF. Efeito da incorporação de Cálcio e Fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

Resumo

O uso de dentifrícios fluoretados por crianças menores de seis anos de idade tem sido apontado como fator de risco para a fluorose dentária. A redução da concentração de fluoreto (F) nos dentifrícios é considerada uma alternativa para evitar este problema, contudo a ação anticariogênica apresentada pelos dentifrícios disponíveis no mercado (1100 µg F/g) deve ser mantida. Os dentifrícios suplementados, que utilizam compostos de fosfato (P) e cálcio (Ca), mostram-se mais efetivos em prevenir a desmineralização e melhoram a capacidade de remineralização, portanto, a suplementação de dentifrícios pode ser uma alternativa para diminuir a concentração de F, mantendo a eficácia do produto. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de um composto contendo Ca e P (Glicerofosfato de Cálcio - CaGP) em dentifrícios com baixa concentração de F sobre a desmineralização (*in vitro*) e remineralização (*in situ*) do esmalte, de forma a manter a mesma ação anticariogênica de um dentifrício de 1100 µg F/g. Inicialmente, blocos de esmalte previamente selecionados através de dureza de superfície inicial (SH), foram submetidos a ciclagens de pH de desmineralização e tratamento diário com dentifrícios contendo 500 µg F/g e concentrações entre 0 e 2% de CaGP, diluídos em água destilada/deionizada. Foram utilizados também dentifrícios contendo as mesmas concentrações de CaGP sem F, um dentifrício sem adição de F, Ca e P (Placebo) e um comercial (controle positivo, 1100 µg F/g). Após análise de dureza pós-ciclagem e determinação de F, Ca e P presentes no esmalte, observou-se menor perda mineral (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$) para o grupo com 500 µg F/g associado a 0,25% de CaGP. Não houve diferença entre os grupos 500 µg F/g associado a 0,25% de CaGP e 500 µg F/g nas concentrações de F (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$), entre 500 µg F/g associado a 0,25% de CaGP e controle positivo nas concentrações de Ca (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Em seguida, o efeito remineralizador do dentifrício com baixa concentração de F associado ao CaGP que apresentou melhor resultado (0,25% CaGP) no estudo *in vitro* foi avaliado em um estudo *in situ*, duplo-cego cruzado. Voluntários utilizaram dispositivos palatinos durante 3 dias, em

5 diferentes fases experimentais, com 4 blocos de esmalte desmineralizado artificialmente. Os dentifrícios utilizados (3x ao dia) foram: sem F e CaGP (Placebo), um dentifrício com 500 µg F/g (NaF), dois contendo 500 µg F/g (NaF ou MFP) associado ao CaGP a 0,25% e um dentifrício comercial (controle positivo, 1100 µg F/g). Determinou-se dureza de superfície e em secção longitudinal do esmalte e concentração de F, Ca e P presentes no esmalte. Blocos tratados com os dentifrícios com 500 µg F/g (NaF ou MFP) suplementados com 0,25% de CaGP apresentaram dureza semelhante ao controle positivo (ANOVA e Kruskal-Wallis; $p>0,05$) diferindo do dentifrício 500 µg F/g ($p<0,05$). O grupo 500 µg F/g (NaF) associado a 0,25% de CaGP e o controle positivo mostraram semelhantes concentrações de F, Ca e P (ANOVA e Kruskal-Wallis; $p>0,05$). Com o objetivo de entender o mecanismo de ação do CaGP associado ao fluoreto, estudou-se o efeito deste sobre a hidroxiapatita sintética. O pó de hidroxiapatita (HA) produzido foi suspenso em soluções de CaGP nas concentrações de 0,25 e 2% associadas ou não ao NaF (500 µg F/mL). Uma solução com 1100 µg F/g foi utilizada como controle positivo (CP). Depois de repetidas alterações no pH das soluções, analisou-se o precipitado formado pela Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) e a concentração de F, Ca e P na hidroxiapatita. Os grupos com CaGP (0,25% e 2%) apresentaram estrutura molecular com baixa cristalinidade e maior solubilidade, com concentração de Ca reduzida. Estrutura molecular e relação molar Ca/P mostram HA mais estável e menos solúvel no grupo 500 µg F/g associado à CaGP 0,25%, bem como formação de fluoreto de cálcio (CaF₂), resultados similares ao 1100 µg F/g.

Palavras-chave: Desmineralização. Remineralização dentária. Esmalte dentário. Hidroxiapatita. Dentifrícios. Fluoretos. Cálcio. Dureza.

Zaze ACSF. Effect of calcium and phosphate addition to fluoride dentifrices on anti-caries efficacy [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

Abstract

The use of fluoride dentifrices by children under 6 years of age has been pointed as a risk factor for dental fluorosis. The reduction of fluoride (F) concentration in dentifrices has been considered as an alternative to avoid this problem; however, the anti-caries effect presented by commercially available dentifrices (1,100- μg F/g) must be sustained. The dentifrices enhanced with phosphate (P) and calcium (Ca) compounds are more effective to prevent demineralization and to enhance remineralization, therefore, those dentifrices may be an alternative to reduce F concentration, preserving the product efficacy. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of calcium (Ca) glycerophosphate (CaGP) in low fluoride concentration dentifrices on enamel demineralization (in vitro) and remineralization (in situ), sustaining an anticariogenic action similar to a 1100 μg F/g dentifrice. Enamel blocks, previously selected by surface hardness analysis (SH), were submitted to a demineralization pH cycling and daily treatments with dentifrices with 500 μg F/g and concentrations of CaGP between 0 and 2%, diluted in deionized water. There was also used toothpastes containing the same concentrations of CaGP without F, a dentifrice with no F, Ca or P (placebo) and a commercial one (positive control, 1100 μg F/g) were also used. Hardness was again measured and the amount of F, Ca and P in enamel was determined. Group 500 μg F/g 0.25% CaGP showed the lowest mineral loss (Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). There was no difference in F concentrations between groups 500 μg F/g 0.25% CaGP and 500 μg F/g (Kruskal-Wallis; $p > 0.05$) and in Ca concentrations between 500 μg F/g 0.25% CaGP and positive control (Kruskal-Wallis; $p > 0.05$). Following that, the remineralizing effect of the low F dentifrice enhanced with CaGP that showed the best result (0.25% CaGP) in the in vitro study was evaluated in a double-blind crossover in situ study. Volunteers wore palatal appliances, during 3 days, containing 4 enamel blocks with artificial caries lesion. Five experimental periods were set. The following dentifrices were used 3x/day: no fluoride and no CaGP (Placebo), one dentifrice with 500 μg F/g (NaF), two dentifrices with 500 μg F/g (NaF or MFP) associated to 0.25% of CaGP

and one commercial dentifrice (positive control, 1,100 µg F/g). Surface and cross-sectional hardness, and F, Ca and P concentration in enamel were determined. The dentifrices with 500 µg F/g (NaF or MFP) and 0.25% of CaGP showed hardness values similar to positive control (ANOVA and Kruskal-Wallis; $p>0.05$) and different from dentifrice 500 µg F/g ($p<0.05$). The dentifrice with 500 µg F/g (NaF) and 0.25% of CaGP and positive control showed similar F, Ca and P concentrations (ANOVA and Kruskal-Wallis; $p>0.05$). To understand the mode of action of CaGP associated to fluoride, its effect on synthetic hydroxyapatite was studied. Hydroxyapatite powder was suspended in CaGP solutions (0.25 and 2%) associated or not to sodium fluoride (500 µg F/mL). A 1,100 µg F/g solution was used as positive control (CP). Following repeated alterations in pH solutions, the precipitate was analyzed by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy and F, Ca and P concentration in hydroxyapatite. The groups with CaGP (0,25% and 2%) presented molecular structure with low crystal and more solubility, with concentration Ca reduced. The molecular structures and molar relationship Ca/P show there is stableer and less soluble in the group 500 µg F/g associated to CaGP 0,25%, as well as formation of calcium fluoride (CaF₂), similar results to 1100 µg F/g.

Keywords: Demineralization. Tooth remineralization. Dental enamel. Hydroxyapatite; Dentifrices. Fluorides. Calcium. Hardness.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figure 1 - (A) Ionic (FI) and (B) Total (FT) fluoride concentration ($\mu\text{g/g}$, mean $\pm$ sd, n=9) of the experimental dentifrices before (NA) and after (A) accelerated aging test. 42
- Figure 2 - SH_1 (A) e ΔKHN (B) values (mean $\pm$ se, n=12) according to fluoride and calcium glycerophosphate concentration (%CaGP) in the experimental dentifrices. 42
- Figure 3 - Fluoride (A), calcium (B) and phosphorus (C) concentration ($\mu\text{g/mm}^3$) values (mean $\pm$ se, n=12) according to fluoride and calcium glycerophosphate concentration (%CaGP) in the experimental dentifrices. 43

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Representação gráfica do espectro no infravermelho modificada de Fourier de acordo com os grupos após ciclagem de pH. A: HAdesm. B: 500. C: 1100. D: CaGP 0,25%. E: CaGP 2%. F: 500 CaGP 0,25%. G: 500 CaGP 2%. 77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 -	Results (mean $\pm$ sd, n=12) of hardness analysis according to experimental dentifrices: placebo, 500 μ g F/g, 500 0.25% CaGP, 500 2% CaGP and positive control	41
Table 2 -	Results (mean $\pm$ sd, n=12) of the fluoride, calcium and phosphorus concentration in enamel according to experimental groups: placebo, 500 μ g F/g, 500 0.25% CaGP, 500 2% CaGP and positive control	41

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Valores médios ($\pm$ dp, n=9) das durezas de superfície (SH, SHd e SHf), porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH) e perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) de acordo com os grupos	60
Tabela 2 -	Valores médios ($\pm$ dp, n=9) das concentrações de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes no esmalte após experimento <i>in situ</i> de acordo com os grupos	60

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos e hidroxila em relação à hidroxiapatita submetida a ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm)	78
Tabela 2 -	Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos e água em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm)	78
Tabela 3 -	Valores médios ($\pm$ dp, n=5) das concentrações (mg/g) de fluoreto ligado fracamente (CaF ₂) e fortemente a hidroxiapatita (FA) de acordo com os grupos	79
Tabela 4 -	Valores médios ($\pm$ dp, n=5) das concentrações (mg/g) de cálcio (Ca) e fósforo (P) e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos	79

LISTA DE ABREVIATURAS

%SH =	Porcentagem de perda de dureza de superfície
% SHr =	Porcentagem de recuperação de dureza de superfície
°C =	Graus celcius
μ =	Micro
μg F/g =	Microgramas de flúor por grama
μg/mm ³ =	Micrograma por milímetro cúbico
Ca =	Cálcio
CaF ₂ =	Fluoreto de cálcio
CaGP =	Glicerofosfato de Cálcio
cm =	Centímetro
DCPD =	Dicálcio fosfato dihidratado
dp =	Desvio padrão
ΔKHN =	Perda integrada da dureza de subsuperfície
F =	Flúor
FA =	Flúor fortemente ligado
FI =	Flúor iônico
Fins.=	Flúor insolúvel
FST =	Flúor solúvel total
FT =	Flúor total
FTIR =	Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier
<i>g</i> =	Gravidade
H =	Hora
HA =	Hidroxiapatita
HCL =	Ácido clorídrico
H ₂ O =	Água
ISA =	Ionic strength adjustor
KHN =	Knoop hardness number
MFP =	Monofluorfosfato de Sódio
mL =	Mililitros
mL/mm ² =	Mililitros por milímetro quadrado
mm =	Milímetros

mm^2	=	Milímetros quadrados
mol L^{-1}	=	Molaridade
NaF	=	Fluoreto de Sódio
NaOH	=	Hidróxido de Sódio
OH	=	Hidroxila
P	=	Fósforo
PO_4	=	Íon fosfato
pH	=	Potencial hidrogeniônico
ppm	=	Partes por milhão
s	=	Segundos
sd	=	Standard deviation
SH	=	Dureza de superfície inicial
SH1	=	Dureza de superfície pós ciclagem
SHd	=	Dureza de superfície pós desmineralização
SHf	=	Dureza de superfície final
SHi	=	Dureza de superfície inicial
TISAB	=	Tampão ajustador de força iônica
v1	=	Estiramento simétrico
v2	=	Vibração angular
v3	=	Estiramento assimétrico
v4	=	Vibração angular

SUMÁRIO

1	Introdução Geral	26
2	Capítulo 1 - Efficacy of low-fluoride dentifrice with calcium glycerophosphate on enamel demineralization.	32
2.1	Abstract	32
2.2	Introduction	33
2.3	Material and Methods	34
2.4	Results	37
2.5	Discussion	38
2.6	References	44
3	Capítulo 2 - Avaliação de dentifrício com baixa concentração de fluoreto suplementado com Glicerofosfato de Cálcio na remineralização de lesões de cárie <i>in situ</i> .	48
3.1	Resumo	48
3.2	Introdução	49
3.3	Materiais e Métodos	50
3.4	Resultados	56
3.5	Discussão	57
3.6	Referências	61
4	Capítulo 3 - Ação do glicerofosfato de cálcio sobre a hidroxiapatita (HA) durante ciclagem de pH: análise pela espectrometria de infravermelho, difração de raio-x e bioquímica	67
4.1	Resumo	67
4.2	Introdução	68
4.3	Objetivo	69
4.4	Materiais e Métodos	69
4.5	Resultados	72
4.6	Discussão	74
4.7	Referências	80
5	Anexos	86

1 Introdução Geral

Ao longo do século XX, o fluoreto (F) foi o principal agente utilizado na prevenção da cárie dentária em todo o mundo, oferecido à população de maneiras diversas, sendo as mais utilizadas a fluoretação da água de abastecimento e o uso de dentifrícios fluoretados. Entretanto, ocorre também uma exposição ao F decorrente da dieta, por meio de alimentos e bebidas industrializados, e da utilização de suplementos [Buzalaf et al., 2001]. Em estudos realizados em diferentes países, o uso de produtos fluoretados foi considerado o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie dentária [Rolla e Saxegaard, 1990; Narvai, 2000; Cury et al., 2004; Stookey et al. 2004] bem como do aumento na incidência da fluorose [Horowitz, 1992; Pang e Vann, 1992; Mascarenhas, 2000; Cochran et al. 2004]. Portanto, segundo Bergamaschi [2003] torna-se necessário o desenvolvimento de novas diretrizes para a promoção da saúde bucal e o reparo das lesões cariosas, sem causar outros danos aos indivíduos.

Pendrys e Stamm [1990] levantaram a hipótese de que a água de abastecimento não foi o único fator responsável pelo aumento na incidência da fluorose dentária, pois este fato ocorreu tanto em áreas que receberam a adição de fluoretos na água, como em áreas onde a água de abastecimento não era fluoretada. No mesmo ano, Lalumandier observou que crianças que tiveram acesso a dentifrícios fluoretados nos primeiros dois anos de vida e que viviam em áreas com água não fluoretada, apresentavam fluorose dentária, o que sugere que o uso de dentifrícios fluoretados por crianças nessa faixa etária é um fator de risco para o desenvolvimento desta alteração. Osuji et al. [1988] afirmaram que crianças que tiveram acesso a dentifrícios fluoretados antes dos 25 meses de idade mostraram taxas de fluorose dental 11 vezes maiores que aquelas que tiveram acesso após esta idade, concluindo que a fluorose dentária estava associada ao uso de dentifrícios em crianças de pouca idade em 70% dos casos. Em concordância, Mascarenhas e Burt [1998] afirmam que durante os seis primeiros anos de vida da criança, fase em que ocorre a odontogênese, o uso de dentifrícios fluoretados pode ser considerado como um fator de risco para a fluorose dentária.

Crianças menores de seis anos de idade ainda não apresentam o total desenvolvimento do reflexo de expectoração, o que resulta em maior ingestão de

* Lista de referências no anexo A

dentifrício durante a escovação dentária. Ericson e Forsman [1969] relataram que crianças de quatro a sete anos ingerem entre 24,5% e 33,3% de F do dentifrício após a escovação dentária, entretanto Lima e Cury [2001] afirmam que em média 57% do dentifrício colocado na escova são ingeridos quando se avalia crianças menores de seis anos de idade, ocorrendo uma variação de 17% a 98%. Frente ao problema observado, várias recomendações foram propostas para diminuir a incidência de fluorose, tais como a escovação supervisionada, uso de quantidades reduzidas de dentifrício e a redução do tamanho do orifício das embalagens comerciais [Horowitz, 1992; Hamilton, 2001; Lima e Cury, 2001]. Devemos levar em consideração, entretanto, que modificar hábitos é uma tarefa árdua, principalmente quando a mídia não reforça esta mudança. Este problema é enfrentado quando se trata da quantidade de dentifrício que deve ser aplicada na escova dentária, portanto, torna-se necessário investigar novas maneiras para reduzir a ingestão de fluoretos pelas crianças.

A redução da concentração de F dos dentifrícios é uma das alternativas possíveis, porém alguns estudos mostraram que dentifrícios contendo 250 µg F/g são menos efetivos que aqueles contendo 1000 µg F/g na prevenção da cárie dentária [Koch et al., 1982; Mitropoulos et al., 1984]. Outra alternativa seria a redução do pH de dentifrícios de baixa concentração de F, pois sabe-se que o principal responsável pela ação anticariogênica de agentes de aplicação tópica de F é o fluoreto de cálcio e que sua formação aumenta à medida que se reduz o pH do meio [Saxegaard e Rolla, 1988; Ogaard, 2001]. Brighenti et al. [2006] observaram que a redução da microdureza do esmalte de dente bovino após ciclagens de pH *in vitro* foi menor após tratamento com dentifrícios acidulados do que com os neutros em todas as concentrações testadas, principalmente o dentifrício acidificado com 550 µg F/g, que apresentou uma redução na microdureza menor do que o dentifrício neutro de 1100 µg F/g. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos avaliando dentifrícios com pH reduzido [Friberger, 1975; Petersson et al., 1989; Alves et al., 2007].

Outra maneira de aumentar a efetividade de um dentifrício fluoretado é suplementá-lo com cálcio e/ou fosfato. Esta modalidade de dentifrício tem se destacado, ganhando espaço como produto com potencial para remineralizar ou minimizar a formação da lesão cariiosa. Trata-se do dentifrício suplementado, que contém F, P e Ca como agentes ativos. Testes *in vitro* demonstram que os

dentifrícios com cálcio solúvel, monoflúorfosfato (MFP) e dicálcio fosfato dihidratado (DCPD) apresentam um potencial remineralizador maior, quando comparados aos dentifrícios convencionais [Moreno, 1993; Leach et al., 1987]. Os dentifrícios suplementados com outros complexos de Ca e P mostram-se mais efetivos em prevenir a desmineralização [Blake-Haskins et al., 1992; Hicks e Flaitz 2000; Kardos et al., 1999; Legeros; 1999; Schemehorn et al., 1998], melhoram a capacidade remineralizadora [Hicks e Flaitz 2000; Johnson, 1993] e a incorporação de F [Schemehorn et al., 1999a], além de aumentar a biodisponibilidade do F quando comparado a um dentifrício padrão testado clinicamente (NaF/sílica) [Schemehorn et al., 1998; Schemehorn, 1999].

As reações químicas que ocorrem durante a desmineralização são determinadas pela supersaturação de Ca e P e a presença ou não de F no biofilme bucal. Quando estes fatores estão associados, o efeito do F é potencializado, o que promove a redução da dissolução da hidroxiapatita dentária [Hicks et al., 2004]. A supersaturação do meio por Ca e P também altera o comportamento do F na remineralização. Mantendo seus níveis elevados durante períodos de desafio cariogênico, a dissolução do esmalte poderia ser inibida e a remineralização aumentada, potencializando a capacidade tampão da saliva [Duckworth, 1993]. Segundo Schemehorn [1999b], o processo de remineralização depende primariamente da presença de íons Ca e P na saliva e é intensificado na presença do F, o que explica o maior potencial remineralizador apresentado pelos dentifrícios suplementados. Portanto, um dentifrício suplementado é capaz de disponibilizar não somente o F como agente ativo no processo de remineralização, mas também Ca solúvel e P, garantindo a disponibilidade destes íons que permanecerão por um período prolongado na saliva e placa residual [Kardos et al., 1999]. A capacidade de diminuir a desmineralização e intensificar a remineralização é uma característica importante de um dentifrício quando se trata de populações com alto índice de cárie, pois a prevenção da formação de lesões cariosas bem como a redução da progressão de lesões já existentes torna-se intensificada. Kashket [1999] afirma que a remineralização na presença de P e Ca solúvel ocorre em profundidade, com deposição de minerais nas camadas mais internas da lesão, propiciando uma remineralização no corpo da lesão. Quando a fonte de P e Ca é salivar, esta deposição ocorrerá mais superficialmente, promovendo a remineralização nas regiões mais superficiais da lesão, deixando as camadas internas inalteradas. Koo e

Cury [1998] demonstraram, em estudo *in situ* que dentifrícios suplementados promovem uma maior incorporação de F nas camadas mais profundas da lesão quando comparados a dentifrícios convencionais e placebo.

Os fosfatos de Ca agem fornecendo íons Ca e P [Whitford et al., 2002] interagindo diretamente com o esmalte, reduzindo sua solubilidade [Grenby e Bull, 1980], potencializando a remineralização [Cury et al., 2003, 2005] e o aumento da incorporação de F no interior da lesão de cárie durante a remineralização [Sullivan et al., 1997; Gonzalez, 1971; Gaffar et al., 1993]. Além de participar ativamente do processo de des/remineralização, parece que o Ca apresenta relação direta na retenção de F pelo biofilme, aumentando a capacidade tampão da placa [Bowen, 1972], reduzindo a quantidade da mesma [Brook et al, 1975] e modificando seu metabolismo por meio da elevação das concentrações de Ca e P [Grenby e Bull, 1975; Duke et al., 1979]. Whitford et al. [2002] encontraram evidências de que a retenção de F no biofilme é dependente da concentração de Ca presente. Esta relação direta foi relatada em outros trabalhos [Rolla e Bowen, 1977; Rolla, 1977; Schamschula et al. 1978] onde se sugere que o F é atraído pelo Ca e se fixa no biofilme. Confirmando esta suspeita, Kato et al. [1997] relataram que existe uma relação direta entre Ca, P e F em várias secções da placa dental. Vogel e colaboradores [2006] analisaram a concentração de F na saliva uma hora após a utilização de produtos contendo Ca e P seguidos por produtos fluoretados, onde observaram um aumento da presença de F quando comparado à aplicação do produto fluoretado isoladamente, ou antes da aplicação do produto contendo Ca e P, o que leva a crer que a presença de F na cavidade bucal é aumentada quando existe Ca e P disponíveis no meio.

Alguns estudos foram realizados para avaliar a adição do Ca em dentifrícios, umas das maneiras seria na forma de um abrasivo como carbonato de Ca ou dicálcio fosfato dihidratado (DCPD). Estudos *in situ* com carbonato de cálcio associado ao Monofluorofosfato de Sódio (MFP) mostraram uma diminuição na desmineralização e um aumento na remineralização do esmalte quando comparado a um dentifrício com mesma concentração de F e sílica como abrasivo [Cury et al., 2003, 2005]. Outros estudos avaliaram a adição do glicerofosfato de Ca (CaGP) aos dentifrícios associados ao MFP e mostraram um efeito anti-cariogênico superior [Naylor e Glass, 1979; Mainwaring e Naylor, 1983]. Lynch e ten Cate [2006] mostraram uma diminuição na desmineralização do esmalte principalmente quando

o glicerofosfato de cálcio (CaGP) foi aplicado antes do desafio cariogênico, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%.

Estudos de dissolução *in vitro* demonstram que uma pequena alteração na concentração de Ca tem maior efeito quando comparado ao P na desmineralização. Embora o Ca e o P diminuam a desmineralização, são necessárias vinte vezes mais P do que Ca para que se consiga um efeito semelhante [Tanaka e Kadoma, 2000].

Apesar de muitos trabalhos comprovarem um aumento na ação anticariogênica de dentifrícios suplementados com Ca e P, a maioria utilizou concentrações altas de F. Winter e colaboradores [1989], observaram que um dentifrício contendo 1055 µg F/g (MFP) apresentou resultados semelhantes a outro com 550 µg F/g, associando duas fontes de F (MFP e NaF), porém ambos apresentavam CaGP em sua formulação.

Alguns estudos analisaram a eficácia de dentifrícios de baixa concentração quando comparados a dentifrícios convencionais, com ao menos 1000 µg F/g, contudo existem divergências nos resultados, porém a maioria dos trabalhos mostra que existe uma diminuição do efeito anticárie quando a concentração de F disponível é reduzida [Reed, 1973; Kloet et al. 1986; Beltrán e Spuznar, 1988; Newbrun, 1992; Warren e Levy, 1999]. Portanto, torna-se interessante investigar se a suplementação de Ca e P com esses íons permite reduzir a concentração de F sem diminuir a eficiência anticariogênica do dentifrício quando comparado a um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g). Tal dentifrício de uso infantil seria uma alternativa para a prevenção da cárie como também da intoxicação crônica causada pelo flúor, contudo sua utilização não ficaria necessariamente restrita apenas a crianças menores de 6 anos, faixa etária de maior risco para o desenvolvimento da fluorose dentária.

2 Efficacy of low-fluoride dentifrice concentration with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *

Key words: Dentifrice. Fluoride. Calcium. Glycerophosphate. Dental enamel. Demineralization. pH-cycling

2.1 Abstract

The use of fluoride dentifrices by children under 6 years of age has been pointed as a risk factor for dental fluorosis. The reduction of fluoride (F) concentration in dentifrices has been considered as an alternative to avoid this problem; however, the anticariogenic effect presented by commercially available dentifrices (1,100- μ g F/g) must be maintained. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of calcium (Ca) glycerophosphate (CaGP) in dentifrices with low F concentration on enamel demineralization, using bovine enamel and pH-cycling model. Experimental dentifrices were manufactured containing 0 or 500- μ g F/g and the concentrations of 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2% of CaGP, and a placebo dentifrice. A commercial dentifrice was used as positive control (1,100- μ g F/g). After polishing and hardness tests, the enamel blocks were submitted to pH-cycling for 5 days and dentifrice treatment (2x/day). Surface and cross-sectional hardness and F, Ca and P concentration present on enamel were analyzed. The association of fluoride (500- μ g/g) and CaGP (0.25%) showed lower mineral loss when compared to other groups (Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). The Ca concentrations of groups 500- μ g F/g associated to CaGP 0.25% and positive control were similar (Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). The results from the present study showed that a low-fluoride dentifrice is capable to maintain the 1,100- μ g F/g efficacy when supplemented with CaGP.

* Capítulo escrito de acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research (Anexo B)

2.2 Introduction

Fluoride dentifrice has been considered as a responsible factor for decrease in the incidence of dental caries [Cury et al., 2004; Stookey et al., 2004], however dental fluorosis increase [Mascarenhas, 2000; Cochran et al., 2004]. Therefore, the development of new directives of oral care without promoting damage to the patients is of great importance.

Many recommendations were proposed to reduce dental fluorosis such as supervised brushing and use of small amount of dentifrices [Horowitz, 1992; Hamilton, 2001; Lima and Cury, 2001]. Even though changing behavior is very difficult, it is necessary investigating new ways to reduce fluoride ingestion by children. Fluoride concentration reduction in the dentifrices could be an alternative; however, the effectiveness of the dentifrice in reduce dental caries has to be sustained. This is possible by decreasing the pH of low-fluoride dentifrice [Friberger, 1975; Petersson, 1989; Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007] or by adding inorganic phosphate [Moreno, 1993; Takeshita et al., 2009]. Calcium-phosphate compound associated to fluoride can reduce the enamel demineralization and increase remineralization [Whitford et al., 2002; Cury et al., 2003, 2005].

The addition of organic phosphate as calcium glycerophosphate (CaGP) can be a source of calcium and phosphate. Clinical trials showed that fluoride (SMFP and NaF) associated to CaGP presented better results when compared to a fluoride dentifrice probably for rising calcium and phosphate's level in the biofilm [Lynch, 2004]. The inorganic calcium and phosphate release occurs by hydrolysis CaGP [Imai and Hayashi, 1993; Vilorio et al., 2000] due the calcium binding to phospholipids [Inoue et al., 1992]. Lynch and ten Cate [2006] showed inhibition of enamel demineralization, using an *in vitro* biofilm model, mainly when the CaGP was applied before caries challenge in the concentrations of 0.10, 0.25 e 0.50%. Thus, it would be interesting to analyze whether CaGP addition to low-fluoride (500 µg/g) dentifrice keeps the 1,100-µg F/g efficacy or not. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of calcium (Ca) glycerophosphate (CaGP) in dentifrices with low F concentration on enamel demineralization.

2.3 Material and methods

Experimental Design

Enamel blocks (4x4 mm) were obtained from bovine incisors, polished, selected by surface hardness (SH, n=156) and randomized in 13 groups (n=12). The blocks were submitted to a demineralization pH-cycling model (De>Re) during 5 days. Treatments were performed using experimental dentifrices with 0 or 500 µg F/g and calcium glycerophosphate (CaGP) with concentrations of 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0%. Commercial dentifrice was used as positive control (CrestTM, 1,100 µg F/g, Procter and Gamble, Cincinnati, OH, USA). After pH-cycling, surface and cross-sectional hardness (SH₁) was again assessed to calculate the percentage change of surface hardness (%SH) and integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN), respectively. Fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations present in the enamel were also determined.

Dentifrice formulation and fluoride analysis

The experimental dentifrices contained the following ingredients: carboxymethylcellulose, sodium methyl-*p*-hydroxybenzoate, sodium saccharin, peppermint oil, glycerol, hydrated silica, sodium lauryl sulfate, titanium dioxide and water. Fluoride (NaF, Merck, Germany) concentration in experimental dentifrice was 500 µg/g and different concentrations of calcium glycerophosphate (CaGP, Sigma-Aldrich Co., USA) were used: 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0%. Dentifrices without fluoride with the same CaGP concentrations and a positive control (PC) with 1,100 µg F/g (Crest®) were used.

Fluoride in dentifrices was analyzed before and after accelerated aging testing according to Delbem et al. [2002]. After dispersion in water (1:3), a sample from the suspension was treated with 2 mol L⁻¹ HCl for total fluoride assessment and buffered with 1 mol L⁻¹ NaOH. For ionic fluoride assessment, supernatants were obtained by centrifuge (906g; 20 min). The same volume of TISAB II buffer (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) was added to the solutions. Fluoride determination was

performed with an ion-selective electrode Orion 96-09 (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) and an ion analyzer Orion 720 A⁺ (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA), calibrated with standards containing between 0.125 and 2.0 µg F/mL. Accelerated aging testing was performed using 2 g of dentifrice at 45°C during 72 hours in sealed up container [Cury, 1989] followed by new analysis according to initial methodology.

pH-cycling (Des>Re) and dentifrice treatments

After coating with an acid-resistant varnish, except for the enamel, the blocks were submitted in individual crystal polystyrene bottle to 5 pH-cyclings at 37° C and kept in fresh remineralizing solution for 2 days [Vieira, 2005]. The demineralizing period was 6 h, and the solution (2.2 mL/mm² of enamel surface) consisted of 2.0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O and 2.0 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄.H₂O in 0.075 mol L⁻¹ acetate buffer, 0.04 µg F/mL at pH 4.7. The remineralizing period was set at 18 h and the solution (1.1 mL/mm² of enamel surface) consisted of 1.5 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂ 4H₂O , 0.9 mmol/L NaH₂PO₄ H₂O, 0.15 mol L⁻¹ KCl in 0.02 mol L⁻¹ cacodylate buffer, 0.05 µg F/mL at pH 7.0. The treatment regime consisted of 1-min soaks of all blocks (2 mL/block) of each treatment group in slurries of placebo, experimental fluoride dentifrices (500 µg F/g) without or with CaGP (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 2%) or positive control. Dentifrices were diluted in deionized water (1:3 in weight). The treatment was performed twice a day (before and after a demineralising period) under agitation. The blocks were washed with deionized water at each change of solution. This pH-cycling model is able to produce an enamel sub-surface lesion [Takeshita et al., 2009].

Hardness measurements

The hardness of the enamel surface was determined before (SH) and after pH cycling (SH₁) using a Shimadzu HMV-2000 microhardness tester (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) under a 25 g load for 10 s. Five indentations, spaced 100 µm apart, were made in the center of the enamel block. After pH cycling, five indentations, spaced 100 µm from the baseline ones, were made to calculate the percentage of surface hardness loss (%SH=((SH₁ – SH)/SH)x100).

For cross-sectional hardness measurements, the enamel blocks were longitudinally sectioned through their center and embedded in acrylic resin with the cut face exposed and gradually polished. Three sequences of eight indentations at different distances (10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 and 330 μm) were made from the surface of the enamel in the central region spaced 100 μm from each other, under a 25 g load for 10 s. The mean values at all three measuring points at each distance from the surface were then averaged. Integrated hardness ($\text{KHN} \times \mu\text{m}$) for the lesion into sound enamel was calculated by the trapezoidal rule (GraphPad Prism, version 3.02) and subtracted from the integrated hardness for sound enamel to obtain the integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN) [Takeshita et al., 2009].

Fluoride, calcium and phosphorus in enamel Analysis

An enamel biopsy was performed according to Weatherell et al. [1985]. Blocks measuring 2 x 2 mm were obtained from one of the halves of the longitudinally sectioned blocks. The blocks were attached to a mandrel which was fixed to the top of a modified microscope with a micrometer (Pantec, Sao Paulo, Brazil) to measure the depth. Self-adhesive polishing discs (13 mm of diameter), 400 grit silicon carbide (Buelher, Germany), were fixed to the bottom of polystyrene crystal bottle (J-10; Injeplast, São Paulo, Brazil). One layer of each enamel block was removed $50 \pm 4.8 \mu\text{m}$ and 0.8 mL 0.5 mol.L^{-1} HCl was added to the bottles. The bottles were agitated for 15 min and 0.8 mL 0.5 mol.L^{-1} NaOH was then added. For F analysis, a specific electrode (Orion 9690) was connected to an ion analyzer (Orion 720+) and TISAB III (total ionic strength adjustment buffer) at 1:10 ratio (TISAB:sample) was used. For Ca analysis, a specific electrode (Orion 9300) was connected to an ion analyzer (Orion 720+) and ISA (ionic strength adjustor) at 1:20 ratio (ISA:sample) was used. Inorganic phosphorus was measured according to Fiske and Subbarow [1925].

Statistical Analysis

GMC software (version 2002) was used with significance limit of 5% [Campos, 2003]. Surface hardness (SH_1), integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN) and fluoride, calcium and phosphorus concentrations ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) in the enamel means

were described in graphics according to fluoride and CaGP concentration in the dentifrices. Statistical analysis was applied considering as variation factors the dentifrices: placebo, 500 µg F/g, 500 µg F/g supplemented with 0.25% of CaGP (500 0.25%CaGP), 500 µg F/g supplemented with 2.0% of CaGP (500 2.0%CaGP) and positive control. Data were submitted to the normality and homogeneity (Kolmogorov-Smirnov and Cochran, respectively) test. Surface hardness (SH) data presented homogeneous and were submitted to one-way analysis of variance followed by Tukey's test multiple comparisons. Data of SH₁, ΔKHN, fluoride, calcium e phosphorus were heterogeneous and were subjected to Kruskal-Wallis test, followed by Miller's test.

2.4 Results

Fluoride concentrations in the experimental dentifrices (0.0 and 500 µg/g) did not change with the increase of CaGP percentage before and after accelerated aging testing of dentifrices (Figure 1).

Enamel surface hardness (mean ±sd) before pH-cycling was 367.0 ±9.9 KHN. The group with the lowest mean hardness was 361.2 ±8.1 and with the highest was 373.4 ±8.8 ($p>0.05$). After pH-cycling, the addition of 0.25% CaGP in the experimental dentifrice produced higher mean value of post pH-cycling surface hardness (SH₁) and lower integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN), regardless of fluoride concentration in the experimental dentifrices (Figure 2). The increase of CaGP concentration in the experimental dentifrice up to 0.25% reduced SH₁ and increased ΔKHN.

The effect of CaGP addition was analyzed by comparison of experimental dentifrices: placebo, 500 µg F/g, 500 0.25%CaGP, 500 2.0%CaGP and positive control. Placebo dentifrice showed (Table 1) lower post pH-cycling surface hardness (SH₁) and higher percentage of surface hardness loss (%SH) values than other fluoride dentifrices ($p<0.05$). Group 500 0.25%CaGP presented higher SH₁ value when compared to fluoride dentifrices ($p<0.05$), including the positive control. The increase of CaGP to 2.0% (500 2.0%CaGP group) reduced SH₁ and increased %SH when compared to the other fluoride dentifrices ($p<0.05$). The results of integrated

loss of subsurface hardness (ΔKHN) showed (Table 1) similar values between placebo and 500 2.0%CaGP groups ($p>0.05$). The positive control and 500 0.25%CaGP groups presented similar ΔKHN results ($p>0.05$).

Fluoride dentifrices showed higher fluoride concentration ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) in enamel when compared to no-fluoride dentifrices (Figure 3A). Calcium concentration increased with CaGP addition in the experimental fluoride dentifrices (Figure 3B). No-fluoride experimental dentifrices presented high concentration of phosphorus in the enamel with 1 and 2% of CaGP (Figure 3C).

Positive control dentifrice showed higher fluoride concentrations results in enamel ($p<0.05$) than placebo, 500 μg F/g, 500 0.25%CaGP and 500 2.0%CaGP (Table 2). The groups 500 μg F/g and 500 0.25%CaGP presented similar fluoride concentration in enamel ($p>0.05$) and higher than 500 2.0%CaGP group ($p<0.05$). Calcium concentration was higher in the 500 2.0%CaGP group when compared to the other experimental dentifrices ($p<0.05$). Positive control and 500 0.25%CaGP presented similar calcium concentration ($p>0.05$) and higher than 500 μg F/g group ($p<0.05$). Phosphorus concentration in enamel was similar among the experimental dentifrices ($p>0.05$), regardless of the fluoride or CaGP concentration (Table 2).

2.5 Discussion

Dentifrice analysis showed ionic fluoride was kept with the rise of the CaGP concentration for all experimental toothpaste (Figure 1). Calcium glycerophosphate is not water-soluble [Inoue et al., 1992] and the kinetic in the toothpaste can be slower than in the solution. Most of fluoride was maintained soluble in the formulation after accelerated aging testing; this can be confirmed by SH_1 and ΔKHN results (Figure 2 and Table 1). Therefore, this was observed until 0.25% CaGP concentrations in the dentifrices, regardless of the fluoride concentration in the formulation (0.0 or 500 $\mu\text{g}/\text{g}$).

The fluoride in dentifrices promoted a $\sim 55\%$ reduction of mineral loss when comparing placebo to 500 μg F/g. The addition of CaGP 0.25% to the 500 μg F/g dentifrice decrease the mineral loss in 132%, a value similar to positive control (Figure 2). An increase of the mineral loss (SH_1 e ΔKHN) occurred when CaGP concentration was 0.5% or higher, regardless of the fluoride concentrations (Figure 2

and 3). The results are due to the rise of the CaGP concentration and not because of the presence of insoluble fluoride on dentifrice. The analysis of fluoride in the dentifrices before and after accelerated aging testing has confirmed this (Figure 1).

Calcium concentration in enamel was higher for fluoride dentifrice with $\geq 0.25\%$ of CaGP compared to no-fluoride dentifrice (Figure 3). The addition of 1.0 and 2.0% CaGP to fluoride dentifrices reduced the concentration of fluoride in enamel; this explains the results illustrated in Figure 2.

Data from table 2 showed that groups 500 $\mu\text{g F/g}$ and 500 0.25%CaGP presented 2 times more fluoride when compared to 500 2%CaGP dentifrice ($p < 0.05$). However, they presented different results of SH_1 , %SH and ΔKHN (table 1). Source of fluoride (NaF) and calcium (CaGP) of the 500 0.25% CaGP dentifrice produced deposits of calcium phosphate probably with fluoride-rich apatite crystals and calcium fluoride and consequently higher hardness values (table 1). Perhaps, these effects were promoted by adsorption of CaGP in enamel surface and hydrolysis during demineralization process releasing mainly calcium with the increase of CaGP concentration in the experimental dentifrices (Figure 3 and table 2). However, the great amount of calcium present in enamel with the 500 2%CaGP dentifrice can be related to reduction of fluoride in enamel (table 2). Apparently, the concentration of CaGP 2% produced a supersaturation of calcium and a great precipitation of calcium-rich crystals superficially obliterating the enamel porous for calcium and fluoride diffusion deeper into the enamel [Silverstone et al., 1981; Lynch et al., 2007]. The pH-cycling model used [Vieira et al., 2005] produces a sub-surface lesion [Takeshita et al., 2009] classified by Lynch et al. [2007] as a high-R lesion. This type of lesion presents a greater surface enamel permeability that facilitates ionic changes due to large and numerous pores. However, when those pores are obliterated, the rate of ionic changes may be reduced. This can explain why the group 500 2%CaGP presented a similar sub-surface lesion (ΔKHN) compared to the placebo (table 1).

Minimal changes in the enamel calcium concentration have a great effect in the demineralization when compared to phosphate (table 2). Even so, calcium and phosphate reduce demineralization; it is necessary more phosphate than calcium to promote similar effect [Tanaka and Kadoma, 2000; Lynch et al., 2007]. As there is no change in the phosphorus concentration present in enamel (table 2), it seems that phosphate was not released due to glycerol linkage [Inoue et al., 1992]. Then, the

release of phosphate will occur by alkaline phosphatase hydrolysis [Imai and Hayashi, 1993; Vilorio et al., 2000]. It is necessary to submit the 500 0.25% CaGP experimental dentifrices to dental biofilm in an *in situ* study to confirm that hypothesis and verify if the phosphate release can improve the efficacy of the experimental dentifrice enhanced with CaGP [Lynch et al., 2007].

The results from the present study showed that a low-fluoride dentifrice is capable to maintain the 1,100-µg F/g efficacy when supplemented with CaGP. In addition, the concentration of 0.25% CaGP provided the best effect against enamel demineralization.

Table 1. Results (mean $\pm$ sd, n=12) of hardness analysis according to experimental dentifrices: placebo, 500 μ g F/g, 500 0.25% CaGP, 500 2% CaGP and positive control

Groups	Analysis			
	SH	SH ₁	%SH	Δ KHN
Placebo	371.4 $\pm$ 8.4 ^a	74.3 $\pm$ 22.7 ^a	-78.7 $\pm$ 6.3 ^a	14339.4 $\pm$ 1969.9 ^a
500 μ g F/g	367.5 $\pm$ 10.5 ^a	180.8 $\pm$ 40.7 ^b	-50.9 $\pm$ 10.7 ^b	8494.2 $\pm$ 1435.3 ^b
500 0.25% CaGP	373.0 $\pm$ 8.8 ^a	264.4 $\pm$ 21.5 ^c	-33.8 $\pm$ 5.1 ^c	4730.0 $\pm$ 1289.7 ^c
500 2% CaGP	366.2 $\pm$ 10.8 ^a	108.4 $\pm$ 49.5 ^d	-70.5 $\pm$ 12.9 ^d	12578.1 $\pm$ 2048.3 ^a
Positive control	373.4 $\pm$ 8.8 ^a	223.3 $\pm$ 16.9 ^e	-40.2 $\pm$ 4.4 ^e	5723.3 $\pm$ 832.1 ^c

Means followed by distinct letters are significantly different according to each analysis. ANOVA: SH (p=0.244). Kruskal-Wallis: SH₁ (p<0.001), %SH (p<0.001) and Δ KHN (p<0.001).

Table 2. Results (mean $\pm$ sd, n=12) of the fluoride, calcium and phosphorus concentration in enamel according to experimental groups: placebo, 500 μ g F/g, 500 0.25% CaGP, 500 2% CaGP and positive control

Groups	Analysis (μ g/mm ³)		
	Fluoride	Calcium	Phosphorus
Placebo	0.10 $\pm$ 0.03 ^a	944.9 $\pm$ 139.3 ^a	136.5 $\pm$ 34.9 ^a
500 μ g F/g	1.39 $\pm$ 0.53 ^b	920.6 $\pm$ 149.6 ^a	148.8 $\pm$ 62.1 ^a
500 0.25% CaGP	1.36 $\pm$ 0.18 ^b	1064.2 $\pm$ 104.5 ^b	141.1 $\pm$ 49.9 ^a
500 2% CaGP	0.68 $\pm$ 0.39 ^c	1201.4 $\pm$ 149.2 ^c	132.9 $\pm$ 43.5 ^a
Positive control	1.76 $\pm$ 0.39 ^d	1055.2 $\pm$ 193.2 ^b	144.1 $\pm$ 36.2 ^a

Means followed by distinct letters are significantly different according to each analysis. Kruskal-Wallis: Fluoride (p<0.001), Calcium (p=0.001) and Phosphorus (p=0.788).

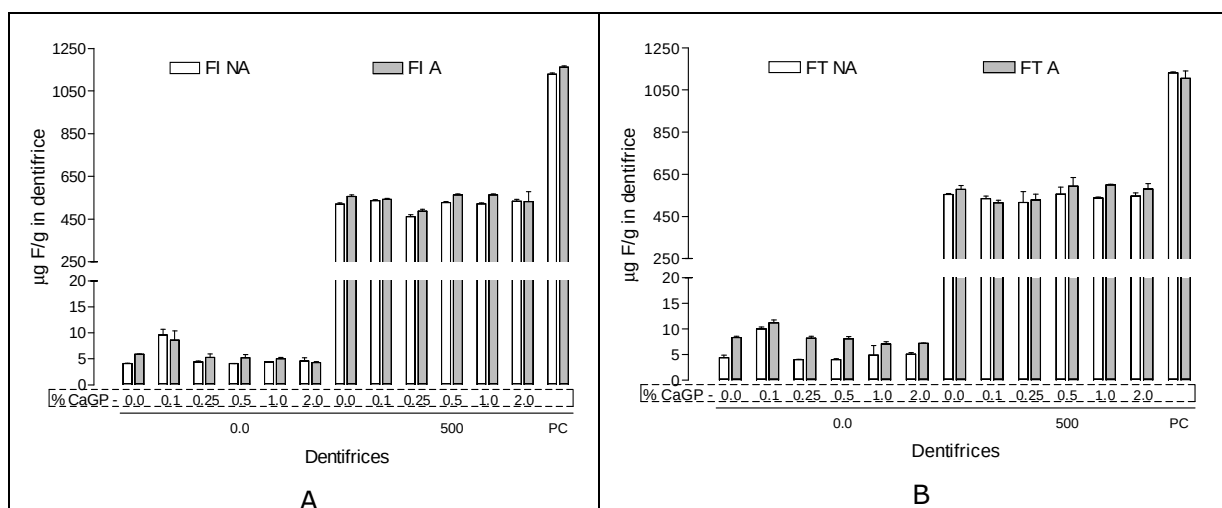


Fig. 1 (A) Ionic (FI) and (B) Total (FT) fluoride concentration (µg/g, mean ± sd, n=9) of the experimental dentifrices before (NA) and after (A) accelerated aging test.

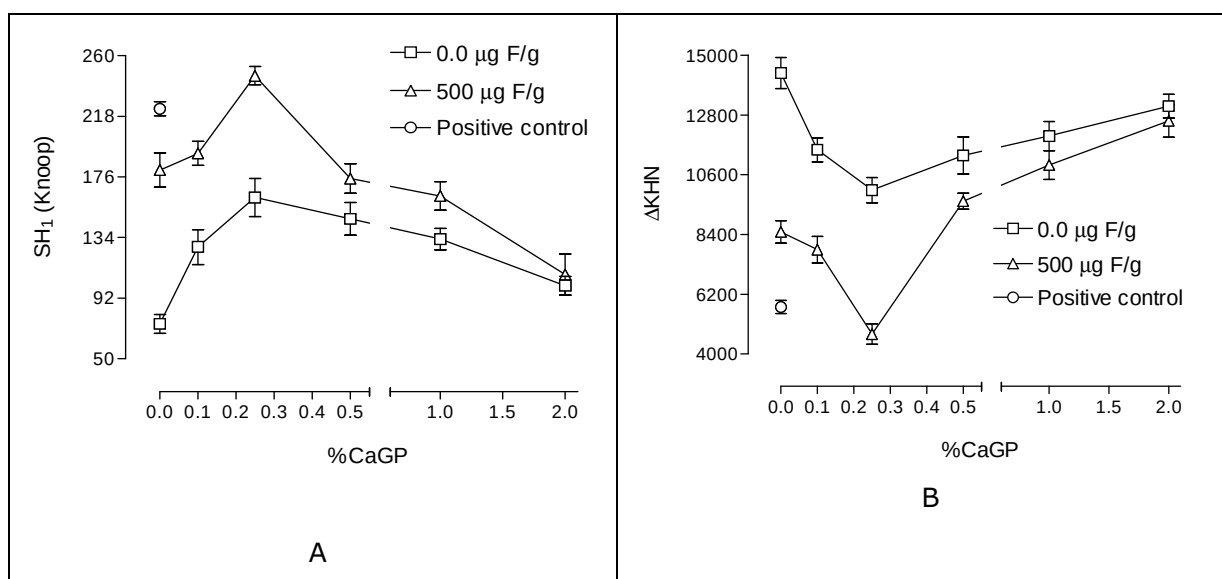


Fig. 2 SH₁ (A) e ΔKHN (B) values (mean ± se, n=12) according to fluoride and calcium glycerophosphate concentration (%CaGP) in the experimental dentifrices.

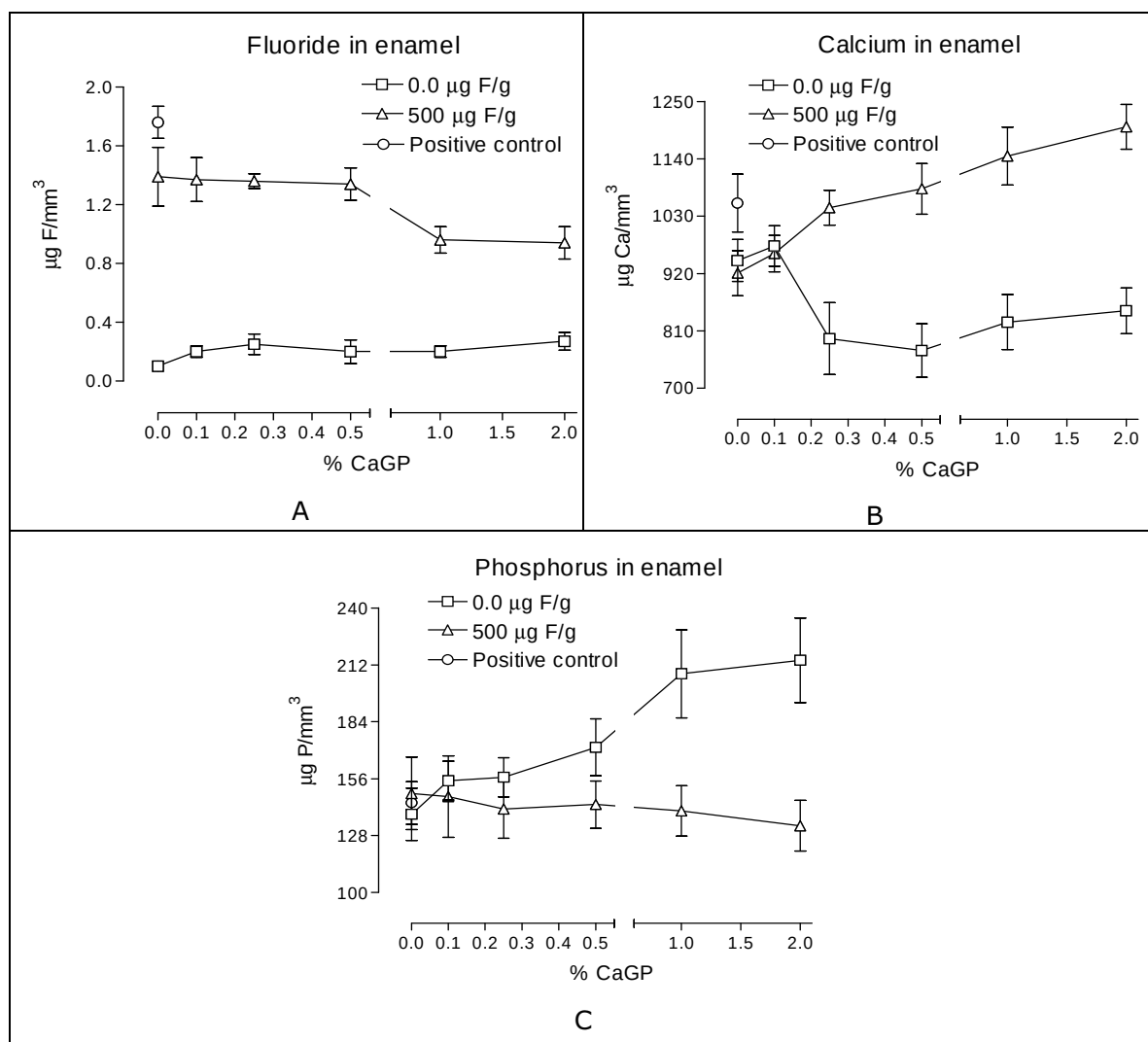


Fig. 3 Fluoride (A), calcium (B) and phosphorus (C) concentration ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) values (mean $\pm$ se, $n=12$) according to fluoride and calcium glycerophosphate concentration (%CaGP) in the experimental dentifrices.

2.6 References

- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem ACB: In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267
- 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;40:239-244.
- Campos GM: GMC 2003 (computer program). Ribeirao Preto, School of Dentistry; 2003. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.
- 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;32:47-53.
- Cury JA: Fluoride dentifrices in Brazil. *RGO* 1989;37:139-142. (in Portuguese)
- 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.
- Cury JA, Francisco SB, Simões 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.
- Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CP: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on *in situ* enamel remineralization. *Caries Res* 2005;39:255-257.
- Delbem ACB, Vieira AEM, Cury JA: Cariostatic potencial evaluation of most popular Brazilian dentifrice. *Rev Bras Odontol* 2002;59:14-18. (in Portuguese)

- Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
- Friberger P: The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel. *Scand J Dent Res* 1975;83:339-344.
- Hamilton J: New CDC report offers fluoride use tips. *J Calif Dent Assoc* 2001;29:723-724.
- Horowitz HS: The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentration for preschool-aged children. *J Public Health Dent* 1992;52:216-221.
- Imai M, Hayashi Y: Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium- β -glycerophosphate (Ca-BGP). *J Oral Pathol Med* 1993;22:411-417.
- Inoue M, In Y, Ishida T: Calcium binding to phospholipid: structural study of calcium glycerophosphate. *J Lipid Res* 1992;33:985-994.
- Lima YBO, Cury JA: Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. *Rev Saúde Pública* 2001;35:576-581.
- Lynch RJM: Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J* 2004;54:310-314.
- Lynch RJ, Ten Cate JM: Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res* 2006;40:142-147.
- Lynch RJM, Mony U, ten Cate JM: Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. *Caries Res* 2007;41:257–262.
- Mascarenhas AK: Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000;22:269-277.
- Moreno EC: Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. *Int Dent J* 1993;43:71-80.

-
- Petersson LG, Lodding A, Hakeberg M, Koch G: Fluoride profiles in human enamel after *in vitro* treatment with dentifrices of different compositions and acidities. Swed Dent J 1989;13:177-183
- Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ: Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel *in vitro*. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. Caries Res 1981;15(2):138-157.
- 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.
- Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB: *In vitro* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. Caries Res 2009;43:50-56.
- Tanaka M, Kadoma Y: Comparative reduction of enamel demineralization by calcium and phosphate *in vitro*. Caries Res 2000;34:241-245.
- Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. Caries Res 2005;39:514-520.
- Viloria IL, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Structure and chemical composition of an experimentally formed apical barrier after the application of calcium-glycerophosphate. J Endod 2000;26:605-609.
- Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H: Micro-sampling by abrasion. Caries Res 1985;19:97-102.
- Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. Caries Res 2002;36:256-265.

3.- Avaliação de dentifrício com baixa concentração de fluoreto suplementado com Glicerofosfato de Cálcio na remineralização de lesões de cárie *in situ* . *

Palavra- chave: Remineralização dentária. Esmalte dentário. Dentifrícios. Fluoretos. Cálcio. Dureza.

3.1 Resumo

A redução da concentração de fluoreto (F) nos dentifrícios é considerada uma alternativa para evitar a fluorose dentária, contudo a ação anticariogênica apresentada pelos dentifrícios comerciais (1100 µg F/g) deve ser mantida. A associação de fluoreto (500 µg/g) e 0,25% de glicerofosfato de cálcio (CaGP) mostrou eficácia semelhante a um dentifrício 1100 µg F/g em estudo *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a efetividade de dentifrícios com baixa concentração de F (NaF ou MFP) suplementado com 0,25% de CaGP na remineralização *in situ* do esmalte desmineralizado artificialmente. Voluntários (n=9) utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte bovino desmineralizados (n=4) que foram submetidos a 5 regimes de tratamento por 3 dias, de acordo com os dentifrícios experimentais: placebo, 500 µg F/g (NaF), 500 µg F/g (NaF) e 0,25% de CaGP, 500 µg F/g (MFP) e 0,25% de CaGP além de um dentifrício controle positivo (1100 µg F/g). Os dentifrícios com 500 µg F/g (NaF ou MFP) suplementados com 0,25% de CaGP mostraram semelhante recuperação mineral quando comparado ao controle positivo (ANOVA; $p < 0,05$). O dentifrício 500 µg F/g (NaF) e CaGP apresentou concentrações de F (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$), Ca e P (ANOVA; $p > 0,05$) semelhantes ao controle positivo. Concluiu-se que os dentifrícios com 0,25% de CaGP e 500 µg F/g (NaF ou MFP) apresentaram a mesma eficácia do controle positivo (1100 µg F/g).

* Capítulo escrito de acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research (Anexo B)

3.2 Introdução

O uso de produtos fluoretados tem sido apontado como o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie dentária em diversos países [Rolla e Saxegaard, 1990; Narvai, 2000; Cury et al., 2004; Stookey et al., 2004]. Entretanto, crianças que tiveram acesso a dentifrícios fluoretados nos primeiros dois anos de vida e vivem em áreas com água não fluoretada, apresentam fluorose dentária [Lalumandier, 1990] com taxas 11 vezes maiores do que aquelas com acesso após esta idade, mostrando que a fluorose dentária está associada ao uso de dentifrícios em crianças de pouca idade em 70% dos casos, independente da presença de F na água [Osuji et al., 1988].

Existem relatos afirmando que em média 57% do dentifrício colocado na escova é ingerido por crianças menores de 6 anos, ocorrendo uma variação de 17 a 98% [Ericson e Frosmann, 1969; Lima e Cury, 2001]. Frente ao problema observado, várias recomendações foram propostas para diminuir a incidência de fluorose, tais como a escovação supervisionada, uso de quantidades reduzidas de dentifrício e a redução do tamanho do orifício das embalagens comerciais [Horowitz, 1992; Hamilton, 2001; Lima e Cury, 2001;]. A redução da concentração de F dos dentifrícios é uma das alternativas plausíveis, porém alguns estudos mostraram que dentifrícios contendo 250 µg F/g são menos efetivos na prevenção da cárie dentária do que aqueles contendo 1000 µg F/g [Koch et al., 1982; Mitropoulos et al., 1984].

Segundo Schemehorn e colaboradores [1999b], o processo de remineralização depende primariamente da presença de íons Ca e P na saliva e é intensificado na presença do F, o que explica o maior potencial remineralizador apresentado pelos dentifrícios suplementados. A capacidade de diminuir a desmineralização e intensificar a remineralização é uma característica importante de um dentifrício quando se trata de populações com alto índice de cárie, pois a prevenção da formação de lesões cariosas bem como a redução da progressão de lesões já existentes torna-se intensificada.

Os fosfatos de Ca agem fornecendo íons Ca e P [Whitford et al., 2002] interagindo diretamente com o esmalte, reduzindo sua solubilidade [Grenby e Bull, 1980]. Estudos *in situ* com carbonato de cálcio associado ao MFP mostraram uma diminuição na desmineralização e um aumento na remineralização do esmalte

quando comparado a um dentifrício com sílica como abrasivo de mesma concentração de F [Cury et al., 2003, 2005]. Outros estudos avaliaram a adição do glicerofosfato de Ca aos dentifrícios associados ao MFP e mostraram um efeito anticariogênico [Naylor e Glass, 1979; Mainwaring e Naylor, 1983].

Embora muitos trabalhos comprovem aumento da ação anticariogênica de dentifrícios suplementados com Ca e P, a maioria utilizou concentrações altas de F (1100 µg/g). Zaze et al. [2008], em estudo *in vitro*, analisaram dentifrícios experimentais com baixa concentração de fluoreto (500 µg/g) associados ao glicerofosfato de cálcio (CaGP) em diferentes concentrações. Observaram uma menor perda mineral com 0,25% de CaGP apresentando diferença estatística quando comparado ao dentifrício Crest® (1100 µg F/g). Este dentifrício foi testado em estudo *in situ* de desmineralização [Delbem, 2008], confirmando os resultados do trabalho *in vitro* [Zaze et al., 2008]. Entretanto, seria interessante testar esta formulação, verificando se é capaz de ativar o processo de remineralização de lesão de cárie.

Uma formulação com concentração baixa de fluoreto, que promova uma eficácia semelhante ou superior à de um dentifrício padrão ou comercial (1100 µg F/g) mantendo a estabilidade de fluoreto, cálcio e fosfato no dentifrício, pode ser interessante na redução da ingestão de flúor, principalmente em crianças. Com isto, promoveria a redução do risco de intoxicação crônica pelo flúor, beneficiando crianças de menor idade. Tal fórmula também pode ser indicada para adultos, ampliando sua ação com grande impacto em saúde pública (uso familiar).

A proposta do presente estudo foi avaliar o efeito de dois dentifrícios experimentais com diferentes fontes de flúor (NaF e MFP) e baixa concentração (500 µg F/g) suplementados com 0,25% de glicerofosfato de cálcio (CaGP) em ativar o processo de remineralização de lesão de cárie em um modelo *in situ*.

3.3 Material e Método

3.3.1 Delineamento experimental

O estudo foi do tipo cruzado duplo cego com cinco períodos experimentais para determinar a capacidade remineralizadora de dentifrícios fluoretados utilizando

um modelo *in situ*. Blocos de esmalte bovino (4x4 mm) foram sequencialmente polidos com lixas de carboreto de sílica (granulação: 600, 800 e 1200; Buehler, Alemanha) e feltro de polimento (Buehler, Alemanha) com solução diamantada (1 μ , Extec, USA), sendo selecionados blocos (n=410) com dureza de superfície (SHi) entre 353,0 a 375,0 KHN. Após serem submetidos à desmineralização e análise de dureza (SHd), os blocos (n=4) foram fixados em dispositivos palatinos que foram utilizados por voluntários (n=9) adultos jovens (18 a 35 anos) com boa saúde geral e bucal. Os voluntários foram orientados a utilizar o dentifrício placebo por 7 dias e em seguida os dentifrícios experimentais durante 3 dias com intervalos de 7 dias entre eles, quando fizeram uso do dentifrício placebo [Oliveira, 2009]. Os dentifrícios experimentais placebo, 500 μ g F/g (NaF), 500 μ g F/g (NaF) e 0,25% de GPCa, 500 μ g F/g (MFP) e 0,25% de GPCa e um dentifrício comercial como controle positivo (1100 μ g F/g) foram utilizados 3 vezes ao dia. Decorrido o tempo experimental foram realizadas as análises de dureza de superfície (SHf), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH), dureza em secção longitudinal, para o cálculo da perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) e concentrações de F, Ca e P presentes no esmalte dentário (μ g/mm³). Os resultados foram analisados estatisticamente considerando como fator de variação os dentifrícios e, as variáveis, a SHi, SHd, SHf, %SH, Δ KHN e concentração de F, Ca e P presentes no esmalte.

3.3.2 Seleção dos voluntários

Para este estudo, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Processo FOA n. 2835/08), foram selecionados 17 adultos jovens, sem distinção ao gênero, residentes em área com água de abastecimento fluoretada, que apresentaram bom estado de saúde geral e bucal [Kielbassa et al., 2003; Delbem et al., 2005; Tenuta et al., 2005]. Não fizeram parte 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 tenham atividades aquáticas (o cloro presente nas piscinas leva o indivíduo a ter contato com ambiente 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 auto-

imunes, 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; não cumprimento do desenho experimental e voluntário que apresentou capacidade remineralizadora similar entre o dentifrício placebo e o controle positivo (1100 µg F/g). Os voluntários deveriam apresentar potencial de remineralização ao redor de 10 a 20% quando submetidos a 3 dias de remineralização *in situ*, utilizando dentifrício placebo. De acordo com estes parâmetros, os dados referentes a 9 voluntários fizeram parte das análises.

3.3.3 Formulação e Dosagem de F dos Dentifrícios Experimentais

As formulações dos dentifrícios experimentais contêm os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, aroma, sacarinato de sódio, óleo de menta, glicerina, sílica hidratada, lauril sulfato de sódio e água. O F foi acrescido às formulações para se obter uma concentração final de 500 µg F/g (na forma de NaF, Merck, Alemanha e MFP, Sigma-Aldrich, USA) e o composto orgânico (glicerofosfato de cálcio, Sigma-Aldrich, USA) contendo Ca e P, na concentração de 0,25%. Foi utilizado também dentifrício sem adição de F (Placebo) e um dentifrício de mercado (Controle positivo, Crest[®], 1100 µg F/g), para fins de comparação.

Para a dosagem de F utilizou-se um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A+), previamente calibrado com 5 padrões. Pesou-se 100-110 mg de cada dentifrício que foram suspensos em água deionizada num volume final de 10,0 mL, em tubo de polipropileno graduado para centrífuga. Após homogeneização, alíquotas de 0,25 mL foram separadas para a dosagem do F (FT); a essas alíquotas acrescentou-se 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Estas soluções permaneceram sob agitação durante 1h a 45°C, e em seguida foi adicionado 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹. Para dosagem de FT adicionou-se 1 mL de TISAB II (Tampão ajustador de força iônica). Para a dosagem de F iônico (FI), a suspensão de dentifrício foi submetida à centrifugação a 906g durante 20 minutos. Pipetou-se 0,25 mL do sobrenadante ao qual foram acrescentados 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1 mL de TISAB

II para a dosagem de FI. Para a dosagem de flúor solúvel total (FST) pipetou-se 0,25 mL do sobrenadante em tubo de ensaio plástico ao qual adicionou-se 0,25 mL de HCl 2M. Após agitação por uma hora a 45° C, foram adicionados ao tubo 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1 mL de TISAB II para a dosagem de FST. Foram realizadas seis repetições e o cálculo final de flúor, no dentifrício, foi obtido pela fórmula: $\mu\text{g F calculado} \times (\text{diluição})/\text{peso}$. Para o cálculo do flúor ionizável (MFP) partiu-se da dosagem do FST e subtraiu-se o valor encontrado de FI (MFP= FST - FI). No cálculo do flúor insolúvel (Fins.), partiu-se da dosagem do FT e subtraiu-se o valor encontrado de FST (Fins.= FT - FST). [Delbem et al., 2002].

3.3.4 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 externa de esmalte (16 mm²). Lesões artificiais de cárie de subsuperfície [Spiguel et al., 2009] foram produzidas, após SHi, utilizando modelo modificado a partir de Queiroz et al. [2008]. Os blocos foram imersos em solução contendo 1,3 mmol/L Ca, 0,78 mmol/L P em tampão acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03-0,04 $\mu\text{g F/mL}$ (2 mL/mm²), por um período de 16 horas, a uma temperatura de 37°C [Spiguel et al., 2009]. A seguir, realizou-se análise de dureza de superfície pós-desmineralização (SHd) sendo selecionados os blocos com dureza entre 59,0 e 92,0 KHN.

3.3.5 Protocolo do estudo “in situ” e instrução aos voluntários

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 desmineralizado (dois de cada lado) os quais ficaram na mesma altura da resina. Houve cinco períodos experimentais, de acordo com os grupos determinados pelos dentifrícios: placebo, 500 $\mu\text{g F/g}$ (NaF), 500 $\mu\text{g F/g}$ (NaF) + 0,25% de CaGP (500 NaF CaGP), 500 $\mu\text{g F/g}$ (MFP) + 0,25% de CaGP (500 MFP CaGP) e um dentifrício comercial utilizado como controle positivo (Crest® – 1100 $\mu\text{g F/g}$). O voluntário realizou 3 escovações diárias com o dispositivo em posição, o qual deveria somente ser removido durante as refeições, durante 3 dias [Oliveira, 2009].

Terminado este período, o voluntário fez uso de dentífrico sem fluoreto durante 7 dias para, a seguir, receber um novo dispositivo, contendo mais 4 blocos, para uma nova fase experimental. Os mesmos procedimentos foram realizados para todos os dentífricos.

3.3.6 Avaliação da microdureza de superfície

Determinou-se a dureza de superfície nos blocos de esmalte utilizando 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). Realizou-se análises antes (SH_i), pós-desmineralização (SH_d) e após experimento *in situ* (SH_f). Foram realizadas 5 impressões iniciais (SH_i) eqüidistantes 100 µm entre si no centro dos blocos de esmalte e, as demais (SH_d e SH_f) a 100 µm das iniciais, para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_r) de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH = ((SH_f - SH_d) / (SH_i - SH_d)) \times 100$.

Para a análise de dureza em secção longitudinal, os blocos foram seccionados na região central, embutidos em resina acrílica incolor com a face cortada exposta e em seguida o conjunto foi polido gradualmente. 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 distantes da inicial, com carga de 25 g durante 10s. 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].

3.3.7 Determinação de F, Ca e P no esmalte

Na quarta parte de cada bloco removeu-se uma camada de esmalte (53,5 ± 3,7 µm) baseado no trabalho de Weatherell et al. [1985]. Os blocos (2x2 mm) foram fixados com cola adesiva em mandril para peça reta e desgastados utilizando uma

base de microscópio modificada, onde se encontra um manômetro acoplado (Pantec, São Paulo, Brazil), e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de granulação 400 (silicon-carbide, Buelher, USA) em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Acrescentou-se 0,8 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹, no interior dos frascos, os quais foram mantidos sob agitação constante por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,8 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. Os resultados foram expressos em µg/mm³.

Para análise de F utilizou-se eletrodo específico Orion 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). O eletrodo foi previamente calibrado com padrões contendo 0,040 a 0,640 µg F/mL, nas mesmas condições das amostras. Dispensou-se sobre o microeletrodo de referência uma alíquota de 40 µL da solução da biópsia e acrescentou-se o mesmo volume de TISAB II ("tampão ajustador de força iônica"). As leituras foram realizadas em duplicata.

O cálcio foi dosado por espectrofotometria, por meio da adaptação do método descrito por Vogel et al. [1983]. Para calibração, utilizou-se padrões contendo 40 a 200 µg Ca/mL. Foi utilizada uma alíquota de 3 µL, em duplicata, tanto para os padrões como para as amostras. O fósforo foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow [1925], também em duplicata.

3.3.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente considerando como fator de variação os dentífricos, e como variáveis, a SH_i, SH_d, SH_f, %SH_r, ΔKHN e concentração de F, Ca e P presentes no esmalte. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (Cochran tests) das variáveis. Os dados de SH_d, %SH_r, Ca e P mostraram-se homogêneos e em seguida foi realizada análise de variância (One-way) bem como o teste de Tukey. Os dados de SH_i, SH_f, e F mostraram-se heterogêneos e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Miller. As análises foram realizadas no programa GMC versão 2002 [Campos, 2003], estabelecendo-se o nível de significância em 5%.

3.4- Resultados

Os resultados da dosagem de fluoreto total, iônico e solúvel total, dos dentifrícios utilizados no estudo para os grupos placebo, 500 µg F/g, 500 NaF CaGP, 500 MFP CaGP e controle positivo foram, respectivamente: 8,8 ±1,0, 8,7 ±0,5 e 7,4 ±1,2; 520,3 ±11,0, 518,1 ±1,6 e 519,7 ±8,5; 545,6 ±52,0, 500,4 ±18,2 e 513,2 ±56,8; 546,4 ±7,0, 494,7 ±6,6 e 141,7 ±7,2; 1033,6 ±16,2, 1062,2 ±6,3 e 1069,1 ±3,2.

A Tabela 1 mostra os resultados SH_i, SH_d, SH_f, %SH_r e ΔKHN de acordo com os dentifrícios experimentais. Não houve diferença entre os grupos experimentais para os resultados de SH_i (p>0,05), bem como nos valores médios de SH_d (p>0,05). Os dados de SH_f mostraram diferença entre os grupos, sendo que o dentifrício 500 NaF CaGP apresentou maior valor de SH_f quando comparado aos demais grupos (p<0,05). Os dentifrícios 500 NaF CaGP e 500 MFP CaGP apresentaram resultados de %SH_r semelhantes ao controle positivo (p>0,05), porém diferiram entre si (p<0,05). Os dentifrícios fluoretados apresentaram menor perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) quando comparado ao placebo (p<0,05). O grupo 500 MFP CaGP promoveu valores de ΔKHN semelhantes ao controle positivo (p>0,05).

A tabela 2 mostra a concentração de F, Ca e P presente no esmalte após experimento *in situ* sob tratamento dos dentifrícios experimentais. Os dentifrícios fluoretados promoveram maior incorporação de F quando comparados ao placebo (p<0,05). O dentifrício 500 NaF CaGP apresentou valores semelhantes ao controle positivo (p>0,05) e diferentes dos demais dentifrícios fluoretados (p<0,05). Houve semelhança estatística entre os dentifrícios 500 µg F/g e 500 MFP CaGP na incorporação de fluoreto (Tabela 2). Quanto ao Ca presente no esmalte, os grupos placebo, 500 µg F/g e 500 MFP CaGP mostraram valores semelhantes (p>0,05). O dentifrício controle positivo apresentou os maiores valores de Ca presente no esmalte (p<0,05) e foi semelhante ao grupo 500 NaF CaGP (p>0,05). Os grupos 500 µg F/g, 500 MFP CaGP e 500 NaF CaGP apresentaram similar incorporação de P no esmalte (p>0,05). Os maiores valores foram observados com o grupo controle positivo (p<0,05) que foi semelhante ao grupo 500 NaF CaGP (p>0,05).

3.5 Discussão

Com objetivo de melhorar a relação risco-benefício existente entre a fluorose dentária e a ação anticárie dos dentifrícios fluoretados, este estudo verificou se o acréscimo de um fosfato orgânico, glicerofosfato de cálcio, em dentifrícios com concentração de F reduzida poderia manter a eficácia de um produto comercial considerado “padrão ouro”. Para isto utilizou-se um modelo de remineralização *in situ* que contemplasse dois critérios: ser capaz de produzir remineralização de lesões artificiais de cárie de subsuperfície e que esta recuperação mineral fosse entre 10 a 20% quando submetidos ao tratamento com dentifrício placebo. Entre os 17 voluntários selecionados previamente, 8 apresentaram ampla capacidade remineralizadora, às vezes semelhante ao dentifrício com 1100 µg F/g (dados não publicados). Com objetivo de minimizar a variabilidade entre os voluntários e verificar a eficácia dos dentifrícios em um meio bucal com pouca capacidade remineralizadora, apenas 9 voluntários foram incluídos no estudo.

A adição de 0,25% de glicerofosfato de cálcio (CaGP) aos dentifrícios com 500 µg F/g (NaF e MFP) promoveu uma recuperação mineral semelhante ao dentifrício com 1100 µg F/g (Tabela 1). Este acréscimo aumentou a capacidade remineralizadora do dentifrício de 500 µg F/g em 27% quando a fonte de fluoreto foi o NaF e em 14% com o MFP, quando se analisa os resultados de SHf (Tabela 1). O aumento da concentração de fluoreto de 500 para 1100 µg F/g produziu um incremento de 16% na recuperação mineral. De acordo com a faixa de equivalência para estudos intra-orais [Proskin et al., 1992] que varia entre 0,90 a 1,10 (razão entre dentifrício teste e controle positivo), os dentifrícios com 500 µg F/g suplementados com CaGP demonstraram ser equivalentes ao controle positivo. Utilizando os valores médios de SHf, o dentifrício 500 NaF CaGP apresenta um valor de 1,09 e, o 500 MFP CaGP, 0,98. Com os dados de ΔKHN os valores são: 0,77 e 0,95, respectivamente. Valores menores do que 0,90 demonstram superioridade em relação ao dentifrício controle positivo (American Dental Association, 1999, 2005). Estes dados mostram que em situações de alta atividade de cárie [Lima et al., 2008] a capacidade de remineralização será mantida mesmo com a redução da concentração de fluoreto (500 µg F/g).

A superioridade do dentifrício 500 NaF CaGP em reduzir a área da lesão de cárie de subsuperfície (Δ KHN) em relação ao controle positivo (1100 μ g F/g) se deve à sua capacidade de produzir uma supersaturação de Ca e P no meio [Delbem, 2008] pela hidrólise do CaGP [Imai e Hayashi, 1993; Vilorio et al., 2000]. O aumento, principalmente de Ca, leva a uma maior retenção de fluoreto no fluido do biofilme [Whitford et al., 2002; Vogel et al., 1990], que está relacionada à saturação no mineral do esmalte [Vogel et al., 1990; Schemehorn et al., 1999a, 1999b]. Os resultados apresentados na tabela 2 confirmam esta afirmação, pois o dentifrício 500 NaF CaGP promoveu incorporação 36% maior de fluoreto ao esmalte quando comparado ao grupo 500 μ g F/g ($p < 0,05$) e similar ao dentifrício com 1100 μ g F/g ($p > 0,05$). Já uma maior disponibilidade de fluoreto pelo grupo controle positivo promoveu um aumento de Ca e P presente no esmalte (Tabela 2) e conseqüente redução da lesão de cárie (Tabela 1).

Entretanto, o grupo 500 MFP CaGP apresentou concentrações de F, Ca e P semelhantes ao dentifrício 500 μ g F/g ($p > 0,05$) e menor em relação ao controle positivo (Tabela 2). Porém, apresentou capacidade remineralizadora equivalente ao dentifrício 1100 μ g F/g. Provavelmente, a menor disponibilidade de fluoreto advindo do MFP [Petzold, 2001] não permitiu uma incorporação de fluoreto e cálcio no esmalte em grandes proporções. O MFP, quando aplicado ao esmalte, fica adsorvido à superfície por um longo período, e por meio da hidrólise, libera o fluoreto lentamente [van Dijk et al., 1979]. Isto deve favorecer a deposição de fluoreto de cálcio (CaF_2) em quantidade suficiente [Ögaard, 2001] para produzir uma remineralização equivalente ao controle positivo. Entretanto, não é suficiente para aumentar a incorporação de fluoreto e cálcio no esmalte (Tabela 2).

Em um estudo *in vitro*, observou-se uma menor perda mineral com a utilização de dentifrício com 500 μ g/Fg (NaF) associado à 0,25% de GPCa [Zaze et al., 2008] resultado confirmado em posterior estudo *in situ* de desmineralização [Delbem, 2008]. Com base nestes dois estudos e nos resultados do presente trabalho, podemos afirmar que esta modalidade de dentifrício é capaz de diminuir a desmineralização e potencializar a remineralização do esmalte dentário.

Conclui-se que os dentifrícios com baixa concentração de F (500 μ g/g) suplementados com 0,25% CaGP, independente da fonte de Flúor (NaF ou MFP), apresentaram eficácia anticárie equivalente ao controle positivo (1100 μ g F/g) na remineralização de lesão de cárie em modelo *in situ*, o que pode sugerir uma

melhora da relação risco-benefício existente entre a fluorose dentária e a ação anticárie dos dentífricos fluoretados comerciais, porém verifica-se a necessidade da realização de estudos clínicos para a confirmação destes resultados.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ dp, n=9) das durezas de superfície (SH, SHd e SHf), porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHr) e perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) de acordo com os grupos

Grupos	Análise – Dureza				
	SHi	SHd	SHf	%SHr	Δ KHN
Placebo	363,2 $\pm$ 6,4 ^a	75,9 $\pm$ 6,5 ^a	127,5 $\pm$ 7,2 ^a	18,2 $\pm$ 3,8 ^a	7843,2 $\pm$ 864,5 ^a
500 μ g F/g	360,7 $\pm$ 4,3 ^a	76,2 $\pm$ 6,5 ^a	158,2 $\pm$ 10,6 ^b	28,9 $\pm$ 2,5 ^b	6465,1 $\pm$ 613,1 ^b
500 MFP CaGP	368,3 $\pm$ 7,6 ^a	75,7 $\pm$ 8,6 ^a	179,9 $\pm$ 14,9 ^c	36,4 $\pm$ 5,1 ^c	4846,0 $\pm$ 776,6 ^{c,d}
500 NaF CaGP	361,7 $\pm$ 5,4 ^a	76,3 $\pm$ 6,4 ^a	200,8 $\pm$ 20,3 ^d	42,8 $\pm$ 5,6 ^e	3932,3 $\pm$ 866,1 ^d
Controle positivo	364,3 $\pm$ 5,4 ^a	74,5 $\pm$ 12,0 ^a	183,3 $\pm$ 21,3 ^c	39,7 $\pm$ 4,3 ^{e,c}	5090,0 $\pm$ 619,1 ^c

Letras distintas mostram diferença significativa em cada análise (Kruskal-Wallis: SHi – p=0,114 and SHf – p<0,001; ANOVA (One-way): %SH – p<0,001, SHd – p=0,115, Δ KHN – p<0,001).

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ dp, n=9) das concentrações de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes no esmalte após experimento *in situ* de acordo com os grupos

Grupos	Análise do esmalte – microabrasão		
	F, μ g/mm ³	Ca, mg/mm ³	P, mg/mm ³
Placebo	0,360 $\pm$ 0,073 ^a	0,593 $\pm$ 0,079 ^a	0,071 $\pm$ 0,020 ^a
500 μ g F/g	0,521 $\pm$ 0,104 ^b	0,661 $\pm$ 0,083 ^{a,b}	0,091 $\pm$ 0,018 ^{a,b}
500 MFP CaGP	0,504 $\pm$ 0,087 ^b	0,645 $\pm$ 0,135 ^a	0,105 $\pm$ 0,016 ^b
500 NaF CaGP	0,707 $\pm$ 0,067 ^c	0,753 $\pm$ 0,065 ^{b,c}	0,134 $\pm$ 0,022 ^{c,b}
Controle positivo	0,859 $\pm$ 0,182 ^c	0,804 $\pm$ 0,078 ^c	0,137 $\pm$ 0,029 ^c

Letras distintas mostram diferença significativa em cada análise (Kruskal-Wallis: F – p<0,001; ANOVA (One-way): Ca – p<0,001 e P – p<0,001).

3.6- Referências

- Alves KM, 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;41:263-267.
- American Dental Association. Council on Scientific Affairs: Acceptance program guidelines: determination of efficacy in product evaluation. Chicago:ADA; 1999.
- American Dental Association. Council on Scientific Affairs. Acceptance program guidelines: fluoride-containing dentifrices. Chicago:ADA; 2005.
- Campos GM: GMC 2003 (computer program). Ribeirao Preto, School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.
- 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.
- Cury JA, Francisco SB, Simões 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.
- Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CP, et al: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on in situ enamel remineralization. *Caries Res* 2005;39:255-257.
- Delbem ACB: O efeito dos dentifrícios de baixa concentração de flúor suplementado com cálcio na desmineralização e sobre o biofilme dental *in situ*. Relatório Científico Final – FAPESP, Processo 2007/05915-6, 2008.
- Delbem ACB, Vieira AEM, Cury JA: Cariostatic potencial evaluation of most popular Brazilian dentifrice. *Rev Bras Odontol* 2002;59:14-18. (in Portuguese)

- 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.
- Ericsson Y, Forsman B: Fluoride retained from mouth-rinses and dentifrices in pre-school children. Caries Res 1969;3:290-299.
- Fiske CH, Subarrow Y: The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925;66:375-400.
- Grenby TH, Bull JM. Protection against dental caries in rats by glycerophosphates or calcium salts or mixtures of both. Arch Oral Biol 1975;20:717-724.
- Hamilton J: New CDC report offers fluoride use tips. J Calif Dent Assoc 2001;29:723-724.
- Horowitz HS: The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentration for preschool-aged children. J Public Health Dent 1992;52:216-221.
- Imai M, Hayashi Y: Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium- β -glycerophosphate (Ca-BGP). J Oral Pathol Med 1993;22:411-417.
- Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H: Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. Oper Dent 2003;28:765-772.
- Koch G, Petersson LG, Kling E, Kling L: Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries: a three-year clinical study. Swed Dent J 1982;6:233-238.
- Lalumandier JA: The prevalence and risk factors of fluorosis among children in a pediatric practice in Asheville, North Carolina. J Public Health Dent 1990;52:188-189.
- Lima YBO, Cury JA: Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifício. Rev Saúde Pública 2001;35:576-581.

- 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.
- 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.
- Mitropoulos CM, Holloway PJ, Davies TGH, Worthington HV: Relative efficacy of dentifrices containing 250 or 1000 ppm F in preventing dental caries – report of a 32 month clinical trial. *Community Dent Health* 1984;1:193-200.
- Narvai PC: Dental caries and fluoride: a twentieth century relation. *Ciênc Saude Coletiva* 2000;5:381-392. (in Portuguese)
- 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.
- Ögaard B. CaF_2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001;35:40-44.
- Oliveira, R: Modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto utilizando esmalte bovino. [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.
- Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N: Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res* 1988;67:1488-1492.
- Petzold M: The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive *in vitro* study of the CaF_2 precipitation and microstructure. *Caries Res* 2001;35:45-51.

-
- Proskin HM, Chilton NW, Kingman A: Interim report of the ad hoc committee for the consideration of statistical concerns related to the use of intra-oral models in submissions for product claims approval to the American Dental Association. *J Dent Res* 1992;71:949-952
- Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J* 2008;19:21-27.
- 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;69:780-785.
- Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE. Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamel on dentifrice *J Clin Dent* 1999a;10:9-12.
- Schemehorn BR, Orban IC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent* 1999b;10:13-16.
- Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KMRP, Delbem ACB: Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res* 2009;43:302-307.
- 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.
- Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem ACB: In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;43:50-56.
- Tenuta LM, Ribeiro CC, 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.

van Dijk JWE, Borggreven JMPM, Driessens FCM: The effect of fluoride and monofluorophosphate treatment on the electrochemical properties of bovine tooth enamel. Arch Oral Biol 1979; 24:753-758.

Vilorio IL, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Structure and chemical composition of an experimentally formed apical barrier after the application of calcium-glycerophosphate. J Endod 2000;26:605-609.

Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Tatevossian A: Micro-analysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. J Dent Res 1990;69:1316-1323.

Vogel GL, Chow LC, Brown WE: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. Caries Res 1983; 17:23-31.

Vogel GL, Shim D, Schumacher GE, Carey CM, Chow LC, Takagi S: Salivary fluoride from fluoride dentifrices or rinses after use of a calcium pre-rinse or calcium dentifrice. Carie Res 2006;40:449-454.

Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H: Micro-sampling by abrasion. Caries Res 1985;19:97-102.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. Caries Res 2002;36:256-265.

Zaze ACSF, Delbem ACB, Dias AP, Sasaki KT: Efeito da incorporação de cálcio e fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie. [abstract PAc 172]. Braz Oral Res 2008;22. 220.

4. Ação do glicerofosfato de cálcio sobre a hidroxiapatita (HA) durante ciclagem de pH: análise pela espectrometria de infravermelho e bioquímica. *

4.1 Resumo

Estudos têm mostrado que fosfatos e cálcio têm ação na desmineralização do esmalte dentário principalmente quando associados ao fluoreto, porém o mecanismo é incerto. O objetivo do presente trabalho foi analisar a ação do glicerofosfato de cálcio (CaGP) sobre a hidroxiapatita (HA) preparada pelo método de precipitação quando submetida à ciclagem de pH. O processo de ciclagem de pH foi repetido 3 vezes, à temperatura de 37° C e a maturação dos precipitados foi realizada durante 24 horas na mesma temperatura. O precipitado foi seco a 70° C por 24 h, triturado em um pó fino (53 µm) e caracterizado pela Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) e análise de fluoreto, cálcio e fósforo. Estrutura molecular e relação molar Ca/P mostram HA mais estável e menos solúvel nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g e CaGP 0,25%, bem como maior formação de fluoreto de cálcio.

* Capítulo escrito de acordo com as instruções aos autores do periódico Journal of Materials Science: Materials in Medicine (Anexo O)

4.2 Introdução

Tecidos calcificados como o osso e o esmalte são considerados biológica e quimicamente uma combinação de hidroxiapatita (HA), nano cristais de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ e colágeno tipo I [1].

Os fosfatos de cálcio sintéticos e naturais são amplamente empregados na medicina e na odontologia para a reparação de perdas de tecidos ósseos devido à sua alta compatibilidade. Dentre estes fosfatos, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – HA) possui grande importância, pois é o que apresenta maior estabilidade termodinâmica próxima da temperatura ambiente [2]. Um grande número de técnicas está sendo desenvolvido para a síntese do pó de HA devido às crescentes aplicações [3]. Um dos métodos mais utilizados é a técnica da precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução.

A cárie dentária é, ao nível de estrutura dura, a simples dissolução do esmalte dentário na saliva. O componente estrutural inorgânico do esmalte, o qual constitui 95 por cento de seu peso, é predominantemente hidroxiapatita. Portanto, manter este componente na estrutura dental, diminuindo sua dissolução, seria uma das formas eficazes de diminuir a cárie dentária. O uso de produtos fluoretados tem sido apontado como o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie [4,5] bem como do aumento na incidência da fluorose [6,7]. Portanto torna-se necessário o desenvolvimento de novas diretrizes para a promoção da saúde bucal e o reparo das lesões cariosas, sem causar danos adicionais aos indivíduos.

Alguns trabalhos têm demonstrado que sais de fosfato tem ação anticariogênica. A suplementação com sais de fosfato teve início através da adição em dietas e gomas de mascar [8,9]. Dentre os vários sais de fosfato com atividade anticariogênica [3,10-12], o Glicerofosfato de Cálcio (CaGP) mostrou resultados satisfatórios [13].

O modo de ação do CaGP não está completamente definido, entretanto acredita-se que exerça ação direta sobre o esmalte dentário, pois o composto apresenta ação protetora no processo des-remineralização. Quando associado ao flúor, ambos apresentam ação mais potente do que quando verificados isoladamente

[14]. Lynch e ten Cate [15] mostraram uma diminuição na desmineralização do esmalte principalmente quando o glicerofosfato de cálcio (GPCa) foi aplicado antes do desafio cariogênico, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%.

A adição de 0,25% de CaGP a dentifrícios fluoretados de baixa concentração de fluoreto (500 µg F/g) tem demonstrado ação anticariogênica semelhante a um dentifrício padrão de 1100 µg F/g [16]. Em estudo posterior, observa-se que esta associação aumenta a incorporação de fluoreto presente no esmalte dentário, apresentando resultados semelhantes ao dentifrício padrão. Porém quando a concentração de CaGP nos dentifrícios é superior à 0,5%, nota-se uma redução, tanto na presença de F incorporado como na dureza de superfície. A concentração de 0,25% CaGP associada à (500 µg F/g) apresentou o dobro de F incorporado ao esmalte quando comparada à de 2% na mesma associação *.

O desenvolvimento de dentifrícios com baixa concentração de fluoreto tem impacto direto na redução da toxicidade crônica (fluorose dentária), que causa uma redução na mineralização do esmalte/dentina de dentes permanentes durante sua mineralização [6].

Como o mecanismo de ação do CaGP adicionado ao dentifrício sobre o esmalte dentário ainda não está bem esclarecido, a análise do efeito do CaGP sobre a HA seria importante para verificar as alterações que podem ocorrer na combinação dos dois elementos e o efeito do CaGP sobre a deposição de fluoreto de cálcio e fluorapatita.

4.3 Objetivo

A proposição do presente trabalho foi analisar a ação do Glicerofosfato de cálcio (CaGP) sobre a hidroxiapatita (HA) preparada pelo método de precipitação, quando submetida a ciclagem de pH por meio da análise de espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e dosagem de fluoreto, cálcio e fósforo presentes na HA.

4.4 Material e Métodos

Síntese da hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita foi realizada baseando-se nos estudos de Qu e Wei [17] e Rintoul e colaboradores [18]. Para isto, soluções de nitrato de cálcio

[Ca(NO₃)₂.H₂O, Sigma-Aldrich Co., USA] 1 mol L⁻¹ (300 mL) e de fosfato de amônio dibásico [(NH₄)₂HPO₄, Sigma-Aldrich Co., USA] 0,3 mol L⁻¹ (600 mL) foram preparadas. O pH de ambas as soluções foi ajustado entre 10-12 utilizando hidróxido de amônio (29,5%). A solução de fosfato de amônio dibásico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio lentamente (2 a 5 mL/minuto), sob agitação constante e a uma temperatura de 37° C, para facilitar a precipitação de HA bem cristalizadas. A maturação dos precipitados foi realizada durante 7 dias a temperatura de 37° C, mantendo o pH da solução ao redor de 10, em becker, para o crescimento dos cristais e a formação única de fase Hidroxiapatita. O precipitado foi separado por filtração utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mm Hg), lavado repetidamente com água deionizada (250 mL/0,5 g de HA) e seco em estufa por 24 horas a 70° C. Decorrida esta fase, o precipitado foi triturado utilizando um almofariz de ágata. Grãos com 53 µm de diâmetro foram selecionados utilizando peneiras granulométricas (HAsintética).

Ciclagem de pH e tratamento

Soluções (100 mL) de Glicerofosfato de Cálcio (C₃H₇O₆PCa, Sigma-Aldrich Co., USA) nas concentrações de 0,25% (CaGP 0,25%) e 2% (CaGP 2%) [16] foram preparadas associadas ou não ao fluoreto de sódio de 500 µg/mL (500 CaGP 0,25% e 500 CaGP 2%), bem como 500 µg/mL do fluoreto de sódio isoladamente (500). Uma solução com 1100 µg F/g (NaF, Merck, Alemanha) foi utilizada como controle positivo (1100). O pó da hidroxiapatita (0,5 g) produzido foi suspenso nas soluções experimentais preparadas, em quintuplicata, durante 1 hora mantendo pH 7,0. Cinco alíquotas de hidroxiapatita também foram suspensas em água destilada/ deionizada, sendo consideradas como controle negativo (HAdesm).

Após este período, o pH das soluções foi reduzido lentamente até 4 utilizando ácido nítrico (HNO₃, Merck, Alemanha) 1 mol L⁻¹. Decorrido 30 minutos, o pH de cada solução foi elevado para 7 adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH, Merck, Alemanha) 1 mol L⁻¹. O processo de ciclagem de pH foi repetido 3 vezes, à temperatura de 37° C [17,18]. A maturação dos precipitados foi realizada durante 24 horas à temperatura de 37° C. Após a ciclagem de pH, o precipitado foi filtrado utilizando funil de Büchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mm Hg) e lavado subsequentemente cinco vezes com água deionizada para eliminar resíduos

remanescentes de sódio na solução [19]. O precipitado foi seco em estufa por 24 horas a 70° C, triturado utilizando almofariz de ágata e os grãos com 53 µm de diâmetro foram selecionados utilizando peneiras granulométricas, para análise de espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e determinação de fluoreto, cálcio e fósforo nos pós de hidroxiapatita.

Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras da hidroxiapatita obtida foram preparadas e acondicionadas em porta amostra para a análise de FTIR. Os espectros das amostras foram obtidos por meio de refletância difusa, em um espectrofotômetro Marca Nicolet, modelo Magna 760, modelo NEXUS 670, na região espectral entre 4500 a 450 cm⁻¹, usando 128 varreduras e uma resolução de 2 cm⁻¹.

Análise de Fluoreto , Cálcio e Fósforo na Hidroxiapatita

Para análise do fluoreto de cálcio (CaF₂)- flúor fracamente ligado, 5 mg de pó de hidroxiapatita ciclado foram pesados em microtubos de polipropileno (microtubo graduado 1,5 ml, Axygen, C.A, USA) e acrescentou-se 0,5 mL de KOH 1,0 mol L⁻¹ para extração do CaF₂, seguindo o método de Caslavská et al. [20]. Após 24 horas de agitação (Mesa Agitadora Orbital, TE-141, Tecnal), a suspensão foi centrifugada a 2900 g por 20 minutos. Uma alíquota de 0,4 mL do sobrenadante foi neutralizada com 0,4 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹ e o fluoreto foi determinado.

Para dosagem de fluoreto utilizou-se o eletrodo específico (Orion 9409) e eletrodo de referência invertido (Orion 900100) acoplado a um analisador de íons (Orion 720A⁺). O eletrodo foi previamente calibrado com padrões contendo 0,045 a 0,720 µg F/mL, nas mesmas condições das amostras. Foram pipetadas alíquotas de 40 µL da amostra, bem como o mesmo volume de TISAB II (tampão ajustador de força iônica, pH 5,0); as leituras foram realizadas em duplicata.

Em seguida, o restante do sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 3 vezes em água destilada/deionizada e uma vez em metanol para a mensuração do flúor fortemente ligado (FA), Ca e P. Após evaporação do metanol, 0,5 mL de solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ foi adicionada ao microtubo, agitado durante 1

hora e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL NaOH 1,0 mol L⁻¹. As concentrações de F, foram realizadas conforme descrito anteriormente.

A concentração de cálcio foi analisada por método colorimétrico (espectrofotômetro – HITACHI U-2000) por meio da adaptação do método descrito por Vogel et al. [21]. Para calibração, utilizou-se padrões contendo 40 a 200 µg Ca/mL. As amostras foram diluídas 20 vezes utilizando-se uma alíquota de 0,05 mL acrescida de 0,95 mL de água deionizada. Foi utilizada uma alíquota de 3 µL, em duplicata, tanto para os padrões como para as amostras. O fósforo foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow [22].

Análise dos resultados

Os dados da espectrometria no infravermelho foram descritos em função da presença e intensidade (%) das bandas de acordo com os grupos submetidos à ciclagem de pH em relação à hidroxiapatita sem tratamento (HA_{desm}). Os resultados da concentração (mg/g) de fluoreto (CaF₂ e FA), cálcio e fósforo na hidroxiapatita foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Os dados de cálcio apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Os resultados de fluoreto e fósforo foram submetidos à análise paramétrica, como descrita anteriormente, após transformação logarítmica. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GMC versão 2003 [23] com limite de significância de 5%.

4.5 Resultados

As bandas características da hidroxiapatita (HA) correspondente aos grupos funcionais dos fosfatos (PO₄³⁻), hidroxilas (OH⁻) e H₂O foram observadas confirmando a obtenção da fase. O grupo fosfato apresentou 2 bandas: uma nas regiões de 1086-1090 (estiramento simétrico–ν₁) e 1173-1188 cm⁻¹ (estiramento assimétrico–ν₃) e outra nas regiões de 582-598 (vibração angular–ν₂), e 623-631 cm⁻¹

¹ (vibração angular- ν_4). As bandas da hidroxila foram observadas nas regiões de 631-644 e 3570-3572 cm^{-1} [19,25-27]. (Figura 1)

O tratamento com fluoreto (500 e 1100) produziu um aumento nas bandas de fosfatos com maior intensidade para as amostras do grupo de 1100 (Tabela 1). O uso do CaGP promoveu uma redução das bandas de fosfatos em relação a hidroxiapatita sem tratamento, sendo mais acentuado para o grupo com CaGP 2% (Tabela 1). Quando o fluoreto (500) foi associado ao CaGP 0,25% ocorreu um aumento na intensidade destas bandas e, quando misturado ao CaGP 2%, uma redução (Tabela 1). A banda da hidroxila na região de 3570-3572 cm^{-1} esteve ausente nos grupos com CaGP, independente da presença de fluoreto ou da concentração, exceto para o grupo 500 CaGP 0,25% que apresentou uma redução em relação a hidroxiapatita ao redor de 81% próxima à do grupo 1100 (-93%). Todos os grupos apresentaram redução da intensidade da banda OH^- na região de 631-644 cm^{-1} .

O fluoreto 1100 ou a presença de CaGP (0,25 e 2%) reduziram a intensidade das bandas de carbonatos nas regiões de 866-879 cm^{-1} (modo vibracional ν_2) em relação a hidroxiapatita ciclada em intensidade similar. As bandas nas regiões 1421-1425, 1452-1458 e 1641-1660 cm^{-1} refere-se ao modo vibracional ν_3 (estiramento) do grupo carbonato que apresentou maior intensidade na presença de CaGP (Tabela 2). A banda na região de 3361-3412 cm^{-1} corresponde a traços de água na estrutura dos cristais de hidroxiapatita. Sua intensidade diminuiu com os tratamentos de fluoretos, mas foi maior na presença de CaGP (Tabela 2). O grupo 500 CaGP 0,25%, apesar de apresentar um aumento em relação a hidroxiapatita ciclada, apresentou intensidade menor em relação aos outros grupos com CaGP.

As concentrações de fluoreto presentes na hidroxiapatita, fracamente (CaF_2) e fortemente (FA) ligado, foram apresentadas na Tabela 3. Os grupos com fluoretos apresentaram maiores valores de CaF_2 ou FA do que os grupos sem fluoretos ($p < 0,05$). Os grupos 1100 e 500 CaGP 0,25% apresentaram valores de CaF_2 semelhantes ($p > 0,05$) e maiores que o grupo 500 ($p < 0,05$). O grupo 500 CaGP 2% apresentou concentração de CaF_2 igual a do grupo 500 ($p > 0,05$). Os grupos 1100, 500CaGP 0,25% e 500 CaGP 2% apresentaram concentrações de FA maiores que os demais grupos ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença entre o grupo 500 e 500CaGP 0,25% ($p > 0,05$).

Os grupos 500, 1100 e 500 CaGP 0,25% apresentaram concentrações semelhantes de cálcio no cristal ($p > 0,05$) e maiores que os demais grupos ($p < 0,05$). Apesar dos grupos 1100 e 500 CaGP 0,25% apresentarem menores concentrações de fósforo em relação aos outros grupos ($p < 0,05$) estes mostraram melhor relação Ca/P (Tabela 4).

4.6 Discussão

Os achados dos estudos de Zaze ^{*}[16] e Delbem [27] mostram que a adição de CaGP (0,25%) em dentifrícios com reduzida concentração de fluoreto produz um produto com eficácia equivalente a um dentifrício com 1100 µg F/g. Entretanto, para entender como esta associação age na hidroxiapatita analisou-se as alterações moleculares na estrutura do cristal.

De acordo com Antonakosa et al, [26] e Coates [25], o aumento dos modos vibracionais dos fosfatos se mostram mais intensos em apatitas mais mineralizadas. Após o processo de diminuição (dissolução) e aumento de pH (re-precipitação) nas soluções experimentais e hidroxiapatita sintetizada (HA), o espectro do FTIR mostrou que a HA ciclada nas soluções contendo fluoreto (500 e 1100 µg F/g) apresentou um aumento na intensidade das bandas de fosfatos nas regiões entre 582-598 (ν_2), 623-631 (ν_4) e 1086-1090 cm^{-1} (ν_1), sendo maior na concentração de 1100 µg F/g. Entretanto a região entre 1173-1188 cm^{-1} (ν_3) não se alterou (500 µg F/g) e apresentou redução na concentração mais elevada (1100 µg F/g). Estes dados podem ser confirmados pela análise das bandas de carbonatos (Figura 1 e Tabela 2), pois quando estes íons estão presentes na hidroxiapatita, ocupam os sítios dos fosfatos na estrutura do cristal [26,28,29]. Somando-se a isto, houve uma redução da banda OH^- (631-644 e 3570-3572 cm^{-1}) nestes grupos, o que sugere a substituição por fluoreto. A redução destas bandas está relacionada com um aumento do fluoreto e melhor cristalinidade da apatita [30,31]. De acordo com Rintoul et al. [18] e Sundaram et al. [31] a presença da banda OH^- na região de 631-647 cm^{-1} é indicativo de precipitação de hidroxiapatita. Além disso, a redução da intensidade deste pico significa uma ligação do fluoreto à OH^- , sem substituição. A substituição parcial ou completa é observada quando a hidroxiapatita é submetida a altas temperaturas quando ocorre o aparecimento de um pico na região de 745-747

^{*} Zaze ACSF. Efeito da incorporação de cálcio e fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Odontopediatria, 2009, cap. 1.

cm⁻¹ [18,31]. Os dados de dosagem de fluoreto na hidroxiapatita ciclada na presença de fluoreto mostram uma maior formação de fluoreto fracamente ligado (CaF₂) ao cristal (57-60%) quando comparado ao fortemente ligado (40-43%) à estrutura da hidroxiapatita. O aumento de fluoreto de 500 para 1100 µg F/g produziu uma deposição 25% maior de CaF₂ adsorvido a hidroxiapatita (Tabela 3) e estrutura com maior cristalinidade (Figura 1 e Tabelas 1, 2 e 4).

O tratamento com glicerofosfato de cálcio (CaGP) poderia aumentar a saturação em meio ácido com cálcio (Ca) e fósforo (P) [32,33], aumentando a possibilidade da precipitação de uma hidroxiapatita mais cristalina. Entretanto, todas as bandas de fosfatos mostraram redução (Figura 1 e Tabela 1) quando a hidroxiapatita sintetizada (HAsintética) foi diluída em solução com CaGP 0,25 e 2% e submetida à ciclagem de pH. Observou-se, também, a presença dos modos de vibração ν_1 e ν_3 do carbonato [29,34], mas apresentando uma menor intensidade em relação à HAdesm. Apesar da ausência de fluoreto nestes grupos (Tabela 3), o modo vibracional da hidroxila na região de 3570-3572 cm⁻¹ foi ausente, o que pode indicar uma substituição desta banda por carbonato [30,35], pois na região de 631-644 cm⁻¹ a banda está presente, apesar de demonstrar uma redução da intensidade em relação à HAdesm [18,31]. O pico na região 1641-1660 cm⁻¹ aumentou com o uso do CaGP na solução (Figura 1 e Tabela 2) o que poderia explicar estes resultados. A redução da intensidade das bandas de fosfato, ausência da hidroxila (3570-3572 cm⁻¹) e presença de carbonato pode representar um fosfato de cálcio com baixa cristalinidade e mais solúvel em meio ácido. Nos grupos HAdesm, 500 CaGP 2% e CaGP 2% as concentrações de cálcio foram similares, porém menores do que nos demais grupos (Tabela 4; p<0,05). O aumento de carbonatos na estrutura da hidroxiapatita está relacionado com a liberação de íons Ca do cristal. A presença ou aumento de carbonato provoca um déficit de carga negativa, que é compensado pela liberação de íons cálcio, a fim de equilibrar as cargas da estrutura da hidroxiapatita [35]. Além disso, há um aumento da quantidade de água na estrutura em relação a HAdesm, 500 e 1100 µg F/g (Figura 1 e Tabela 2).

A associação do fluoreto (500 µg F/g) ao CaGP 2%, interferiu nos modos vibracionais dos fosfatos, porém há um aumento da banda do carbonato (ν_3) entre as regiões 1421-1660 cm⁻¹. Uma maior incorporação de carbonato à estrutura da hidroxiapatita resultou em uma menor quantidade de cálcio e fósforo em relação à

HAdesm, 500 e 1100 µg F/g e 500 CaGP 0,25% (Tabela 4; $p < 0,05$). A presença de fluoreto não diminuiu estas perdas, apesar de mostrar um aumento na forma fortemente ligado à estrutura da hidroxiapatita (Tabela 3). Com o aumento da banda de água, ausência da banda da hidroxila na região de 3570-3572 cm^{-1} , mas presente na região de 631-644 cm^{-1} e aumento de carbonato à estrutura, supõe-se que o fluoreto deve estar apenas adsorvido ao cristal [18,31].

A menor concentração de CaGP (0,25%) associado a 500 µg F/g melhorou a relação molar Ca/P da hidroxiapatita (1,69) com concentração de cálcio semelhante aos grupos 500 e 1100 µg F/g (Tabela 4). Há uma presença maior de fluoreto fracamente ligado à hidroxiapatita (CaF_2), semelhante ao grupo 1100 µg F/g o que está relacionado a uma apatita mais estável em meio ácido [36]. A concentração de fluoreto fortemente ligado à estrutura do cristal não se alterou quando comparado ao grupo 500 µg F/g (Tabela 3; $p > 0,05$). A análise de FTIR mostra um aumento dos modos vibracionais do fosfato ν_2 e ν_3 e a presença das bandas da hidroxila nas regiões de 631-644 e 3570-3572 cm^{-1} (Figura 1 e Tabela 1). A redução das bandas de OH^- confirma a presença de fluoreto ligado à estrutura dos cristais, porém não há a substituição da hidroxila [18,31], já que não se observou um pico na região de 745-747 cm^{-1} [31]. A presença pouco intensa do pico na região 1641-1660 cm^{-1} , referente ao modo ν_3 do carbonato confirma estes achados [29,34].

Parece que os bons resultados observados nos estudos de Zaze e colaboradores* [16] e Delbem [27] estão relacionados à formação de fluoreto de cálcio adsorvido à estrutura da hidroxiapatita, pois foi semelhante ao grupo 1100 µg F/g (Tabela 3). Somando-se a isto, a estrutura molecular (Figura 1, Tabelas 1 e 2) e a relação molar Ca/P (Tabela 4) mostram uma hidroxiapatita mais estável e menos solúvel no grupo 500 CaGP 0,25%, quando comparado ao HAdesm.

Conclui-se que os grupos com CaGP (0,25% e 2%) apresentaram estrutura molecular com baixa cristalinidade e maior solubilidade, com concentração de Ca reduzida. Estrutura molecular e relação molar Ca/P mostram HA mais estável e menos solúvel nos grupos 1100 µg F/g e 500 µg F/g e CaGP 0,25%, bem como maior formação de fluoreto de cálcio (CaF_2).

*Zaze ACSF. Efeito da incorporação de cálcio e fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Odontopediatria, 2009, cap. 1.

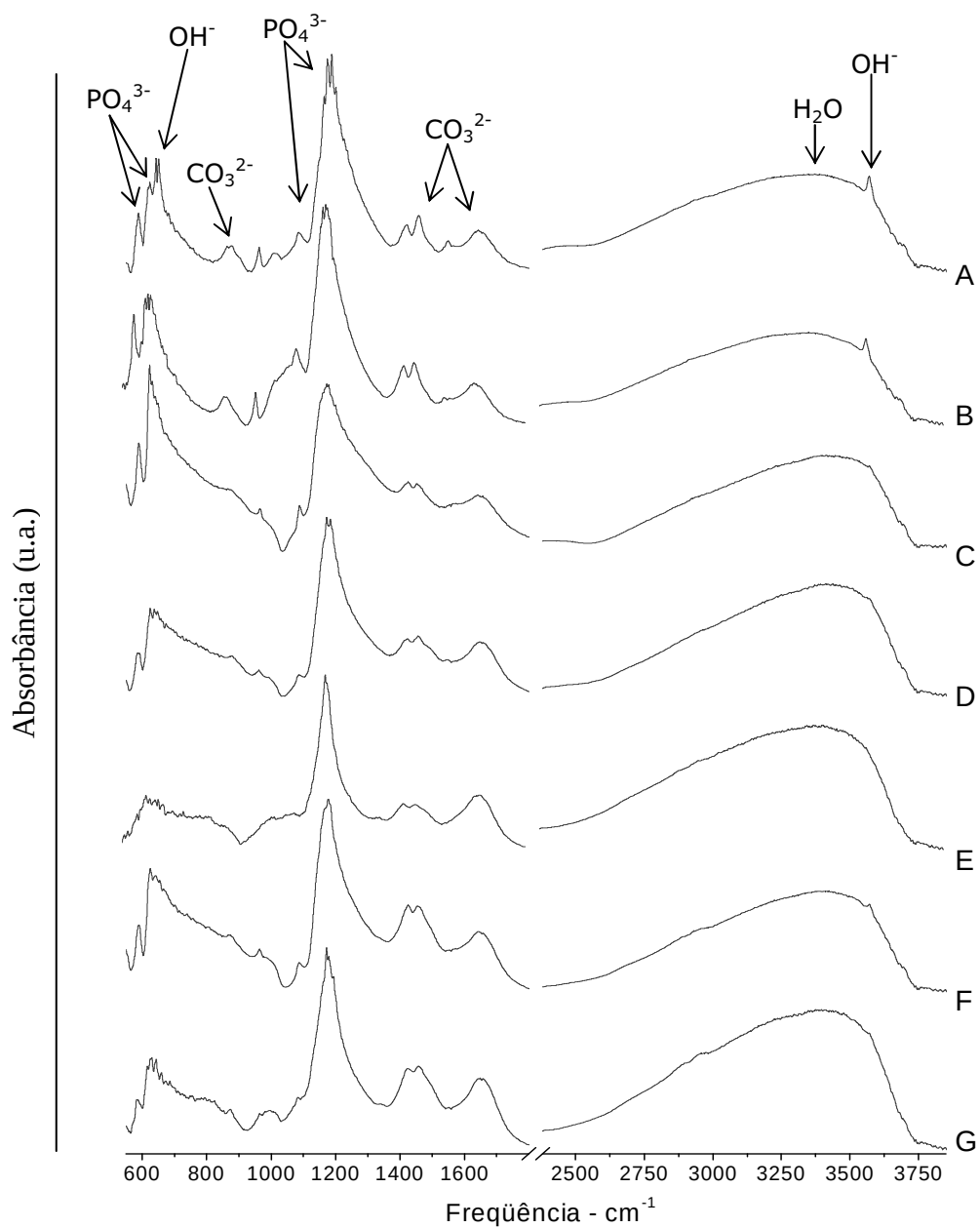


Fig. 1 - Representação gráfica do espectro no infravermelho modificada de Fourier de acordo com os grupos após ciclagem de pH. A: HAdesm. B: 500. C: 1100. D: CaGP 0,25%. E: CaGP 2%. F: 500 CaGP 0,25%. G: 500 CaGP 2%.

Tabela 1 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos e hidroxila em relação à hidroxiapatita submetida a ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm)

Grupos*	Frequência (cm ⁻¹) das bandas					
	582-598	623-625	631-644	1086-1090	1173-1188	3570-3572
	(PO ₄ ³⁻ - v ₂)	(PO ₄ ³⁻ - v ₄)	OH ⁻	(PO ₄ ³⁻ - v ₁)	(PO ₄ ³⁻ - v ₃)	OH ⁻
500	+82	+40	-17	+22	0	-25
1100	+73	+104	-82	+69	-25	-93
CaGP 0,25%	-14	+7	-58	-21	-16	ausente
CaGP 2%	-37	-38	-80	-76	-20	ausente
500 CaGP 0,25%	+16	+40	-77	-9	-12	-81
500 CaGP 2%	-15	+1	-42	-12	-8	Ausente

Tabela 2 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos e água em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm)

Grupos	Frequência (cm ⁻¹) das bandas				
	866-879	1421-1425	1452-1458	1641-1660	3361-3415
	(CO ₃ ²⁻ - v ₂)		(CO ₃ ²⁻ - v ₃)		(H ₂ O)
500	-12	+45	+15	-3	-5
1100	-93	-53	-72	-44	-3
CaGP 0,25%	-89	-23	-36	+28	+22
CaGP 2%	Ausente	-23	-49	+73	+27
500 CaGP 0,25%	-87	+69	+19	+7	+6
500 CaGP 2%	-71	+75	+33	+92	+41

Tabela 3 – Valores médios ($\pm dp$, $n=5$) das concentrações (mg/g) de fluoreto ligado fracamente (CaF_2) e fortemente a hidroxiapatita (FA) de acordo com os grupos

Grupos	Análise – Fluoreto (mg/g)	
	CaF_2	FA
HAdesm	$0,004 \pm 0,001^a$	$0,001 \pm 0,000^a$
500	$9,01 \pm 0,70^b$	$6,11 \pm 0,97^b$
1100	$12,52 \pm 0,72^c$	$8,56 \pm 0,63^c$
CaGP 0.25%	$0,004 \pm 0,001^a$	$0,008 \pm 0,002^d$
CaGP 2%	$0,002 \pm 0,000^d$	$0,022 \pm 0,003^e$
500 CaGP 0.25%	$11,30 \pm 0,48^c$	$7,73 \pm 0,69^{cb}$
500 CaGP 2%	$7,70 \pm 0,60^b$	$8,31 \pm 0,39^c$

Valores seguidos por letras distintas em cada análise mostram diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA: CaF_2 – $p < 0,001$; FA – $p < 0,001$).

Tabela 4 – Valores médios ($\pm dp$, $n=5$) das concentrações (mg/g) de cálcio (Ca) e fósforo (P) e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos

Grupos	Análise – Cálcio e Fósforo (mg/g)		Ca/P molar
	Ca	P	
HAdesm	$252,0 \pm 25,4^a$	$170,6 \pm 22,7^{a,d}$	1.15
500	$329,6 \pm 19,0^b$	$178,7 \pm 5,6^a$	1.43
1100	$321,4 \pm 40,3^{b,c}$	$140,9 \pm 9,2^b$	1.77
CaGP 0.25%	$296,7 \pm 21,8^c$	$159,7 \pm 11,1^{b,a}$	1.41
CaGP 2%	$221,5 \pm 22,4^a$	$120,8 \pm 8,1^c$	1.44
500 CaGP 0.25%	$319,7 \pm 9,5^b$	$151,4 \pm 6,6^{d,b}$	1.69
500 CaGP 2%	$224,2 \pm 33,5^a$	$117,1 \pm 5,9^c$	1.47

Valores seguidos por letras distintas em cada análise mostram diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA: cálcio – $p < 0,001$; fósforo – $p < 0,001$).

4.7 Referências

1. Brown WB, Smith JP, Lehr JR, Frazier AW. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962;196:1048–55.
2. Andrade MC, Filgueiras MRT, Ogasawara TJ. Nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium pretreated in NaOH solution: experiments and thermodynamic explanation. *Biomed Mater Res* 1999;46:441-6.
3. Gonzales M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *J Dent Res* 1971; 50:1056-64.
4. 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;15:167-74.
5. 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;38:542-50.
6. Mascarenhas AK. Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000;22:269-77.
7. 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 results. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32:47-53.
8. Larson RH, Spalter CD, Clemmer BA, Scherp HW. Continuous versus intermittent feedings of different levels of trimetaphosphate in relation to caries development in the rat. *Arch Oral Biol* 1972; 17:1537-41.

9. Vogel GL, Zhang Z; Carey CM, Ly A, Chow LC, Proskin HM. Composition of plaque and saliva following use of an α -tricalcium-phosphate-containing chewing gum and a subsequent challenge. *J Dent Res* 2000;79:58-62.
10. Harris RS, Nizel AE, Walsh BN. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 1967;46:290-4.
11. Gonzalez M, Jeansonne BG, Feagin FF. Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. *J Dent Res* 1973; 52:261-6.
12. Ständtler P, Müller-Bruckschwaiger K, Schäfer F, Huntington E. The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res* 1996; 30:418-22.
13. Winter GB, Holt RD, Williams BF. Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. *Int Dent J* 1989; 39:227-35.
14. Lynch RJ: Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J* 2004;54:310-4.
15. Lynch RJ, Ten Cate JM. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res* 2006;40:142-7.
16. Zaze ACSF, Delbem ACB, Dias AP, Sassaki KT. Efeito da incorporação de cálcio e fosfato em dentifrícios fluoretados na eficácia anticárie [abstract PAc172]. *Braz Oral Res* 2008;22:220.
17. Qu H, Wei M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:129-33.
18. Rintoul L, Wentrup-Byrne E, Suzuki S, Grondahl L. FT-IR spectroscopy of fluoro-substituted hydroxyapatite: strengths and limitations. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:1701–9.

-
19. Wei M, Evans JH, Bostrom T, Gröndahl L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:311-20.
 20. Caslavská V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 1975; 20:333-9.
 21. Vogel GL, Chow LC, Brown WE: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983; 17:23-31.
 22. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
 23. Campos GM: GMC 2003 (computer program). Ribeirão Preto, School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.
 24. Rehman I, Bonfield W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:1-4.
 25. Coates J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers RA. *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester; New York: John Wiley & Sons Ltd, , 2000. pp. 10815-37.
 26. Antonakosa A, Liarokapisa E, Leventouri T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 2007;28:3043–54.
 27. Delbem ACB. O efeito dos dentifrícios de baixa concentração de flúor suplementado com cálcio na desmineralização e sobre o biofilme dental *in situ*. Relatório Científico Final – FAPESP, Processo 2007/05915-6, 2008.

28. Vignoles M, Bonel G, Holcomb DW, Young RA. Influence of preparation conditions on the composition of type-B carbonated hydroxyapatite and on the localization of the carbonate ions. *Calcif Tissue Int* 1988;43:33–40.
29. Gibson IR, Rehman I, Best SM, Bonfield W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:533-9.
30. Jha LJ, Best SM, Knowles JC, Rehman I, Santos JD, Bonfield W. Preparation and characterization of fluoride-substituted apatites. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8: 185–91.
31. Sundaram CS, Viswanathan N, Meenakshi S. Defluoridation chemistry of synthetic hydroxyapatite at nano scale: equilibrium and kinetic studies. *J Hazard Mater* 2008;155: 206–15.
32. Imai M, Hayashi Y. Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium-beta-glycerophosphate (Ca-BGP). *J Oral Pathol Med* 1993;22:411-7.
33. Viloria IL, Yanagiguchi K, Hayashi Y. structure and chemical composition of an experimentally formed apical barrier after the application of calcium-glycerophosphate. *J Endod* 2000;26:605-9.
34. Barinov SM, Rau JV, Cesaro SN, Durisin J, Fadeeva IV, Ferro D, Medvecky L, Trionfetti G. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range. *J Mater Sci: Mater Med* 2006;17:597–604.
35. Wopenka B, Pasteris JD. A Mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Eng* 2005;25:131-43.
36. Ögaard B. CaF_2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001;35:40-4.

ANEXO A**LISTA DE REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL**

- 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;41:263-267.
- Beltrán ED, Spuznar SM: Fluoride in toothpastes for children: suggestion for change. *Pediat Dent* 1988;10:185-188.
- 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]. Araçatuba: Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”;2003.
- 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 FL, Delbem ACB, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT: In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 2006;40:239-244.
- Bowen WH: The cariostatic effect of calcium glycerophosphate in monkeys. *Caries Res* 1972;6:43-51.
- Brook AH, Gawthorpe J, Winter GB: Calcium glycerophosphate and dental plaque. *Caries Res* 1975;9:156-162.
- Buzalaf MA, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F: Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. *ASDC J Dent Child* 2001;68:37-41
- 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;32:47-53.

Cury JA: Fluoride dentifrices in Brazil. RGO 1989;37:139-142. (in Portuguese)

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.

Cury JA, Francisco SB, Simões 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.

Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CP: Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on *in situ* enamel remineralization. Caries Res 2005;39:255-257.

Duckworth RM: The science behind caries prevention. Int Dental J 1993;43:529-539.

Duke SA, Rees DA, Forward GC: Increased plaque calcium and phosphorus concentrations after using calcium carbonate toothpaste containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate. Caries Res 1979;13:57-59.

Ericsson Y, Forsman B: Fluoride retained from mouth-rinses and dentifrices in pre-school children. Caries Res 1969;3:290-299.

Friberger P: The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel. Scand J Dent Res 1975; 83:339-344.

Gaffar A, Blake-Haskins J, Mellberg J: *In vivo* studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. Int Dent J 1993;43:81-88.

Gonzales M: Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. J Dent Res 1971;50:1056- 1064.

Grenby TH, Bull JM: Chemical studies of the protective action of phosphate compounds against the demineralization of human dental enamel *in vitro*. Caries Res 1980;14:210-220.

- Grenby TH, Bull JM: Protection against dental caries in rats by glycerophosphates or calcium salts or mixtures of both. *Arch Oral Biol* 1975;20:717-724.
- Hamilton J: New CDC report offers fluoride use tips. *J Calif Dent Assoc* 2001;29:723-724.
- Hicks MJ, Flaitz CM: Enamel caries formation and lesion progression with a fluoride dentifrice and a calcium-phosphate containing fluoride dentifrice: a polarized light microscopic study. *ASDC J Dent Child*. 2000;67:21-28.
- Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C: Biological factors in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 3). *J Clin Pediatr Dent* 2004;28:203-214.
- Horowitz HS: The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentration for preschool-aged children. *J Public Health Dent* 1992;52:216-221.
- Johnson MF: Comparative efficacy of NaF and SMFP dentifrices in caries prevention: a meta-analytic overview. *Caries Res* 1993;27:328-336.
- 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.
- Kasket S: Historical review of remineralization research. *J Clin Dent* 1999; 10:56-64.
- 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. *Arch Oral Biol* 1997; 42:521-525.
- Kloet HJ, Exterkate RAM, Rempt HE, Ten Cate JM: *In vivo* bovine enamel remineralization and fluoride uptake from two dentifrices containing different fluoride concentration. *J Dent Res* 1986;65:1410-1414.
- Koch G, Petersson L-G, Kling E, Kling L: Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries: a three-year clinical study. *Swed Dent J* 1982;6:233-238.

- Koo RH, Cury JA: Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent* 1998;11:173-176.
- Lalumandier JA: The prevalence and risk factors of fluorosis among children in a pediatric practice in Asheville, North Carolina. *J Public Health Dent* 1990;52:188-189.
- LeGeros RZ, Bleiwas CB, Retino M, Rohanizadeh R, LeGeros JP: Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation. *Am J Dent* 1999;12:65-71.
- Lima YBO, Cury JA: Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. *Rev Saúde Pública* 2001;35:576-581.
- Lynch RJ, Ten Cate JM: Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res* 2006;40:142-147.
- Mainwaring PJ, Naylor MN: A four-year clinical study to determine the caries-inhibiting effect of calcium glycerophosphate and sodium fluoride in calcium carbonate base dentifrices containing sodium monofluorophosphate. *Caries Res* 1983;17:267-276.
- Mascarenhas AK: Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000;22:269-277.
- Mascarenhas AK, Burt BA: Fluorosis risk from early exposure to fluoride toothpaste. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26:241-248.
- Mitropoulos CM, Holloway PJ, Davies TGH, Worthington HV: Relative efficacy of dentifrices containing 250 or 1000 ppm F in preventing dental caries – report of a 32 month clinical trial. *Community Dent Health* 1984;1:193-200.
- Moreno EC: Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. *Int Dent J* 1993;43:71-80.

-
- Narvai PC: Dental caries and fluoride: a twentieth century relation. *Ciênc Saúde Coletiva* 2000;5:381-392. (in Portuguese)
- 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.
- Newbrum E: Current regulations and recommendations concerning water fluoridation, fluoride supplements, and topical fluoride agents. *J Dent Res* 1992;71:1255-1265.
- Ögaard B: CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001;35:40-44.
- Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N: Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res* 1988;67:1488-1492.
- 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;14:384-387.
- Pendrys DG, Stamm JW: Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. *J Dent Res* 1990;69:529-538.
- Petersson LG, Lodding A, Hakeberg M, Koch G: Fluoride profiles in human enamel after *in vitro* treatment with dentifrices of different compositions and acidities. *Swed Dent J* 1989;13:177-183.
- Reed MW: Clinical evaluation of three concentrations of sodium fluoride in dentifrices. *J Am Dent Assoc* 1973;87:1401-1403.
- 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;69:780-785.
- Rolla G, Bowen WH: Concentration of fluoride in plaque, a possible mechanism. *Scand J Dent Res* 1977;85:149-151.

- Rolla G: Effects of fluoride on initiation of plaque formation. *Caries Res* 1977;11:243-261.
- Schamschula RG, Bunzel M, Agus HM, Adkins BL, Barmes DE, Charlton G: Plaque minerals and caries experience: associations and interrelations. *J Dent Res* 1978; 57: 427-432.
- Saxegaard E, Rolla G: Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res* 1988;96:523-535.
- Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE: Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamel on dentifrice *J Clin Dent* 1999a;10:9-12.
- Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE: Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent* 1999b;10:13-16.
- 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.
- 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.
- Tanaka M, Kadoma Y: Comparative reduction of enamel demineralization by calcium and phosphate in vitro. *Caries Res* 2000;34:241-245.
- Vogel GL, Shim D, Schumacher GE, Carey CM, Chow LC, Takagi S: Salivary fluoride from fluoride dentifrices or rinses after use of a calcium pre-rinse or calcium dentifrice. *Carie Res* 2006;40:449-454.
- Warren JJ, Levy SM: A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. *Pediatr Dent* 1999;21:265-271.

Winter GB, Holt RD, Willians BF: Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. *Int Dent J* 1989;39:227-235.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* 2002;36:256-265.

ANEXO B

INSTRUÇÕES AOS AUTORES – CAPÍTULOS 1 e 2

Caries Research

Aims and Scope

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

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

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

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

Conditions

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

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

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

Types of Papers

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

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

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

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



Preparation of Manuscripts

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must

be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

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

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

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

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

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

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

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

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

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

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

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 760.00 per page.

References

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

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

should be explained in the covering letter accompanying the paper.

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

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

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

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

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

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

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

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

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

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

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

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

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

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 <http://www.doi.org/>

Author's Choice™

With this option the author can choose to make his article freely available online against a one-time fee of CHF 2,750.00. This fee is independent of any standard charges for supplementary pages, color images etc. which may apply. More information can be found at <http://content.karger.com/services/choice.asp>.

Does your funding agency/institute require you to deposit your article in an institutional archive (e.g. PubMedCentral)? You will be pleased to hear that Karger journals are fully geared up for this requirement. All you have to do is opt for open access publication of your article through Karger's Author's Choice™. Karger will also take care of the immediate deposit in the PubMedCentral archive and what's more, not of the manuscript, but of the final, published article. The article will also be available with open access right away, and not just after 12 months. The cost of Author's Choice™ is a permissible cost in your grant, so please take care to budget for it.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.



Reprints

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

ANEXO C
COMITÊ DE ÉTICA – CAPÍTULO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFETIVIDADE DE DENTIFRÍCIO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADO COM CÁLCIO E FOSFATO UTILIZANDO DENTE BOVINO E MODELO DE CICLAGEM DE pH" sob responsabilidade de KIKUE TAKEBAYASHI SASSAKI , ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM e ANA CAROLINA SOARES FRAGA ZAZE está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA em 10 de julho de 2006, de acordo com o protocolo nº 61/06.

Araçatuba, 10 de julho de 2006.


Prof.^a Ass. Dr.^a Maria Gisela Laranjeira
Presidente

ANEXO D

COMITÊ DE ÉTICA – CAPÍTULO 2



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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – (CEP)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"AVALIAÇÃO DE DENTIFRÍCIO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADO COM GLICERIFOSFATO DE CÁLCIO NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CARIE in situ"*, sob a responsabilidade de ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em reunião realizada em 12/02/09, de acordo com o Processo FOA-2835/08.

Araçatuba, 13 de fevereiro de 2009.

Alessandra Marcondes Aranega
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

mssps.

ANEXO E

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO (4X4mm)



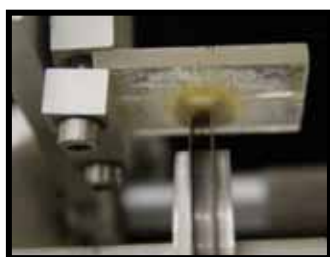
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz por meio de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



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 4 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 F**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.

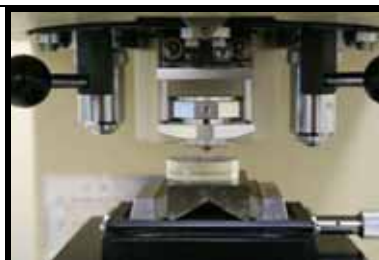
ANEXO G

ANÁLISE DA DUREZA DO ESMALTE



1. 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).

2. 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.



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



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

ANEXO H**DUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL**



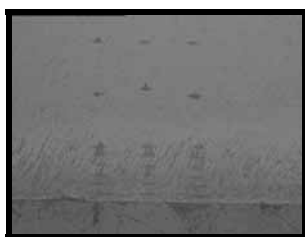
1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 gramas de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, USA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 minutos e mais 7 minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição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



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



3. Microdurômetro 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).



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 minutos – 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.

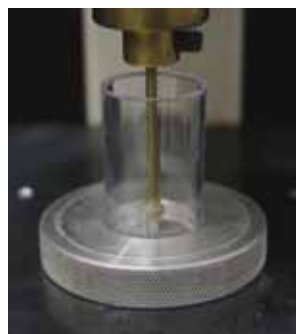
ANEXO I

ANÁLISE DOS CONTEÚDOS DE FLÚOR, CÁLCIO E FOSFATO NO ESMALTE



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

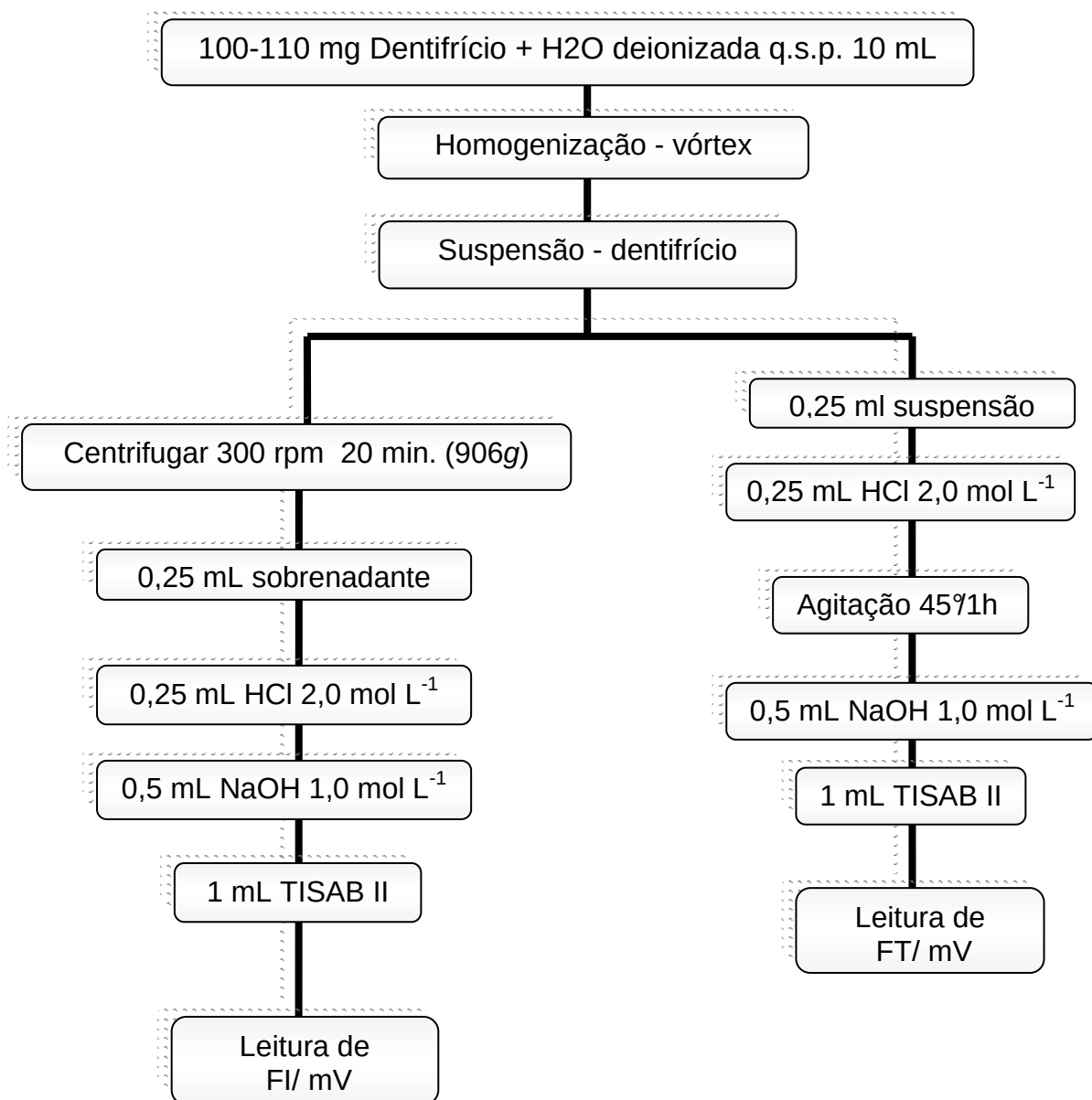
-
2. Bloco de esmalte adaptado ao mandril, sendo submetido à microabrasão, com desgaste de 50 μm , para análise da incorporação de F, Ca e P.



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

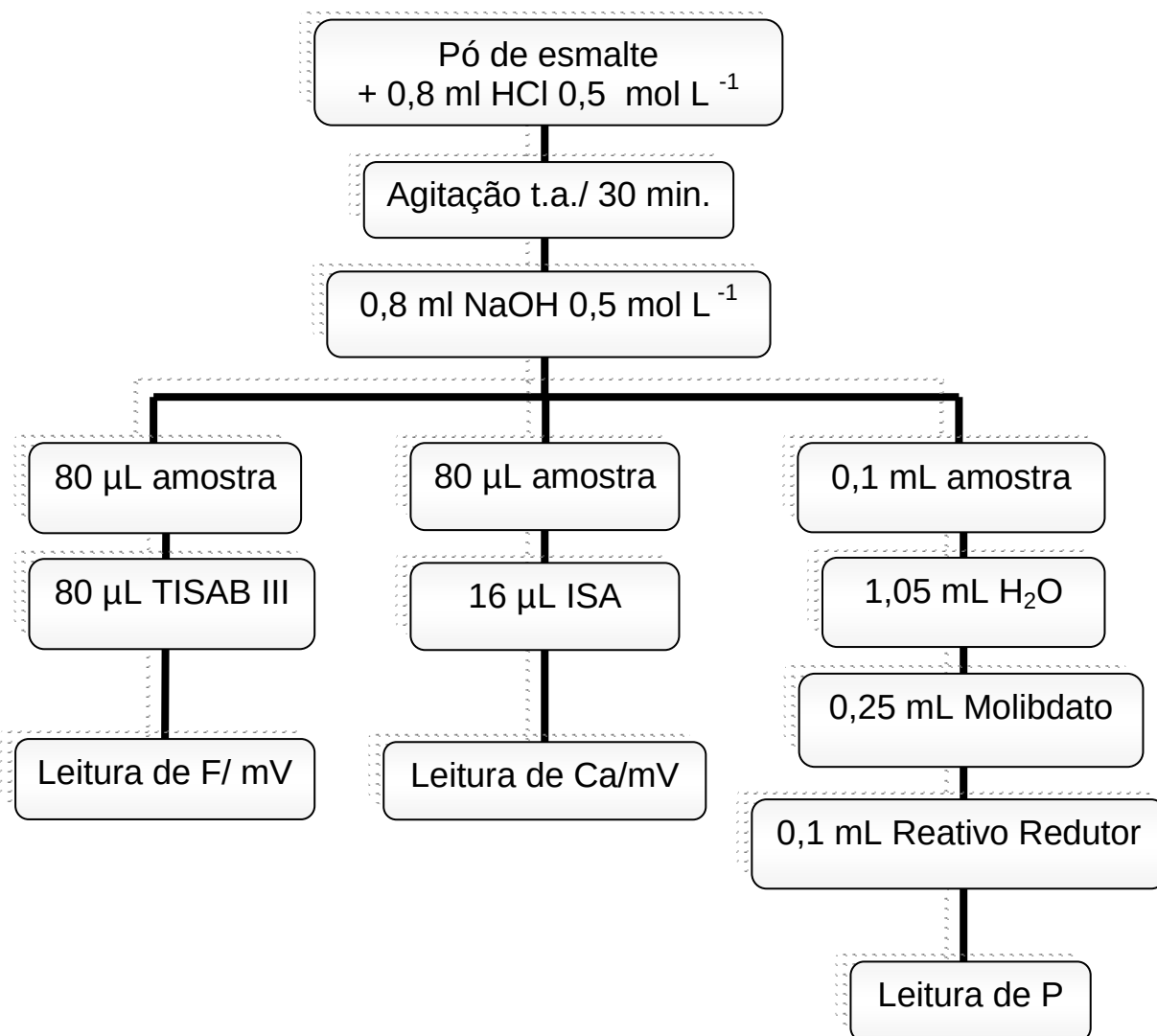
ANEXO J

DOSAGEM DE F DOS DENTIFRÍCIOS – CAPÍTULO 1



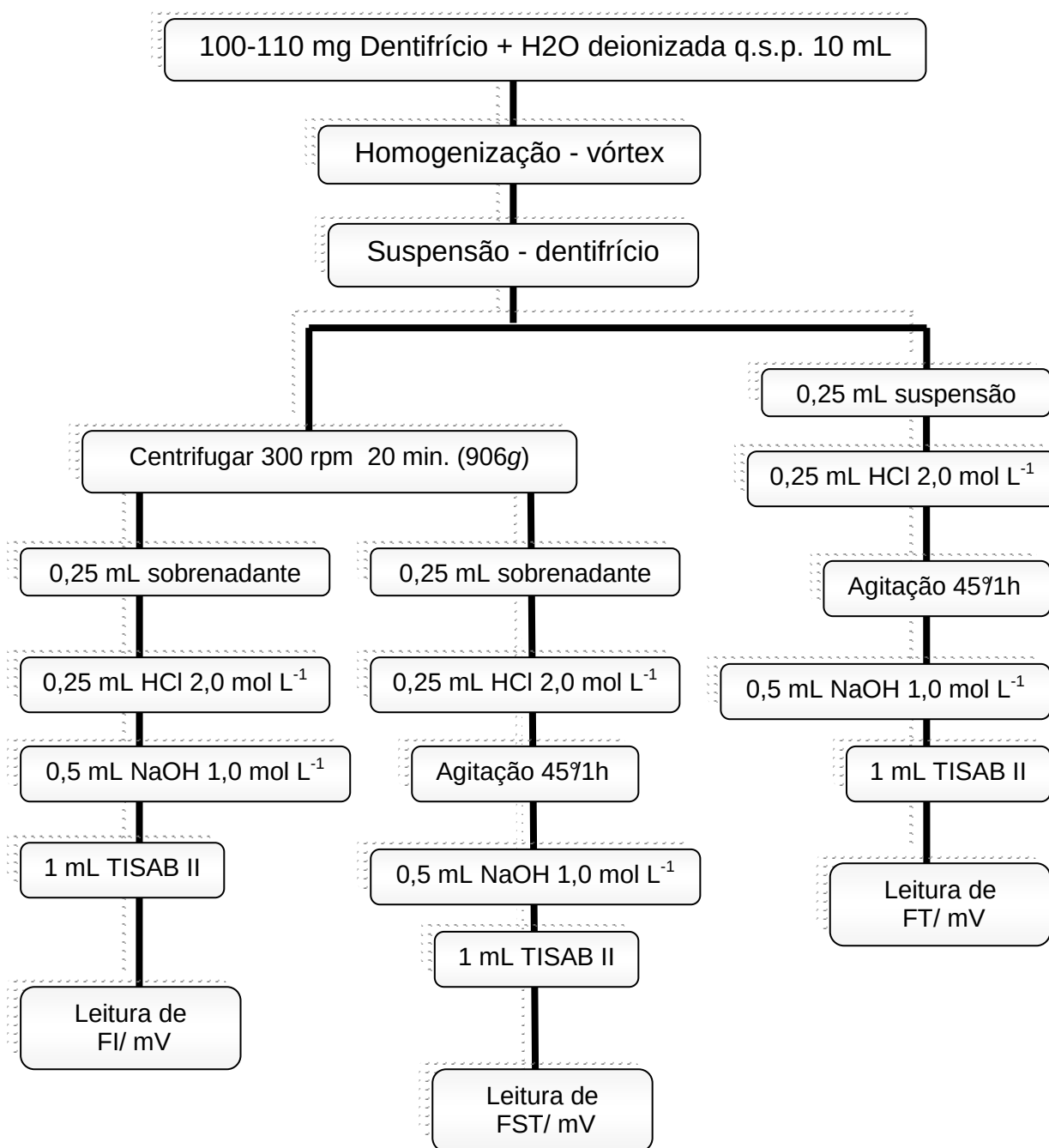
ANEXO L

DETERMINAÇÃO DE F, CA E P NO ESMALTE – CAPÍTULO 1



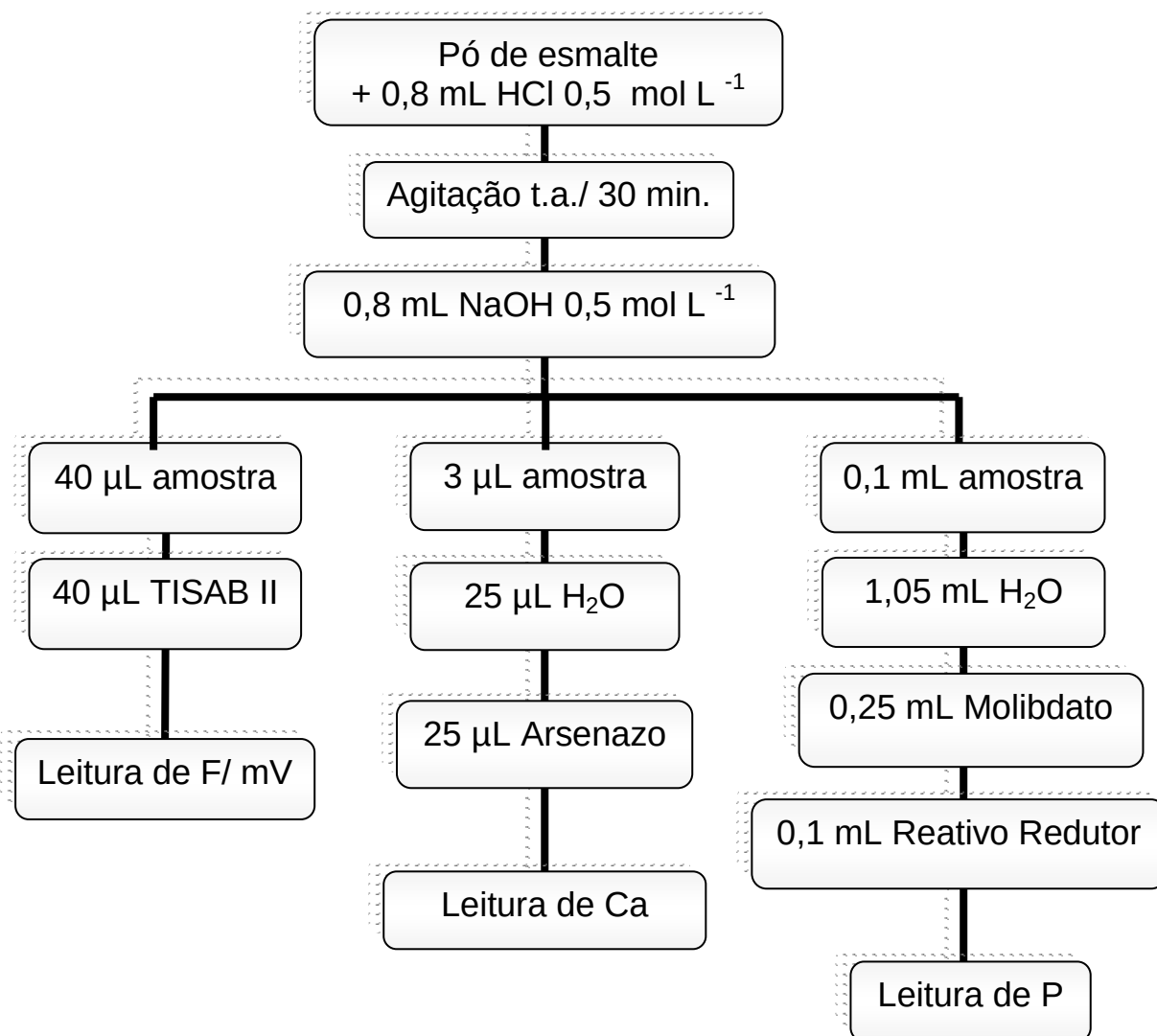
ANEXO M

DOSAGEM DE F DOS DENTIFRÍCIOS – CAPÍTULO 2



ANEXO N

DETERMINAÇÃO DE F, CA E P NO ESMALTE – CAPÍTULO 2



ANEXO O

INSTRUÇÕES AOS AUTORES – CAPÍTULO 3

Journal of Materials Science: Materials in Medicine

ISSN: 0957-4530 (print version)

ISSN: 1573-4838 (electronic version)

Journal no. 10856

Springer US

Instructions for authors

Aims and scope

The *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* publishes refereed papers providing significant progress in the application of biomaterials and tissue engineering constructs as medical or dental implants, prostheses and devices. Coverage spans a wide range of topics from basic science to clinical applications, around the theme of materials in medicine and dentistry. The central element is the development of synthetic and natural materials used in orthopaedic, maxillofacial, cardiovascular, neurological, ophthalmic and dental applications. Special biomedical topics include biomaterial synthesis and characterisation, biocompatibility studies, nanomedicine, tissue engineering constructs and cell substrates, regenerative medicine, computer modelling and other advanced experimental methodologies.

Presentation

Each of the following sections should begin on separate pages: title page, abstract, text, acknowledgments, references, individual tables, figure legends. The main text of the paper should be divided into sections and subsections. Pages should be numbered consecutively beginning with the title page. Please adhere to these instructions carefully as improperly prepared manuscripts will be returned for alteration.

Abstract

Please provide an abstract of 100 to 150 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.
Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or

endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci* 1999;36:234–5.

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 2000; doi:10.1007/s001090000086

Book

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Book chapter

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. pp. 251–306.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ANEXO P

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)



1. Espectrofotômetro modelo Magna 760 (Nicolet, Madison, USA)

-
2. Amostras da hidroxiapatita acondicionadas em porta amostra para a análise de FTIR



3. Porta amostra para a análise de FTIR acoplado ao espectrofotômetro
-

ANEXO Q

ANÁLISE DE FLUORETO , CÁLCIO E FÓSFORO NA HIDROXIAPATITA

