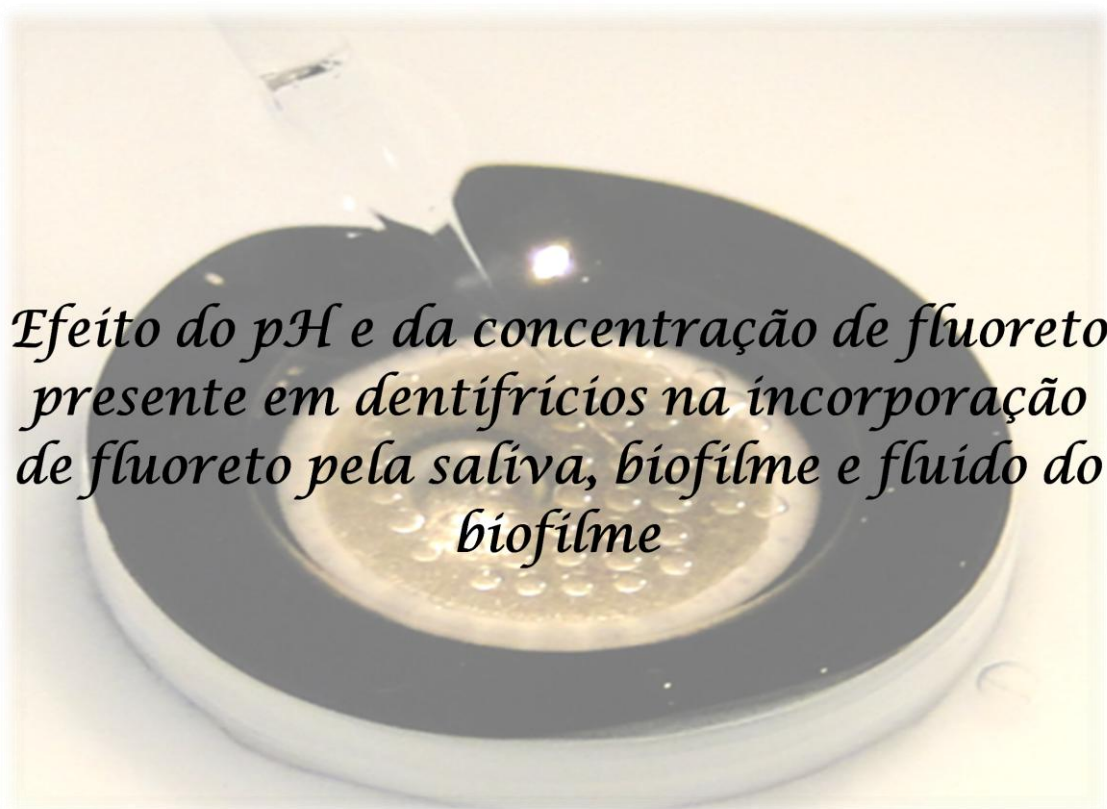


Karina Yuri Kondo



*Efeito do pH e da concentração de fluoreto
presente em dentífrícios na incorporação
de fluoreto pela saliva, biofilme e fluido do
biofilme*

Araçatuba-SP

2013



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Câmpus de Araçatuba

Karina Yuri Kondo

*Efeito do pH e da concentração de fluoreto
presente em dentífrícios na incorporação
de fluoreto pela saliva, biofilme e fluido do
biofilme*

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

Orientador: Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan

Araçatuba-SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

K82e

Kondo, Karina Yuri.

Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios na incorporação de fluoreto pela saliva, biofilme e fluido do biofilme / Karina Yuri Kondo. - Araçatuba : [s.n.], 2013

81 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan

1. Flúor 2. Dentifrícios 3. Placa dentária 4. Saliva I. T.

Black D27
CDD 617.645

DADOS CURRICULARES

KARINA YURI KONDO

Nascimento	28.10.1986 – Bauru /SP
Filiação	Sérgio Aquio Kondo Maria Cristina Miyahara Kondo
2007/2010	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
2011/2013	Curso de Pós - Graduação em Ciência Odontológica - área Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.
Associações	CROSP- Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO- Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica APCD Araçatuba- Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas IADR- International Association for Dental Research

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Sérgio e Cristina,

Meus mais sinceros agradecimentos por tudo que são e representam, pelo amor, sabedoria e compreensão. Por todos os momentos compartilhados de alegrias, tristezas, ensinamentos e aprendizagens. Pela força, união, motivação e confiança em mim depositados ao longo dos anos.

Meu amor e gratidão são eternos!

Ao meu irmão, Vítor,

Por me ajudar, aconselhar e me apoiar com paciência e carinho nesses anos em que convivemos juntos, dividindo muitos momentos, pois só você sabe das alegrias e dificuldades, por conviver tão próximo! Você é muito importante para mim e, sem dúvida esses 5 anos de convivência ficarão guardados e serão lembrados como os melhores de minha vida, com saudade e gratidão!

Aos meus avós, Seizí e Díná,

Pelo esmero em cuidar de nossa família e cultivar esse bem mais valioso, pelo apoio e torcida e, pela presença em nossas vidas!

Amo cada um de vocês!

Agradecimentos Especiais

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan**, minha gratidão por sua orientação nesses anos de Mestrado, transmitindo a mim sabedoria, compartilhando experiências, com muita atenção e paciência. Exemplo de docente competente, dedicado e humano. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas para meu crescimento profissional!*

"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém que nos faça fazer o melhor que pudermos."

Ralph Waldo Emerson

Aos voluntários,

Vitor Kondo, Daniela Oliveira, Jackeline do Amaral, Juliano Pessan, Ana Carolina, Milene, Renata, Taynara Lima, Thiago Aragaki, Renan Fernandes, Luiz Miguel Minani, Kevin Hall, Douglas Monteiro, Marcelle Danelon, Marcelo Moretto, Juliana Kawano, Bruna Martins, Miriam Serrano, Matheus Brasilino, Larissa Álamo, Maria Daniela Basso, Ana Laura dos Santos, Gustavo Síles e André Godas, que participaram, colaboraram e possibilitaram a concretização deste estudo, meu muito obrigada! Seus esforços, dedicação, comprometimento e responsabilidade, foram fundamentais. Meu reconhecimento e agradecimento por tudo e, principalmente pela amizade!

“Não haja medo que a sociedade se desmorone sob um excesso de altruísmo. Não há perigo desse excesso.”

Fernando Pessoa

Agradecimientos

A *Deus*, por minha vida e saúde, por prover forças em dias difíceis, iluminar meus passos e por estar sempre presente, abençoando a mim e à minha família.

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, na pessoa dos professores Ana Maria Pires Soubhia, Diretora e, Wilson Roberto Poi, Vice-Diretor, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado nesta instituição.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, *Dr. Robson, Dr. Alberto, Dr. Juliano, Dra Sandra, Dr. Célio, Dra. Danda, Dra. Cristiane* pela convivência, também pelos conhecimentos compartilhados durante o curso de mestrado, durante as clínicas da Disciplina de “Assistência Odontológica da Criança em Clínica” e Bebê-Clínica.

Ao *Professor Dr. Robson Frederico da Cunha*, por seus conhecimentos compartilhados durante as aulas das Disciplinas de Metodologia do Ensino e Psicologia e pela convivência sempre agradável. Agradeço também pela oportunidade de participação nos trabalhos da Bebê-Clínica. A paixão pelo que faz e competência demonstradas são inspiradores!

Ao *Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan* e à *Profa. Dra. Kikue Takebayashi* pelas aulas de Metodologia Científica I, além dos *professores Dr. Heitor Honório, Dra. Cristina Antoníallí, Dra. Rita Meneghetti, Dra Ana Cláudia Okamoto* e todos os demais que muito contribuíram para minha formação durante o curso de mestrado.

Aos meus amigos *Roshni, Poliana, Luiz, Ricardo e Sérgio*, por todo apoio, compreensão e pela amizade de muitos anos.

Ao *curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do seu coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos funcionários da biblioteca, em especial às bibliotecárias *Ana Paula, Ana Cláudia e Denise*, pela ajuda, paciência e amizade.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelos serviços prestados.

Aos amigos do mestrado em Saúde Bucal da Criança, *Carla Favretto, Nathália Viana, Luciene Castro, Juliana Mendonça, José Antônio, Ana Laura e Fernanda*, pela convivência nesses anos de curso.

Aos amigos do Doutorado em Saúde Bucal da Criança, *Tatiana Uemura, Marcelle Danelon, Jackeline do Amaral, Marcelo Moretto, Maria Daniela Basso, Daniela Oliveira, Danielle Camara, Remberto, Nathália e Michele* pela convivência boa e agradável.

À professora *Maria Cristina Rosifini Alves Rezende*, um exemplo de profissional, sempre altruísta. Obrigada pelas oportunidades que me proporcionou para meu crescimento profissional e pelo companheirismo em Congressos.

À técnica da Disciplina de Odontopediatria, *María dos Santos Ferreira Fernandes* por sua solicitude e ajuda indispensáveis para realização dos trabalhos, sempre que precisei. Obrigada por tudo!

Ao Departamento de Cirurgia, em especial à professora *Alessandra Aranega*, que gentilmente nos concedeu o empréstimo da centrífuga para que pudéssemos prosseguir com as análises.

Ao Laboratório de Bioquímica da FOB – USP/ Bauru, à *Professora Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf* e às técnicas *Thelma* e *Larissa*, que me receberam durante minhas análises em Bauru.

Agradeço também *à todos* que, direta ou indiretamente, contribuíram.

....meus agradecimentos

"O grande líder é aquele que está disposto a desenvolver as pessoas até o ponto em que elas eventualmente o ultrapassem em seu conhecimento e habilidade."

Fred A. Manske

"Quando o caminho a sua frente parecer longo e difícil, lembre-se: as mais longas trajetórias começam com um primeiro passo, então, dê o primeiro passo. Quando chegar lá, comemore e lembre-se de traçar mais uma meta, continue a dar sentido à sua vida, use de seu poder de escolha e vontade e dê novamente o primeiro passo. Isto só depende de você."

Flávio Souza

KONDO, K.Y. **Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios na incorporação de fluoreto pela saliva, biofilme e fluido do biofilme.** 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2013.

RESUMO

O uso de fluoretos tem contribuído para o declínio da prevalência da cárie observado nas últimas décadas, porém um aumento na prevalência da fluorose dentária tem sido observado concomitantemente. Alternativas como a redução do pH e da concentração de fluoreto (F) dos dentifrícios têm sido estudadas na tentativa de melhorar a efetividade clínica dos mesmos, sem afetar sua eficácia anti-cárie. Considerando a escassez de estudos com metodologias *in vivo* avaliando a retenção intrabucal de F após a utilização de formulações aciduladas, o presente estudo avaliou a influência do pH e da concentração de fluoreto (F) de dentifrícios na retenção de F pela saliva, biofilme e fluido do biofilme. Voluntários ($n=22$) utilizaram dentifrícios contendo 0 (Placebo), 550 (DCRF – dentifrício com concentração reduzida de F) e 1100 ppm F (DC – dentifrício convencional), em pH 4,5 e 7,0, e escovaram seus dentes 3 vezes/dia seguindo um protocolo duplo-cego e cruzado. Amostras de saliva e biofilme dentário foram coletadas após 7 dias de uso dos dentifrícios, 1 e aproximadamente 12 horas após a última escovação. As análises de F e cálcio (Ca) foram realizadas com o eletrodo invertido após tamponamento com TISAB III e pelo método Arsenazo III, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA fatorial, teste de Tukey HSD e coeficiente de correlação de Pearson ($p<0,05$). As concentrações de F no fluido do biofilme 1h após a escovação com o DCRF acidulado não diferiram das observadas para o DC neutro, sendo ambas significativamente mais altas que as obtidas com o placebo; este padrão, entretanto, não foi observado para o biofilme e saliva. Observou-se a ausência de um padrão definido para as concentrações de Ca nestes compartimentos, porém correlações significativas foram observadas entre as concentrações de F e Ca na saliva e no biofilme. De acordo com protocolo do estudo, concluiu-se que o pH influenciou na

retenção de F no fluido do biofilme, tendo pouca ou nenhuma influência na retenção no biofilme e na saliva, respectivamente.

Palavras-chave: Flúor. Dentifrícios. Placa dentária. Saliva.

Abstract

KONDO, K.Y. **Effect of pH and fluoride concentration in dentifrices on fluoride uptake by saliva, biofilm and biofilm fluid**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2013.

ABSTRACT

The use of fluorides has contributed to the decline in caries prevalence observed in the last decades, however an increase in the prevalence of dental fluorosis has been observed concomitantly. Alternatives such as the reduction of the pH and fluoride (F) concentration of dentifrices have been studied as an attempt to improve their clinical effectiveness without affecting its anti-caries efficacy. Given the scarcity of *in vivo* studies assessing intraoral fluoride retention after using acidic formulations, the present study evaluated the influence of pH and F concentration of dentifrices on F uptake by saliva, biofilm and biofilm fluid. Volunteers (n = 22) used dentifrices containing 0 (Placebo), 550 (LFD – low-fluoride dentifrice) and 1100 ppm F (CD – conventional dentifrice) at pH 4.5 and 7.0, and brushed their teeth 3 times/day following a double-blind, crossover protocol. Saliva and dental biofilm samples were collected after 7 days of using the dentifrices, 1 and approximately 12 hours after last brushing. F and calcium (Ca) analysis were performed with the inverted electrode after buffering with TISAB III and the Arsenazo III method, respectively. Data were analyzed by factorial ANOVA, Tukey's HSD test and Pearson's correlation coefficient ($p < 0.05$). F concentrations in the biofilm fluid 1h after brushing with acidic LFD were similar to those observed for neutral CD, both being significantly higher than values found for the Placebo; this pattern, however, was not observed for the biofilm and saliva. No defined trend was observed for Ca concentrations in these compartments, but significant correlations were observed between Ca and F concentrations in saliva and in the biofilm. According to the study protocol, it was concluded that pH influenced the uptake of F by the biofilm fluid, having little or no influence on the uptake by the biofilm and saliva, respectively.

Keywords: Fluorine. Dentifrices. Dental plaque. Saliva.

Lísta de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Dentifrícios utilizados no estudo (placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F em pH 4,5 e 7,0)	61
Figura 2 -	Técnica transversal para dispensar o dentifrício na escova (cerdas planas para impedir remoção indesejada de biofilme das faces livres) – referência: Bitufo Flex 0592)	61
Figura 3 -	Kit de tratamento contendo escova dental, dentifrício experimental, copo medidor de 10 mL e fio dental sem flúor	61
Figura 4 -	Confecção de orifício na tampa de um eppendorf com o auxílio de um soldador	65
Figura 5 -	Selamento da ponta da ponteira de 10 µL com calor	65
Figura 6 -	Inserção do óleo mineral na pipeta selada (40µL)	65
Figura 7 -	Óleo mineral na ponteira selada	66
Figura 8 -	Etapas para finalização do conjunto acondicionador do biofilme pós-coleta	66
Figura 9 -	Espátula plástica para transferência do biofilme coletado	66
Figura 10 -	Inserção da espátula plástica no suporte	66
Figura 11 -	Coleta de saliva estimulada por 3 minutos, com auxílio de uma banda de borracha presa ao fio dental	67
Figura 12 -	Saliva estimulada dispensada em um tubo J40, previamente pesado	67

Figura 13 - Saliva coletada e pesada na balança de 4 casas (Adventurer, Ohaus)	67
Figura 14 - Ponteiras 1000 µL cortadas em bisel para confecção das espátulas modificadas para coleta do biofilme	68
Figura 15 - Aspecto final da espátula modificada	68
Figura 16 - Coleta do biofilme das superfícies lisas e proximais de todos os dentes de um hemiarco	68
Figura 17 - Transferência do biofilme da espátula modificada para a espátula plástica	69
Figura 18 - Inserção da espátula com biofilme em óleo mineral: Após coleta do biofilme	69
Figura 19 - Pesagem do conjunto após a coleta do biofilme na balança de 5 casas (Shimadzu)	69
Figura 20 - Centrífuga Combi 514-R	70
Figura 21 - Centrifugação para obtenção do fluido do biofilme: 21023 g/ 4°C/ 5 minutos	70
Figura 22 - Apecto após centrifugação com separação do fluido do biofilme da massa sólida do biofilme total	70
Figura 23 - Aparato utilizado para leitura de F + analisador de íons + bomba à vácuo	71
Figura 24 - Cubeta de teflon (seta amarela) + eletrodo de referência (seta verde) + eletrodo invertido e sua respectiva membrana	71

(seta vermelha) no centro da cubeta	
Figura 25 - Aspecto geral do aparato para utilização de micropipeta de vidro	71
Figura 26 - Suporte e micropipeta de vidro	72
Figura 27 - Transferência do fluido do biofilme com o auxílio de uma micropipeta de vidro para a membrana do eletrodo invertido	72
Figura 28 - Proporção de TISAB III e amostra (1:10) e eletrodo de referência fechando o circuito para leitura do fluido do biofilme	72
Figura 29 - Análise com eletrodo invertido e fechamento do circuito com o eletrodo de referência (leitura das amostras de saliva e biofilme total quanto ao F)	72
Figura 30 - Biofilme na ponteira selada	73
Figura 31 - Corte na ponta da ponteira com auxílio do bisturi	73
Figura 32 - Aspecto final após o corte	73
Figura 33 - Tubo tipo eppendorf para expulsão da massa sólida do biofilme	73
Figura 34 - Placa de 96 poços (TPP test plate)	76
Figura 35 - Placa de 96 poços com água deionizada + amostra + Arsenazo III no leitor de microplacas	76
Figura 36 - Leitor de microplacas acoplado ao computador para obtenção dos valores de cálcio	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	45
Tabela 2 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μM) no fluido do biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	46
Tabela 3 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μM) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	47
Tabela 4 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	48
Tabela 5 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/mL}$) no fluido do biofilme dentário 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	49
Tabela 6 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/mL}$) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0	50
Tabela 7 - Correlação entre as concentrações de fluoreto e cálcio nas amostras de biofilme total, fluido do biofilme e saliva considerando todos os dentifrícios do estudo, pH e tempos de coleta simultaneamente	51
Tabela 8 - Potencial hidrogeniônico (pH) determinado nas suspensões de dentifrícios ($n=3$)	81
Tabela 9 - Concentração de fluoreto ($n=3$) nos dentifrícios utilizados no estudo	81

Lísta de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA = Análise de Variância

Ca = Cálcio

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

°C = Graus Celsius

ceo-s = superfícies cariadas (c), com extração indicada (e) e obturadas (o)

DC = Dentifrício Convencional

DCRF = Dentifrício com concentração reduzida de fluoreto

DP = Desvio padrão

F = Fluoreto

FT = Fluoreto Total

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g = grama

g = Gravidade

h = Hora (s)

HCl = Ácido Clorídrico

HSD = Honestly Significant Difference

NaF = Fluoreto de sódio

NaOH = Hidróxido de Sódio

mL = Mililitro

mL /min = mililitros por minuto

M = Molar

μM = Micromolar

min. = Minuto

mg = Miligrama

nm = nanômetro

$\mu\text{g/g}$ = Micrograma por grama

$\mu\text{g F/g}$ = Micrograma de fluoreto por grama

$\mu\text{g/mL}$ = Micrograma por mililitro

μL = Microlitro

pH = Potencial Hidrogeniônico

ppm F = Parte por milhão de fluoreto

Q.S.P = Quantidade Suficiente Para

rpm = Rotações por minuto

TISAB = Tampão de Ajuste da Força Iônica Total

UNESP = Universidade Estadual Paulista

α = Alfa

β = Beta

p = Probabilidade

SUMÁRIO

1	Introdução	33
2	Material e Método	34
3	Resultados	36
4	Discussão	37
	Referências	41
	Anexos	532

Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios na incorporação de fluoreto pela saliva, biofilme e fluido do biofilme.

Kondo KY, Manarelli MM, Pessan JP

Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

Título curto: Retenção intrabucal de F após uso de dentifrícios acidulados.

Palavras-chave: Flúor. Dentifrícios. Placa Dentária. Saliva.

Correspondência:

Juliano Pelim Pessan

Univ. Estadual Paulista (UNESP)

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua: José Bonifácio 1193

CEP: 16015-050 Araçatuba – SP

Tel: (55) (18) 3636 3274

Fax: (55) (18) 3636 3332

Email: jpessan@foa.unesp.br

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

Resumo

O presente estudo avaliou a influência do pH e da concentração de fluoreto (F) de dentifrícios na retenção de F pela saliva, biofilme e fluido do biofilme. Voluntários ($n=22$) utilizaram dentifrícios contendo 0 (Placebo), 550 (DCRF – dentifrício com concentração reduzida de F) e 1100 ppm F (DC – dentifrício convencional), em pH 4,5 e 7,0, e escovaram seus dentes 3 vezes/dia seguindo um protocolo duplo-cego e cruzado. Amostras de saliva e biofilme dentário foram coletadas após 7 dias de uso dos dentifrícios, 1 e aproximadamente 12 horas após a última escovação. As análises de F e cálcio (Ca) foram realizadas com eletrodo invertido após tamponamento com TISAB III e pelo método Arsenazo III, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA fatorial, teste de Tukey HSD e coeficiente de correlação de Pearson ($p<0,05$). As concentrações de F no fluido do biofilme 1h após a escovação com o DCRF acidulado não diferiram das observadas para o DC neutro, sendo ambas significativamente mais altas que as obtidas com o placebo; este padrão não foi observado para o biofilme e saliva. Observou-se a ausência de um padrão definido para as concentrações de Ca nestes compartimentos, porém correlações significativas foram observadas entre as concentrações de F e Ca na saliva e no biofilme. De acordo com o presente protocolo, concluiu-se que o pH influenciou na retenção de F no fluido do biofilme, tendo pouca ou nenhuma influência no biofilme e na saliva, respectivamente.

1. Introdução

Os dentifrícios fluoretados têm sido considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da fluorose dentária, especialmente quando dentifrícios contendo 1000 ppm F ou mais são utilizados por crianças menores de 6 anos de idade [Wong et al., 2010]. Dessa forma, a redução da concentração de fluoreto (F) nos mesmos seria uma alternativa para se minimizar a ingestão de fluoreto por esta fonte, embora não existam evidências e nem um consenso na comunidade científica quanto à eficácia dos dentifrícios com concentração reduzida de fluoreto (DCRF) [Walsh et al., 2010].

Com o objetivo de se aumentar a reatividade do dentifrício, desenvolveu-se diferentes formulações de DCRF e pH acidulado, cuja efetividade foi atestada em estudos com diferentes protocolos [Gerdin, 1974; Petersson et al., 1989; Negri e Cury, 2002; Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007; Nobre-dos-Santos et al., 2007; Buzalaf et al., 2009]. Mais recentemente, a efetividade de um DCRF (550 ppm F) em pH acidulado foi avaliada em um estudo clínico randomizado, no qual foi demonstrado que o incremento de ceo-s em crianças utilizando este dentifrício foi semelhante ao observado para crianças utilizando formulações contendo 1100 ppm F, independente do pH [Vilhena et al., 2010].

No entanto, a literatura ainda é escassa quanto a estudos avaliando o uso dessas formulações, especialmente relacionado à retenção intrabucal (saliva, biofilme e fluido do biofilme) de F. Embora as concentrações de F na saliva [Olympio et al., 2007] e no biofilme [Buzalaf et al., 2009] resultantes do uso destas formulações tenham sido avaliadas, não existem informações quanto a concentração de F no fluido do biofilme após o uso de DCRF aciduladas.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do pH e da concentração de F de dentifrícios na retenção de F na saliva, no biofilme total, bem como no fluido do biofilme. A hipótese do estudo foi a de que o uso de um DCRF em pH acidulado promoveria aumentos na concentração de F no biofilme e fluido do biofilme semelhantes aos observados após o uso de um dentifrício convencional (DC, 1100 ppm F) em pH neutro. Também foram avaliadas as concentrações de cálcio nos 3 compartimentos bucais, uma vez que não existem informações disponíveis após o uso de formulações aciduladas.

2. Material e Método

Foram recrutados voluntários na faixa etária entre 21 a 40 anos, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, com número de processo FOA – 01421/2011 (Anexo B). O tamanho da amostra foi estabelecido em 15 indivíduos para se obter diferença significativa na concentração de F no biofilme dentário utilizando-se dentifrícios sem e com F, resultando em uma força de 80 % (β) e $\alpha = 0,05$ [Pessan et al., 2008]. Considerando eventuais perdas devido ao delineamento cruzado do estudo, optou-se por incluir 24 voluntários.

Após a dosagem dos dentifrícios quanto ao fluoreto total [Delbem et al., 2002] (Anexo E) - e pH [Moretto et al., 2010] (Anexo F), o estudo se iniciou com uma profilaxia dental (pasta Odahcam Dentsplay, sem F) e raspagem periodontal (quando necessário), bem como com a entrega do kit de tratamento (Anexo C) e a pasta com as orientações aos voluntários (Anexo P). Seguiu-se um protocolo de tratamento duplo-cego e cruzado (Anexo D), no qual os voluntários foram aleatoriamente distribuídos para realizar a escovação com os dentifrícios experimentais: Placebo (sem F), DCRF (550 ppm F) e DC (1100 ppm F), em pH 4,5 e 7,0, totalizando 6 combinações de tratamento. Todos os dentifrícios experimentais possuíam a mesma consistência, continham sílica como abrasivo e fluoreto de sódio (NaF) como sal fluoretado, tendo sido os mesmos envasados em tubos idênticos (Anexo C) e codificados por um pesquisador não envolvido na etapa experimental. Os voluntários escovaram seus dentes 3 vezes ao dia (manhã, tarde e noite), utilizando aproximadamente 0,5 g de dentifrício (técnica transversal – [Villena, 2000]), fazendo o enxágue da boca com 10 mL de água. No sexto dia, foram orientados a escovar somente a superfície oclusal dos dentes por 1 minuto e a não fazerem o uso do fio dental. Além disso, foram orientados a absterem-se de comer e beber, exceto água e, não mais escovar os dentes depois da última escovação neste dia, até que a primeira amostra de saliva e biofilme fosse coletada na manhã do sétimo dia (Anexo D).

Para a coleta da saliva (Anexo H), o fluxo salivar foi estimulado com a mastigação de uma banda de borracha, coletando-se toda a saliva formada durante os 3 minutos em um recipiente de plástico previamente pesado (J40), calculando-se o fluxo salivar (mL/minuto). O biofilme foi coletado (Anexo I) das superfícies

vestibular, lingual e interproximal de todos os dentes do hemiarco direito (superior e inferior), com o auxílio de uma espátula plástica com ponta em bisel. Os voluntários foram então instruídos a escovar a superfície oclusal de seus dentes e 1 hora após amostras de saliva e biofilme (hemiarco esquerdo) foram coletadas, conforme descrito anteriormente.

A espátula contendo o biofilme foi imediatamente inserida num tubo para microcentrífuga preenchido com óleo mineral (Sigma Aldrich Brasil Ltda, SP). Após a pesagem do conjunto, os tubos foram centrifugados (21.023 g/ 4°C/ 5 min), para a separação das fases fluida e sólida do biofilme [Tenuta et al., 2006] - (Anexo J). O fluido foi aspirado com uma micropipeta de vidro e imediatamente transferido para a membrana do eletrodo invertido. Para análise da fase sólida do biofilme, a ponta da ponteira anteriormente selada foi cortada com uma lâmina de bisturi para que a massa sólida fosse expelida em um tubo para microcentrífuga de 2 mL (Anexo L). Adicionou-se HCl 1M (0,5 mL/10 mg de biofilme úmido), sendo então as amostras agitadas (30 rpm/ 3h/ 25°C). Na sequência, adicionou-se NaOH 1M (0,5 mL/10 mg de biofilme úmido), sendo os tubos novamente centrifugados para separação das fases [Nobre dos Santos et al., 2002]. Ao sobrenadante foi adicionado TISAB III (Thermo Orion, Beverly, Massachusetts, United States) (1:10) imediatamente antes da leitura de F (Anexo N). As amostras de saliva (1 mL da amostra) foram centrifugadas (12000 rpm; 5 min), sendo o sobrenadante (200 µL) tamponado com 20 µL de TISAB III [Vogel et al., 2000] – (Anexo M). As análises de F de todas as amostras foram realizadas sobre a superfície da membrana do eletrodo invertido (9409, Thermo Orion, Beverly, Massachusetts, United States) com o uso de um microscópio e microeletrodo de referência acoplado a um micromanipulador, para fechar o circuito (Anexo J) - [Vogel et al., 1997]. As amostras de fluido do biofilme foram diluídas com TISAB III (1:10) - [Vogel et al., 1992a, 1997] na superfície da membrana do eletrodo invertido, com uma micropipeta de vidro [Vogel et al., 1997]. As amostras de Ca foram analisadas em triplicata, por espectrofotometria (650 nm), no leitor de microplacas (PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer), pelo método Arsenazo III (Anexo O).

Para a análise estatística, foi utilizado o programa Statistica, versão 11.0. Os dados foram analisados por ANOVA fatorial, seguida do teste de Tukey HSD (Honestly Significantly Difference) para comparações individuais. Também foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson para verificar a existência de

correlação entre as concentrações de F e Ca nas amostras. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

Os valores médios ($\pm$ DP) de pH para os dentifrícios acidulados e neutros, respectivamente, foram 4,24 ($\pm$ 0,01) e 6,81 ($\pm$ 0,01) (placebo); 4,49 ($\pm$ 0,02) e 6,81 ($\pm$ 0,01) (DCRF); e 4,87 ($\pm$ 0,01) e 6,79 ($\pm$ 0,01) (DC). A concentração média de F ($\pm$ DP) nos dentifrícios acidulados e neutros foi 14,7 ($\pm$ 5,6) e 14,8 ($\pm$ 5,9) (Placebo); 520,2 ($\pm$ 4,5) e 504,4 ($\pm$ 19,4) (DCRF); e 1107,2 ($\pm$ 8,1) e 1081,6 ($\pm$ 30,5) (DC) – (Anexo Q).

Uma relação dose-resposta pôde ser observada entre a concentração de fluoreto nos dentifrícios e as resultantes na saliva, no biofilme total e no fluido do biofilme. Para o biofilme total, tal relação foi verificada para ambos os tempos de coleta e valores de pH (Tabela 1). Houve influência dos fatores dentifrício ($F=50,87$, $p<0,0001$) e tempo de coleta ($F=12,08$, $p=0,001$), sem interação significativa entre os mesmos. Os valores obtidos 1 h após a escovação foram mais altos que os observados 12 horas após para todos os dentifrícios, embora sem diferenças significativas. Em acréscimo, a concentração de F 1 h após o uso do DCRF neutro e ácido não diferiram significativamente dos observados para o DC neutro. Em comparação aos dados obtidos para o Placebo, entretanto, diferenças significativas foram encontradas apenas para o DC neutro 1 h após a escovação, bem como DC ácido, 1 e 12 h após a escovação ($p<0,05$). (tabela 1).

Para o fluido do biofilme, a relação dose-resposta foi mais evidente para os dentifrícios acidulados (tabela 2). Houve influência dos fatores dentifrício ($F=34,83$, $p<0,0001$), bem como tempo de coleta ($F=87,99$, $p<0,0001$) e pH ($F=5,76$, $p=0,02$), com interação significativa entre os fatores dentifrício e tempo ($F=12,09$, $p<0,0001$). Para todos os tratamentos, valores mais altos foram observados para o tempo de 1 hora em comparação ao de 12 horas, sendo estas diferenças significativas somente para o DCRF neutro e DC neutro e ácido. Todos os valores obtidos para os dentifrícios acidulados foram mais altos que os neutros. Em acréscimo, a concentração de flúor 1 h após a escovação com o DCRF acidulado não diferiu significativamente da obtida para o DC neutro, sendo ambos significativamente mais altos que o Placebo.

A concentração de F na saliva foi influenciada pelos fatores dentifrício ($F=33,8$, $p<0,0001$) e tempo de coleta ($F=38,22$, $p<0,0001$), com interação significativa entre estes ($F=15,14$, $p<0,0001$). Para todos os dentifrícios fluoretados, as concentrações de fluoreto na saliva retornaram a níveis basais 12 h após a escovação. Os valores obtidos para DCRF neutro, bem como DC neutro e ácido, 1h após a escovação foram significativamente mais altos que os obtidos em todas as demais comparações (tabela 3).

Para as concentrações de Ca no biofilme total, somente o fator pH apresentou influência sobre os resultados ($F=4,44$, $p=0,04$), havendo interação significativa entre este e os fatores dentifrício e tempo de coleta ($F=3,78$, $p=0,03$). A única diferença significativa foi observada entre os valores obtidos 1 h após o uso do DC acidulado e neutro (Tabela 4). Para o fluido do biofilme, somente o fator dentifrício apresentou influência sobre os resultados ($F=4,40$, $p=0,02$), havendo interação significativa entre este e os fatores pH e tempo de coleta ($F=4,62$, $p=0,02$). Os valores obtidos 12 h após o uso do DC neutro foram mais altos em comparação as demais combinações de tratamentos e tempos, embora sem diferença significativa em alguns dos casos (Tabela 5). Além disso, a concentração de cálcio após o uso do DCRF acidulado foi significativamente diferente da obtida após o uso do Placebo ácido 12 h após a escovação. Com relação às concentrações de Ca na saliva, estas não foram influenciadas pelos fatores do estudo. A concentração média de todas as análises foi 25,9 µg/mL, tendo as médias variado de 23,0 (DC neutro 12 horas e DC acidulado 1 hora após escovação) a 31,1 (DCRF acidulado 12 horas após a escovação) (Tabela 6).

Uma correlação positiva foi observada entre as concentrações de F na saliva e fluido do biofilme ($r=0,33$; $p=0,0001$), bem como entre as concentrações de F no biofilme total e o fluido ($r=0,27$; $p<0,0001$). Menores coeficientes de correlação foram observados entre as concentrações de F e Ca na saliva e no biofilme dental (Tabela 7).

4. Discussão

Formulações dentifrícias de baixa concentração (500-550 ppm F) e pH acidulado (5,5; 4,5) têm se mostrado uma alternativa efetiva viável no controle da cárie dentária [Negri e Cury, 2002; Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007; Nobre-dos-Santos et al., 2007, Vilhena et al., 2010], ao mesmo tempo em que minimiza a

ingestão de fluoreto durante a escovação [Buzalaf et al., 2009]. No entanto, ainda existem poucos estudos na literatura avaliando a eficácia destas formulações, não existindo até o momento nenhum estudo *in vivo* avaliando a concentração de F no fluido do biofilme dental após o uso de dentifrícios acidulados de baixa concentração de F. Considerando que o fluido do biofilme se encontra em contato direto com a superfície do esmalte, com o biofilme propriamente dito e com a saliva, o estudo da composição inorgânica deste se reveste de grande importância do ponto de vista clínico, uma vez que a concentração iônica no mesmo determina a saturação do mineral dentário na cavidade bucal [Vogel et al., 1990; Margolis e Moreno, 1992].

No presente estudo, observou-se que a concentração de F no fluido do biofilme resultante do uso do DCRF acidulado não diferiu estatisticamente da obtida após o uso do dentifrício com o dobro da concentração de flúor (DC) em pH neutro. Este achado parece explicar, ao menos em parte, o motivo pelo qual o incremento de cárie em crianças utilizando um dentifrício acidulado contendo 550 ppm F não diferiu significativamente do grupo de crianças utilizando uma formulação convencional (1100 ppm F) em pH neutro em um estudo clínico randomizado [Vilhena et al., 2010]. Em acréscimo, o uso do DC em pH acidulado promoveu aumentos na concentração de F no fluido do biofilme semelhantes aos observados para o DC em pH neutro. Estes achados também estão de acordo com os resultados de Vilhena et al. [2010], os quais demonstraram não haver diferenças significativas na progressão de cáries em crianças com alto risco de cárie após o uso de formulações de DC neutras e ácidas. Estes dados, em conjunto, indicam que o estudo da composição inorgânica do fluido do biofilme é um bom indicador do desempenho clínico de formulações fluoretadas de uso tópico.

Um padrão semelhante foi observado no biofilme total, exceto pelo fato de que a concentração de F 1 h após a escovação com o DCRF acidulado não tenha diferido significativamente da obtida após o uso do Placebo; ressalta-se, entretanto, que o uso dos DCRFs (neutros e ácidos) dobrou a incorporação de F quando comparado ao uso do Placebo. Tal padrão confirma dados obtidos no único estudo disponível até o presente momento avaliando a incorporação de F no biofilme após o uso de formulações aciduladas [Buzalaf et al., 2009], no qual foi demonstrado que as concentrações de F após uso de um DCRF ácido e DC neutro não diferiram significativamente entre si. A diferença mais marcante entre o estudo supracitado e o presente trabalho, entretanto, é que o uso de um DC acidulado praticamente dobrou

a concentração média de F no biofilme quando comparado ao DC neutro, enquanto que no presente estudo esta diferença foi de aproximadamente 15%. Entretanto, a alta variabilidade nos valores obtidos por Buzalaf et al. [2009], somada à escassez de estudos avaliando a incorporação de F pelo biofilme após o uso de dentifrícios acidulados, não permite uma análise mais aprofundada sobre as possíveis razões para as diferenças encontradas.

As concentrações de F na saliva retornaram aos níveis basais 12h após a escovação, refletindo o *clearance* salivar, não tendo sido observada a influência do pH. Tal fenômeno já era esperado considerando que o F presente na saliva representa o íon liberado de outros sítios intrabuciais (tecidos dentais duros, mucosa e biofilme dental), não existindo nenhum mecanismo de “retenção” de F que pudesse ser influenciado pelo pH. Uma vez que o F é liberado lentamente destes sítios para a saliva, era razoável se esperar que as pequenas diferenças ocorridas na concentração de F no biofilme e fluido decorrentes do pH no presente estudo seriam dificilmente observadas na saliva, especialmente em tempos de coleta relativamente distantes do momento da escovação. Entretanto, Olympio e colaboradores [2007] observaram que um DCRF acidulado levou a concentrações de F na saliva semelhantes às obtidas pelo uso de um dentifrício comercial neutro. Acredita-se que diferenças entre as formulações utilizadas no presente estudo e no de Olympio et al. [2007], bem como no padrão de escovação e enxágüe da boca, tenham levado a padrões de retenção de F na saliva diferentes para os dois estudos. Assim como para os dados de biofilme total, até o momento somente existe um estudo avaliando a retenção de F na saliva após o uso de dentifrícios ácidos, reforçando a necessidade de estudos futuros sobre o tema.

Com relação aos resultados obtidos para o cálcio nos três compartimentos bucais, parece não existir um padrão definido de aumento e nem de diminuição nestes, de acordo com o pH, as concentrações de F e tempos de coleta. Esta ausência de padrão era, de certa forma, esperada, visto que o abrasivo dos dentifrícios é livre de cálcio (sílica). Entretanto, as concentrações de cálcio nas amostras foram analisadas com o objetivo de se avaliar a existência de uma associação entre a concentração de F e Ca nos diversos compartimentos de retenção de F intrabuciais, especialmente para o biofilme total.

Observou-se a existência de um equilíbrio entre as concentrações de F no biofilme total e no fluido do biofilme, bem como entre a saliva e fluido do biofilme. Tal

equilíbrio era esperado com base em estudos prévios [Vogel et al., 1992a, 1992b; Rølla e Ekstrand, 1996; Vogel et al., 1997] visto que a fase fluida do biofilme está em contato com a superfície do esmalte, com a saliva e com o biofilme dental. Verificou-se também a existência de correlação entre F e Ca na saliva e no biofilme dental, a qual apesar de moderada e fraca (respectivamente), foi significativa. Assim, os resultados do presente estudo confirmam achados anteriores de que as concentrações de F no biofilme dependem das concentrações de Ca no mesmo [Whitford et al., 2002, 2005; Pessan et al., 2006, 2008, 2010]. Para o fluido do biofilme, entretanto, não se verificou a existência de uma correlação significativa, sugerindo que os aumentos nas concentrações de F no mesmo parecem não depender das concentrações de Ca. Esta ausência de correlação parece razoável considerando-se que uma das principais formas de incorporação do F ao biofilme se dá por meio de ligações com íons cálcio presentes na membrana de bactérias e ligados a proteínas do mesmo [Rose et al., 1996], sendo que a liberação de F da fase sólida do biofilme para o fluido não necessariamente envolve a liberação de íons cálcio para o mesmo.

Em resumo, os resultados do presente trabalho indicam que o pH do dentifrício influenciou na incorporação de F no fluido do biofilme, exercendo menor ou nenhuma influência na concentração de F no biofilme total e na saliva. Embora o efeito de dentifrícios acidulados sobre o esmalte dental já tenha sido comprovado anteriormente [Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007; 2009], dados acerca da retenção intrabucal de F após o uso destas formulações são importantes para uma melhor compreensão do mecanismo de ação destes produtos.

Agradecimentos

Agradecemos aos voluntários pela participação e também à técnica de laboratório do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pela colaboração nos procedimentos laboratoriais durante o desenvolvimento deste trabalho e ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório pela contribuição na análise estatística. Idealizou e desenhou o experimento: JPP. Realizaram os experimentos: KYK, JPP. Analisaram os dados: KYK, JPP. Escreveram o artigo: KYK e JPP.

Referências

- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sassaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
- Alves KM, Pessan JP, Buzalaf MA, Delbem AC: Short Communication: in vitro evaluation of the abrasiveness of acidic dentifrices. *Eur Arch Paediatr Dent* 2009; 10:43-45.
- Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sassaki KT: in vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 2006;40:239-244.
- Buzalaf MA, Vilhena FV, Iano FG, Grizzo L, Pessan JP, Sampaio FC, Oliveira RC: The effect of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on plaque and nail fluoride levels in young children. *Caries Res* 2009;43:142-146.
- Delbem AC, Vieira AE, Cury JA: Cariostatic potencial evaluation of the most popular Brazilian dentifrice. *Rev Bras Odontol* 2002;59:14-18.
- Gerdin PO: Studies in dentifrices, 8: clinical testing of an acidulated, nongrinding dentifrice with reduced fluorine contents. *Sven Tandlak Tidskr* 1974;67: 283-297.
- Margolis HC, Moreno EC: Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res* 1992; 71:1776-1784.
- Moretto MJ, Magalhães AC, Sassaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR: Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44:135-140.
- Negri HM, Cury JA: Dose-response effect of a dentifrice formulation with low fluoride concentration - an in vitro study. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16:361-365.
- Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA: Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 2002;36:347-352.
- Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel-Cury AA, Cury JA: *In situ* effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel mineralization and fluoride uptake. *Oral Sci* 2007;49: 147-154.

- Olympio KP, Bardal PA, Cardoso VE, Oliveira RC, Bastos JR, Buzalaf MA: Low-fluoride dentifrices with reduced pH: fluoride concentration in whole saliva and bioavailability. *Caries Res* 2007;41:365-370.
- Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SM, Whitford GM, Buzalaf MA: Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci* 2006;114:489-493.
- Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA: Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *J Dent Res* 2008;87:461-465.
- Pessan JP, Alves KM, Ramires I, Taga MF, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MAR: Effects of regular and low-fluoride dentifrices on plaque fluoride. *J Dent Res* 2010;89:1106-1110.
- Petersson LG, Lodding A, Hakeberg M, Koch G: Fluorine profiles in human after *in vitro* treatment with dentifrices of different compositions and acidities. *Swed Dent J* 1989;13:177-183.
- Rölla G, Ekstrand J: Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry*. 2n ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996, pp.215-229.
- Rose RK, Shellis RP, Lee AR: The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996;30:458-464.
- Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA: Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res*. 2006;85:834-838.
- Villena RS: An investigation of the transverse technique of dentifrice application to reduce the amount of fluoride dentifrice for young children. *Pediatr Dent* 2000;22:312-317.
- Vilhena FV, Olympio KP, Lauris JR, Delbem AC, Buzalaf MA: Low-fluoride acidic dentifrice: a randomized clinical trial in a fluoridated area. *Caries Res* 2010;44:478-484.
- Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Tatevossian A: Micro-analysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. *J Dent Res* 1990;69:1316-1323.
- Vogel GL, Carey CM, Ekstrand J: Distribution of fluoride in saliva and plaque fluid after a 0.048 mol/L NaF rinse. *J Dent Res* 1992a;71:1553-1557.

- Vogel, GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC, Takagi S: *In vivo* fluoride concentrations measured for two hours after a NaF or a novel two-solution rinse. J Dent Res 1992b;71:448-452.
- Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC: Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. J Dent Res 1997;76:761-767.
- Vogel GL, Mao Y, Chow LC, Proskin HM: Fluoride in plaque fluid, plaque, and saliva measured for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. Caries Res 2000;34:404-411.
- Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev 2010;1:CD007868.
- Wong MC, Glenny AM, Tsang BW, Lo EC, Worthington HV, Marinho VC: Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. Cochrane Database Syst Rev 2010;1:CD007693..
- Whitford GM, John LW, Tara ES, Steven MA: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. Caries Res 2002;36: 256-265.
- Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL: Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. Caries Res 2005;39:100-107.

Legenda de Tabelas

Tabela 1 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 2 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μM) no fluido do biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 3 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μM) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 4. Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 5. Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/mL}$) no fluido do biofilme dentário 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 6. Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/mL}$) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Tabela 7. Correlação entre as concentrações de fluoreto e cálcio nas amostras de biofilme total, fluido do biofilme e saliva considerando todos os dentifrícios do estudo, pH e tempos de coleta simultaneamente

Tabela 1 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício			Placebo		550 ppm F		1100 ppm F	
(pH)			(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)
Tempo após escovação	12 h	Média	10,1 ^a	11,2 ^a	17,3 ^{abc}	21,5 ^{abc}	30,3 ^{bcd}	33,5 ^{cde}
		DP	3,6	3,7	6,2	10,6	20,4	26,7
	1 h	Média	12,0 ^{ab}	12,3 ^{ab}	24,8 ^{abcd}	26,4 ^{abcd}	42,7 ^{de}	50,1 ^e
		DP	5,3	3,9	16,5	15,3	33,6	42,2

Média $\pm$ desvio padrão, $n=22$. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as médias. ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 2 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μ M) no fluido do biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício			Placebo		550 ppm F		1100 ppm F	
(pH)			(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)
Tempo após escovação	12 h	Média	5,1 ^a	5,7 ^a	5,2 ^a	6,4 ^{abc}	6,0 ^{ab}	6,8 ^{abc}
		DP	1,1	1,7	0,9	1,9	1,9	2,2
	1 h	Média	6,6 ^{abc}	5,8 ^{ab}	7,7 ^{bcd}	8,2 ^{cd}	9,5 ^{de}	10,5 ^e
		DP	1,7	1,9	2,7	2,3	3,9	4,0

Média $\pm$ desvio padrão, $n=22$. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as médias. ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 3 - Concentração de fluoreto (média $\pm$ DP, μ M) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício		Placebo		550 ppm F		1100 ppm F	
(pH)		(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)
Tempo após escovação	12 h	Média	2,6 ^a	2,7 ^a	2,7 ^a	3,0 ^{ab}	2,9 ^{ab}
		DP	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5
	1 h	Média	2,6 ^a	2,6 ^a	3,4 ^{bc}	3,2 ^{ab}	3,9 ^c
		DP	0,6	0,4	1,2	0,6	1,6

Média $\pm$ desvio padrão, $n=22$. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as médias. ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 4 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/g}$) no biofilme dental 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício		Placebo		550 ppm F		1100 ppm F		
(pH)		(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	
Tempo após escovação	12 h	Média	14,2 ^{ab}	13,2 ^{ab}	12,8 ^{ab}	14,2 ^{ab}	13,3 ^{ab}	14,1 ^{ab}
		DP	2,2	3,5	2,5	3,4	4,4	3,8
	1 h	Média	13,6 ^{ab}	14,2 ^{ab}	13,6 ^{ab}	13,0 ^{ab}	12,2 ^a	15,5 ^b
		DP	4,4	1,3	2,4	2,9	3,1	5,7

Média $\pm$ desvio padrão, $n=22$. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as médias. ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 5 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/ mL}$) no fluido do biofilme dentário 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício		Placebo		550 ppm F		1100 ppm F		
(pH)		(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	
Tempo após escovação	12 h	Média	146,0 ^{ab}	130,6 ^a	142,1 ^{ab}	196,5 ^{bc}	212,0 ^c	131,7 ^{ab}
		DP	48,4	46,8	40,4	64,5	115,5	51,5
	1 h	Média	155,5 ^{abc}	150,1 ^{abc}	174,6 ^{abc}	181,1 ^{abc}	152,5 ^{abc}	139,4 ^b
		DP	63,3	51,2	92,5	35,6	35,6	50,1

Tabela 6 - Concentração de cálcio (média $\pm$ DP, $\mu\text{g/ mL}$) na saliva 1 e 12 horas após o uso de dentifrícios Placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F, em pH 4,5 e 7,0

Dentifrício		Placebo		550 ppm F		1100 ppm F		
(pH)		(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	(7,0)	(4,5)	
Tempo após escovação	12 h	Média	25,9	26,9	26,1	31,1	23,0	27,3
		DP	9,3	12,1	10,2	10,3	10,6	11,0
	1 h	Média	23,4	25,9	26,4	25,4	26,6	23,0
		DP	11,2	12,0	12,2	12,6	11,9	12,0

Média $\pm$ desvio padrão, $n=22$. Não existem diferenças significativas entre as médias. ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 7 - Correlação entre as concentrações de fluoreto e cálcio nas amostras de biofilme total, fluido do biofilme e saliva considerando todos os dentifrícios do estudo, pH e tempos de coleta simultaneamente

	F	F	F	Ca	Ca	Ca
	fluido biofilme	biofilme total	saliva	fluido biofilme	biofilme total	saliva
F fluido biofilme	*	r=0,27	r=0,33	r=0,10	r=0,07	r=-0,06
		p<0,0001	p=0,0001	p=0,12	p=0,28	p=0,36
F biofilme total	r=0,27	*	r=0,11	r=0,04	r=0,13	r=-0,14
	p<0,0001		p=0,07	p=0,53	p=0,03	p=0,03
F saliva	r=0,33	r=0,11	*	r=-0,06	r=-0,02	r=0,21
	p<0,0001	p=0,07		p=0,36	p=0,71	p=0,001
Ca fluido biofilme	r=0,10	r=0,04	r=-0,06	*	r=0,059	r=0,01
	p=0,19	p=0,53	p=0,36		p=0,35	p=0,91
Ca biofilme total	r=0,07	r=0,13	r=-0,02	r=,059	*	r=-0,17
	p=0,28	p=0,03	p=0,71	p=0,35		p=0,01
Ca saliva	r=-0,06	r=-0,14	r=0,21	r=,007	r=-0,17	*
	p=0,36	p=0,03	p=0,01	p=0,91	p=0,01	

Coeficiente de correlação de Pearson ($n=264$, $p<0,05$).

* Não calculado

ANEXO A

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Caries Research

Aims and Scope

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

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

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

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

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

Conditions

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

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

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

Types of Papers

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

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

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

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

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes. Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

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

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

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

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

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

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

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization

and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.

- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Examples

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

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

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

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

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

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

Supplementary Material

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

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

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

Digital Object Identifier (DOI)

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

*Author's Choice*TM

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

NIH-Funded Research

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

Self-Archiving

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

Page Charges

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

Proofs

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

Reprints

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

ANEXO B
COMITÊ DE ÉTICA - CEP



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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto ***"Retenção intrabucal de flúor, cálcio e fosfato após uso de dentifrícios fluoretados suplementados com Trimetafosfato de Sódio"***, sob a responsabilidade da Pesquisadora **KARINA YURI KONDO**, está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 12/08/2011, de acordo com o Processo FOA-01421/2011.

Araçatuba, 23 de agosto de 2011.

ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM
Coordenador do CEP

ACBD/vbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3234 E-mail: cep@foa.unesp.br



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

ATA DA REUNIÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
4.ª reunião ordinária do ano de 2012, de 13/06/2012

FLS.....	73
PROC.:	144/11
RUB.:	6449

- 1 (Destaque individual da Ordem do Dia solicitado pelo Coordenador). **MANIFESTAÇÃO: APROVA**
 2 a) o Parecer emitido pela Professora Assistente Doutora Alessandra Marcondes Aranega, favorável ao
 3 desenvolvimento do projeto de pesquisa em referência; b) **INFORMA** o Pesquisador responsável que,
 4 conforme dispõe a Resolução CNS n.º 251, de 07 de agosto de 1997, o mesmo deverá apresentar
 5 relatório parcial em 13/06/2013 e, relatório final em 13/06/2014;
 6 **05. Processo FOA-01988/2011 – CLEA ADAS SALIBA GARBIN. Referência:** Solicita autorização para
 7 o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa "Perfil da farmacoterapia utilizada por idosos
 8 institucionalizados e suas características comportamentais em relação à saúde". (Destaque individual
 9 da Ordem do Dia solicitado pelo Coordenador). **MANIFESTAÇÃO: APROVA a)** o Parecer emitido
 10 pelo Professor Assistente Doutor Luiz Eduardo Corrêa Fonseca, favorável ao desenvolvimento do projeto
 11 de pesquisa em referência; b) **INFORMA** a Pesquisadora responsável que, conforme dispõe a
 12 Resolução CNS n.º 251, de 07 de agosto de 1997, a mesma deverá apresentar relatório parcial em
 13 13/12/2012 e, relatório final em 13/06/2013;
 14 **06. Processo FOA-01953/2011 – ANA PAULA DOSSI DE GUIMARÃES E QUEIROZ. Referência:**
 15 Solicita autorização para o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa "O Cirurgião-Dentista na percepção
 16 de escolares do Município de Araçatuba - SP". (Destaque individual da Ordem do Dia solicitado pelo
 17 Coordenador). **MANIFESTAÇÃO: APROVA a)** o Parecer emitido pela Professora Adjunto Sandra Maria
 18 Herondina Coelho Ávila de Aguiar, favorável ao desenvolvimento do projeto de pesquisa em referência;
 19 b) **INFORMA** a Pesquisadora responsável que, conforme dispõe a Resolução CNS n.º 251, de 07 de
 20 agosto de 1997, a mesma deverá apresentar relatório parcial em 13/12/2012 e, relatório final em
 21 13/06/2013;
 22 **07. Processo FOA-01421/2011 – KARINA YURI KONDO. Referência:** a) Relatório Parcial do Projeto
 23 de Pesquisa "Retenção intrabucal de flúor, cálcio e fosfato após uso de dentífricos fluoretados
 24 suplementados com Trimetafosfato de Sódio"; b) Alteração na metodologia proposta; c) Alteração no
 25 título do Projeto para "Efeito do pH e da concentração de flúor presente em dentífricos na incorporação
 26 de flúor pela saliva, biofilme e fluido do biofilme". (Destaque individual da Ordem do Dia solicitado
 27 pelo Coordenador). **MANIFESTAÇÃO: APROVA:** a) o parecer emitido pela Professora Adjunto Denise
 28 Pedrini Ostini, favorável ao Relatório Parcial do Projeto em referência, juntado às folhas 64-66; b)
 29 Alteração na metodologia proposta; c) Alteração no título do Projeto para "Efeito do pH e da
 30 concentração de flúor presente em dentífricos na incorporação de flúor pela saliva, biofilme e fluido do
 31 biofilme";
 32 **08. Processo FOA-01527/2011 – PAULO SEDLACEK. Referência:** Relatório Parcial do Projeto de
 33 Pesquisa "Álbum de figurinhas como ferramenta didática sobre avulsão e replante dentários".
 34 (Destaque individual da Ordem do Dia solicitado pelo Coordenador). **MANIFESTAÇÃO: APROVA** a
 35 devolução ao pesquisador responsável para que no item 05 do formulário descreva quais as etapas do
 36 projeto que já foram realizadas, apresentando resultados obtidos extensivamente detalhado com tabelas
 37 e gráficos;
 38 **09. Processo FOA-01335/2011 – LUCIENE PEREIRA DE CASTRO. Referência:** a) Relatório Parcial do
 39 Projeto de Pesquisa "Relação entre o contato precoce com o açúcar e a presença da cárie dentária"; b)

2

wbm/

continua

ANEXO C



1. Dentifrícios utilizados no estudo (placebo, 550 ppm F e 1100 ppm F em pH= 4,5 e 7,0).



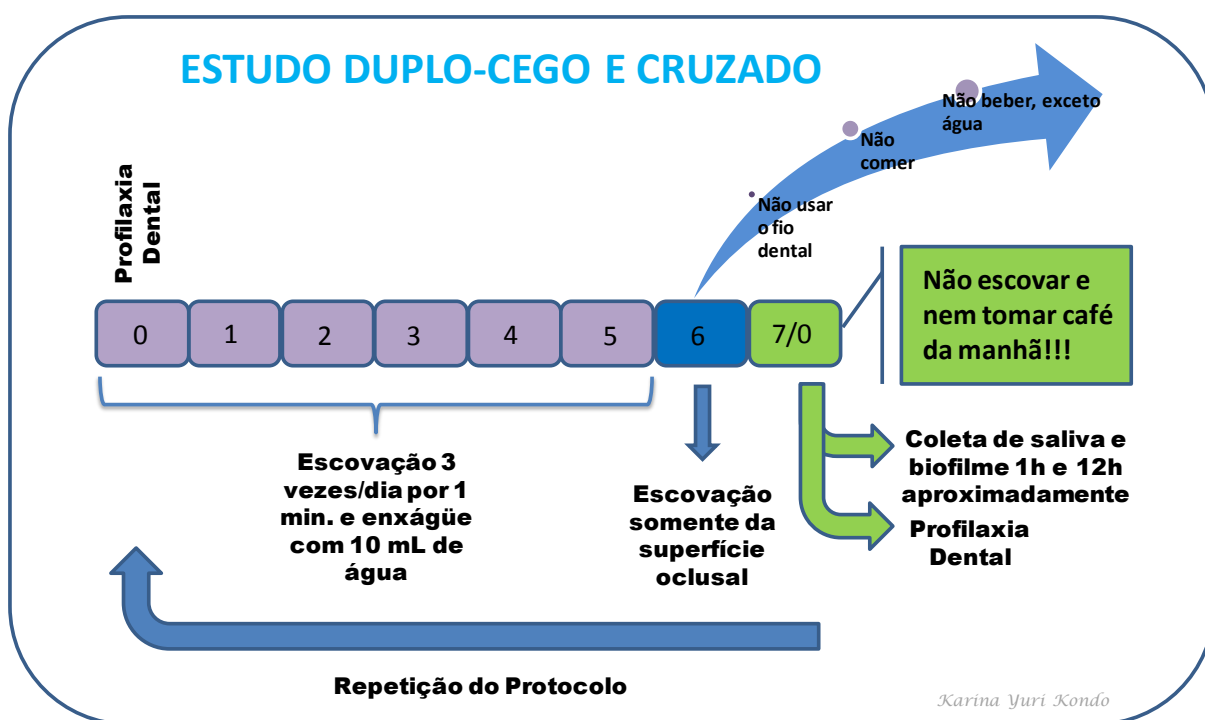
2. Técnica transversal para dispensar o dentifrício na escova [Villena et al., 2000] (cerdas planas para impedir remoção indesejada de biofilme das faces livres) - referência: Bitufo Flex 0592).



3. Kit de tratamento contendo escova dental, dentifrício experimental, copo medidor de 10 mL e fio dental sem flúor

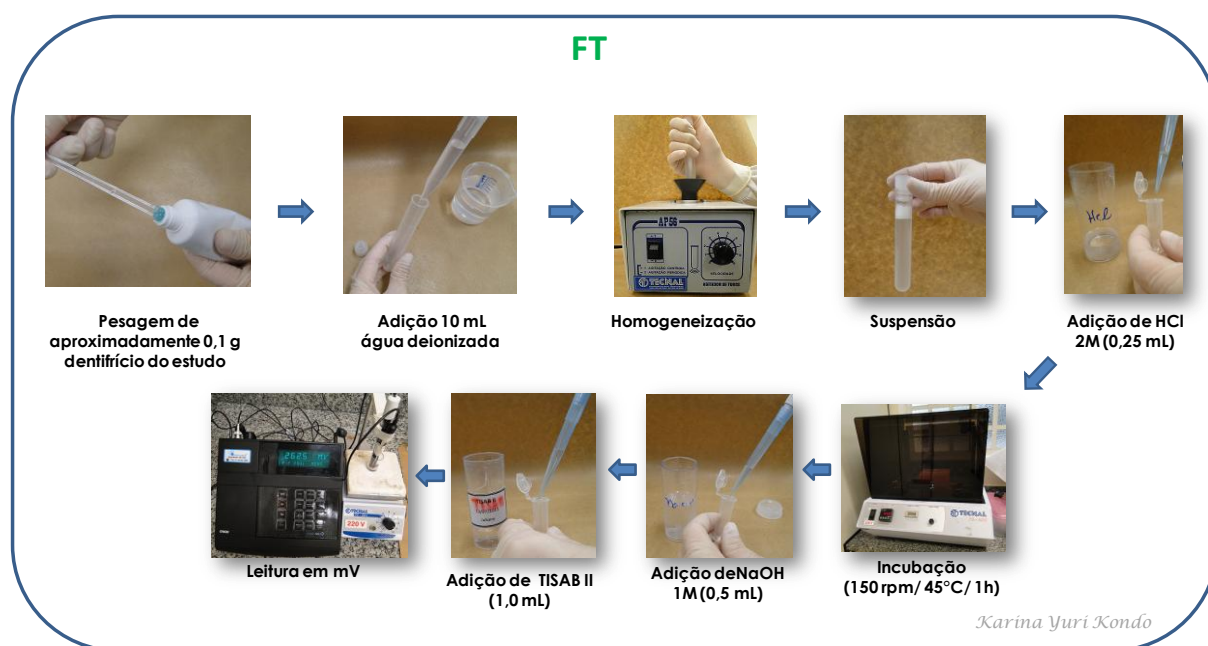
ANEXO D

ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROTOCOLO DE TRATAMENTO



ANEXO E

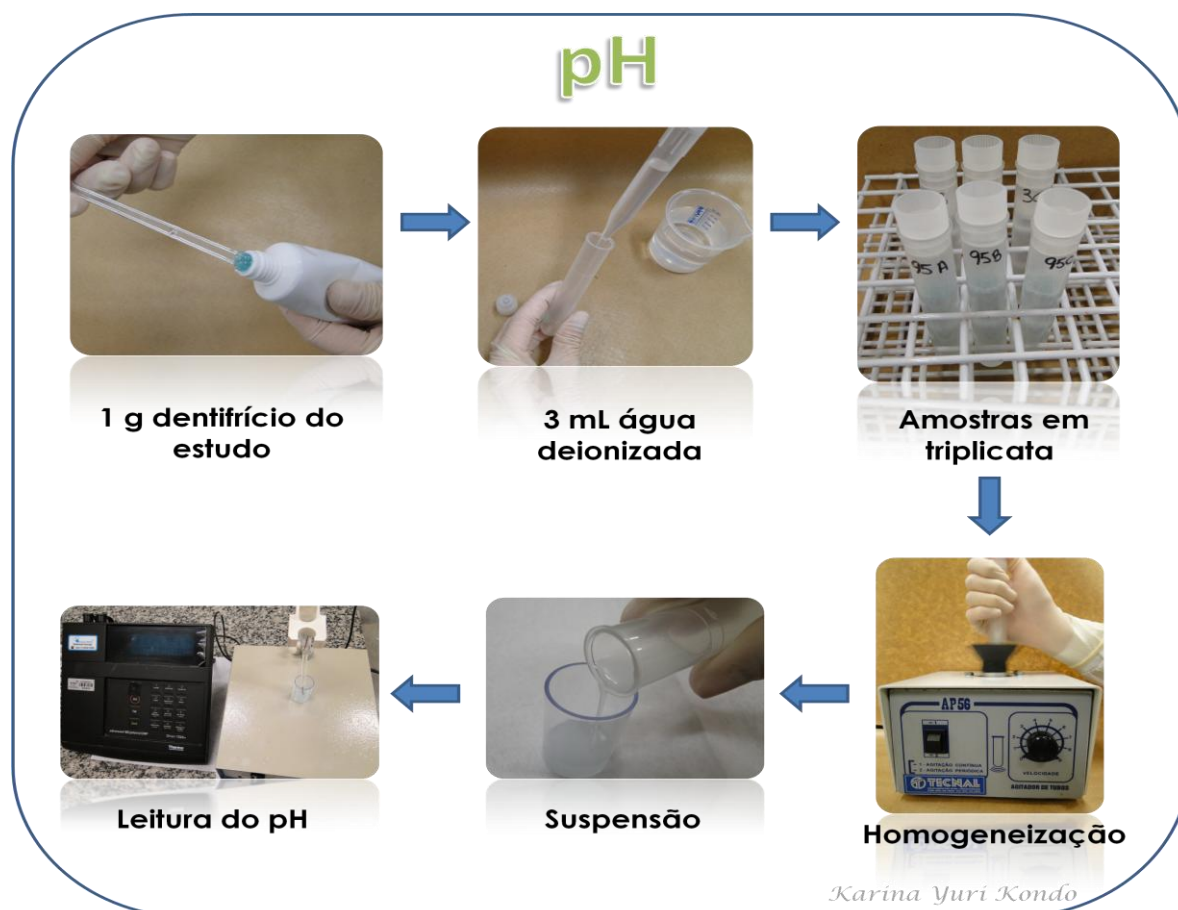
ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DE FLUORETO TOTAL



Delbem *et al.*, 2002

ANEXO F

Análise de pH dos dentifrícios



Moretto *et al.*, 2010

ANEXO G

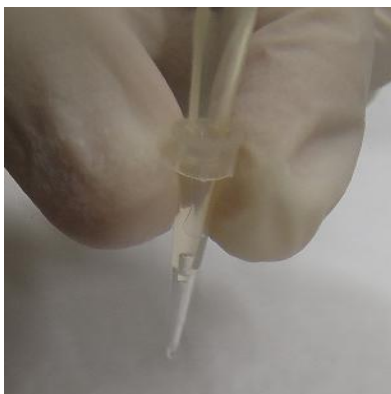
PREPARO DO CONJUNTO ACONDICIONADOR DE BIOFILME PÓS-COLETA (EPPENDORF + ÓLEO + ESPÁTULA)



4. Confecção do orifício na tampa de um eppendorf com o auxílio de um soldador



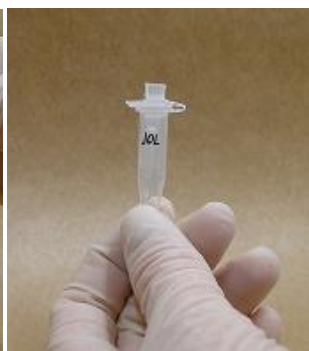
5. Selamento da ponta da ponteira de 10 µL com calor



6. Inserção do óleo mineral na pipeta selada (40 µL)



7. Óleo mineral na ponteira selada



8. Etapas para
finalização do
conjunto
acondicionador do
biofilme pós-coleta



9. Espátula plástica para transferência do biofilme
coletado

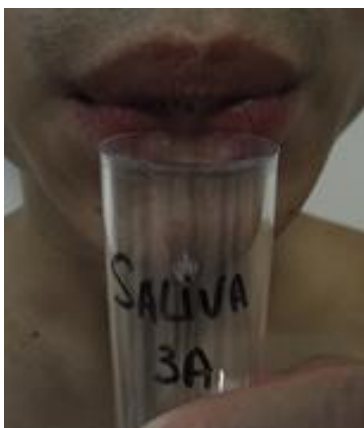


10. Inserção da espátula plástica no
suporte

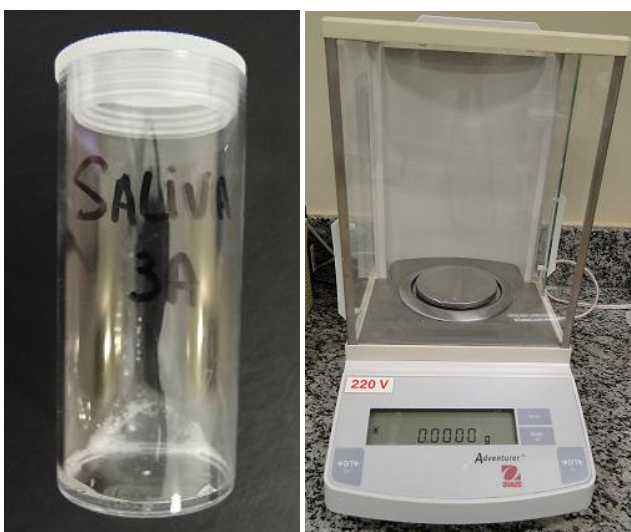
ANEXO H
COLETA DE SALIVA



11. Coleta de saliva estimulada por 3 minutos, com auxílio de uma banda de borracha presa ao fio dental.



12. Saliva estimulada dispensada em um tubo J40, previamente pesado



13. Saliva coletada e pesada na balança de 4 casas (Adventurer, Ohaus)

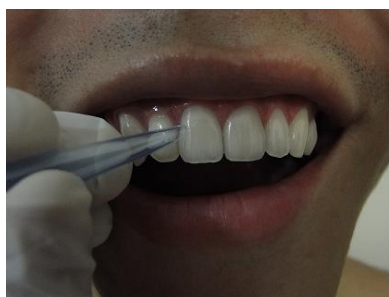
ANEXO I
COLETA DE BIOFILME



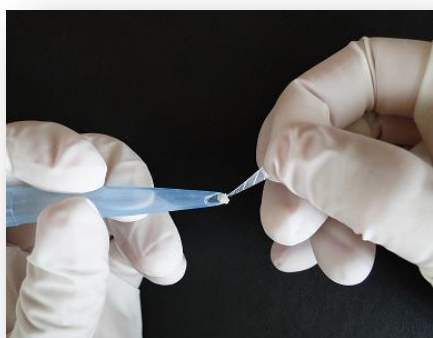
14. Ponteiros 1000 µL cortadas em bisel para confecção das espátulas modificadas para coleta do biofilme



15. Aspecto final da espátula modificada



16. Coleta do biofilme das superfícies lisas e proximais de todos os dentes de um hemiarco



17. Transferência do biofilme da espátula modificada para a espátula plástica



18. Inserção da espátula com biofilme em óleo mineral: após coleta do biofilme



19. Pesagem do conjunto após a coleta do biofilme na balança de 5 casas (Shimadzu)

ANEXO J

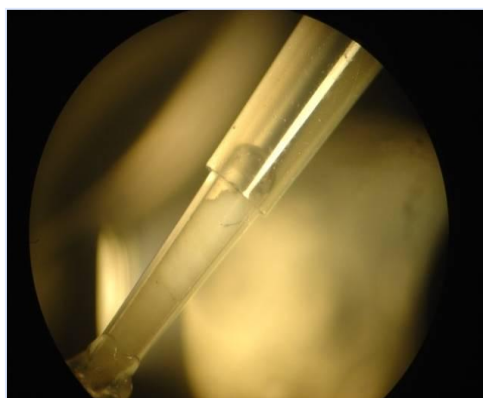
PROCESSAMENTO E LEITURA DO F DO FLUIDO DO BIOFILME E LEITURA DO F DO BIOFILME TOTAL



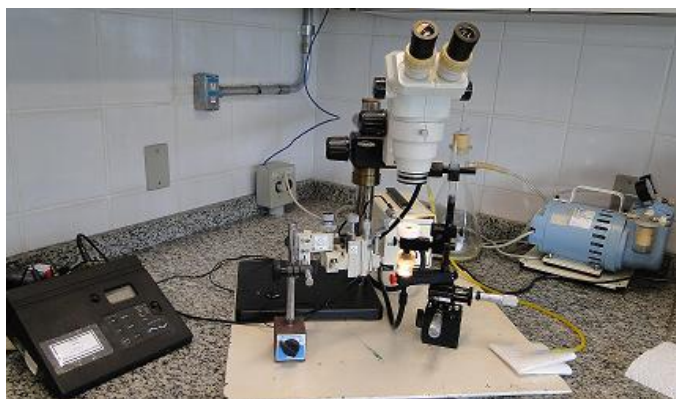
20. Centrífuga Combi 514-R



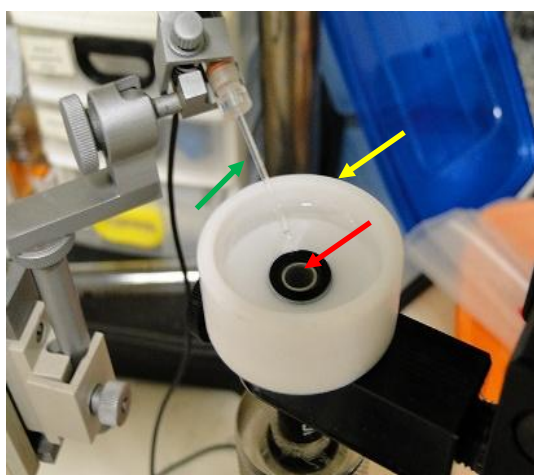
21. Centrifugação para obtenção do fluido do biofilme: 21023g/ 4°C/ 5 minutos



22. Aspecto após centrifugação com separação do fluido do biofilme da massa sólida do biofilme total



23. Aparato utilizado para leitura de F + analisador de íons + bomba à vácuo



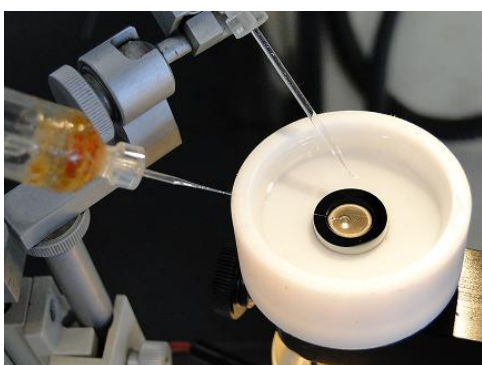
24. Cubeta de teflon (seta amarela) + eletrodo de referência (seta verde) + eletrodo invertido e sua respectiva membrana (seta vermelha) no centro da cubeta



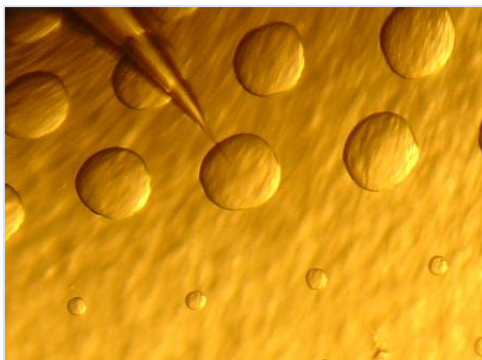
25. Aspecto geral do aparato para utilização de micropipeta de vidro



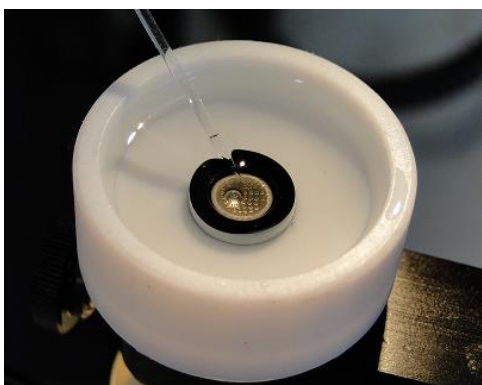
26. Suporte e micropipeta de vidro



27. Transferência do fluido do biofilme com o auxílio de uma micropipeta de vidro para a membrana do eletrodo invertido



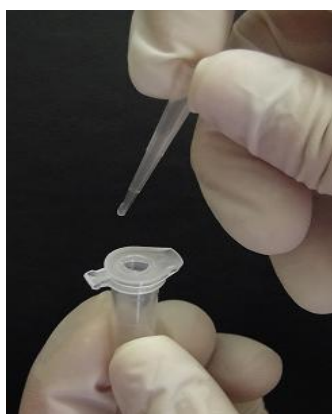
28. Proporção de TISAB III e amostra (1:10) e eletrodo de referência fechando o circuito para leitura do fluido do biofilme



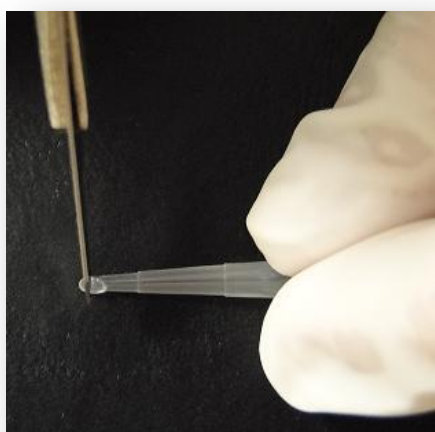
29. Análise com eletrodo invertido e o fechamento do circuito com o eletrodo de referência (leitura das amostras de saliva e biofilme total quanto ao F).

ANEXO L

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE BIOFILME TOTAL



30. Biofilme na ponteira selada



31. Corte na ponta da
ponteira com auxílio do
bisturi



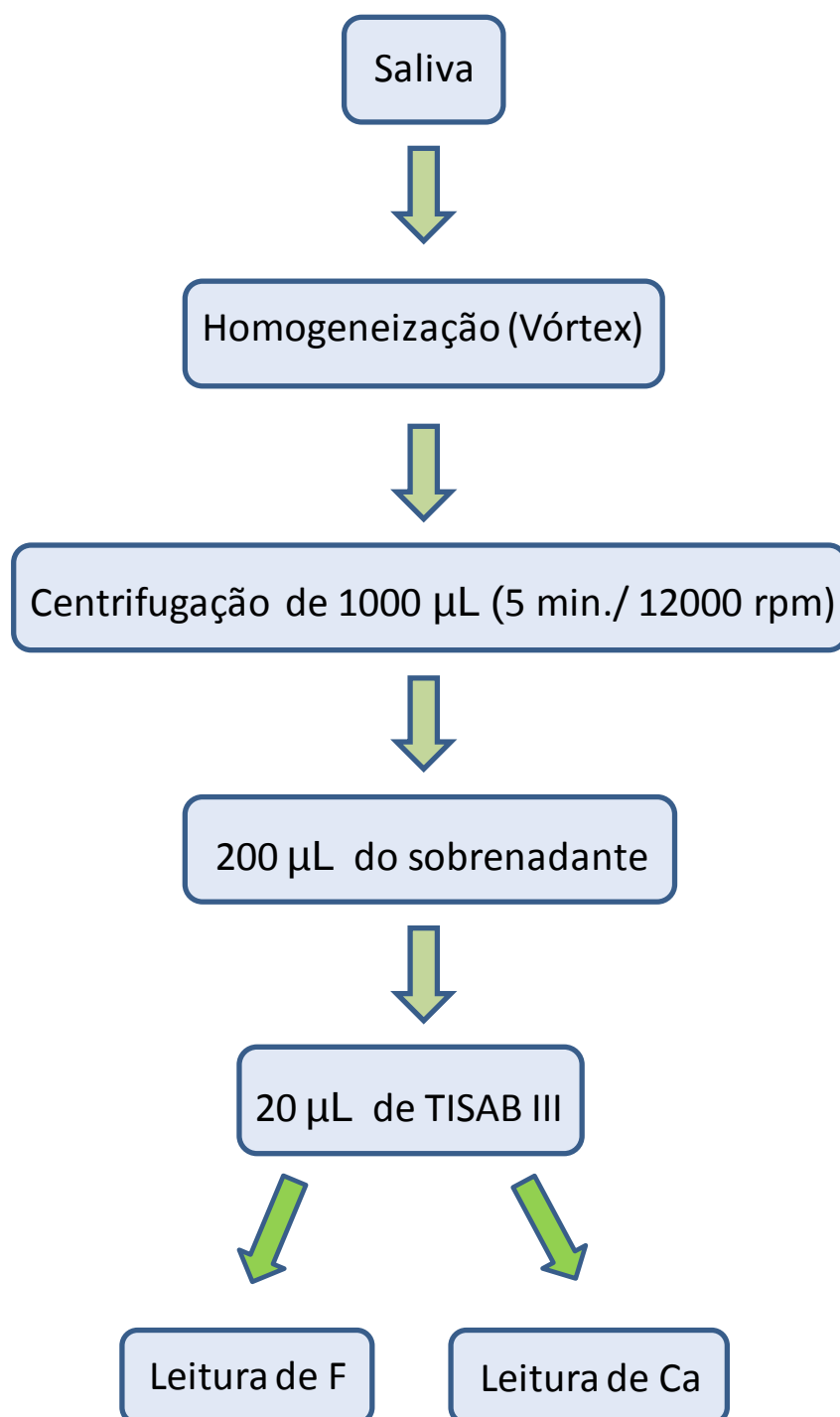
32. Aspecto final
após o corte



33. Tubo tipo eppendorf
para expulsão da massa
sólida do biofilme

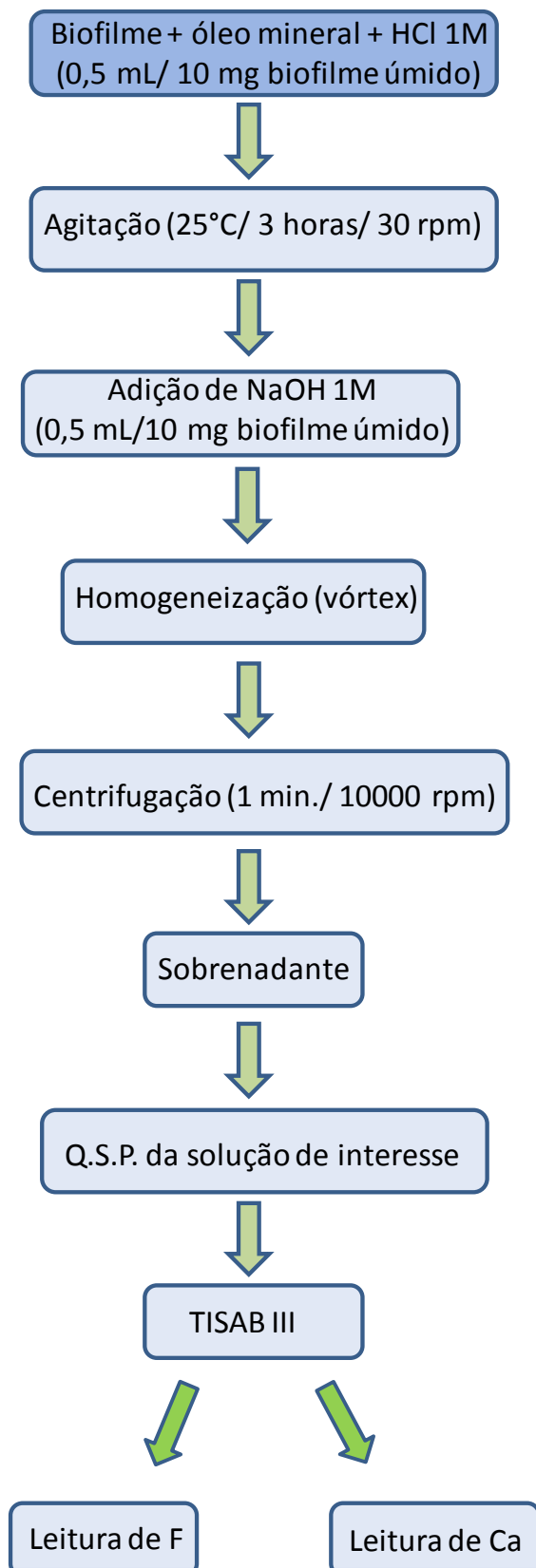
ANEXO M

ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

*Vogel et al., 2000*

ANEXO N

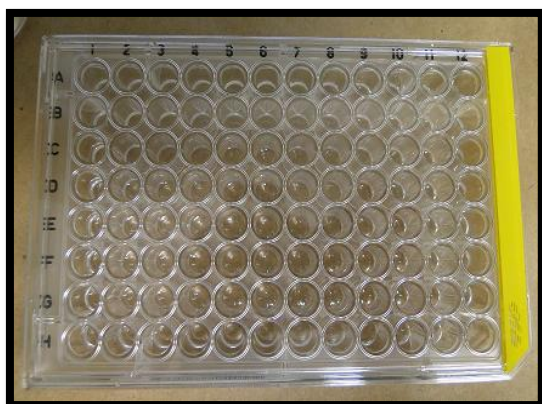
ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE BIOFILME DENTAL



Nobre dos Santos *et al.*,
2002

ANEXO O

ANÁLISE DE CA (ESPECTROFOTOMETRIA)



34. Placa de 96 poços (TPP test plate)



35. Placa de 96 poços com água deionizada + amostra + Arsenazo III no leitor de microplacas



36. Leitor de microplacas acoplado ao computador para obtenção dos valores de cálcio

ANEXO P

ORIENTAÇÕES POR ESCRITO AOS VOLUNTÁRIOS

Nome do voluntário,

Para que tudo ocorra da melhor forma possível, leia com atenção, algumas instruções que se seguem e, qualquer dúvida entrar em contato nos telefones presentes em seu Kit-estojo ou na pasta preta/azul.

Serão 6 tratamentos diferentes, com duração de uma (1) semana cada. A seqüência de uso dos dentifrícios será aleatória e os tratamentos serão:

- ✓ Dentifrício sem fluoreto (pH 4,5);
- ✓ Dentifrício sem fluoreto (pH 7,0);
- ✓ Dentifrício com 550 ppm de fluoreto (pH 4,5);
- ✓ Dentifrício com 550 ppm de fluoreto (pH 7,0);
- ✓ Dentifrício com 1100 ppm de fluoreto (pH 4,5);
- ✓ Dentifrício com 1100 ppm de fluoreto (pH 7,0).

Durante o estudo, você deverá escovar os dentes 3 vezes ao dia (manhã, tarde e noite), **não mais que isso**. Você poderá utilizar **somente** a escova, o fio dental e o dentifrício fornecidos.

A cada escovação você deverá colocar a pasta no sentido transversal da escova, como mostra a imagem:



Para o enxágüe da boca após a escovação, você deverá usar o copinho plástico fornecido (encher **somente 1x** até a marcação 10 mL - tracejado)



Para um maior controle do estudo, pedimos que você anote nas fichas das páginas seguintes o horário de cada escovação, no campo correspondente ao dia e ao horário. Caso

aconteça de você esquecer de escovar em algum dos horários, pedimos que marque com um “X” no campo correspondente. É fundamental que esta informação **não seja omitida**, uma vez que a frequência da escovação influenciará nos resultados.

No dia que antecede a coleta (**6° DIA**), você deverá escovar **apenas a superfície oclusal dos dentes (por 1 minuto), aplicando pouca força e, não fazer uso do fio dental**, para que possa haver a formação de placa/biofilme nas faces livres e interproximais dos dentes. Nos demais dias, você pode escovar os dentes e fazer uso do fio conforme seu costume.



Após a última escovação neste dia (**6° DIA**), você **não poderá consumir nenhum alimento ou bebida, exceto água**. No dia seguinte (**7° DIA**) você deverá comparecer ao Laboratório de Odontopediatria FOA-Centro no horário a ser combinado e anotado na ficha.

IMPORTANTE: No dia da coleta, você não poderá tomar café da manhã ou escovar os dentes em casa!!!

Faremos a coleta de saliva e de placa de um lado da boca. Você então irá escovar novamente a superfície oclusal dos seus dentes (conforme mostra a figura acima) e **EXATAMENTE 1 HORA APÓS** você deverá retornar ao laboratório, para que amostras de saliva e placa sejam coletadas (do outro lado da boca) novamente. Ao final desta coleta, serviremos um pequeno lanche.

Você então receberá nova profilaxia dentária e receberá um dentifrício novo, para que possa ser utilizado na semana seguinte. Assim, o protocolo será repetido até que todos os dentifrícios tenham sido usados.

IMPORTANTE: Você não poderá utilizar outros produtos fluoretados (bochechos em casa como Listerine, Plax.... ou outros produtos no consultório, como aplicação tópica de flúor ou verniz).

Outros Telefones para Contato:

(18) 3636- 3316 (Laboratório Pediatria)

(18) 8106-6087 (Karina TIM)

1ª SEMANA

Data início: ____/____/____

Voluntário: _____

Tratamento: _____

Profilaxia: () Sim () Não

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Manhã					
Tarde					
Noite					

No 6º dia, escovar somente a **OCCLUSAL** dos dentes (ver fotos no início)

	Dia 6
Manhã	
Tarde	
Noite	

Depois da escovação da noite, só é permitido consumo de água.

Na manhã seguinte, **NÃO ESCOVAR OS DENTES E NÃO TOMAR CAFÉ-DA-MANHÃ.**

Traga sua pasta de anotações, seu kit-estojo (dentifrício, escova e copo do bochecho), pois você precisará escovar os dentes no laboratório!

DIA DA COLETA: ____/____/____**HORÁRIO DA COLETA:** _____

ANEXO Q

**RESULTADOS DA DOSAGEM DE PH E FT DOS DENTIFRÍCIOS
EXPERIMENTAIS**

Tabela 8 - Potencial hidrogeniônico (pH) determinado nas suspensões de dentifrícios (n=3)

Dentifrício	Placebo		550 ppm F		1100 ppm F	
	ácido	neutro	ácido	neutro	ácido	neutro
Média	4,24	6,81	4,49	6,81	4,87	6,79
DP	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01

Tabela 9 - Concentração de fluoreto (n=3) nos dentifrícios utilizados no estudo

Dentifrício	Placebo		550 ppm F		1100 ppm F	
	ácido	neutro	ácido	neutro	ácido	neutro
Média	14,7	14,8	520,2	504,4	1107,2	1081,6
DP	5,6	5,9	4,5	19,4	8,1	30,5