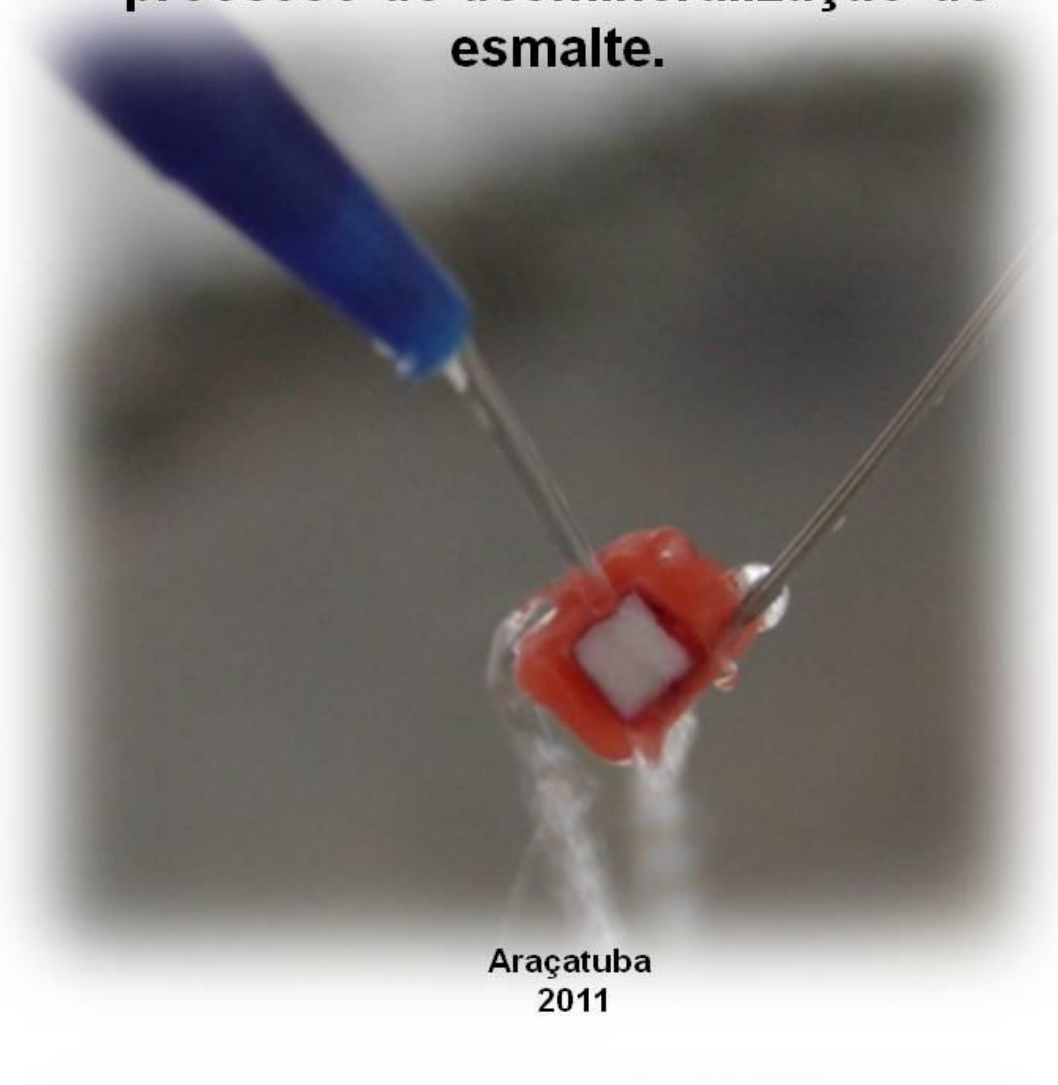


DANIELLE MENDES DA CAMARA

**Avaliação in vitro da eficácia de
dentifrícios de baixa concentração
de fluoreto suplementados com
hexametafosfato sobre o
processo de desmineralização do
esmalte.**



Araçatuba
2011

DANIELLE MENDES DA CAMARA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIOS DE BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADOS COM
HEXAMETAFOSFATO SOBRE O PROCESSO DE
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki

Araçatuba

2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- C172a Camara, Danielle Mendes da.
Avaliação in vitro da eficácia de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto suplementados com hexametáfosfato sobre o processo de desmineralização do esmalte / Danielle Mendes da Camara. - Araçatuba : [s.n.], 2011
66 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Kikue Takebayashi Sassaki
1. Desmineralização 2. Flúor 3. Fosfatos 4. Esmalte dentário
5. Fluorose dentária

Black D27
CDD 617.645

COMISSÃO EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki - Orientadora, Professora Assistente Doutora do Departamento de Ciências Básicas, Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem - Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf - Professora Titular do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB, Universidade de São Paulo- Bauru.

DADOS CURRICULARES

DANIELLE MENDES DA CAMARA

Nascimento	15-12-1981 – Santo André-SP
Filiação	Silas Moises da Camara Cleusa Mendes Silva da Camara
2002/2008	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba
2009/2011	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica APCD- Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas

Dedicatória

Dedicatória

A Deus, sempre em primeiro lugar

Elevo meus olhos para o monte, de onde vem meu socorro?

O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra,

Não deixará o teu pé vacilar, aquele que te guarda não dormitará,

Eis que não dormitará, nem dormirá aquele que guarda a Israel.

O Senhor é quem te guarda, o Senhor é a tua sombra á tua mão direita,

De dia o sol não te ferirá, nem a lua de noite,

O Senhor te guardará de todo mal, ele guardará a tua vida,

O Senhor guardará a tua saída e a tua entrada, desde agora e para sempre.

(Salmos 121)

A meus queridos e amados pais Silas e Cleusa,

Não há palavras para demonstrar o que sinto por vocês. Muito obrigada pela dedicação, carinho, amor e exemplo de vida que me passam. Esta nova etapa da minha vida eu dedico a vocês, que me ensinaram o grande valor da vida, dos estudos e do trabalho. Amo vocês!

“Honra teu pai e tua mãe para que prolongue seus dias na terra que o Senhor teu Deus te dá”

Êxodo 20:12

A minha irmã Fabiane,

Obrigada pelo amor, conselhos, amizade, e pelo seu exemplo de esforço e dedicação me trouxeram até aqui. Muito obrigada pelos dias alegres de nossa infância e juventude!

Te amo do fundo do meu coração!

Agradecimentos especiais

Agradecimentos especiais

A minha orientadora, Professora Doutora Kikue

Obrigada pelo carinho, paciência, dedicação, disponibilidade e amizade

Professora,

Fica aqui minha admiração respeito e minha eterna gratidão pela aprendizagem durante esta caminhada.

Ao Professor Alberto Delbem

Agradeço seu exemplo de dedicação a pesquisa, disponibilidade e apoio durante a realização do meu trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

Agradecimentos

Agradecimentos

Aos meus avôs maternos Ilka Rodrigues e Jaime Mendes da Silva (in memorian) e aos meus avôs paternos Antônio Câmara (in memorian) e Ordália Faria da Câmara (in memorian), muito obrigada pelo exemplo de vida e valorização dos estudos que me passaram. Vou levá-los com carinho dentro do meu coração por toda a minha vida!!

Ao meu cunhado Fabiano,

Você é muito especial em nossa família. Obrigada pela amizade, carinho e por fazer a minha irmã feliz!!

Aos meus tios, tias e primos,

Obrigada pelo apoio, amizade e compreensão.

Paz e harmonia: Eis a verdadeira riqueza de uma família.

(Benjamim Franklin)

As minhas amigas-irmãs: Amália, Bruna, Marcelle e Kéia

Obrigada pelos bons momentos de amizade, amor e carinho!! Amo vocês!!

Se plantares uma semente de amizade, recolherá um ramo de felicidade

(Lois L. Kaufman)

As minhas amigas Giselle, Ana Karina, Andréia, Roberta,

Nossa amizade foi além dos tempos da escola, um tesouro no meu coração, que está bem guardado!! Obrigada pelos bons momentos e pela amizade!

As minhas amigas Tatiana Freitas, Luciene, Vanessa Carvalho,

Vocês todas são muito especiais! Obrigada pela amizade!

As minhas amigas Jackeline, Dani Picco, Dani Oliveira, Adelisa, Carol Lodi, Michele, e Maria Cristina,

Obrigada pelo carinho e amizade. Vocês são especiais!

À estagiária Marcela Lumi Miyasaki, pela ajuda prestada.

Aos colegas Flávia, Carla, Gabriel, Laís, Taynara, Thiago, Camila, Josi e Lidiane,

Obrigada pelo carinho e convivência

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

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP,

Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profª Dra. Rosângela dos Santos Nery, Profª Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, agradeço pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos.

À Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis,

Pela amizade e colaboração: Vocês são especiais!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Cláudio, Ivone, Izamar, Luzia, Maria Cláudia e Marina pela atenção e disponibilidade com que sempre me receberam.

Ao Diogo, Reinaldo, Conrado e Valéria da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pela paciência, carinho e atenção, com grande carinho serão sempre lembrados.

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

A FAPESP,

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo incentivo a pesquisa e colaboração financeira.

EPÍGRAFE

*“Dai-me Senhor, a perseverança das ondas do mar, que
fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo
avanço”.*

(Gabriela Mistral)

RESUMO

CAMARA DM. Avaliação in vitro da eficácia de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto suplementados com hexametáfosfato sobre o processo de desmineralização do esmalte. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Resumo

Formulações de dentifrícios com concentrações reduzidas de fluoreto (F) têm sido estudadas para diminuir o risco de fluorose dentária. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de dentifrícios com concentrações reduzidas de F (250 µgF/g), suplementados com hexametáfosfato (HMP) sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino. Blocos de esmalte foram submetidos a repetidas ciclagens de pH alternadas com tratamentos (2x/dia) com dentifrícios sem F contendo HMP nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0%, dentifrícios com 250 µgF/g suplementados com HMP nas mesmas concentrações, placebo (sem F e HMP), um com 500 µgF/g, outro com 1100 µgF/g e um comercial (Crest[®], de 1100 µgF/g). Após as ciclagens determinou-se a dureza de superfície final (SH_f), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) e o conteúdo de F no esmalte. Os resultados foram submetidos à ANOVA e teste de Bonferroni (p<0.05). O grupo 250 µgF/g com 0,5% de HMP apresentou maior valor de SH_f, e menor ΔKHN, seguido do grupo de 250 µgF/g com 1,0% de HMP que ficou semelhante ao 1100 µgF/g e Crest[®]. HMP não interferiu na incorporação de F pelo esmalte em concentrações menores que 3%. Além disso, a adição de 0,5% de HMP a um dentifrício sem F causou um aumento de SH_f e uma redução de ΔKHN em comparação ao placebo. Conclui-se que é possível reduzir a concentração de F a 250 µgF/g e se obter uma ação comparável de um dentifrício comercial sobre a desmineralização do esmalte bovino através da suplementação com hexametáfosfato nas concentrações de 0,5 e 1%.

Palavras-chave: Desmineralização, flúor, fosfatos, esmalte dentário, fluorose dentária.

ABSTRACT

CAMARA DM. Evaluation in vitro of the efficacy of dentifrices with low concentration of fluoride supplemented with hexametaphosphate on the enamel demineralization process [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Abstract

Formulations of dentifrices with reduced concentrations of fluoride (F) have been studied to decrease the risk of dental fluorosis. The aim of this study was to evaluate the efficacy of dentifrices with low concentration of F (250 µgF/g), supplemented with hexametaphosphate (HMP) on the demineralization of bovine tooth enamel. Blocks of enamel were submitted to repeated pH cyclings alternated with treatments (2x/day) with dentifrices without F or containing 250 µgF/g supplemented with HMP at concentrations of 0, 0,25, 0,5 1,0, 2,0 e 3,0%, dentifrices supplemented with HMP the same concentrations, placebo (without F and HMP), a dentifrice with 500 µgF/g, another with 1100 µgF/g and a commercial dentifrice (Crest[®], 1100 µgF/g). After cycling, the following analysis were conducted: final surface hardness (SH_f), subsurface hardness integrated loss (ΔKHN) and the content of F on enamel. The results were submitted to variance analysis and Bonferroni test (p<0.05). The group of 250 µgF/g with 0,5% HMP showed the highest SH_f value and the lowest ΔKHN value, followed by the group supplemented with 1,0% HMP which was similar to 1100 µgF/g and Crest[®] groups. HMP did not impair the uptake of F by enamel at concentrations lower than 3%. Furthermore the addition of 0,5% HMP to a non fluoridated dentifrice caused a rise on SH_f and a decrease on ΔKHN in comparison to placebo. It was concluded that it is possible to reduce the concentration of F to 250 µgF/g and obtain an action similar to a commercial dentifrice on the demineralization of enamel by supplementation with hexametaphosphate in concentrations of 0.5 and 1%.

Keywords: Demineralization, Fluorine, Phosphates, Dental enamel, Dental Fluorosis.

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

°C=	Graus Celsius
Ca=	Cálcio
CDAW =	Crest Dual Action Whitening
cm=	Centímetro
cm ² =	Centímetro quadrado
dp=	Desvio padrão
epm=	Erro padrão da média
F=	Fluoreto
g=	Grama
h=	Hora
HCl=	Ácido clorídrico
HMP=	Hexametáfosfato
KCl=	Cloreto de potássio
KHN=	Unidade de dureza Knoop
L=	Litro
n=	Número de amostra
nm=	nanômetro
NaF=	Fluoreto de sódio

NaOH=	Hidróxido de sódio
P=	Fósforo
pH=	Potencial de Hidrogênio
s=	Segundos
SH _i =	Dureza de superfície inicial
SH _f =	Dureza de superfície final
TISAB=	Tampão ajustador de força iônica total
min=	minuto
mg=	Miligrama
mL=	Mililitro
mm=	Milímetro
mm ² =	Milímetro quadrado
mm ³ =	Milímetro cúbico
mol L ⁻¹ =	Mol por litro
mmol L ⁻¹ =	Milimol por litro
mV=	Milivolts
µg=	Micrograma
µm=	Micrometro

SUMÁRIO

Introdução	24
Materiais e métodos	25
Resultados	29
Discussão	35
Referências	40
Anexos	43

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIOS DE BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADOS COM
HEXAMETAFOSFATO SOBRE O PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO DO
ESMALTE.**

Camara DM, Delbem ACB, Miyasaki ML, Sassaki KT.

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

Título curto: Potencial anticárie do hexametáfosfato associado ao fluoreto.

Palavras chave: Dentifrício. Esmalte dentário. Flúor. Fosfato.
Desmineralização. In vitro.

Correspondência:

Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sassaki
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Departamento de Ciências Básicas
Rua José Bonifácio 1193
Araçatuba – SP - Brasil
CEP: 16015-050
Tel: (55) (18) 3636 2788
Fax : (55) (18) 3636 3332
Email: kts@foa.unesp.br

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

Introdução

Formulações de dentifrícios de reduzida concentração de fluoreto (F) têm sido estudadas com o objetivo de diminuir a ingestão do íon por crianças e reduzir a fluorose dentária [Wong et al., 2010; Walsh et al., 2010]. Uma forma de aumentar a eficácia anticariogênica de um dentifrício é a suplementação com fosfato. Takeshita et al. [2009] observaram que a adição de fosfato na forma de trimetafosfato, um polifosfato cíclico, na concentração de 1% a um dentifrício de 500 µgF/g resulta numa eficácia similar a de um dentifrício padrão de 1100 µgF/g, in vitro, sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino. Dessa forma, a adição de fosfato compensaria a redução da ação anticárie causada pela menor concentração de F.

Dentre os outros polifosfatos conhecidos, o hexametafosfato (HMP) é muito utilizado na indústria como um agente antimicrobiano devido à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana externa [Vaara, 1992] e dispersar o biofilme microbiano [van der Meie et al., 2002; Khammar et al., 2004]. O HMP é um polifosfato linear com 10 a 12 repetições desta subunidade [Baig et al., 2005], sendo uma variante de cadeia mais longa do pirofosfato. Em comparação a este, apresenta maior resistência ao desafio hidrolítico no ambiente oral [Winston et al., 2007] e maior afinidade e retenção à superfície do esmalte graças aos múltiplos sítios de ligação. A utilização de HMP nos dentifrícios iniciou-se a partir do ano 2000 [White e Gerlach, 2000], devido à sua capacidade de prevenir a formação de cálculos [White et al., 2002; Liu et al., 2002; Schiff et al., 2005] e remover e reduzir a adsorção de pigmentos ao dente [Baig et al., 2002; Gerlach et al., 2002; Baig et al., 2005], mostrando boa cobertura e retenção na superfície do dente [Busscher et al., 2002]. Além dessas propriedades, baixos danos erosivos foram observados com o uso de dentifrícios contendo fluoreto estanhoso e HMP [Hopper et al., 2007].

Com relação à ação anticariogênica, entretanto, os estudos têm avaliado o HMP sempre associado a altas concentrações de fluoreto (1100 µg F/g) sob a forma de fluoreto estanhoso com HMP 13% [Wefel et al., 2002] ou de NaF com HMP 7% [Pfarrer e White, 2002; Wefel et al., 2002]. Os estudos foram feitos in vitro [Wefel et al., 2002], in situ [Pfarrer et al., 2002] como também com crianças de 9 a 12 anos [Stookey et al., 2004]. Não há, entretanto, na literatura, estudos sobre o

efeito do HMP associado a concentrações menores de F. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar *in vitro* se a suplementação de um dentifrício com HMP promoveria uma melhora na eficácia do dentifrício de concentração reduzida de F (250 µgF/g) em relação a um de mercado de 1100 µg F/g, na redução da desmineralização do esmalte, como também determinar em qual concentração esse efeito é observado.

Materiais e métodos

Delineamento Experimental

Após a aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal (2009-002506) (Anexo O), blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução neutra de formol a 2% em temperatura ambiente (Anexo B). As superfícies de esmalte dos blocos foram sequencialmente polidas e aqueles com dureza de 350-380 Kg/mm² (SH_i) foram selecionados e divididos, de acordo com a média de dureza de todos os blocos e seu intervalo de confiança, em 15 grupos experimentais de 12 espécimes cada (Anexo D). Os blocos de esmalte foram submetidos num período de sete dias, a cinco ciclagens de pH (Anexo E) e ao tratamento duas vezes ao dia com os dentifrícios contendo 0 e 250 µg F/g associados a HMP nas concentrações de 0% (placebo, 250F), 0,25% (0F+0,25, 250F+0,25), 0,5% (0F+0,5, 250F+0,5), 1,0% (0F+1,0, 250F+1,0), 2,0% (0F+2,0, 250F+2,0) e 3,0% (0F+3,0, 250F+3,0). Foram utilizados também dentifrícios com 500 µg F/g (500F) e 1100 µg F/g (1100F) de mesma formulação e o comercial Crest® (1100 µgF/g) como controle positivo. Após as ciclagens de pH, a microdureza de superfície do esmalte foi novamente medida (SH_f). Em seguida os blocos foram seccionados longitudinalmente e numa metade foi determinada a dureza de subsuperfície do esmalte (Anexo F) para calcular a perda de dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) e na outra metade, o conteúdo de F. Para a análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de SH_i e SH_f, ΔKHN e as concentrações de F no esmalte e como fator de variação, os dentifrícios.

Formulação, determinação do pH e concentração de F e P dos dentifrícios

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foram preparados dentifrícios contendo HMP (Aldrich Chemistry, CAS 68915-31-1, Reino Unido) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0%, com adição ou não de F na concentração de 250 µg F/g sob a forma de NaF (Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Foram preparados também o dentifrício placebo, sem adição de HMP nem F, um dentifrício com 500 µg F/g e outro com 1100 µg F/g com a mesma formulação que os demais. Foi utilizado também um comercial de 1100 µg F/g (Crest®, Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EUA), como controle positivo. Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 (peso:peso) e foi realizada a leitura através do eletrodo de pH (Orion 290A, Orion Research Inc., Boston, EUA), sob agitação constante. As concentrações de F total (FT), F iônico (FI), fósforo total (PT), fósforo iônico (PI) e fósforo solúvel total (PST) presentes nos dentifrícios foram determinadas antes e após um teste de envelhecimento acelerado no qual foram mantidos por 72 horas à temperatura de 45°C [Tabchoury e Cury, 1994]. O F dos dentifrícios foi dosado de acordo com o método descrito por Delbem et al. [2002]. Foram pesados 100-110 mg de cada dentifrício, em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais foi acrescentada água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do FT, 0,25 mL dessa suspensão foi mantido sob agitação durante 1h a 45°C com 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Em seguida foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e acrescentado 1,0 mL de TISAB II (*total ionic strength adjustor buffer*). Para a dosagem de F foi utilizado um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A), previamente calibrado com cinco padrões (1, 2, 4, 8 e 16 µg F/mL). Para a dosagem de FI, o restante da suspensão de dentifrício foi submetido à centrifugação a 906g durante 20 min. Foi pipetado 0,25 mL do sobrenadante e acrescentou-se 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II e o F dosado da mesma forma que o FT [Delbem et al, 2002]. O P dos dentifrícios foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Fiske e Subbarow [1925]. Para a dosagem de PT, a suspensão de dentifrícios foi submetida à hidrólise com HCl 1 mol L⁻¹,

durante 1h em banho fervente, seguida de centrifugação e o P dosado no sobrenadante. Para o PI e PST, a suspensão de dentifrício foi centrifugada inicialmente e no sobrenadante obtido foi dosado o PI; para o PST, esse sobrenadante foi hidrolisado da mesma forma que o PT, antes da determinação de P. A leitura de absorbância foi feita a 660 nm, em leitora de placas (PowerWave 340, Biotek).

Ciclagem de pH (Des>Re)

Os blocos foram submetidos em frascos individuais durante sete dias a cinco ciclagens de pH, à temperatura de 37°C, permanecendo os últimos dois dias em solução remineralizadora [Vieira *et al.*, 2005] (Anexo J). Os blocos foram imersos sob agitação constante, duas vezes ao dia durante 1 min, em suspensões de dentifrícios em água destilada/deionizada (1:3 – peso:peso) quando removidos das soluções desmineralizadora (6 horas – Ca e P 2,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 µg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm²) e remineralizadora (18 horas – Ca 1,5 mmol L⁻¹, P 0,9 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mol L⁻¹ em tampão cacodilato de sódio 0,02 mol L⁻¹, 0,05 µg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 s, após serem removidos das soluções Des-Re e dentifrício/água.

Determinação da dureza de superfície do esmalte

A dureza de superfície foi determinada antes (SH inicial, SH_i) e após as ciclagens de pH (SH final, SH_f) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 g por 10 s. Foram realizadas inicialmente cinco impressões a 100 µm uma da outra, na região central do esmalte e após as ciclagens, outras cinco a 100 µm em relação às impressões iniciais. As médias das durezas foram obtidas através das dimensões das impressões. Para a análise da dureza em secção longitudinal (Anexo F), uma secção foi feita no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Utilizou-se microdurômetro Micromet 5114 (Buehler, Lake Bluff, EUA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão) e o software Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA), carga de 5 g por 10 s em aumento de 1000 vezes. Três sequências de 14 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 µm da superfície externa

do esmalte foram realizadas na área central dos blocos, distantes 100 μm uma da outra. Os valores médios dos três pontos medidos foram calculados em cada distância [Delbem et al., 2010]. A dureza integrada (KHN x μm) para a lesão dentro do esmalte hígido foi calculada pela regra trapezoidal (GraphPad Prism, versão 3.02) e subtraída da dureza integrada do esmalte hígido para obter a perda de dureza subsuperficial integrada (ΔKHN) [Spiguel et al., 2009].

Análise de F no esmalte

Blocos (2x2 mm) obtidos de uma das metades dos blocos seccionados no sentido longitudinal foram fixados com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte (100 μm) foi removida [Weatherell et al., 1985; Takeshita et al., 2009]. Utilizou-se uma base de microscópio modificada com manômetro acoplado (Pantec, São Paulo, Brasil) e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de carbureto de sílica, granulação 400 (Buelher) em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Os frascos, após a adição de 1,0 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹, foram mantidos sob agitação constante durante 1 h sendo por fim adicionado 1,0 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

Para análise de F utilizou-se eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA). Os eletrodos foram previamente calibrados com padrões contendo 0,5 a 8 μg F/mL, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas, com alíquotas de 500 μL da solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Bioestat versão 5.0, estabelecendo-se em 5% o nível de significância. Foram considerados como variáveis os valores de SHi, SHf, ΔKHN , concentrações de F no esmalte e nos dentifrícios e como fator de variação, os dentifrícios. Os dados foram inicialmente verificados quanto à distribuição normal e homogeneidade das variâncias. O resultados de SHi, SHf e ΔKHN foram submetidos á ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os dados de F no esmalte foram submetidos á

transformação logarítmica seguida de ANOVA e teste de Bonferroni. Com relação à concentração de F nos dentifrícios foi feita uma comparação entre aqueles submetidos e não submetidos ao envelhecimento acelerado, como também nos de 250 µg F/g com e sem HMP, através do teste *t* pareado. Os testes de correlação de Pearson foram realizados entre a concentração de F dos dentifrícios sem HMP e as variáveis SH_f e concentração de F no esmalte e entre os valores de SH_f e ΔKHN.

Resultados

As concentrações de F designadas como fluoreto total (FT) e iônico (FI) e de P como fósforo total (PT), iônico (PI) e solúvel total (PST) dos dentifrícios submetidos ou não ao envelhecimento acelerado estão apresentadas na figura 1. As concentrações de FI nos dentifrícios não envelhecidos estão dentro da faixa de variação de 10% do valor esperado e não se alterou após o envelhecimento acelerado (teste *t*, *p*>0,05, figura 1A). A adição de HMP nos dentifrícios de 250 µg F/g nas concentrações utilizadas não causou alteração na concentração de FI nem de FT (teste *t*, *p*>0,05, figura 1A). Com relação ao P, as concentrações de PI no sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de dentifício foram de 10 a 20% daquelas estimadas a partir da massa molar (figura 1B). Após tratamento com HCl 1 mol L⁻¹ durante 1h em banho fervente tanto do sobrenadante (PST) como da suspensão não centrifugada (PT), os valores obtidos foram maiores, variando de 30 a 90% dos teoricamente esperados (figura 1B). Nos dentifrícios submetidos ao envelhecimento acelerado, a concentração de PI aumentou em média 50% naqueles que continham HMP em todas as concentrações, com exceção de 0,25%, nos quais não houve alteração. Quanto ao PST e PT, não houve alteração (figura 1B). Os valores (média ± dp) de pH das suspensões dos dentifrícios dos grupos placebo, 0F+HMP, 250F, 250F+HMP, 550F, 1100F e Crest® foram 8,74 ± 0,01, 7,40 ± 0,74, 8,74 ± 0,01, 8,26 ± 0,42, 8,79 ± 0,01, 8,82 ± 0,02 e 7,09 ± 0,02, respectivamente. Após o teste de envelhecimento acelerado, os pH medidos foram, na mesma sequência, 8,00 ± 0,06, 6,71 ± 0,77, 7,66 ± 0,01, 7,20 ± 0,60, 6,64 ± 0,01, 8,09 ± 0,002 e 6,57 ± 0,01, mostrando um decréscimo que variou de 0,52 a 2,15 unidades de pH (Anexo N).

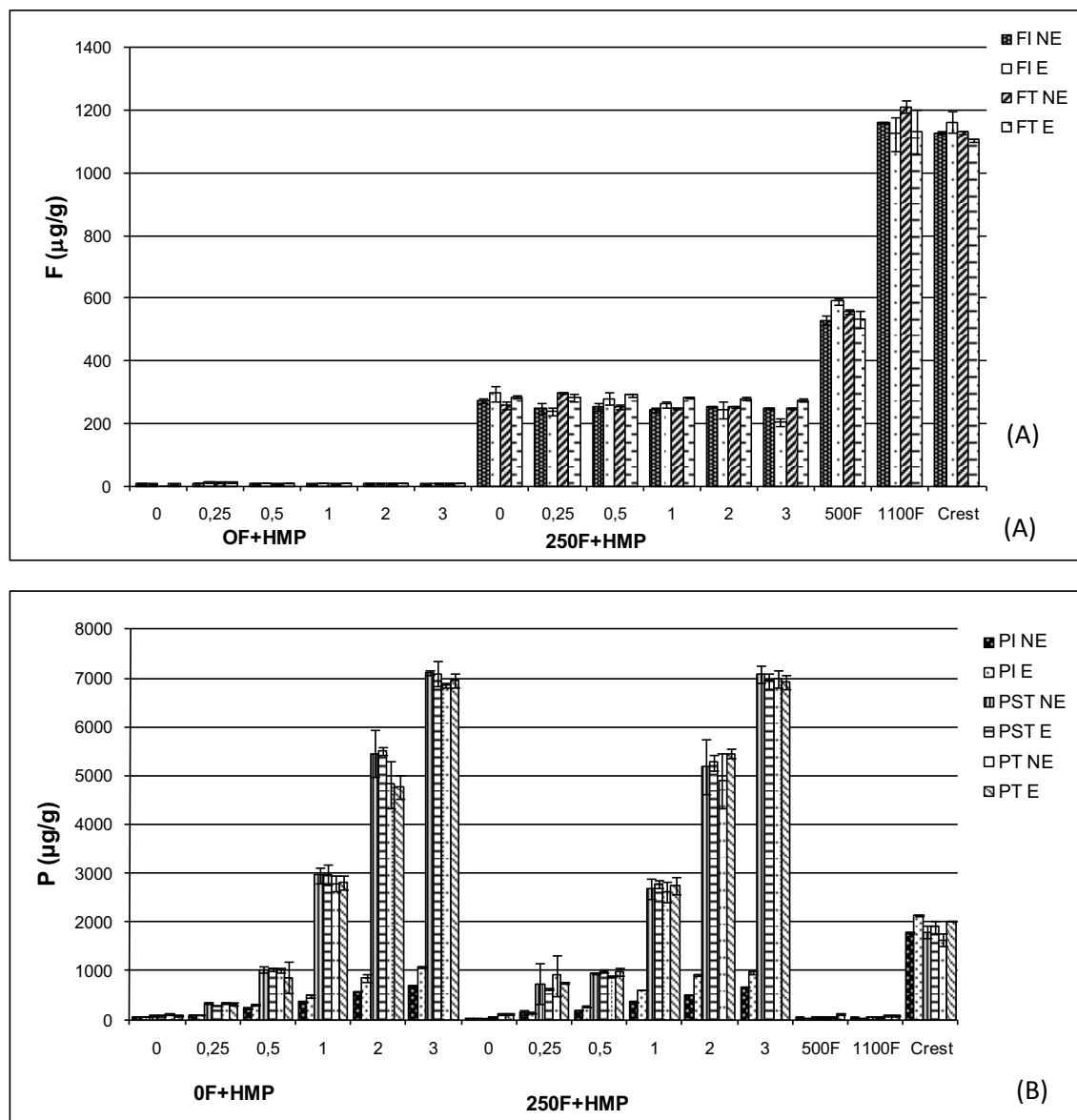


Figura 1. Concentração (µg/g) de fluoreto iônico (FI) e total (FT) (A) e de fósforo iônico (PI), solúvel total (PST) e total (PT) (B) de dentifrícios envelhecidos (E) e não envelhecidos (NE) (n=3). Barras verticais indicam dp.

As médias $\pm$ dp de SH_i (kg/mm²) do esmalte dos grupos variaram de $370,0 \pm 8,2$ a $376,3 \pm 5,7$ e não houve diferença significativa entre elas (ANOVA, $p=0,865$). A figura 2 mostra os valores de SH_f (kg/mm²) medida após os blocos serem submetidos às ciclagens de pH e tratamento com dentifrícios. A maior perda de dureza foi observada no grupo placebo e naqueles com HMP sem F, com exceção do grupo 0F+0,5 o qual foi similar ao grupo 250F. O grupo 250F+0,5, por sua vez,

foi o que mostrou o maior valor de SH_f entre todos os grupos, seguido do 250F+1,0 que mostrou dureza semelhante à de 1100F e Crest. Em concentrações maiores de HMP, entretanto, houve maior perda de dureza e no grupo 250F+2,0 o resultado foi semelhante ao do placebo. A dureza final do grupo 250F foi maior que a do placebo e menor que a de 500F, a qual, por sua vez, foi menor que a de 1100F e Crest ($p<0,05$), mostrando uma correlação positiva entre a concentração de F no dentifrício e SH_f ($r=0,9008$, Pearson, $p=0,037$).

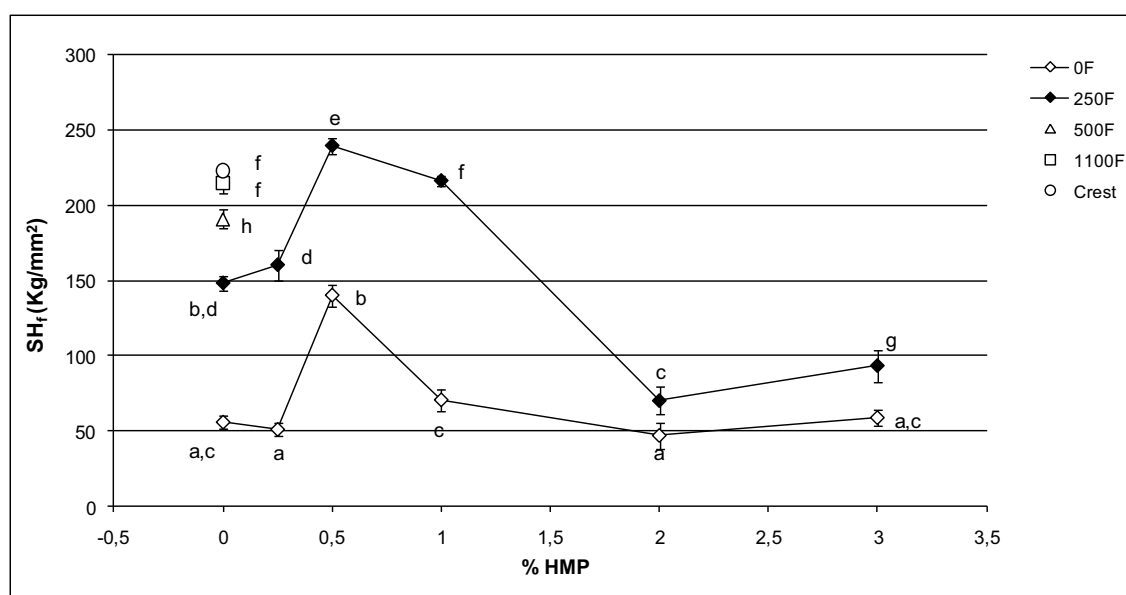


Figura 2. Valores (média $\pm$ epm, $n=12$) de dureza final de superfície (Kg/mm^2) de esmalte após ciclagens de pH e tratamento com os dentifrícios. Letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes (ANOVA, Bonferroni, $p<0,05$).

Os valores de dureza do esmalte em secção longitudinal nas diferentes profundidades a partir da superfície estão mostrados na figura 3. Observa-se perda de dureza até uma profundidade aproximada de 130 μm , a partir da qual todos os grupos já mostram uma dureza similar à do esmalte hígido. Com exceção de 0F+3,0, 250F+3,0 e 250F+2,0 observa-se um perfil de lesão subsuperficial em todos os grupos. O grupo 250F+0,5 foi o que apresentou maiores valores de dureza nas camadas mais superficiais. O grupo 250F+1,0 mostrou um perfil próximo ao do 1100F e Crest e nas camadas mais profundas, um perfil intermediário entre o 500F e o 1100F. Nos grupos sem F, a adição de HMP resultou numa perda de dureza semelhante ao do grupo 250F apenas na concentração de 0,5%. Nas

concentrações de 2,0 e 3,0% as perdas foram maiores, contudo, menores que a do placebo (figura 3).

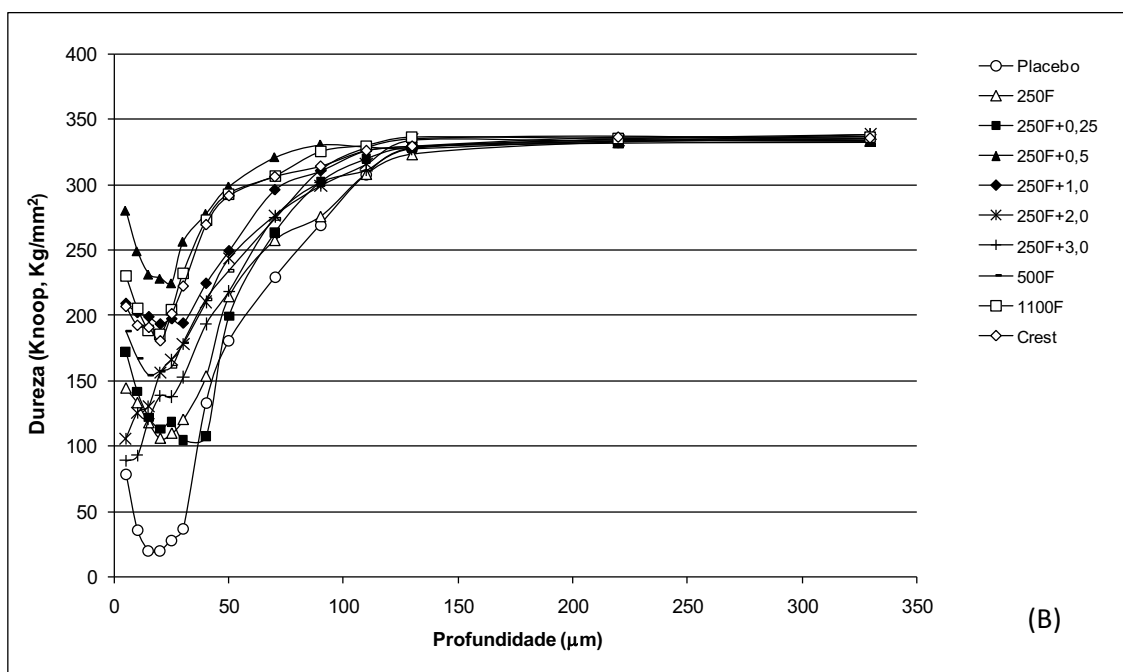
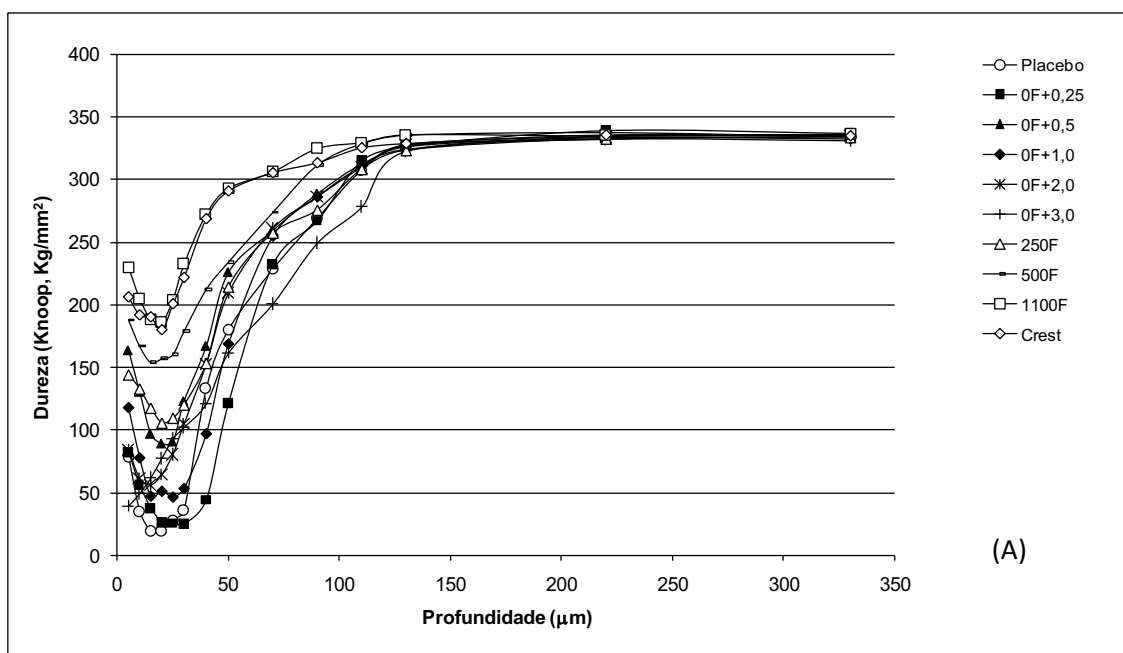


Figura 3. Perfil da dureza em função da profundidade do esmalte após ciclagens de pH e tratamento com dentifrícios dos grupos 0F+HMP (A) e 250F+HMP (B) comparados aos grupos 250F, 500F, 1100F e Crest® (n=12).

A figura 4 mostra os valores de ΔKHN em função da concentração de HMP. O menor valor de ΔKHN foi observado no grupo 250F+0,5, seguido de 250F+1,0 que foi semelhante ao de 1100F e Crest. Com concentrações maiores de HMP a perda foi maior e o grupo 250F+3,0 ficou próximo ao grupo 250F, sem HMP. Dentre os grupos sem F, o que continha 0,5% de HMP foi o que apresentou o melhor resultado, igualando-se ao 250F. A perda de dureza integrada mostrou uma correlação negativa com a dureza superficial final ($r = -0,8232$, Pearson, $p < 0,0001$).

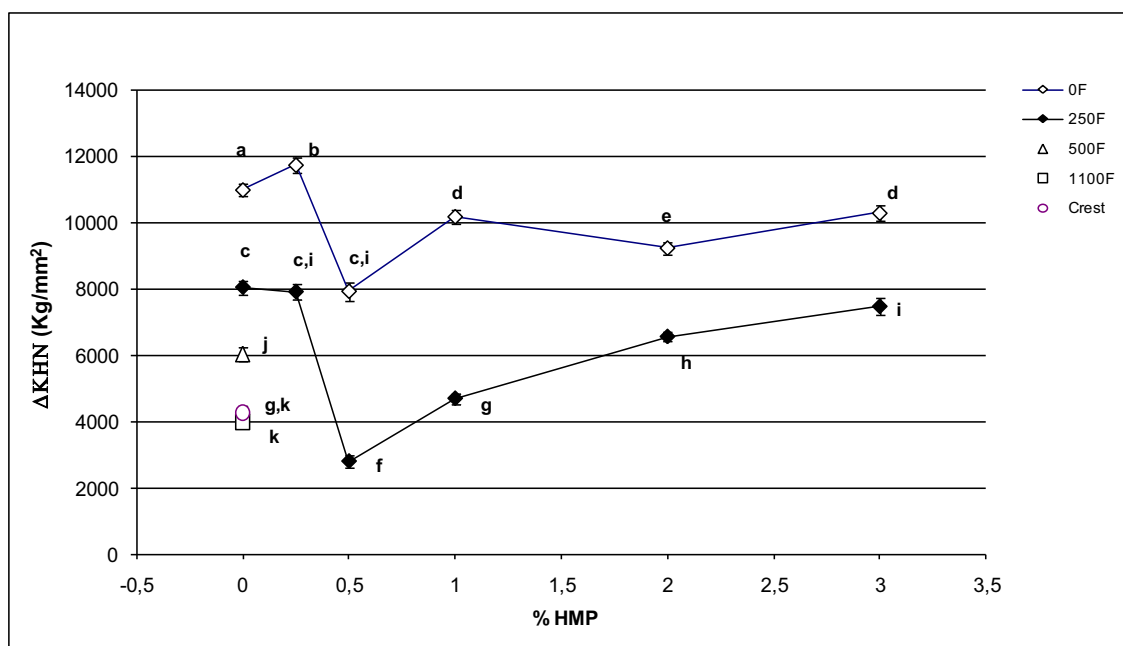


Figura 4. Valores médios (Kg/mm^2) de perda de dureza subsuperficial do esmalte de acordo com a concentração de HMP e F no dentífrico. Letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes (ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$). As barras verticais indicam epm.

A figura 5 mostra o conteúdo de F no esmalte obtido por meio da abrasão dos blocos após as ciclagens de pH e tratamento com os dentífricos. Houve uma correlação positiva significativa entre a concentração de F nos dentífricos dos grupos sem adição de HMP e o conteúdo de F no esmalte ($r = 0,9709$, Pearson, $p = 0,006$). O grupo 500F apresentou concentração de F intermediária entre 250F e os grupos 1100F e Crest, sendo esses dois últimos iguais entre si. Os grupos de 250 $\mu gF/g$ mostraram conteúdos de F maiores que os grupos não fluoretados, mas

semelhantes entre si, com exceção do grupo 250F+3,0 que ficou igual ao placebo e aos grupos com HMP, sem F.

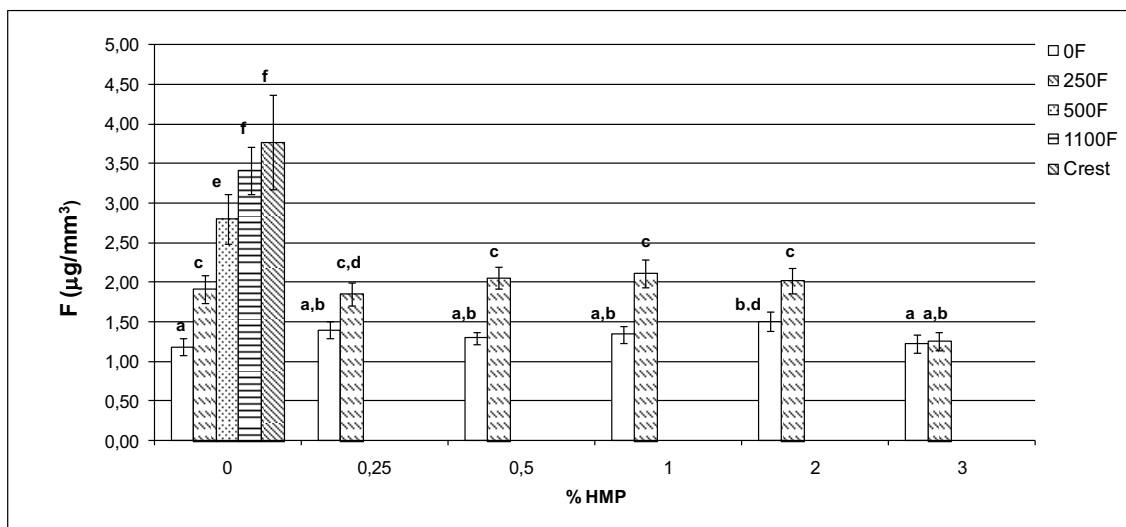


Figura 5. Valores (média $\pm$ epm, n=12) de concentração de F no esmalte após ciclagens de pH e tratamento com dentifrícios. Letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes (ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$).

Discussão

Estudos laboratoriais sob condições controladas e padronizadas são importantes para avaliar o potencial anticariogênico de novas formulações de dentifrícios antes de realizar um estudo in situ ou clínico.

O presente trabalho in vitro avaliou a eficácia de dentifrícios contendo 250 µg F/g associados ao HMP nas concentrações de 0,25 a 3,0%, mostrando que em determinadas proporções essa associação tem eficácia similar a de um dentifrício padrão de 1100 µg F/g em reduzir a desmineralização do esmalte, o que possibilitaria reduzir a concentração de F e dessa forma, diminuir a ingestão do íon pelas crianças, prevenindo a fluorose dentária.

A adição de qualquer composto ao dentifrício fluoretado não deve interferir na biodisponibilidade do F. A adição de HMP 0,25 a 3,0% não alterou a concentração de FI (figura 1A) nos dentifrícios de 250 µg F/g (teste t , $p > 0,05$), o que indica que não houve alteração na disponibilidade do F. Com relação ao PI, o fato de não se obter os valores calculados a partir da massa molar sugere que o HMP está presente no dentifrício e atua no esmalte predominantemente na forma polimerizada,

uma vez que suas unidades de fosfato só são determinadas após hidrólise em ácido a temperaturas altas, como mostram os valores de PST e PT (figura 1B). Por outro lado, o aumento na concentração de PI após envelhecimento acelerado sugere que essa hidrólise pode acontecer espontaneamente ao longo do tempo, liberando mais unidades de fosfato no meio aquoso do dentífrico. Houve um aumento médio de 40% do valor obtido inicialmente, após o teste de envelhecimento acelerado, no qual os dentífricos foram mantidos a 45° C durante 72h. Da mesma forma que os outros polifosfatos, o HMP não mostra boa estabilidade por tempo prolongado em ambientes aquosos. Esse problema foi resolvido nas formulações comerciais mais recentes, utilizando-se formulações à base de sílica pobres em água que reduzem a hidrólise do HMP e ajudam a manter níveis efetivos de atividade do composto [Sensabaugh e Sagel, 2009].

Verificar a relação dose-resposta é um passo importante na avaliação da eficácia de qualquer suplemento adicionado ao dentífrico, como também validar o protocolo experimental utilizado. Os resultados obtidos para os grupos placebo, 250F, 500F, 1100F e Crest® mostram uma relação dose-reposta e validam o modelo de ciclagem de pH (figuras 2, 4 e 5).

Os dados da dureza final de superfície (figura 2), dureza em secção longitudinal (figura 3) e perda de dureza integrada de subsuperfície (figura 4) mostram que existe uma proporção adequada entre as concentrações de F e HMP para se obter respostas semelhantes aos dos dentífricos de 1100 µgF/g. Para uma concentração de F de 250 µg/g, os melhores resultados foram obtidos com 0,5 e 1,0% de HMP. Pfarrer et al. (2002) observaram num estudo in vitro utilizando ciclagem de pH que o tratamento com dentífrico de 1100 µgF/g (NaF) suplementado com 7% HMP resultou em perda mineral integrada equivalente ao do Crest®. Num estudo in situ, Wefel et al. (2002) reportaram que dentífricos contendo NaF 0,243% com HMP 7% ou SnF₂ 0,454% com HMP 13% mostraram resultados semelhantes aos dos respectivos controles sem HMP com relação à lesão de esmalte analisada por microscopia de luz polarizada, mas que o SnF₂ suplementado com HMP foi superior em prevenir a desmineralização de superfícies de raiz. Baseando-se nesses trabalhos, a proporção mais adequada para um dentífrico de 250 µgF/g, seria 1,59 a 2,95% de HMP, entretanto nessa faixa de concentração, no presente trabalho, a dureza final de superfície foi próxima à do placebo e a perda de dureza de

subsuperfície foi maior do que na concentração de 0,5 ou 1,0%. Nessa comparação, contudo, deve-se considerar que aqueles autores não avaliaram outras concentrações de HMP. Além disso, é possível que na presença de alta concentração de F (1100 µg/g) o efeito do HMP não seja tão evidente quanto na de 250 µgF/g.

A incorporação de F por áreas de lesões desmineralizadas artificialmente pode ser um indicativo positivo da atividade anticariogênica de um dentifrício fluoretado, mas não é o único mecanismo pelo qual um composto pode inibir a desmineralização ou aumentar a remineralização do esmalte [Pfarrer et al., 2002]. A análise do conteúdo de F no esmalte mostrou que os níveis de F (figura 5) após tratamento com os dentifrícios de 250 µgF/g suplementados ficaram similares ao do grupo 250F sem HMP, com exceção do grupo 250F+3,0 que se mostrou semelhante ao placebo, sugerindo que a presença de HMP não interfere na incorporação de F em concentrações abaixo de 3,0%. Pfarrer et al. [2002] não encontraram diferença significativa na incorporação de F pelo esmalte após ciclagem de pH e tratamento com o dentifrício de 1100 µgF/g associado a 7% HMP (Crest DAW, NaF) em comparação ao tratado com Crest Cavity Protection (NaF, 1100 µgF/g), o que está de acordo com os resultados do presente trabalho, considerando-se a proporção entre a concentração de F e a de HMP, o que equivale a 1,75% de HMP para um dentifrício de 250 µgF/g.

Uma vez que o HMP permanece predominantemente na forma polimérica, não hidrolisada, como mostram os valores de PI nos dentifrícios (figura 1A), é de se supor que sua ação inibidora da desmineralização não se deve à liberação de íons ortofosfato. Por outro lado, o HMP mostra uma grande afinidade à apatita do esmalte como resultado da ligação dos grupos fosfatos aos sítios de cálcio da superfície, o que explica sua alta eficiência na remoção de pigmentos do dente. Os pigmentos adsorvidos ao esmalte ou ligados à película são substituídos pela ligação dos fosfatos do HMP e enquanto ligados previnem a adsorção posterior de outros pigmentos [Baig et al., 2002]. Através dessas múltiplas ligações, as moléculas de HMP formam uma camada de fosfatos condensados alterando a permeabilidade seletiva do esmalte [van Dijk et al., 1980] e nesse caso, com aumento da seletividade a cátions. Segundo van Dijk et al. [1980], os compostos que alteram a permeabilidade seletiva do esmalte podem interferir em dois

processos que determinam a progressão da cárie: na difusão longitudinal através dos poros do esmalte devido à sua influência na seletividade iônica e de alguma forma, na dissolução dos cristais de apatita. Os dados da incorporação de F no esmalte (figura 5) mostram que, em concentrações de HMP menores que 3%, essa camada de fosfatos não interferiu no fluxo de íons F para o interior da lesão. Além disso, os resultados da dureza tanto superficial (figura 2) quanto em secção longitudinal (figura 3) sugerem que essa camada de polifosfato atuaria como sítio de ligação aos íons H^+ responsáveis pela desmineralização do esmalte, retardando, portanto a progressão da lesão. Por outro lado, o perfil de dureza subsuperficial (figura 3) onde se observa a ausência de uma camada mais externa mineralizada nos grupos com 3% de HMP e a menor incorporação de F no esmalte nesses grupos (figura 5) sugerem que em concentrações altas de HMP as cargas negativas dos grupos fosfatos condensados estariam dificultando a entrada dos íons F pelos poros do esmalte.

Conclui-se com base nos resultados obtidos, que a associação de HMP, na concentração de 0,5 a 1,0% a um dentifrício de 250 $\mu gF/g$ proporciona uma eficácia equivalente a de um dentifrício padrão de 1100 $\mu gF/g$ na ação inibidora da desmineralização do esmalte, in vitro. Essas propriedades físico-químicas do HMP junto com sua ação antimicrobiana poderão resultar em maior ação anticariogênica em estudos no ambiente oral.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos (Processo 2009/03517-9). Agradecemos também à técnica de laboratório do Departamento de Odontologia Social e Infantil, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Referências

Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.

Baig AA, Kozak KM, Cox ER, Zoladz JR, Mahony L, White DJ: Laboratory studies on the chemical whitening effects of a sodium hexametaphosphate dentifrice. *J Clin Dent* 2002;13:19-24.

Baig A, He T, Buisson J, Sagel L, Suszcynsky-Meister E, White DJ: Extrinsic whitening effects of sodium hexametaphosphate - a review including a dentifrice with stabilized stannous fluoride. *Compend Contin Educ Dent* 2005;26:47-53.

Busscher HJ, White DJ, Van der Mei H, Baig AA, Kozak KM: Hexametaphosphate effects on tooth surface conditioning film chemistry-In vitro and in vivo studies. *J Clin Dent* 2002;13:38-43.

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

Delbem ACB, Danelon M, Sasaki KT, Vieira AEM, Takeshita EM, Brighenti FL, Rodrigues E: Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: An in situ study. *Arch Oral Biol* 2010;55:913-918.

Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus: *J Biol Chem* 1925;66:375-400.

Gerlach RW, Ramsey LL, Baker RA, White DJ: Extrinsic stain prevention with a combination dentifrice containing calcium phosphate surface active builders compared to two marketed controls. *J Clin Dent* 2002;13:15-18.

Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX: The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent* 2007;35:476-481.

Khammar N, Malhautier L, Degrange V, Lensi R, Fanlo JL: Evaluation of dispersion methods for enumeration of microorganisms from peat and activated carbon biofilters treating volatile organic compounds. *Chemosphere* 2004;54:243-254.

Liu H, Segreto VA, Baker RA, Vastola KA, Ramsey LL, Gerlach RW: Anticalculus efficacy and safety of a novel whitening dentifrice containing sodium hexametaphosphate: a controlled six month clinical trial. J Clin Dent 2002;13:25-28.

Pfarrer AM, White DJ, Rapozo-Hilo, Featherstone ID: Anticaries and hard tissue abrasion effects of a “dual action” whitening, sodium hexametaphosphate tartar control dentifrice. J Clin Dent 2002;13(1):50-54.

Schiff T, Saletta L, Baker RA, Winston JL, He T: Desensitizing effect of a stabilized stannous fluoride/Sodium hexametaphosphate dentifrice. Compend Contin Educ Dent 2005;26:35-40.

Sensabaugh C, Sagel ME: Stannous fluoride with sodium hexametaphosphate: review of laboratory, clinical and practice-based data. J Dent Hyg 2009;83:70-78.

Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC: 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, Gonzalez-Gierbolini C, Bartizek RD, Biesbrock AR: The relative anticaries effectiveness of three fluoride-containing dentifrices in Puerto Rico. Caries Res 2004;38:542-550.

Tabchoury CPM, Cury JA: Estudo de condições de envelhecimento precoce de dentifrícios para prever o comportamento do flúor em condições ambientais. Rev Bras Farm 1994;75:67-71.

Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. Caries Res 2009b;43:50-56.

Vaara M: Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 1992;56:395-411.

Van der Mei HC, White DJ, Cox ER, Geertsema-Doornbusch GI, Busscher HI: Bacterial Detachment from salivary conditioning films by dentifrice supernates. J Clin Dent 2002;13:44-49.

Van Dijk JW, Borggreven JM, Driessens FC: The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel. Arch. Oral Biol 1980;25:591-595.

Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpaste of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescent. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;jan20:CDOO7868.

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

Wefel JS, Stanford CM, Ament DK, Hogan MM, Harless JD, Pfarrer AM, Ramsey LL, Leusch MS, Biesbrock AR: In situ evaluation of sodium hexametaphosphate-containing dentifrices. *Caries Res* 2002;36:122-128.

White DJ, Gerlach RW: Anticalculus effects of a novel dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical, mechanism, and clinical response. *J Contemp Dent Pract* 2000;1:1-19.

White DJ, Cox ER, Suszcynskymeister EM, Baig AA: In vitro studies of the anticalculus efficacy of a sodium hexametaphosphate whitening dentifrice. *J Clin Dent* 2002;13:33-37.

Winston JL, Fiedler SK, Schiff T, Baker R: An anticalculus dentifrice with sodium hexametaphosphate and stannous fluoride: a six-month study of efficacy. *J Compend Dent Pract* 2007;8:1-8.

Wong MC, Glenny AM, Isang BW, Lo EC, Worthing HV, Marinho VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;jan20:CDOO7693.

Anexos

ANEXO A

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

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

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

Dr. R.P. Shellis
r.p.shellis@bris.ac.uk
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

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

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.

Digital Object Identifier (DOI)

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

Examples

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

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 www.karger.com/authors_choice.

Page Charges

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

Proofs

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

Reprints

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

ANEXO B

CONFECÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO (4X4mm)



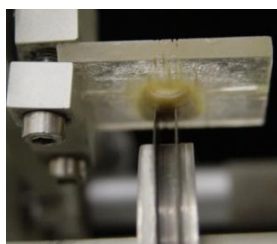
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz por meio de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



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 C

PLANIFICAÇÃO DA DENTINA E POLIMENTO DO ESMALTE



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

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz Beta – Grinder – Polisher e Vector Power Head (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e lixas de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler), durante 30 s sob baixa rotação e refrigeração.



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

Sequência do polimento de esmalte:

- ✓ Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
- ✓ Lixas de granulação 600 (20 s) e 1200 (30 s) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 min, entre cada lixa;
- ✓ Acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) durante 1 min com suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
- ✓ Lavagem durante 30 s com jato de água deionizada;
- ✓ Limpeza em lavadora ultrassônica Modelo 2110 (Branson, Danbury CT, EUA) com água destilada/ deionizada (2min).

ANEXO D

ANÁLISE DA DUREZA DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE

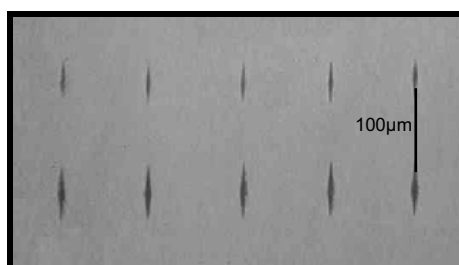


1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, EUA).

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



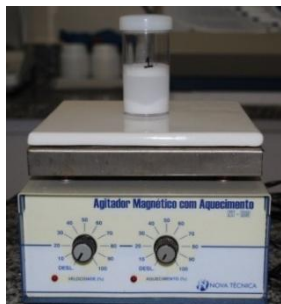
3. Fotomicrografia das impressões (SHi). (Aumento: 100x)



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

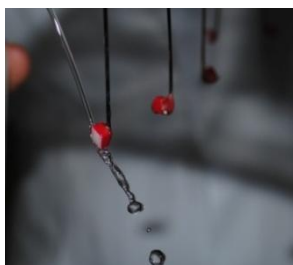
ANEXO E

CICLAGEM DE pH (Des>Re)



1. Agitador Magnético com Aquecimento TE – 081 (Piracicaba, SP - Brasil) utilizado para agitar o dentifrício com velocidade de 50% durante 15 min.

2. Mesa Agitadora TE - 141-Orbital (Tecnal, Piracicaba - SP, Brasil) utilizada para tratamento dos blocos de esmalte, em rotação 7 durante 1 min.



3. Lavagem dos blocos de esmalte antes e após os tratamentos, durante 30 s com água deionizada.

4. Estufa para cultura bacteriológica (Olidef cz Ribeirão Preto – SP, Brasil) utilizada para manter os blocos de esmalte nas soluções de Des e Re em temperatura 37°C, durante o período da ciclagem.



ANEXO F

ANÁLISE DA DUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL



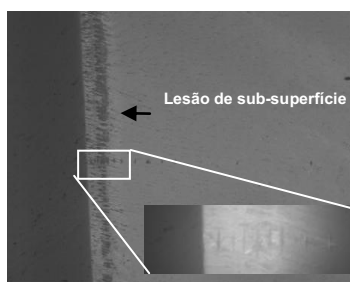
1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 g de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, EUA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 min e mais 7 min de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola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



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



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



4. Fotomicrografia das impressões. (Aumento: 1000x)

Seqüência do polimento de esmalte:

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

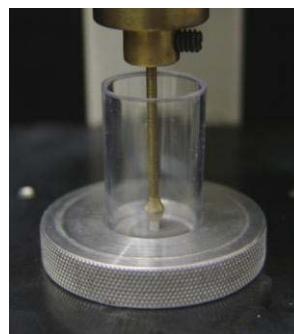
ANEXO G

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE F 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 100 μm , para análise do F.



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



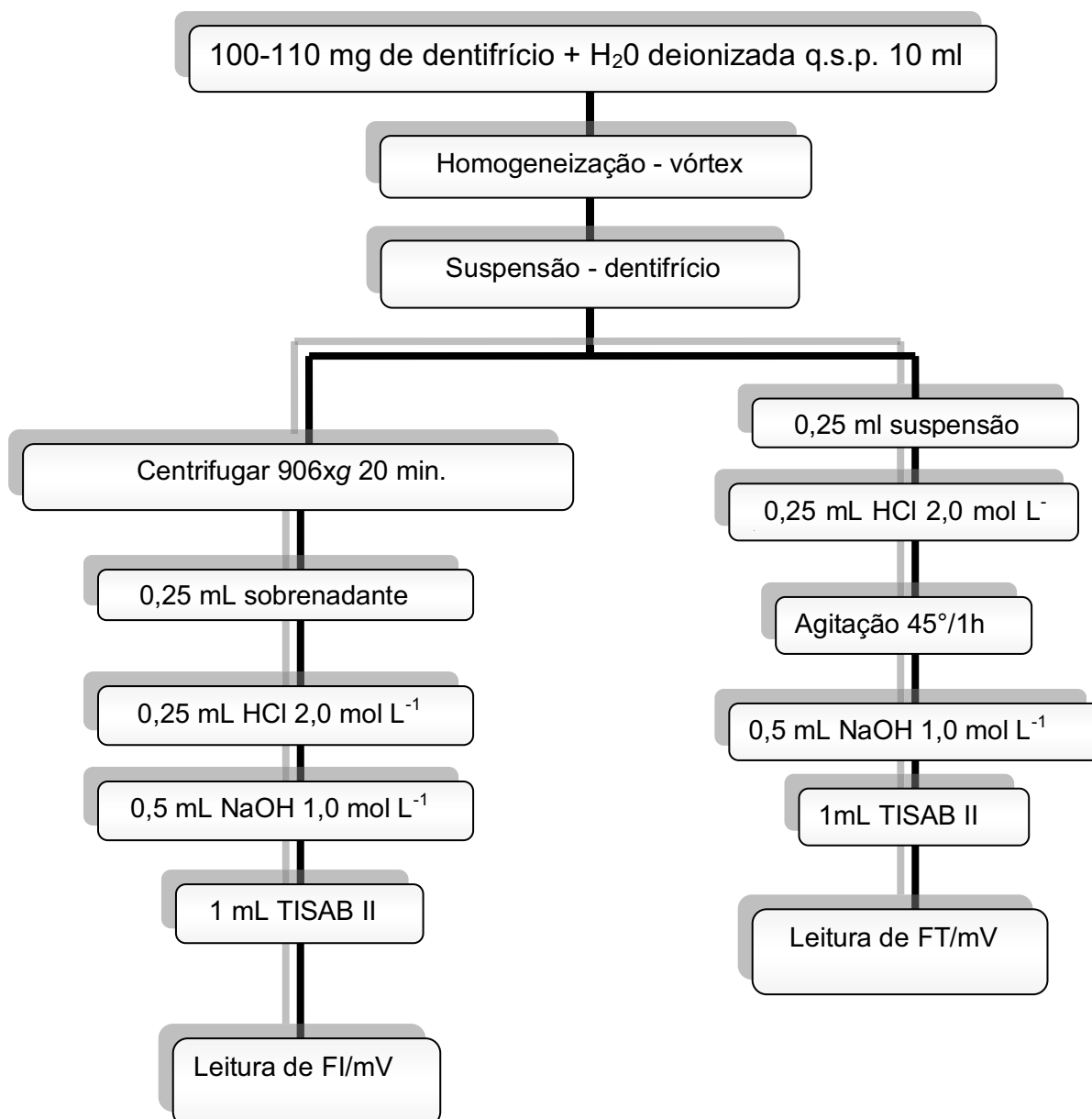
4. Para análise do conteúdo de F no esmalte utilizou-se:

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

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

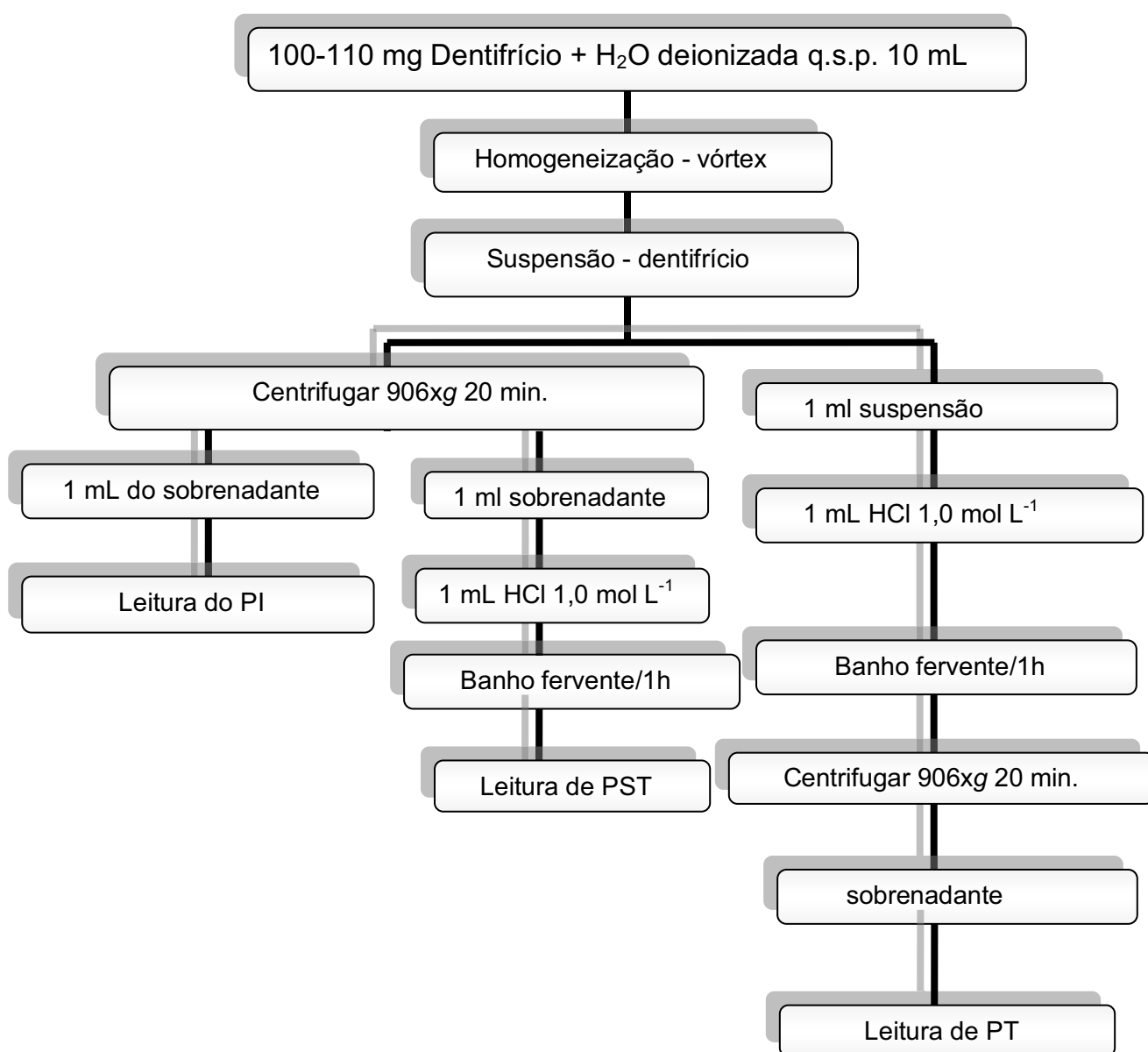
C- Analisador de íons Orion 720A (Orion Research, Inc.).

ANEXO H
ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DE F DOS DENTIFRÍCIOS



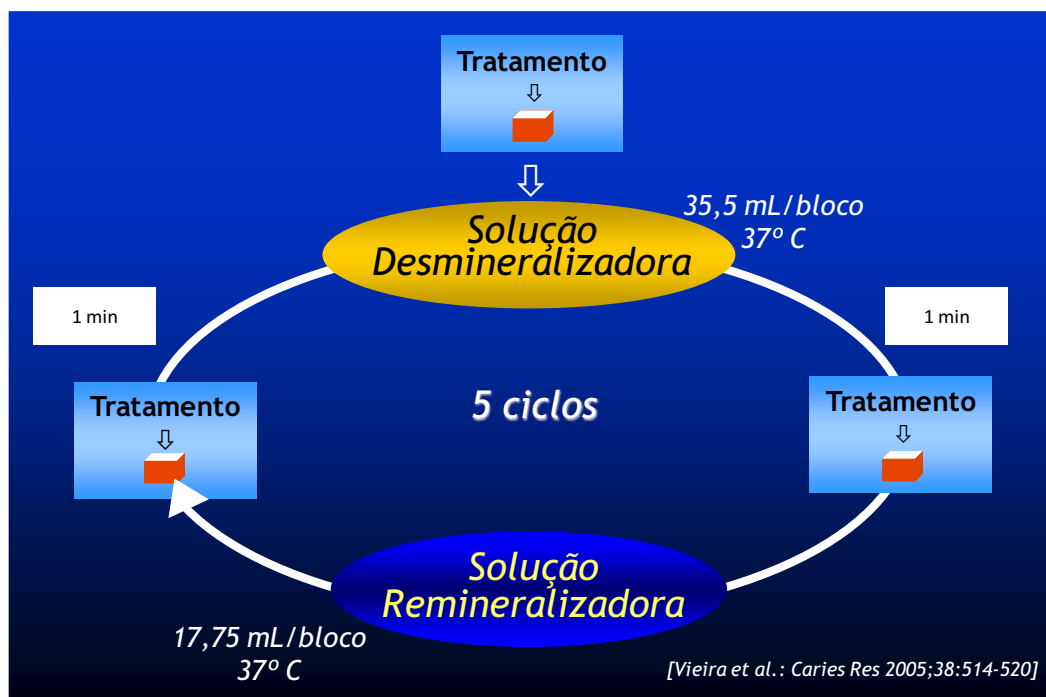
ANEXO I

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DE P DOS DENTIFRÍCIOS



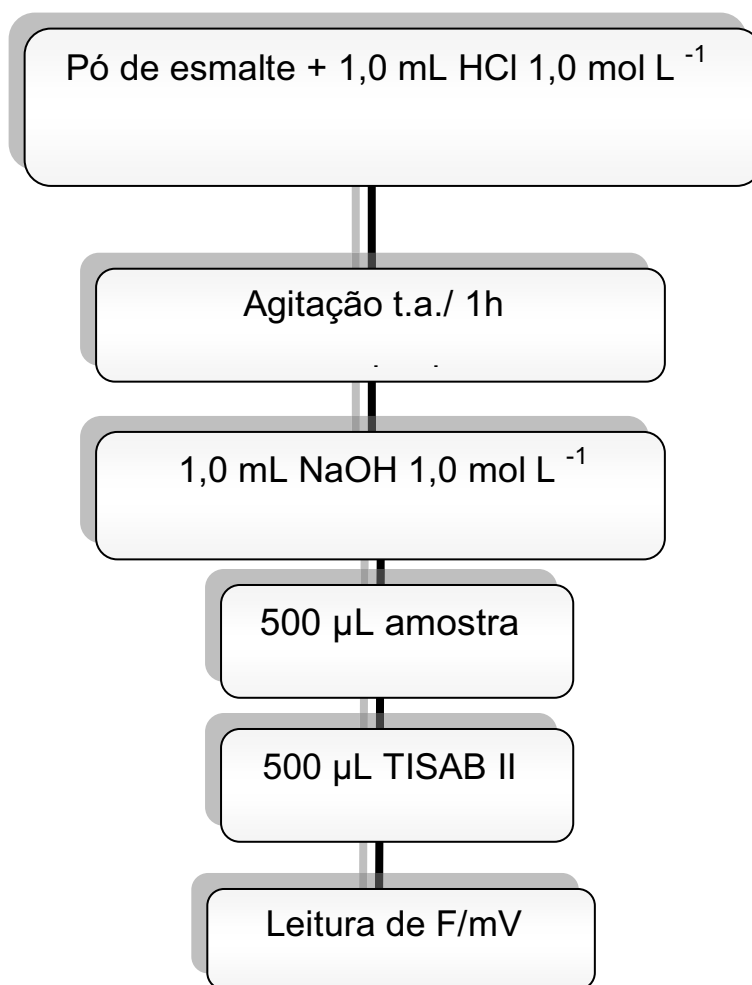
ANEXO J

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CICLAGEM DE pH (Des>Re)



ANEXO K

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE F NO ESMALTE



ANEXO L

Médias das durezas iniciais e finais

Dureza inicial (SH _i)						Dureza final (SH _f)						
Placebo												
Blocos	média					média						
1	377	370	375	368	370	372,0	31	45	38	44	40	39,6
2	373	375	375	375	377	375,0	62	81	76	136	26	76,2
3	380	377	380	380	380	379,4	73	62	49	49	55	57,6
4	380	373	380	377	373	376,6	94	85	76	67	45	73,4
5	380	373	375	370	370	373,6	45	41	34	43	26	37,8
6	380	380	380	380	380	380,0	102	98	74	50	46	74,0
7	380	380	375	380	380	379,0	45	34	50	57	62	49,6
8	380	375	380	375	375	377,0	67	69	79	77	77	73,8
9	380	380	377	380	380	379,4	48	43	44	40	49	44,8
10	361	361	365	361	361	361,8	44	45	58	50	57	50,8
11	375	375	373	373	375	374,2	44	53	58	55	57	53,4
12	365	368	365	365	365	365,6	45	40	30	33	35	36,6
média = 374,467						média = 55,6						
dp = 5,69742						dp = 15,16						
Grupo 0F+0,25												
Blocos	média					média						
1	370	375	373	370	375	372,6	77	79	86	81	89	82,4
2	375	373	373	373	373	373,4	33	38	37	37	41	37,2
3	377	375	375	375	373	375,0	59	52	48	50	57	53,2
4	380	377	375	377	377	377,2	40	45	40	41	50	43,2
5	380	375	377	380	375	377,4	32	36	30	31	31	32,0
6	361	365	361	365	363	363,0	45	56	57	57	52	53,4
7	361	361	365	361	361	361,8	53	47	53	40	48	48,2
8	380	377	375	375	375	376,4	55	60	46	44	41	49,2
9	370	375	375	375	373	373,6	42	40	38	38	43	40,2
10	380	377	375	375	380	377,4	68	80	84	68	76	75,2
11	354	356	356	356	356	355,6	35	33	52	38	30	37,6
12	380	377	375	377	377	377,2	65	52	53	70	50	58,0
média = 371,72						média = 50,8						
dp = 7,38						dp = 15,23						
Grupo 0F+0,5												
Blocos	média					média						
1	370	375	373	370	370	371,6	98	86	111	108	104	101,4
2	361	361	365	361	361	361,8	110	123	113	110	115	114,2
3	356	356	356	359	359	357,2	123	145	146	130	147	138,2
4	377	380	380	377	370	376,8	171	104	153	229	212	173,8
5	370	373	375	377	375	374,0	145	156	170	168	139	155,6
6	380	380	380	380	380	380,0	167	149	173	161	127	155,4
7	380	375	370	370	373	373,6	80	130	161	168	168	141,4
8	380	380	375	377	377	377,8	133	141	152	162	139	145,4
9	380	373	377	380	380	378,0	148	156	152	151	127	146,8
10	361	363	361	361	365	362,2	112	94	104	118	95	104,6
11	380	380	375	380	375	378,0	144	127	148	129	92	128,0
12	377	380	377	375	377	377,2	173	187	182	167	160	173,8
média = 372,35						média = 139,88						
dp = 7,65						dp = 24,12						

Grupo 0F+1,0												
Blocos	média						média					
1	380	377	375	375	375	376,4	82	77	88	89	87	84,6
2	377	375	375	373	375	375,0	87	73	87	84	73	80,8
3	373	373	375	377	375	374,6	81	96	100	93	104	94,8
4	380	380	380	375	380	379,0	55	46	46	38	52	47,4
5	361	365	365	361	361	362,6	80	97	99	82	89	89,4
6	380	380	377	377	375	377,8	106	85	89	80	90	90,0
7	380	377	377	377	380	378,2	50	67	52	45	50	52,8
8	370	373	375	373	375	373,2	24	32	24	26	27	26,6
9	361	361	363	361	363	361,8	106	99	100	99	104	101,6
10	365	361	361	365	365	363,4	33	48	44	39	46	42,0
11	380	375	377	375	377	376,8	81	76	73	70	62	72,4
12	380	375	380	375	375	377,0	63	60	62	66	63	62,8
	média = 373,0						média = 70,4					
	dp = 6,5						dp = 23,84					

Grupo 0F+2,0												
Blocos	média						média					
1	380	375	375	380	377	377,4	22	20	24	24	20	22,0
2	380	375	380	380	380	379,0	102	92	90	90	90	92,8
3	380	380	380	380	380	380,0	21	21	27	20	20	21,8
4	380	380	375	380	380	379,0	68	62	62	70	60	64,4
5	380	375	377	380	377	377,8	20	28	29	24	22	24,6
6	380	380	380	380	375	379,0	81	82	70	84	70	77,4
7	377	380	380	377	375	377,8	75	65	79	53	52	64,8
8	377	377	375	380	375	376,8	96	85	98	95	84	91,6
9	377	375	377	377	373	375,8	15	19	21	36	30	24,2
10	375	377	380	375	380	377,4	21	23	30	25	28	25,4
11	380	375	377	375	375	376,4	23	27	30	27	25	26,4
12	361	356	363	352	361	358,6	25	27	29	25	25	26,2
	média = 376,25						média = 46,80					
	dp = 5,69						dp = 28,98					

Grupo 0F+3,0												
Blocos	média						média					
1	377	373	377	370	375	374,4	81	79	69	70	95	78,8
2	377	377	375	377	380	377,2	43	47	43	45	46	44,8
3	356	352	356	354	356	354,8	35	39	35	28	37	34,8
4	380	375	380	380	377	378,4	55	47	42	31	40	43,0
5	380	375	375	373	375	375,6	72	69	57	57	69	64,8
6	380	377	375	375	380	377,4	31	30	30	30	32	30,6
7	375	370	373	373	370	372,2	67	71	80	80	90	77,6
8	380	377	377	377	377	377,6	41	45	41	48	46	44,2
9	361	361	365	361	365	362,6	65	61	75	66	65	66,4
10	363	359	356	354	354	357,2	65	86	102	90	84	85,4
11	380	375	375	375	380	377,0	74	65	79	79	60	71,4
12	356	356	356	360	356	356,8	54	53	66	67	69	61,8
	média = 370,10						média = 58,63					
	dp = 9,36						dp = 18,47					

Grupo 250F												
Blocos	média						média					
1	370	375	373	377	377	374,4	106	113	118	108	102	109,4
2	365	363	363	367	368	365,2	119	136	131	137	132	131,0
3	380	377	377	375	375	376,8	138	158	149	158	158	152,2
4	377	370	377	370	375	373,8	149	168	145	142	154	151,6
5	370	368	375	370	370	370,6	126	135	153	135	152	140,2
6	375	370	375	375	373	373,6	171	171	180	184	161	173,4
7	350	356	350	359	356	354,2	142	180	189	168	164	168,6
8	370	365	370	370	370	369	167	160	148	167	156	159,6
9	380	375	375	377	380	377,4	128	134	131	142	141	135,2
10	377	380	380	377	377	378,2	151	140	138	152	138	143,8
11	370	368	368	370	373	369,8	161	157	160	157	153	157,6
12	380	375	377	380	375	377,4	160	185	164	132	140	156,2
	média = 371,70						média = 148,23					
	dp = 6,80						dp = 17,62					

Grupo 250F+0,25												
Blocos	média					média					média	
1	361	365	365	363	365	363,8	113	118	123	121	125	120,0
2	380	377	377	380	377	378,2	208	216	218	225	215	216,4
3	380	377	375	377	377	377,2	214	225	216	220	225	220,0
4	368	370	375	370	375	371,6	202	182	192	195	200	194,2
5	380	380	375	377	375	377,4	150	140	137	137	141	141,0
6	375	373	377	377	377	375,8	164	185	170	160	173	170,4
7	356	361	359	363	363	360,4	123	132	146	134	125	132,0
8	377	375	377	377	377	376,6	156	154	167	157	150	156,8
9	365	368	365	365	365	365,6	141	144	142	137	145	141,8
10	361	365	361	361	365	362,6	140	137	146	132	142	139,4
11	380	375	375	375	375	376,0	165	154	162	176	177	166,8
12	380	375	380	377	380	378,4	123	113	115	134	140	125,0
média =						371,97	média =					
dp =						6,87	dp =					

Grupo 250F+0,5												
Blocos	média					média					média	
1	380	380	380	380	380	380,0	254	268	274	241	252	257,8
2	380	375	380	380	380	379,0	254	227	220	211	234	229,2
3	370	365	361	359	361	363,2	227	212	254	220	234	229,4
4	370	370	377	377	370	372,8	260	241	239	282	263	257,0
5	375	373	377	380	377	376,4	263	236	222	249	263	246,6
6	377	377	380	377	377	377,6	212	244	252	254	252	242,8
7	380	380	377	380	380	379,4	257	246	254	249	258	252,8
8	354	352	352	352	350	352,0	229	211	202	210	214	213,2
9	352	352	354	352	354	352,8	202	203	208	211	200	204,8
10	380	377	377	370	373	375,4	257	257	257	268	257	259,2
11	380	373	375	373	380	376,2	231	234	231	222	229	229,4
12	356	352	356	359	352	355,0	249	260	241	246	263	251,8
média =						369,98	média =					
dp =						11,01	dp =					

Grupo 250F+1,0												
Blocos	média					média					média	
1	373	375	370	363	368	369,8	205	206	229	231	223	218,8
2	370	375	370	373	365	370,6	184	227	213	218	206	209,6
3	377	373	363	368	380	372,2	184	217	188	188	216	198,6
4	380	375	380	380	377	378,4	214	220	184	168	234	204,0
5	380	375	380	380	377	378,4	268	254	266	177	222	237,4
6	377	373	373	377	375	375,0	185	204	206	206	214	203,0
7	377	373	370	370	375	373,0	225	227	222	229	222	225,0
8	375	377	376	377	377	376,4	239	227	239	229	236	234,0
9	361	355	354	359	361	358,0	227	222	205	193	210	211,4
10	352	352	354	356	354	353,6	208	202	218	222	214	212,8
11	380	380	380	380	380	380,0	216	210	222	229	227	220,8
12	356	350	359	361	352	355,6	204	218	220	227	229	219,6
média =						370,1	média =					
dp =						9,3	dp =					

Grupo 250F+2,0												
Blocos	média					média					média	
1	380	380	380	375	377	378,4	103	105	90	91	74	92,6
2	380	380	377	380	380	379,4	85	103	145	92	115	108,0
3	359	352	350	352	359	354,4	52	44	50	59	70	55,0
4	380	375	373	375	375	375,6	130	110	94	90	90	102,8
5	376	377	375	376	375	375,8	37	29	32	22	23	28,6
6	370	375	373	373	375	373,2	37	25	36	44	43	37,0
7	377	375	375	375	375	375,4	132	133	111	115	135	125,2
8	370	368	368	368	365	367,8	80	85	77	87	74	80,6
9	370	373	370	370	370	370,6	50	58	61	67	71	61,4
10	370	373	370	373	370	371,2	37	30	35	35	36	34,6
11	380	377	375	377	375	376,8	50	41	55	69	41	51,2
12	345	345	341	343	343	343,4	62	70	66	57	61	63,2
média =						370,17	média =					
dp =						10,73	dp =					

Grupo 250F+3,0												
Blocos	média					média					média	
1	380	380	375	375	373	376,6	171	132	93	87	84	113,4
2	380	380	380	377	373	378,0	120	136	135	129	147	133,4
3	375	380	375	375	377	376,4	98	96	100	106	102	100,4
4	375	380	380	380	375	378,0	179	168	164	167	171	169,8
5	375	380	375	375	380	377,0	121	117	106	119	112	115,0
6	365	370	370	368	365	367,6	60	76	59	50	50	59,0
7	380	380	375	375	375	377,0	123	104	106	115	124	114,4
8	361	365	365	365	363	363,8	58	61	62	76	70	65,4
9	352	354	354	356	354	354,0	56	67	72	71	53	63,8
10	377	375	377	377	375	376,2	69	58	62	58	62	61,8
11	380	380	375	380	380	379,0	65	60	63	79	77	68,8
12	370	375	375	375	373	373,6	50	45	55	54	67	54,2
média =						373,10						93,28
dp =						7,55						36,65

Grupo 500F												
Bloco	média					média					média	
1	370	373	375	373	370	372,2	204	206	231	231	216	217,6
2	372	370	370	368	373	370,6	187	167	179	167	182	176,4
3	380	380	380	380	380	380,0	206	222	194	204	206	206,4
4	352	352	350	352	347	350,6	185	208	200	175	185	190,6
5	361	365	361	363	365	363,0	167	182	184	192	164	177,8
6	375	377	375	375	377	375,8	165	168	182	182	168	173,0
7	370	373	375	369	370	371,4	218	218	235	228	234	226,6
8	354	352	354	356	358	354,8	133	135	141	153	160	144,4
9	377	380	377	380	377	378,2	182	188	196	206	200	194,4
10	375	380	377	380	380	378,4	176	194	197	210	209	197,2
11	372	375	375	375	375	374,4	168	188	184	170	187	179,4
12	380	377	377	377	375	377,2	211	191	194	212	215	204,6
média =						370,55						190,70
dp =						9,55						22,29

Grupo 1100F												
Blocos	média					média					média	
1	370	373	375	370	373	372,2	210	206	200	215	220	210,2
2	380	380	375	375	380	378,0	196	180	204	200	191	194,2
3	361	363	361	365	365	363,0	216	218	216	225	194	213,8
4	373	375	373	373	370	372,8	180	180	200	190	206	191,2
5	380	375	377	377	375	376,8	206	212	191	216	190	203,0
6	380	375	377	375	377	376,8	220	210	220	234	212	219,2
7	350	352	354	354	354	352,8	222	228	225	210	206	218,2
8	377	380	377	380	380	378,8	240	260	249	257	274	256,0
9	380	380	377	377	375	377,8	246	231	225	249	239	238,0
10	375	375	373	373	375	374,2	167	184	173	174	176	174,8
11	354	359	354	359	359	357,0	212	208	210	200	214	208,8
12	377	373	377	375	377	375,8	254	240	249	257	230	246,0
média =						371,33						214,45
dp =						8,80						23,39

Crest												
Blocos	média					média					média	
1	377	368	377	377	370	373,8	209	264	190	241	193	219,4
2	375	370	377	377	377	375,2	236	258	193	209	238	226,8
3	363	361	377	356	361	363,6	222	228	193	209	274	225,2
4	380	375	370	370	373	373,6	198	226	216	234	227	220,2
5	375	373	373	375	375	374,2	249	229	246	194	225	228,6
6	380	375	375	375	373	375,6	249	220	239	234	200	228,4
7	380	373	373	380	373	375,8	236	287	227	198	241	237,8
8	380	380	380	375	377	378,4	200	214	236	252	212	222,8
9	377	377	375	373	377	375,8	207	210	239	210	224	218,0
10	356	356	359	361	361	358,6	208	202	198	210	227	209,0
11	363	359	363	363	361	361,8	228	228	227	212	214	221,8
12	352	352	356	352	356	353,6	219	204	220	214	218	215,0
média =						370,00						222,75
dp =						8,25						7,42

ANEXO M

Dureza em secção longitudinal em diferentes profundidades (Δ KHN)

Placebo															
	5 μ m	10 μ m	15 μ m	20 μ m	25 μ m	30 μ m	40 μ m	50 μ m	70 μ m	90 μ m	110 μ m	130 μ m	220 μ m	330 μ m	Δ KHN
1	95,1	22,7	8,6	8,6	8,6	17,1	234,6	251,5	270,0	274,9	307,5	332,6	339,4	339,4	10390,3
2	66,9	20,4	13,3	11,5	13,9	11,8	11,4	98,2	167,3	296,0	301,7	326,1	319,7	332,6	12244,5
3	76,9	40,7	21,3	22,8	12,7	11,0	113,7	196,8	307,5	319,7	332,6	339,4	339,4	339,4	10545,3
4	67,5	27,5	8,9	8,9	8,9	17,6	17,6	169,7	219,9	307,5	332,6	332,6	326,1	326,1	11697,3
5	99,3	45,3	42,4	36,7	36,2	74,0	165,0	177,2	247,2	247,2	280,0	319,7	339,4	353,5	10321,8
6	98,2	52,0	16,9	14,5	12,2	13,5	64,0	67,5	196,8	296,0	307,5	332,6	326,1	332,6	11832,8
7	74,7	44,0	48,8	29,3	68,1	52,4	185,2	212,9	216,3	238,9	313,5	332,6	339,4	326,1	10414,8
8	64,5	19,5	9,2	9,6	14,2	11,9	145,9	234,9	216,3	234,9	301,7	326,1	332,6	332,6	11342,3
9	46,3	11,4	13,9	15,7	68,7	87,5	190,9	167,3	243,0	301,7	307,5	319,7	326,1	326,1	9998,5
10	95,1	88,4	14,9	14,9	16,9	15,5	153,9	185,2	223,5	243,0	251,5	319,7	326,1	339,4	11275,0
11	79,9	22,0	20,0	38,7	38,7	60,2	149,8	231,0	234,9	238,9	319,7	332,6	339,4	346,3	11090,3
12	82,3	32,1	21,5	28,4	38,5	64,0	167,3	172,2	203,0	234,9	339,4	319,7	339,4	326,1	10805,8
média	78,9	35,5	20,0	20,0	28,1	36,4	133,3	180,4	228,8	269,5	307,9	327,8	332,8	335,0	10996,5
dp	16,2	20,8	12,9	10,9	21,9	28,8	69,2	53,8	36,1	32,9	24,2	6,9	7,5	8,9	697,5

Grupo 0F+0,25															
	5 μ m	10 μ m	15 μ m	20 μ m	25 μ m	30 μ m	40 μ m	50 μ m	70 μ m	90 μ m	110 μ m	130 μ m	220 μ m	330 μ m	Δ KHN
1	70,6	68,1	37,2	31,9	28,6	26,2	41,5	196,8	234,9	260,5	326,1	332,6	339,4	339,4	11213,0
2	51,2	59,7	59,2	30,0	17,4	7,4	11,4	53,6	179,8	182,5	301,7	319,7	332,6	326,1	12689,5
3	106,2	98,2	91,2	50,4	47,7	38,5	41,5	32,7	216,3	290,5	326,1	339,4	346,3	346,3	11577,3
4	87,5	76,1	51,6	72,0	70,0	67,5	88,4	66,3	182,5	301,7	313,5	307,5	339,4	346,3	11518,3
5	51,6	41,8	30,9	22,0	26,7	20,7	61,3	107,4	251,5	270,0	326,1	319,7	339,4	332,6	11792,0
6	56,8	19,7	20,4	13,1	25,7	14,4	56,8	158,2	251,5	270,0	313,5	319,7	346,3	332,6	12044,3
7	100,4	86,6	27,5	17,1	19,4	24,8	24,8	212,9	260,5	265,2	319,7	332,6	346,3	332,6	11294,8
8	129,9	25,0	20,5	23,3	13,9	28,8	126,7	243,0	290,5	307,5	313,5	326,1	332,6	339,4	10010,8
9	99,3	60,2	14,9	13,5	13,5	13,7	14,9	158,2	212,9	251,5	326,1	332,6	332,6	346,3	11816,3
10	73,3	47,0	46,6	19,3	22,8	33,3	35,3	169,7	265,2	247,2	313,5	332,6	332,6	332,6	11278,8
11	68,1	36,7	32,9	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	219,9	270,0	290,5	319,7	339,4	332,6	13002,8
12	94,1	54,5	22,1	12,8	12,9	12,9	16,2	47,7	223,5	290,5	313,5	339,4	346,3	339,4	12740,0
média=	82,4	56,1	37,9	26,4	25,9	25,0	44,2	121,5	232,4	267,3	315,3	326,8	339,4	337,2	11748,1
dp=	24,5	23,8	21,6	18,1	17,1	16,4	35,0	78,1	33,2	32,7	10,9	9,7	5,8	6,7	817,5

Grupo 0F+0,5															
	5 μ m	10 μ m	15 μ m	20 μ m	25 μ m	30 μ m	40 μ m	50 μ m	70 μ m	90 μ m	110 μ m	130 μ m	220 μ m	330 μ m	Δ KHN
1	188,1	131,9	98,2	89,3	86,6	85,7	134,1	199,0	231,0	265,2	296,0	328,0	332,6	326,1	8791,3
2	108,6	145,9	116,5	91,2	81,5	40,7	40,9	129,9	206,3	243,0	296,0	319,7	339,4	346,3	10095,0
3	199,6	191,8	75,4	66,3	119,9	118,1	136,3	221,1	269,8	289,8	328,0	326,1	326,1	326,1	7591,0
4	188,0	142,1	111,1	113,7	70,0	102,7	158,2	260,5	274,9	301,7	326,1	332,6	353,5	353,5	7507,8
5	191,8	168,0	71,6	77,0	85,3	107,4	179,8	207,8	263,7	296,8	328,0	326,1	332,6	339,4	7766,0
6	175,2	155,9	94,6	87,5	88,7	90,9	129,9	203,7	249,1	279,3	314,8	326,5	336,8	338,3	8515,8
7	172,2	126,7	111,1	108,6	115,1	160,4	216,3	243,0	265,9	285,2	301,7	332,6	332,6	339,4	7361,0
8	162,7	109,9	77,6	65,7	50,4	74,0	133,2	231,0	265,2	270,0	326,1	313,5	339,4	332,6	8748,8
9	128,3	87,5	85,7	68,7	144,0	193,8	234,9	260,5	301,7	313,5	319,7	326,1	332,6	346,3	6928,3
10	119,3	71,3	103,8	75,4	84,0	151,9	199,0	203,0	243,0	280,0	319,7	332,6	339,4	332,6	8153,0
11	174,7	167,3	156,0	165,0	101,5	116,5	179,8	260,5	285,2	326,1	280,0	313,5	326,1	326,1	6557,0
12	151,9	64,0	58,7	58,7	58,7	231,0	260,5	290,5	255,9	313,5	313,5	313,5	326,1	326,1	7278,5
média=	163,4	130,2	96,7	88,9	90,5	122,8	166,9	225,9	259,3	288,7	312,5	324,2	334,8	336,1	7941,1
dp=	30,1	40,2	25,9	29,4	26,4	53,3	58,5	42,0	25,1	23,4	15,6	7,4	7,8	9,4	974,6

Grupo 0F+1,0															
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	129,9	54,5	39,5	38,0	22,1	19,6	36,7	131,6	313,5	274,9	280,0	319,7	332,6	332,6	10762,3
2	156,0	61,8	28,6	27,2	19,7	46,0	76,1	122,2	307,5	326,1	313,5	326,1	332,6	332,6	10265,5
3	156,0	106,2	23,7	35,1	44,3	46,0	199,9	212,9	265,2	307,5	319,7	307,5	332,6	332,6	9394,5
4	128,3	99,3	93,1	128,3	99,3	106,2	105,0	156,0	223,5	243,0	346,3	332,6	332,6	346,3	9517,5
5	140,9	80,7	41,8	38,7	30,0	22,3	131,6	247,2	280,0	285,2	339,4	332,6	332,6	339,4	9811,8
6	149,8	81,5	66,9	42,4	84,0	101,5	138,4	209,5	251,5	296,0	326,1	319,7	346,3	326,1	9152,3
7	182,5	125,2	65,1	94,1	48,1	53,2	72,0	190,9	231,0	274,2	296,0	326,1	334,9	334,9	9657,0
8	95,1	52,0	35,8	31,7	43,7	73,1	119,3	172,2	307,5	274,9	270,0	326,1	334,9	334,9	10223,5
9	100,4	95,1	23,7	35,1	35,3	20,2	27,6	138,4	196,8	326,1	346,3	326,1	332,6	326,1	11201,8
10	39,3	20,4	31,3	34,0	41,8	72,0	167,3	177,2	219,9	251,5	313,5	326,1	332,6	332,6	10556,3
11	73,3	97,2	83,2	79,1	54,1	38,2	42,4	89,3	151,9	285,2	270,0	332,6	332,6	326,1	11325,3
12	63,4	58,2	31,7	27,6	32,9	39,8	47,7	179,8	313,5	296,0	313,5	346,3	332,6	332,6	10416,8

média= **117,9** **77,7** **47,0** **50,9** **46,3** **53,2** **97,0** **168,9** **255,2** **286,7** **311,2** **326,8** **334,1** **333,1** **10190,4**
dp= 43,5 29,2 23,9 32,0 23,7 29,5 55,5 44,1 52,1 25,8 27,3 9,3 3,9 5,8 702,0

	Grupo 0F+2,0														
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	67,5	44,6	34,8	29,3	60,7	82,3	105,0	212,9	223,5	234,9	285,2	326,1	332,6	319,7	10564,3
2	89,3	70,6	93,1	94,1	89,3	102,7	209,5	223,5	265,2	274,9	280,0	332,6	326,1	326,1	8545,0
3	113,7	77,6	59,2	48,1	88,4	98,2	138,4	151,6	251,5	296,0	326,1	332,6	326,1	326,1	9323,0
4	72,6	54,5	55,9	51,6	70,6	169,7	182,5	156,0	260,5	301,7	319,7	326,1	332,6	332,6	9004,0
5	117,8	54,1	45,3	73,3	78,4	89,3	227,2	260,5	280,0	290,5	296,0	313,5	326,1	326,1	8415,8
6	106,2	71,3	49,2	48,8	55,9	99,3	102,7	125,2	255,9	301,7	313,5	319,7	326,1	332,6	9964,3
7	83,2	99,3	68,7	56,8	71,3	46,0	75,4	285,2	296,0	296,0	332,6	346,3	353,5	360,9	9459,5
8	25,7	23,2	34,0	66,9	64,5	126,7	179,8	219,9	251,5	319,7	332,6	339,4	346,3	353,5	9473,3
9	84,5	61,9	55,0	58,6	72,4	101,8	152,6	204,4	260,5	289,4	310,7	329,5	333,7	334,7	9366,9
10	23,8	45,6	46,3	66,3	60,2	68,1	149,8	227,2	270,0	290,5	296,0	326,1	326,1	326,1	9460,8
11	99,3	57,3	47,7	92,1	136,7	151,9	165,0	234,9	290,5	307,5	313,5	326,1	339,4	339,5	8252,3
12	123,7	76,1	84,0	85,7	120,7	123,7	144,0	212,9	227,2	234,9	313,5	319,7	346,5	346,5	9098,5

média= **83,9** **61,3** **56,1** **64,3** **80,8** **105,0** **152,7** **209,5** **261,0** **286,5** **310,0** **328,1** **334,6** **335,4** **9244,0**
dp= 32,7 19,6 18,1 19,5 24,9 34,3 44,3 45,7 22,0 26,4 17,4 8,9 9,7 12,5 651,3

	Grupo 0F+3,0														
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	40,0	55,0	88,4	102,7	109,9	112,4	116,5	165,0	169,7	265,2	270,0	332,6	326,1	326,1	9908,8
2	17,7	20,5	44,6	90,2	119,3	142,1	172,2	182,5	231,0	247,2	274,9	326,1	332,6	332,6	9632,3
3	17,7	21,1	42,4	74,7	79,9	100,4	160,4	212,9	234,0	260,5	285,2	326,1	332,6	332,6	9897,3
4	33,5	34,8	42,1	58,7	95,1	98,2	101,5	147,8	174,7	219,9	270,0	332,6	332,6	332,6	11163,8
5	60,2	91,2	99,3	72,9	83,2	77,6	149,8	190,9	227,2	251,5	290,5	313,5	332,6	332,6	9736,0
6	40,9	78,4	82,3	83,2	86,6	122,2	133,2	188,0	238,9	285,2	307,5	319,7	346,3	326,1	9386,0
7	58,7	61,8	76,9	87,5	94,1	96,1	105,0	138,4	216,3	238,9	280,0	319,7	339,4	346,3	10204,3
8	26,1	28,9	29,8	30,5	32,7	39,8	91,2	145,9	196,8	238,9	260,5	326,1	332,6	332,6	11758,8
9	37,7	38,2	55,9	74,0	103,8	107,4	115,1	138,4	151,9	209,5	247,7	332,6	326,1	326,1	10979,0
10	42,2	28,8	46,7	67,8	107,4	123,7	134,9	158,2	165,0	274,9	285,2	332,6	339,4	339,4	10784,0
11	68,7	93,1	98,2	123,7	126,7	136,7	83,2	172,2	190,9	265,2	274,9	307,5	326,1	326,1	9217,5
12	30,9	42,1	38,0	66,3	82,3	72,6	93,1	100,4	216,3	238,9	296,0	307,5	326,1	326,1	10906,0

média= **39,5** **49,5** **62,1** **77,7** **93,4** **102,4** **121,3** **161,7** **201,1** **249,7** **278,5** **323,1** **332,7** **331,6** **10297,8**
dp= 16,2 26,2 25,2 23,1 24,3 28,9 28,8 30,2 30,3 22,1 16,0 9,5 6,4 6,3 799,6

	Grupo 250F+0,25														
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	133,0	116,2	116,5	98,2	95,1	116,5	98,2	199,9	206,3	270,0	326,1	326,1	326,1	332,6	8572,8
2	126,7	116,5	115,1	113,7	101,5	91,2	100,4	129,9	265,9	307,5	307,5	332,6	326,1	326,1	8720,0
3	147,8	133,2	112,8	111,1	116,3	79,9	79,9	265,2	238,9	280,0	319,8	313,5	332,6	326,1	8307,0
4	216,3	101,5	79,9	93,1	89,9	109,7	99,4	212,1	296,3	307,5	319,7	326,1	332,6	339,4	8212,8
5	191,8	188,1	112,8	101,8	109,5	116,3	109,5	190,9	251,9	280,0	328,0	328,0	326,1	332,6	7796,5
6	114,5	109,5	109,5	125,7	136,3	145,8	191,8	251,9	313,5	326,1	332,6	339,4	346,3	353,5	6799,3
7	177,6	171,7	136,3	125,2	140,9	112,8	92,4	199,6	241,0	296,8	328,0	339,4	326,1	313,5	7837,5
8	190,9	112,4	98,2	107,4	75,4	60,9	71,6	177,6	223,5	319,7	311,8	328,0	326,1	339,4	8898,0
9	206,2	133,2	99,3	92,4	140,9	116,3	93,6	164,9	290,5	301,7	307,5	326,1	332,6	332,6	8082,0
10	184,9	188,1	186,6	181,0	174,5	109,5	125,7	207,8	289,7	307,5	339,4	332,6	326,1	326,1	6637,3
11	185,2	103,8	93,1	96,1	127,7	91,8	98,2	164,9	276,2	313,5	319,7	332,6	346,3	339,4	8218,8
12	193,8	227,2	206,2	113,7	115,1	107,9	131,6	231,0	270,0	319,7	301,7	326,1	339,4	332,6	6881,0

média= **172,4** **141,8** **122,2** **113,3** **118,6** **104,9** **107,7** **199,6** **263,6** **302,5** **320,2** **329,2** **332,2** **332,8** **7913,6**
dp= 33,3 41,4 37,6 24,2 27,2 21,5 31,3 38,2 32,1 17,7 11,3 6,9 7,8 9,8 761,3

	Grupo 250F+0,5														
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	263,9	243,0	243,0	219,9	243,0	285,2	285,2	296,0	301,7	332,6	326,1	326,1	332,6	339,4	2744,5
2	263,9	219,9	199,9	206,3	234,9	274,9	326,1	307,5	326,1	326,1	326,1	326,1	332,6	339,4	2721,5
3	296,5	219,9	212,9	203,0	247,0	274,9	319,7	326,1	326,1	326,1	332,6	332,6	326,1	339,4	2470,0
4	236,5	224,4	213,1	238,9	203,0	174,7	219,9	234,9	296,0	326,1	326,1	326,1	332,6	339,4	4243,4
5	249,7	256,6	260,5	243,0	216,3	247,2	185,2	260,5	326,1	326,1	332,6	332,6	339,4	332,6	3258,0
6	265,2	260,5	223,5	234,9	206,2	234,9	238,9	251,5	326,1	339,4	326,1	326,1	339,4	326,1	3579,8
7	305,4	296,4	234,9	238,9	216,3	255,9	270,0	326,1	326,1	326,1	326,1	326,1	330,5	330,5	2272,8
8	275,9	247,2	230,2	222,2	231,5	267,6	277,2	303,2	321,2	327,4	328,7	328,7	353,5	346,3	2751,9
9	314,9	271,5	255,9	209,5	196,8	243,0	290,5	326,1	326,1	332,6	326,1	326,1	326,1	326,1	2475,0
10	314,9	287,7	234,9	227,7	219,9	247,2	280,0	290,9	319,7	339,4	332,6	326,1	329,3	332,6	2654,0
11	296,4	207,9	213,2	230,7	236,5	271,5	314,9	335,8	324,8	335,2	335,2	326,1	332,6	319,7	2606,5
12	279,4	256,6	255,9	265,2	247,2	301,7	326,1	326,1	332,6	332,1	332,6	332,6	332,6	332,6	1636,3

média= **280,2 249,3 231,5 228,4 224,9 256,6 277,8 298,7 321,1 330,8 329,2 327,9 333,9 333,7 2784,5**
dp= 25,6 27,8 19,7 17,7 17,5 32,2 44,2 33,4 10,9 5,2 3,6 2,9 7,4 7,5 661,6

Grupo 250F+1,0															
	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	25 µm	30 µm	40 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	130 µm	220 µm	330 µm	ΔKHN
1	179,8	193,8	223,5	188,0	238,9	177,2	164,3	247,2	290,6	319,7	326,1	332,6	339,4	339,4	4986,8
2	197,9	188,0	206,2	212,5	234,9	174,7	209,5	223,5	326,1	319,7	326,1	326,1	326,1	326,1	4519,5
3	207,9	184,1	172,2	177,2	227,2	188,0	274,9	231,0	290,5	313,5	326,1	326,1	326,1	326,1	4677,0
4	216,3	193,8	209,5	179,8	162,7	167,3	193,8	243,0	255,9	285,2	326,1	332,6	332,6	332,6	5656,5
5	188,6	179,9	177,2	174,2	147,8	179,8	206,2	243,0	285,2	307,5	326,1	326,1	326,1	326,1	5514,3
6	193,1	188,6	193,1	216,3	216,3	243,0	243,0	260,3	319,7	326,1	326,1	326,1	332,6	332,6	3975,0
7	223,5	247,2	227,2	231,0	219,9	209,5	234,9	270,0	274,9	290,5	326,1	326,1	339,4	346,1	3905,5
8	230,3	193,1	196,8	188,0	188,0	209,5	216,3	234,9	301,7	296,0	326,1	339,7	339,4	353,0	5132,5
9	224,4	206,2	188,6	169,7	177,2	145,9	227,2	247,2	280,0	313,5	326,1	326,1	339,4	326,1	5151,3
10	213,2	207,9	175,8	177,2	164,3	179,4	251,5	274,9	313,5	319,7	332,6	326,1	332,6	339,4	4622,1
11	218,7	213,3	202,8	203,0	179,9	247,2	251,5	280,0	301,7	324,8	324,8	339,4	353,5	339,4	3860,3
12	217,2	231,0	216,3	205,6	213,1	209,1	222,9	239,6	315,8	313,9	326,1	330,6	332,7	339,4	4223,5

média= **209,2 202,2 199,1 193,5 197,5 194,2 224,7 249,5 296,3 310,8 326,5 329,8 335,0 335,5 4685,3**
dp= 15,9 20,1 18,5 19,6 31,2 30,3 29,6 17,9 20,7 13,4 1,9 5,2 7,9 8,8 616,2

Grupo 250F+2,0															
	5 mm	10 mm	15 mm	20 mm	25 mm	30 mm	40 mm	50 mm	70 mm	90 mm	110 mm	130 mm	220 mm	330 mm	DKHN
1	109,5	134,1	156,0	167,3	128,3	188,0	251,5	255,9	290,5	313,5	326,1	346,3	332,6	339,4	6295,5
2	77,0	107,1	140,9	150,9	195,6	177,2	234,9	243,0	251,9	301,7	307,5	319,7	339,4	339,4	6580,0
3	104,8	88,7	109,9	158,2	193,8	209,5	206,5	247,2	255,9	296,0	313,5	332,6	339,4	353,5	6990,5
4	101,8	97,6	116,3	153,6	140,9	188,1	188,0	247,2	280,0	296,0	319,7	332,6	326,1	339,4	6715,3
5	147,8	188,0	76,1	280,0	112,4	111,1	219,9	255,9	296,0	290,5	285,2	346,3	319,7	332,6	6504,3
6	95,1	203,0	188,0	165,0	290,5	223,5	179,8	234,9	234,9	260,5	301,7	360,9	368,5	353,5	5672,5
7	92,5	119,3	144,0	134,9	165,0	177,2	193,8	296,0	307,5	296,0	319,7	326,1	332,6	332,6	6300,8
8	115,2	123,9	126,7	119,4	123,7	120,7	145,9	179,8	307,5	307,5	332,6	326,1	332,6	339,4	7572,5
9	167,3	117,8	138,4	140,2	117,8	182,5	238,9	270,0	274,9	290,5	319,7	332,6	326,1	332,6	6411,0
10	59,7	102,7	117,8	123,7	174,7	179,8	223,5	260,5	296,0	307,5	313,5	332,6	326,1	332,6	6635,0
11	90,2	75,4	145,9	147,8	196,8	193,8	265,2	251,5	270,0	332,6	326,1	332,6	332,6	332,6	6031,8
12	109,9	147,8	109,9	131,6	158,2	188,0	177,2	182,5	255,9	301,7	326,1	326,1	332,6	339,4	6951,0

média= **105,9 125,5 130,8 156,1 166,5 178,3 210,4 243,7 276,8 299,5 316,0 334,5 334,0 338,9 6555,0**
dp= 28,9 38,2 28,2 42,0 49,8 32,2 34,8 33,0 23,6 16,9 13,0 11,4 12,2 7,5 488,3

	Grupo 250F+3,0														
	5 mm	10 mm	15 mm	20 mm	25 mm	30 mm	40 mm	50 mm	70 mm	90 mm	110 mm	130 mm	220 mm	330 mm	DKHN
1	100,4	158,2	162,7	185,2	129,9	196,8	162,7	174,7	255,9	274,9	301,7	319,7	332,6	332,6	6874,5
2	69,4	64,0	160,4	136,7	179,8	153,9	231,0	280,0	307,5	313,5	326,1	319,7	326,1	339,4	6613,3
3	60,2	57,1	63,0	109,5	149,8	172,2	219,9	223,5	280,0	319,8	319,8	353,5	339,4	339,4	7908,5
4	91,2	86,6	144,0	162,7	129,9	188,0	280,0	269,8	289,7	304,2	313,5	326,1	339,4	353,5	6416,0
5	66,7	58,9	79,9	123,7	136,7	140,2	207,8	188,1	257,7	282,8	285,2	328,0	339,4	332,6	8561,8
6	69,1	92,4	112,8	127,7	136,3	140,9	150,9	207,8	203,9	289,7	304,2	313,5	339,4	346,3	8165,3
7	123,7	89,9	100,4	103,3	91,2	99,3	131,6	140,2	238,9	280,0	313,5	326,1	339,4	339,4	9235,3
8	72,0	70,6	74,7	113,7	137,5	150,7	214,1	220,3	274,8	296,0	313,5	326,1	346,3	339,4	8166,6
9	97,6	82,9	100,4	133,2	123,7	149,8	196,8	223,5	313,5	319,7	301,7	332,6	326,1	339,4	7312,8
10	133,2	111,1	153,9	142,1	129,9	129,9	140,2	231,0	296,0	307,5	319,7	326,1	332,6	332,6	7159,5
11	97,2	129,9	153,9	162,7	149,8	142,1	203,0	255,9	280,0	326,1	319,7	332,6	332,6	332,6	6603,0
12	87,5	113,7	145,9	162,0	162,0	171,1	184,5	209,5	304,2	307,5	313,5	328,0	326,1	332,6	6579,5

média= **89,0 92,9 121,0 138,5 138,0 152,9 193,5 218,7 275,2 301,8 311,0 327,7 335,0 338,3 7466,3**
dp= 23,0 30,6 36,6 25,2 21,7 26,5 42,5 39,5 31,8 17,0 11,1 9,8 6,6 6,5 921,2

	250F														
	5 μm	10 μm	15 μm	20 μm	25 μm	30 μm	40 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	130 μm	220 μm	330 μm	ΔKHN
1	149,8	138,4	106,2	129,9	64,0	77,6	92,1	149,8	227,2	285,2	301,7	319,7	332,6	332,6	8904,0
2	131,6	100,4	96,1	88,4	116,5	172,2	167,3	206,2	260,5	255,9	313,5	332,6	326,1	339,4	8068,8
3	164,3	149,8	116,5	103,8	96,1	100,4	122,2	188,0	274,9	290,5	290,5	332,6	346,3	332,6	8764,0
4	150,6	151,9	129,9	116,5	100,4	100,4	149,8	188,0	247,2	255,9	307,5	313,5	326,1	332,6	8264,3
5	160,7	140,2	97,2	70,0	81,5	70,0	87,5	255,9	251,5	301,7	319,7	326,1	332,6	332,6	8521,3
6	179,9	134,9	126,7	102,7	136,7	83,2	126,7	206,2	274,9	265,2	290,5	326,1	326,1	339,4	8331,0
7	98,2	113,7	144,0	119,3	199,9	140,2	185,2	280,0	274,9	285,2	313,5	326,1	332,6	326,1	6774,0
8	147,4	144,0	147,8	123,7	109,9	131,6	188,0	216,3	251,5	270,0	313,5	326,1	339,4	339,4	7636,0
9	160,7	145,9	100,4	75,4	79,9	77,6	117,8	227,2	251,1	265,2	296,0	326,1	332,6	346,3	8714,8
10	144,4	123,5	112,4	95,1	102,7	98,2	106,2	151,9	260,5	280,0	307,5	319,7	326,1	319,7	8409,3
11	118,4	86,6	99,3	145,9	128,3	193,8	285,2	296,0	301,7	313,5	307,5	319,7	339,4	339,4	6832,0
12	127,9	169,7	138,4	101,5	102,7	199,9	216,3	209,5	216,3	243,0	339,4	313,5	332,6	326,1	7358,8

média= **144,5** **133,3** **117,9** **106,0** **109,9** **120,4** **153,7** **214,6** **257,7** **275,9** **308,4** **323,5** **332,7** **333,9** **8048,2**
dp= 22,4 23,4 18,9 22,3 34,9 46,5 58,0 45,2 22,8 20,5 13,5 6,3 6,4 7,4 733,5

	500F														
	5 μm	10 μm	15 μm	20 μm	25 μm	30 μm	40 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	130 μm	220 μm	330 μm	ΔKHN
1	175,8	156,0	140,2	123,7	140,2	153,9	188,0	231,0	265,2	290,5	307,5	332,6	332,6	326,1	7041,0
2	179,8	167,3	147,8	172,2	172,2	196,8	185,2	227,2	260,5	301,7	332,6	332,6	339,4	326,1	6194,5
3	197,9	185,2	140,2	140,2	177,2	216,3	285,2	274,9	290,5	307,5	332,6	332,6	346,3	339,4	5217,8
4	179,9	179,8	179,8	196,8	190,9	199,9	223,5	260,5	265,3	296,0	326,1	332,6	353,5	339,4	5240,0
5	191,3	170,3	149,8	199,9	216,3	212,9	216,3	238,9	265,2	326,1	332,6	339,4	346,3	339,4	5179,3
6	182,5	167,3	125,2	125,2	125,2	167,3	265,2	251,5	265,2	326,1	326,1	332,6	332,6	319,7	6105,0
7	197,9	175,8	185,2	153,9	185,2	182,5	231,0	265,2	301,7	326,1	332,6	346,3	332,6	326,1	5108,3
8	179,8	120,7	111,1	142,1	151,9	172,2	193,8	216,3	270,0	296,0	326,1	332,6	339,4	326,1	6832,3
9	205,0	199,9	193,8	212,9	162,7	177,2	158,2	165,0	274,9	332,6	332,6	332,6	339,4	346,3	5900,0
10	188,6	165,0	147,8	144,0	162,7	190,9	212,9	199,9	251,5	313,5	326,6	339,4	326,1	353,5	6421,0
11	182,5	147,8	169,7	156,0	117,8	147,8	193,8	234,9	290,5	307,5	332,6	339,4	326,1	332,6	6683,3
12	193,8	171,8	160,7	120,7	126,7	133,2	197,9	247,9	287,7	314,9	335,2	332,6	335,6	335,2	6565,0

média= **187,9** **167,2** **154,3** **157,3** **160,8** **179,2** **212,6** **234,4** **274,0** **311,5** **328,6** **335,4** **337,5** **334,2** **6040,6**
dp= 9,2 19,8 24,6 31,5 29,8 25,8 35,4 30,4 15,1 14,0 7,4 4,6 8,3 9,9 703,0

1.100F															
	5 μm	10 μm	15 μm	20 μm	25 μm	30 μm	40 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	130 μm	220 μm	330 μm	ΔKHN
1	219,9	216,3	188,0	182,5	255,9	280,0	296,0	301,7	313,5	319,7	332,6	326,1	322,6	332,6	3318,3
2	196,8	144,0	160,4	149,8	188,0	265,2	307,5	319,7	326,1	332,6	332,6	339,4	346,3	332,6	4193,8
3	196,8	193,8	174,7	167,4	169,7	212,9	265,2	274,9	307,5	313,5	332,6	332,6	326,1	339,4	4908,5
4	247,2	234,9	190,9	190,9	199,9	223,5	243,0	251,5	285,2	326,1	332,1	332,6	353,5	332,6	4277,3
5	271,5	216,3	199,9	206,2	223,5	206,2	243,0	290,5	313,5	326,1	332,6	353,5	346,3	332,6	3831,3
6	256,6	243,0	247,2	196,8	196,8	209,5	251,5	265,2	296,0	332,6	326,1	326,1	332,6	332,6	3817,8
7	224,4	212,9	193,8	182,5	251,5	263,9	270,0	296,0	307,5	319,7	326,1	332,6	339,4	339,4	3602,3
8	243,0	231,0	193,8	203,0	188,0	199,9	285,2	290,5	307,5	313,5	326,1	326,1	332,6	353,5	3820,3
9	193,1	168,0	164,3	162,7	179,8	263,9	319,7	332,6	313,5	326,1	332,6	346,3	339,4	346,3	3809,0
10	236,3	203,0	160,4	185,2	193,0	193,8	265,2	280,0	307,5	332,6	326,6	346,3	326,1	339,4	4469,3
11	230,3	184,1	171,8	197,9	197,9	260,5	274,9	319,7	319,7	332,6	332,6	346,3	332,6	332,6	3927,3
12	243,0	213,2	216,3	206,3	206,2	212,9	251,5	296,0	280,0	326,1	326,1	326,1	326,1	326,1	3839,8

média= **229,9** **205,0** **188,5** **185,9** **204,2** **232,7** **272,7** **293,2** **306,5** **325,1** **329,9** **336,2** **335,3** **336,6** **3984,5**
dp= 24,9 28,7 25,3 18,1 26,7 31,2 25,1 23,5 13,4 7,1 3,3 9,8 9,7 7,4 420,1

	Crest														
	5 μm	10 μm	15 μm	20 μm	25 μm	30 μm	40 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	130 μm	220 μm	330 μm	ΔKHN
1	207,8	172,2	196,8	206,2	216,3	247,2	260,5	285,2	326,1	296,0	319,7	326,1	339,4	339,4	4335,5
2	203,6	177,6	212,9	193,8	193,8	209,5	238,9	265,2	280,0	313,5	326,1	326,1	326,1	339,4	4554,8
3	191,8	212,1	223,5	206,2	174,7	219,9	313,5	290,5	313,5	313,5	326,1	332,6	332,6	332,6	3835,8
4	221,1	199,0	285,2	188,0	234,9	234,9	260,5	290,5	296,0	307,5	307,5	319,7	346,3	339,4	3943,0
5	190,9	172,2	140,2	129,9	169,7	171,7	247,2	280,0	307,5	326,1	326,1	332,6	346,3	332,6	5290,0
6	216,5	203,6	203,0	134,9	116,5	116,5	234,9	301,7	290,8	326,1	326,1	326,1	332,6	326,1	5308,5
7	181,0	162,0	191,8	199,9	196,8	216,3	285,2	280,0	301,7	326,1	326,1	332,6	339,4	332,6	4238,3
8	207,5	181,0	136,3	138,6	195,6	203,6	241,0	282,8	296,8	328,0	328,0	336,6	353,5	339,4	5042,8
9	225,9	207,8	171,7	181,0	195,6	221,1	260,5	276,2	282,8	304,2	328,0	328,0	332,6	326,1	4510,8
10	221,1	195,8	171,7	185,2	195,6	234,9	289,7	319,7	328,0	328,0	336,6	336,6	326,1	332,6	3784,3
11	185,2	209,5	185,2	203,0	296,0	270,0	307,5	319,7	319,7	270,0	332,6	326,1	332,6	339,4	3270,0
12	225,9	212,1	168,0	195,9	225,9	319,8	290,5	304,2	328,0	328,0	328,0	328,0	326,1	346,3	3153,3

média= **206,5** **192,1** **190,5** **180,2** **201,0** **222,1** **269,2** **291,3** **305,9** **313,9** **325,9** **329,3** **336,1** **335,5** **4272,2**
dp= 16,1 18,0 39,8 28,7 42,6 49,6 27,2 17,0 17,2 17,6 7,1 5,0 9,0 6,1 716,0

ANEXO N
pH dos dentifrícios

Dentifrícios				
Grupos	não envelhecidos		envelhecidos	
	média	dp	média	dp
Placebo	8,74	0,01	8,00	0,06
0F+0,25	8,66	0,04	8,04	0,01
0F+0,5	7,45	0,01	6,64	0,01
0F+1,0	7,15	0,01	6,45	0,01
0F+2,0	6,91	0,00	6,24	0,00
0F+3,0	6,85	0,05	6,17	0,01
250F	8,74	0,01	7,66	0,01
250F+0,25	8,60	0,01	7,98	0,06
250F+0,5	8,60	0,00	7,65	0,01
250F+1,0	8,46	0,00	7,08	0,00
250F+2,0	8,03	0,03	6,71	0,00
250F+3,0	7,64	0,02	6,58	0,04
500F	8,79	0,01	6,64	0,01
1100F	8,82	0,02	8,09	0,00
Crest	7,09	0,02	6,57	0,01

ANEXO O

Comitê de ética na experimentação animal



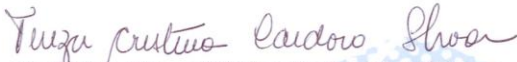
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIO DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADO COM FOSFATO SOBRE O PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE. ESTUDO IN VITRO"** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki** e colaboração de **Danielle Mendes da Camara** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 27/03/2009 de acordo com o protocolo 2009-002506.

Araçatuba, 27 de Março de 2009



Prof.^a Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

Danielle Mendes da Camara