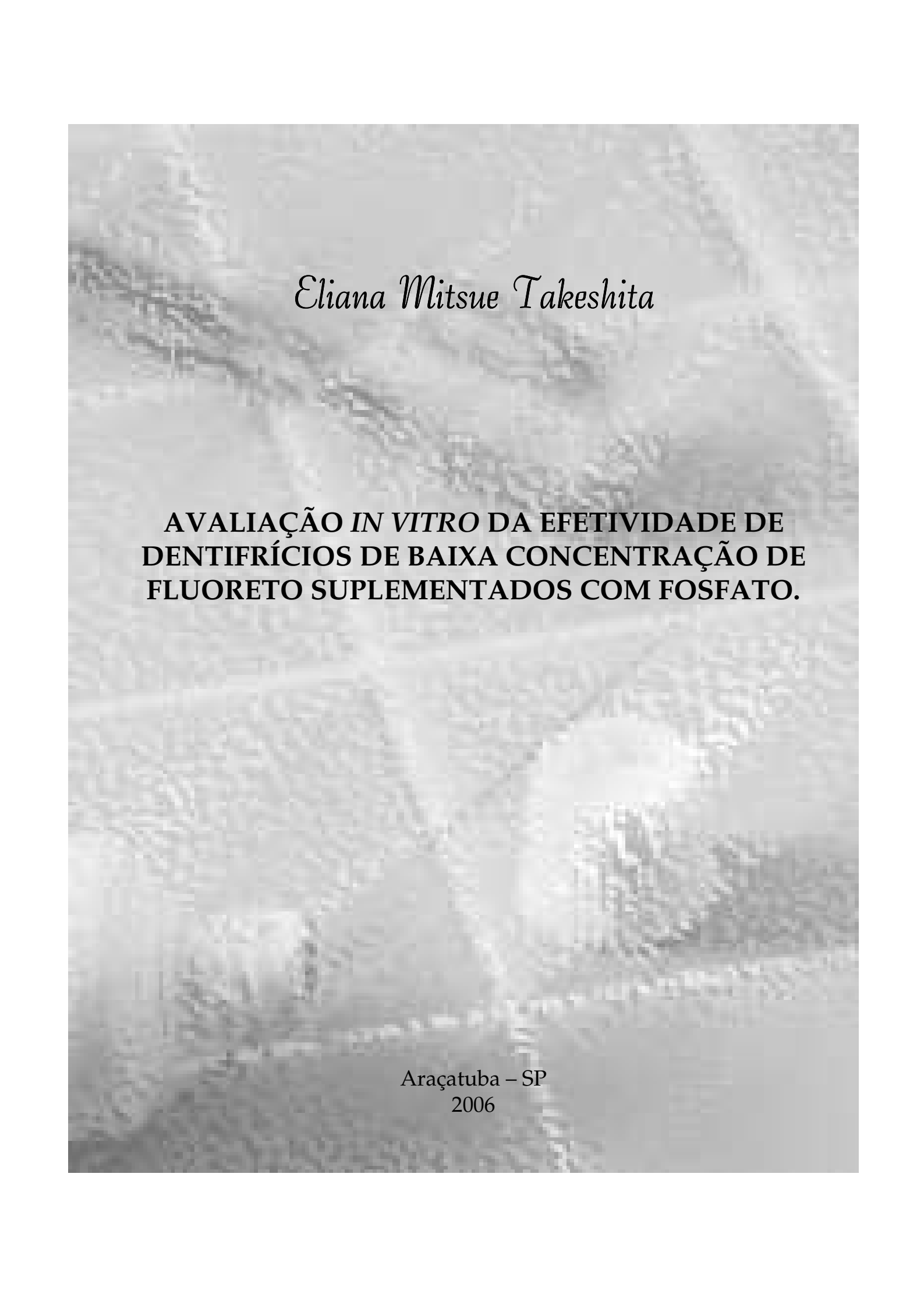




Eliana Mitsue Takeshita

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE
DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE
FLUORETO SUPLEMENTADOS COM FOSFATO.**

Araçatuba – SP
2006

Eliana Mitsue Takeshita

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE
DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE
FLUORETO SUPLEMENTADOS COM FOSFATO.**

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

Orientadora: Kikue Takebayashi Sasaki

ARAÇATUBA - SP

2006

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T136a

Takeshita, Eliana Mitsue

Avaliação *in vitro* da efetividade de dentifrícios
de baixa concentração de fluoreto e suplementados
com fosfato / Eliana Mitsue Takeshita. -

Araçatuba : [s.n.], 2006

69 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006

Orientador: Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki

1. Dentifrícios 2. Esmalte dentário 3. Cárie dentária 4. Flúor
5. Fosfatos 6. Desmineralização

Black D27

CDD 617.645

Dados Curriculares

Eliana Mitsue Takeshita

Nascimento

28.12.1981 – Vitória - ES

Filiação

Milton Teiti Takeshita

Cleusa Mitsuko Nonaka Takeshita

2000/2003

Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Unesp – Campus Araçatuba.

2005/2006

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

Dedicatória



À DEUS,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando os meus passos em meu longo caminho rumo a grandes realizações. Devo a Ele todos os meus momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado.

Muito Obrigada!

À MINHA FAMÍLIA,

Por todos os conceitos divididos, ensinados e aprendidos. Pelo apoio e confiança em mim depositados em todos os momentos de minha vida. E que a distância fez provar a união que há entre nós.

AOS MEUS PAIS, MILTON E CLEUSA,

Pela confiança que possuem em mim. Desde a minha infância até os dias de hoje. São exemplos de determinação, dedicação, honestidade, muita felicidade e amor. Agradeço por todos os momentos em que estamos juntos e todos os esforços para que nunca faltasse nada tanto para mim quanto para meus irmãos, passando segurança e tranqüilidade para que nós realizássemos todos os nossos objetivos.

Não há palavras que expressem meu amor por vocês.

AOS MEUS IRMÃOS, WILTON E WILLIAM

Pela grande alegria que proporcionam a nossa família. Mesmo com objetivos diferentes e em lugares distantes, somos um trio e tanto. Wilton, pela sua determinação e exemplo de irmão mais velho, sempre me guiando e protegendo! Ajudou-me em vários momentos de minha vida. Somos irmãos e amigos de profissão. E meu “irmazinho”, William, pela sua determinação, companheirismo e sua grande capacidade de agradar a todos com seu carinho e sensibilidade.

Agradeço por serem meus queridos irmãos.

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

Van Shendel

À MINHA ORIENTADORA,

Prof^a Dr^a Kikue Takebayashi Sasaki, minha querida orientadora, exemplo de docente e pesquisadora. Pelo exemplo de determinação, organização, humildade e perseverança. Agradeço por todo o esforço que dedicou a esse trabalho, e por ter me proporcionado todos esses anos de orientação. Aprendi muito estando ao seu lado.

Agradeço pela amizade, preocupação e compreensão, conversas e risadas que demos ao longo da nossa convivência.

Ao Prof Dr Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Pelo exemplo de dedicação, experiência e competência. E realiza as pesquisas superando todos os grandes desafios. E por ter atendido e compreendido todas as dificuldades que tivemos para a realização desse trabalho.

“A primeira fase do saber, é amar os nossos professores”

Erasmus

Agradecimentos Especiais



Aos meus padrinhos, Júlio e Setsuko,

Presente em todos os momentos de minha vida. Obrigada pela preocupação e dedicação que sempre demonstram por mim.

Ao meu namorado, Fábio,

Pela compreensão nas fases finais da realização desse trabalho. E, mesmo longe, passou a segurança que precisava para terminar mais uma grande conquista.

A aluna Luciene Pereira de Castro,

Pela ajuda na realização da fase laboratorial, e compreensão diante as exigências feitas por mim.

"Para cada esforço disciplinado há múltiplas recompensas"
Jim Rohn

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Paulo Roberto Botacin, digníssimo Diretor e Dr. Célio Percinoto, digníssimo Vice-Diretor.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

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

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mario Luis da Silva, pelo auxílio indispensável e momentos de descontração.

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

À todos os amigos de turma de mestrado: Alessandra, Eliana, Janaina, Max Douglas e Tais, pela convivência.

A todos os colegas que fizeram parte do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, em especial , Daniela e Antônio, pela amizade e toda animação que passaram durante o curso.

Aos amigos do Laboratório que sempre incentivaram, ajudaram e compreenderam o esforço na realização desse trabalho, Ana Elisa, Ana Carolina, Karina Mirela, Marcelle, Márcia, Felipe, Camila, Luciana, Karina.

A Fernanda Lourenção Brighenti por ter me ensinado e aconselhado nos momentos iniciais da realização deste trabalho.

A Eliana Rodrigues por ter se tornado uma grande amiga e por dividir todos os momentos durante a pós-graduação.

Ao amigo Kélio Garcia Silva por compartilhar as idas ao frigorífico, pela ajuda e esforço e a convivência no laboratório.

A amiga Gracieli Prado Elias, por participar de certa forma incentivando e dando apoio na realização desse trabalho, e por compartilhar na realização de outros trabalhos.

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

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

Aos Demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial, Profa Dra Denise Pedrini, Profa Dra Cristina Antonili Silva E Prof Dra. Adriana Cristina Zavanelli, pelos ensinamentos transmitidos durante a graduação e pós-graduação.

Ao Departamento de Ciências Básicas, pelo incentivo durante os trabalhos realizados durante a graduação, em especial, Profa Dra Rita Cássia Dornelles Menegatti, e os técnicos Gim e Mauro.

Aos amigos que participaram e incentivaram durante a pós-graduação, em especial, Débora e Michel.

As minhas amigas Sayaka Iwama e Tatiana Corrêa da Silva pela convivência e apoio na realização dos trabalhos de pesquisa durante a graduação.

Aos amigos que mesmo com a distância continuam sempre meus amigos: Bianca, Ioninha, Livia, Solange, Marcelle, Fernando, Ricardo, Aline, Megumi, e Fran.

Ao Frigorífico Friboi, em especial, ao veterinário Henrique Borges, que permitiu a coleta dos dentes bovinos.

Ao Senhor Mario Ogasawara, da Faculdade de Farmácia de Riberão Preto – USP, que com seus conhecimentos auxiliou na manipulação dos dentifrícios experimentais.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido para a realização do trabalho (05/54651-6)

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

Minha eterna gratidão...

SUCESSO

“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros, deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu...

...Isso é ter tido sucesso”.

Ralph Waldo Emerson

Epígrafe



SUMÁRIO

RESUMO.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 PROPOSIÇÃO.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Delineamento Experimental.....	28
3.2 Formulação e Dosagem de F dos Dentifrícios Experimentais.....	28
3.3 Ciclagem de pH (Des>Re).....	29
3.4 Determinação da microdureza do esmalte.....	30
3.5 Determinação de F, Ca e P no esmalte e nas soluções.....	30
3.6 Análise Estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	34
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	53

RESUMO



RESUMO

TAKESHITA, E. M. **Avaliação *in vitro* da efetividade de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto suplementados com fosfato.** Araçatuba, 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

A redução da concentração de fluoreto (F) nos dentifrícios é importante para a prevenção da fluorose dental, entretanto, é necessário manter a mesma efetividade de um dentifrício de mercado (1100 µgF/g). O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* se a suplementação com fosfato em dentifrícios com baixa concentração de F pode proporcionar eficácia semelhante a de um dentifrício padrão sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino, utilizando modelo de ciclagem de pH. Blocos de esmalte selecionados foram submetidos a repetidas ciclagens de pH alternadas com tratamento diário com dentifrícios contendo 500 µgF/g e entre 0 e 3% de trimetafosfato de sódio (TMP); foram utilizados também um dentifrício sem adição de F e TMP (placebo) e um comercial (Crest®, de 1100 µgF/g). Após as ciclagens foram determinadas a porcentagem de perda da microdureza de superfície, perda mineral (ΔZ) e conteúdo de F, cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos e análise de correlação de Pearson para determinar diferenças e relação dose resposta entre os tratamentos. Os resultados mostraram que a adição de TMP (0,25-3,0%) a dentifrícios sem F causa uma diminuição na %SMH e na ΔZ , e quando adicionado a um dentifrício de 500 µgF/g o efeito final torna-se comparável a de um dentifrício de 1100 µgF/g. Observou-se também aumento na concentração de F na camada superficial da lesão com o aumento da concentração de TMP. Conclui-se que é possível reduzir a concentração de F a 500 µg/g e se obter uma ação comparável com a de um dentifrício comercial através da suplementação com fosfato sob a forma de TMP.

Palavras-chave: Dentifrícios. Esmalte dentário. Flúor. Cárie dentária. Fosfato. Desmineralização.

ABSTRACT



ABSTRACT

TAKESHITA, E. M. *In vitro* evaluation of dentifrices with low fluoride content supplemented with phosphate. Araçatuba, 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

The reduction of fluoride (F) concentration in dentifrices is important to prevent dental fluorosis, but it is necessary to maintain their effectiveness. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, whether the phosphate supplementation of a dentifrice with low F content would provide a similar effect when compared to a standard dentifrice. Bovine enamel demineralization in a pH cycling model was used. Enamel blocks were selected through surface microhardness (SMH) and were subjected to a pH cycling during 7 days. The treatment was done twice daily for 1 min with dentifrice containing 500 µgF/g. The sodium trimetaphosphate (TMP) concentration varied from 0 up to 3%. For the control groups, a dentifrice without F and P and a “Gold Standard” dentifrice (1100 µgF/g) were used. After the pH cycling, the percentage change of surface microhardness (%SMH), mineral loss (ΔZ) and the assessment of F, calcium and phosphate in enamel were calculated. Parametrical and non-parametrical tests and Pearson’s correlation analysis were used to determine difference ($p < 0.05$) and dose-response relationship between treatments. The results showed that TMP addition (from 0.25 to 3%) to a dentifrice without F induces a reduction in %SMH and ΔZ . When this concentration of TMP is added to a dentifrice with 500 µg F/g the final effect is similar to a dentifrice with 1100 µgF/g (CrestTM). Also, the results showed an increase in the F content in lesion surface layer with the increase of TMP concentration. It is concluded that it is possible reduce the F content to 500 µgF/g by supplementing with phosphate and obtain a similar action when compared to a market dentifrice.

Keywords: Dentifrice. Dental enamel. Fluoride. Dental Caries. Phosphate. Demineralization.

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

A adição de fluoreto (F) ao dentifrício teve início na década de 60 e, embora a expansão de seu uso tenha provocado uma diminuição na incidência da cárie dentária, foi acompanhada por um aumento na fluorose dentária (ten Cate, 2004). A prevalência de fluorose aumentou em áreas com e sem fluoretação das águas, o que levantou a hipótese de que outros fatores que não a água de abastecimento eram responsáveis pela fluorose (Pendrys & Stamm, 1990).

O uso de dentifrícios fluoretados por crianças durante o período de desenvolvimento dental, do nascimento até os seis anos de idade, tem sido considerado um fator de risco para a fluorose dentária (Mascarenhas, 2000).

Um dos recursos para redução na ingestão de F pelas crianças seria a diminuição de sua concentração no dentifrício (Horowitz, 1992) contanto que mantenha sua efetividade anticariogênica comparável a de um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g).

O aumento da eficácia do dentifrício pode ser obtido pela redução do seu pH e conseqüente aumento na formação de fluoreto de cálcio (Saxegaard & Rolla, 1988; Ogaard, 2001; Negri & Cury, 2002; Brighenti *et al.*, 2006).

Outro recurso que poderia ser empregado é a suplementação com cálcio e/ou fosfato, uma vez que o processo da remineralização, embora seja intensificado pelo F, depende primariamente da presença desses íons na saliva (Schemehorn *et al.*, 1999a,b). Se uma quantidade suplementar de íons cálcio e fosfato fosse acrescentada aos íons já presentes na saliva, sem insolubilizar o F, seria possível obter um efeito aditivo ao do F.

Dentre os vários sais de fosfato com atividade anticariogênica (Harris *et al*, 1967; Gonzalez, 1971; Larson *et al*, 1972; Gonzalez *et al*, 1973; Ständtler *et al*, 1996), o trimetafosfato de sódio (TMP) parece ser o mais ativo (Harris *et al.*, 1966). Estudos sugerem que o TMP atua reduzindo o processo de desmineralização (Henry & Navia, 1969), entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está completamente definido.

Trabalhos clínicos utilizando dentifrícios com 3% TMP não associado a F mostraram uma ligeira redução nos incrementos de cárie quando comparados a um dentifrício placebo (Ständtler, 1996). Outro, porém, mostrou que a adição de 3% TMP a um dentifrício de 1500 µgF/g não mostrou diferenças significantes quando comparado ao mesmo dentifrício sem a suplementação (O'Mullane *et al.*, 1997), indicando que na presença de altas concentrações de F a suplementação de TMP não traz aumento na ação anticariogênica. Entretanto, é possível que em um dentifrício de baixa concentração de F a suplementação possa incrementar seu efeito anticariogênico.

A formulação de um dentifrício com menor concentração de F suplementado com cálcio e/ou fosfato deve manter estes íons sob forma ativa; por outro lado, não foi estabelecida qual concentração desses íons seria adequada para um dentifrício de baixa concentração de F. Assim, seria interessante determinar qual concentração de cálcio e fosfato que associada a uma baixa concentração de F promoveria uma ação anticariogênica semelhante a de um dentifrício padrão de mercado (1100 µg F/g), sem interferir na ação e estabilidade do F.

Por outro lado, de acordo com as recomendações mais recentes (ten Cate & Mundorff-Shrestha, 1995), para atestar a eficácia de dentifrícios já existentes como também para validar novas formulações é necessário verificar a relação dose-resposta desses dentifrícios. Um dos modelos utilizados na avaliação desses produtos é a ciclagem de pH que permite simular o desenvolvimento de cárie sob condições controladas (White, 1995). Vieira *et al.* (2005) padronizaram a metodologia da ciclagem de pH para esmalte bovino e obtiveram relação dose-resposta e, portanto, esse modelo foi o utilizado no presente trabalho.

PROPOSIÇÃO



PROPOSIÇÃO

A proposição do presente trabalho foi avaliar *in vitro* se a suplementação com fosfato em dentifrícios com baixa concentração de F pode proporcionar eficácia semelhante a de um dentifrício padrão sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino, utilizando modelo de ciclagem de pH.

Foram analisadas:

- a porcentagem de alteração da microdureza de superfície
 - a dureza do esmalte em secção longitudinal e a porcentagem de volume mineral em diferentes distâncias da superfície do esmalte
 - a perda mineral integrada
 - a concentração de F, Ca, P presente no esmalte.
-

MATERIAL E MÉTODO



3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento Experimental

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol neutro a 2% em temperatura ambiente. As superfícies de esmalte dos blocos foram seqüencialmente polidas e aqueles com dureza (baseline) de 330-370 KHN (SMH₁) foram selecionados e divididos, de acordo com a média de dureza do total de blocos e seu intervalo de confiança, em grupos experimentais de 10 espécimes cada (Anexo B e C). Os blocos de esmalte bovino foram submetidos num período de sete dias, a cinco ciclagens de pH e ao tratamento duas vezes ao dia com dentifrício. As formulações de dentifrícios tinham concentrações de F de zero e 500 µg/g e concentrações de TMP de 0 a 3%. Foi utilizado o dentifrício comercial Crest[®] ("Gold Standard"- 1100 µg F/g) para fins de comparação. Após as ciclagens de pH, a microdureza de superfície do esmalte (SMH₂) foi novamente medida para cálculo da porcentagem de alteração de dureza da superfície (%ASMH). Em seguida foi determinada a dureza do esmalte em secção longitudinal e calculada a porcentagem de volume mineral em diferentes distâncias da superfície do esmalte seguida da perda mineral integrada (ΔZ). Foi determinada a concentração de F, Ca e P no esmalte e nas soluções após as ciclagens.

3.2 Formulação e Dosagem de F e P dos Dentifrícios Experimentais

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, laurilsulfato de sódio e água.

O fluoreto (F) foi acrescentado às formulações para obter uma concentração final de 500 µg F/g (na forma de NaF- Merck®) e o TMP (Sigma®), nas concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 3%. Foram preparados também um dentifrício sem F e sem TMP (placebo) e dentifrícios sem adição de F mas com as diferentes concentrações de TMP. A determinação do flúor total (FT) e do flúor iônico (FI) foi realizada através do método utilizado por Delbem *et al.* (2002) (Anexo A). 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 (0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 µgF/g). O P dos dentifrícios foi determinado de acordo com o método de Fiske & Subbarow (1925), submetendo-se previamente parte das amostras à hidrólise com HCl 1 mol L⁻¹ em banho-fervente durante 1 h (Anexo B).

3.3 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 remineralizante (Vieira *et al.*, 2005). Os blocos foram imersos sob agitação constante, duas vezes ao dia durante um minuto, em suspensões de dentifrícios em água destilada/deionizada (1:3 – peso:peso) quando removidos das soluções desmineralizante (Des, 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 remineralizante (Re, 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 segundos, após serem removidos das soluções Des ou Re e dentifrício/água.

3.4 Determinação da Microdureza do Esmalte

A microdureza de superfície foi determinada antes (SMH inicial, SMH₁) e após as ciclagens de pH (SMH final, SMH₂) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 gramas por 10 segundos (Anexo E). 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, sendo calculada a porcentagem de variação de microdureza de superfície (%ASMH), [$\%ASMH = ((SMH_2 - SMH_1) / SMH_1) \times 100$]. Após análise da SMH, secções longitudinais foram feitas no centro dos blocos e uma das metades incluídas em resina acrílica e polida. Uma seqüência de oito impressões a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte foi realizada na região central dos blocos e outras duas a 100 µm acima e abaixo, sob carga de 25 gramas por 10 segundos (Anexo F). As médias foram calculadas em cada distância e os valores convertidos em conteúdo mineral (% vol. min.) (Featherstone *et al.*, 1983). A área integrada (%vol. min. x µm) do esmalte hígido (Z₁) e do esmalte após ciclagem de pH (Z₂) foi calculada (Ögaard *et al.*, 1988; Arends & Bosch, 1992; Sullivan *et al.*, 1995) seguida da perda mineral integrada ($\Delta Z = Z_2 - Z_1$) (Vieira *et al.*, 2005).

3.5 Determinação de F, Ca e P no esmalte e nas soluções

Uma das metades dos blocos seccionados longitudinalmente foi seccionada obtendo um bloco com dimensões 2X2mm. As medidas foram realizadas com

paquímetro digital (Mitutoyo CD-15B, Mitutoyo Corporation, Japan) para obter-se a área de superfície do esmalte. Em seguida, duas camadas, a primeira de 10 μm e a segunda de 40 μm de esmalte foram removidas, baseando-se no trabalho de Weatherell *et al.* (1985). Para tal foi utilizado um micromotor acoplado à peça reta (N 270, Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de granulação 600 (silicon-carbide, BUEHLER) para a primeira camada e lixa de granulação 320 (silicon-carbide, BUEHLER) para a segunda camada, em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast) (Anexo G). As superfícies dos blocos foram lavadas com 0,4 mL de água deionizada, no interior dos frascos onde foi acrescentado 0,4 mL de HCl 1 mol L⁻¹. Os frascos foram mantidos sob agitação constante por 30 minutos e seguida da adição de 0,8 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Aliquotas de 0,7 mL dessa mistura foram pipetadas, adicionadas de 0,07 mL de TISAB III (*total ionic strength adjustor buffer*) para dosagem de F. Outra alíquota de 0,7 mL foi adicionada de 0,014 mL de ISA (*ionic strenght adjustor*) para determinação de cálcio utilizando-se eletrodo específico (Orion 9300) e analisador de íons (Orion 720A). Dessa mistura alíquotas de 100 μL foram utilizadas para dosagem de fósforo inorgânico, pelo método espectrofotométrico de Fiske & Subbarow (1925). Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles/mm}^3$.

Foi realizada a análise das soluções de ciclagem de pH com relação à variação (final-inicial) da quantidade de (μg) de F (ΔF) e Ca (ΔCa). As diferenças das três soluções (Des, Re 1° - 5° dia e Re 6° - 7° dia) foram somadas (Anexo M).

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi aplicada a análise estatística mais adequada para cada resultado: com exceção do quociente de reação para as soluções desmineralizantes e análise da %vol.min em diferentes distâncias, em que foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, todos os demais resultados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Tukey. Foi realizada também a análise de regressão e correlação de Pearson. As análises foram feitas utilizando-se o programa GMC versão 2002 (Campos, 2003), estabelecendo-se o nível de significância em 5%.

RESULTADOS



4 RESULTADOS

As concentrações (média±dp) de F e P nos dentifrícios estão apresentadas na tabela 1. Observa-se que sem prévia hidrólise ácida a concentração de P encontrada nos dentifrícios é de no máximo 30% daquela estimada pela fórmula molecular do TMP. O pH (média±dp) dos dentifrícios experimentais foi de $7,3 \pm 0,4$ e do Crest® foi de $7,0 \pm 0,008$.

< Tabela 1>

A Figura 1A mostra os valores médios de %ASMH (Anexo I) do esmalte dos blocos tratados com os dentifrícios experimentais e comercial (Crest®). Observa-se que o tratamento com dentifrícios sem F contendo TMP até a concentração de 0,1% não diminui a porcentagem de perda de microdureza, permanecendo igual ao placebo. O efeito de TMP só é observado a partir da concentração de 0,25%, na ausência de F e aumenta com sua concentração. Nos dentifrícios com F (500 µg/g) a adição de TMP causou uma maior redução da %ASMH a partir da concentração de 0,1%, se igualando ao Crest®. Em concentrações acima de 1% obteve-se eficácia maior que o do Crest®. O efeito da adição de TMP ao dentifrício sobre a %ASMH mostrou correlação significativa tanto em dentifrícios sem F ($r=0,9767$, $p=0,0006$), como naqueles com F ($r=0,8554$, $p=0,0144$).

< Figura 1>

A figura 1B mostra que nos grupos tratados com dentifrícios sem F a perda mineral foi menor que a do placebo a partir da adição de 0,1% de TMP. O efeito máximo foi observado na concentração de 1%. A adição de TMP ao dentifrício de 500 µgF/g provocou uma melhora na sua eficácia reduzindo a perda mineral, a partir da concentração de 0,25%, quando se iguala ao Crest®; nas concentrações acima de 0,5%

observam-se perdas ainda menores. O efeito da adição de TMP sobre a perda mineral mostrou correlação significativa tanto nos dentifrícios sem F ($r=0,8756$, $p=0,0104$) como naqueles com F ($r=0,8554$, $p=0,0098$).

A Figura 2 mostra que as diferenças de conteúdo mineral entre os grupos são mais evidentes até uma profundidade de cerca de 50 μm ; essas diferenças podem ser observadas já na primeira camada de 10 μm , mesmo nos grupos em que não tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa no ΔZ .

< Figura 2 >

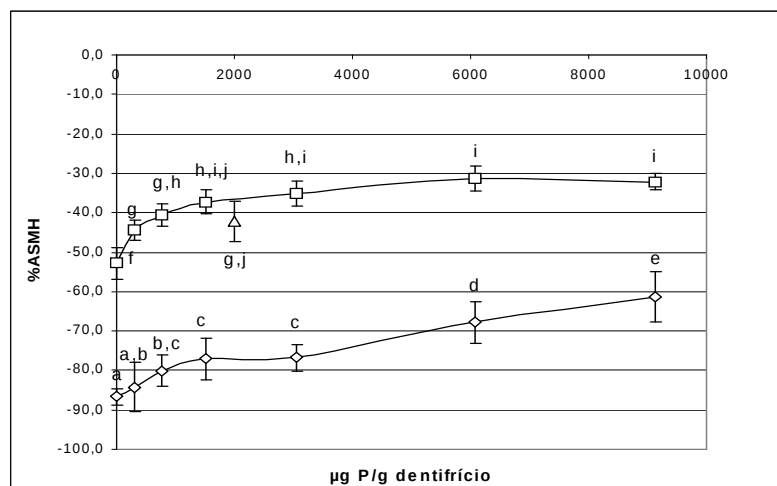
Pela análise do conteúdo mineral após a microabrasão (figura 3), observa-se que há correlação entre a concentração de F no esmalte e a concentração de TMP tanto nos dentifrícios sem F ($r=0,8549$, $p=0,0146$) como naqueles com F ($r=0,9759$, $p=0,0006$). Com relação ao Ca, a correlação só foi observada nos dentifrícios com F ($r=0,7798$, $p=0,0382$) e quanto ao P, não houve correlação.

< Figura 3 >

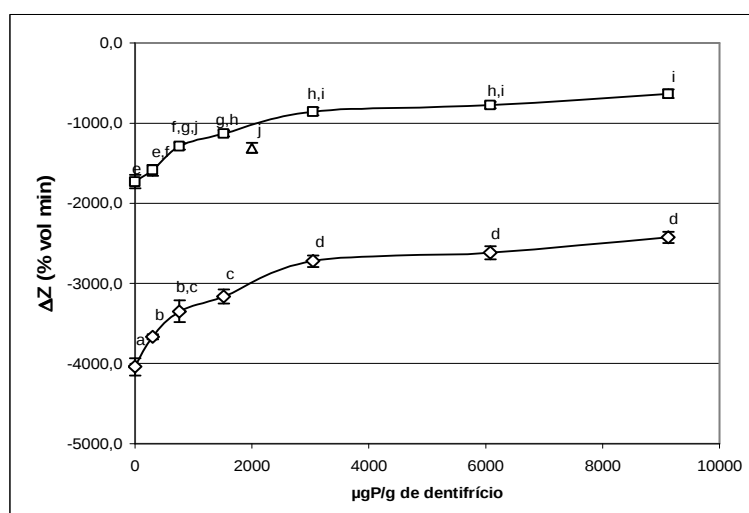
A partir das concentrações de F e Ca das soluções utilizadas nas ciclagens, determinou-se o quociente de reação para CaF_2 através da fórmula do produto de solubilidade ($K_{ps} = [\text{Ca}].[F]^2$) (anexo M). Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos com diferentes concentrações de TMP.

Tabela 1. Concentração (µg/g) de F iônico (FI) e total (FT) e P (sem e após hidrólise) dos dentifrícios. Os valores expressam médias±dp e o número de amostras

Dentifrício	F (µg/g)				P (µg/g)			
	Flúor Iônico (FI)		Flúor Total (FT)		Sem Hidrólise		Após Hidrólise	
	0	500	0	500	0	500	0	500
0% TMP	5,6 ± 1,72 (6)	520,5 ± 2,1 (3)	7,36 ± 2,2 (6)	512,7 ± 2,1 (3)	30,59 ± 19,11 (3)	18,66 ± 1,9 (3)	36,43 ± 12,05 (3)	10,32± 10,1 (3)
0,1% TMP	5,7 ± 1,6 (6)	516,8 ± 22,5 (3)	8,4 ± 4,2 (6)	500,4 ± 15,2 (3)	94,31 ± 4,17 (3)	71,73 ± 3,7 (3)	273,29 ± 19,9 (3)	219,90 ± 3,12 (3)
0,25% TMP	5,6 ± 2,2 (6)	520,9 ± 22,7 (3)	6,8 ± 2,5 (6)	511,4 ± 20,9 (3)	127,70± 6,22 (3)	106,51± 3,2 (3)	623,86 ± 14,71 (3)	551,77 ± 6,7 (3)
0,5% TMP	5,3 ± 1,8 (6)	506,5 ± 22,5 (3)	7,0 ± 2,6 (6)	501,4 ± 19,1 (3)	178,93± 2,13 (3)	181,42 ± 12,35 (3)	1142,67 ± 12,6 (3)	1209,47 ± 37,5 (3)
1% TMP	4,9 ± 1,6 (6)	514,2 ± 12,4 (3)	6,8 ± 2,2 (6)	523,7 ± 13,4 (3)	287,56 ± 14,64 (3)	297,05 ± 11,86 (3)	2187,25 ± 27,85 (3)	2550,81 ± 16,29 (3)
2% TMP	6,3 ± 0,7 (3)	478,3 ± 10,6 (3)	9,2 ± 1,4 (3)	489,9 ± 8,7 (3)	561,51 ± 21,05 (3)	408,61 ± 14,18 (3)	5017,31 ± 74,4 (3)	4197,66 ± 17,24 (3)
3% TMP	4,8 ± 1,2 (3)	532,1 ± 32,5 (3)	4,3 ± 0,2 (3)	543,8 ± 34,5 (3)	483,07± 9,7 (3)	397,28 ± 16,33 (3)	5972,23 ± 259,0 (3)	5946,73 ± 75,19 (3)
Crest®		1117,3 ± 29,0 (3)		1083,6 ± 29,3(3)		1944,37 ± 25,6 (3)		



(A)



(B)

Figura 1 – (A) Porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%ASMHI), (B) perda mineral (ΔZ) do esmalte dos blocos tratados com dentifrícios com 500 $\mu\text{gF/g}$ (□), 0 $\mu\text{gF/g}$ (◇) e Crest® (Δ). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

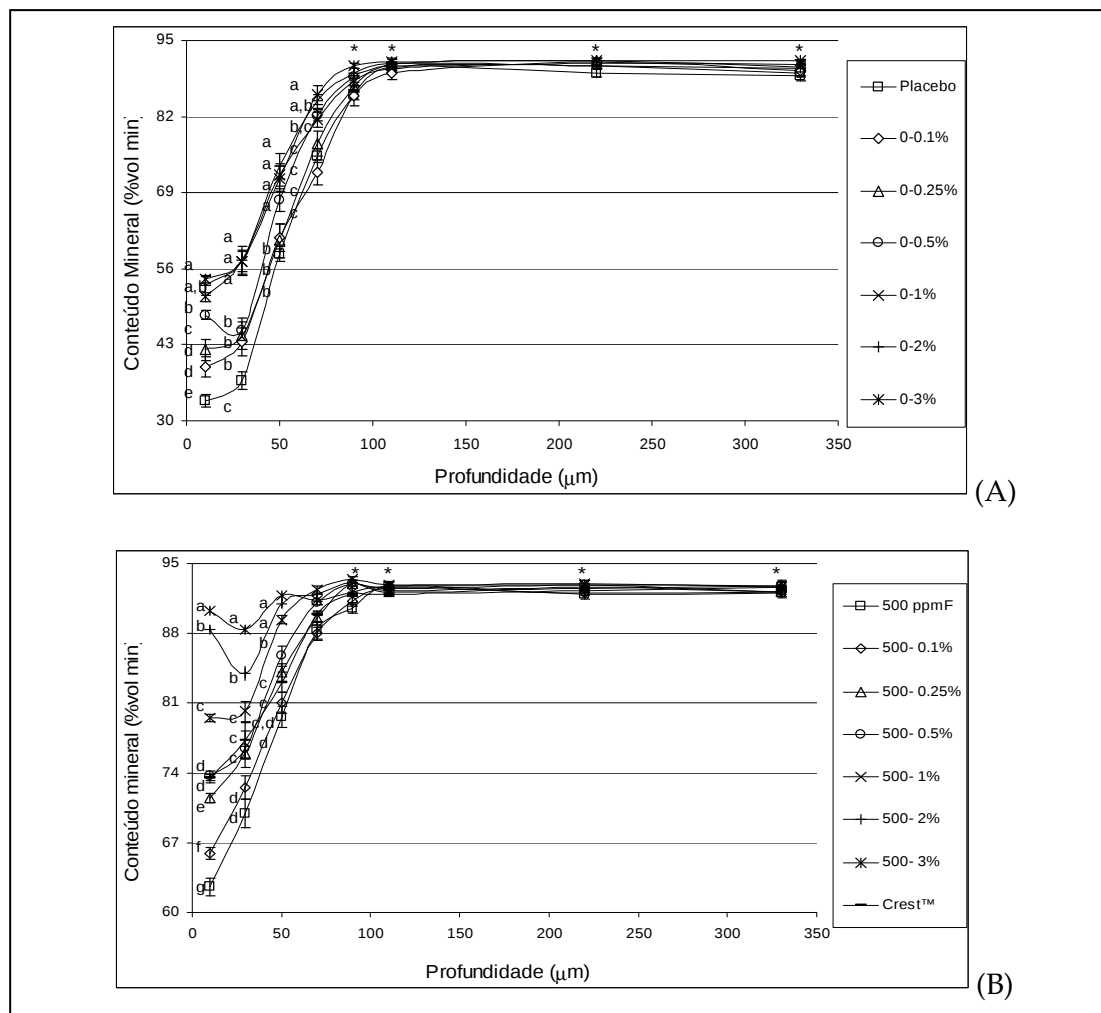


Figura 2 – Conteúdo mineral (%Vol.min, n=10) em diferentes profundidades do esmalte dos blocos tratados com dentifrícios sem F (A) e com 500 $\mu\text{gF/g}$ e Crest® (B). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p<0,05$).

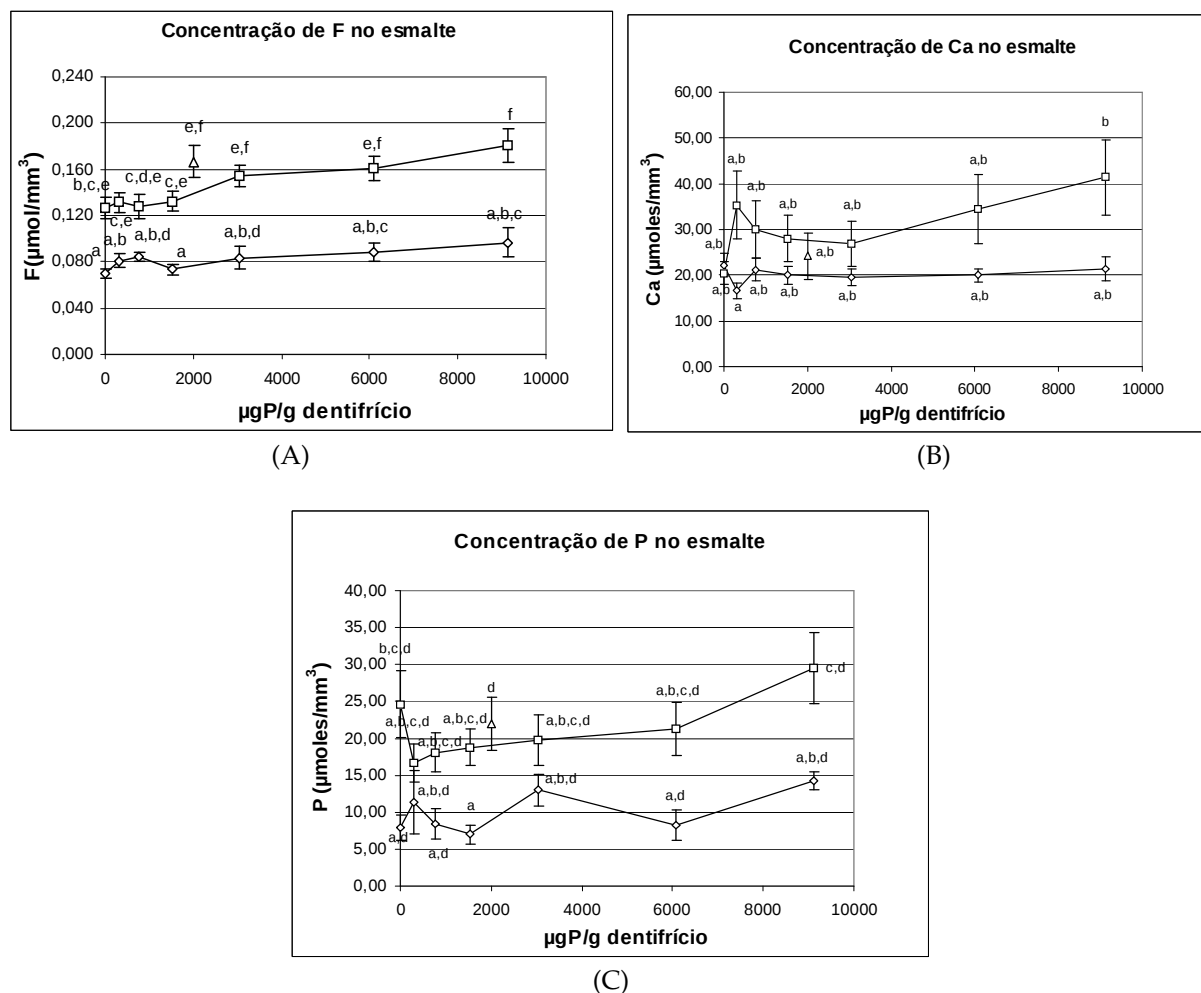


Figura 3 – Concentração ($\mu\text{mol}/\text{mm}^3$) de F (A), Ca (B) e P (C) (média $\pm$ epm, $n = 10$) no esmalte dos blocos tratados com dentifícios experimentais de 0 $\mu\text{gF}/\text{g}$ (◇), 500 $\mu\text{gF}/\text{g}$ (□) e Crest® (Δ). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p,0,05$).

DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

Uma das formas de prevenção da fluorose dentária seria a diminuição da exposição ao F pela redução de sua concentração disponível nos dentifrícios (Horowitz, 1992).

Entretanto, é necessário que esses dentifrícios com menor concentração de F sejam eficazes tanto quanto um dentifrício comercial de 1100 µgF/g. Alguns autores têm preconizado a utilização de agentes anticariogênicos associados ou não ao F (Ingram & Edgar, 1994; Roberts, 1995). Assim, a suplementação com fosfato em um dentifrício contendo 500 µgF/g poderia proporcionar a mesma efetividade. Como demonstrado no presente trabalho, os dentifrícios suplementados com TMP, dependendo da concentração adicionada, apresentaram uma eficácia equivalente ou maior que a do controle positivo (Crest®, 1100 µgF/g).

Alguns trabalhos relatam que a atividade anticariogênica dos sais de fosfato, dentre eles o TMP, se deve a uma redução do processo de desmineralização do esmalte (Henry & Navia, 1969; Gonzalez, 1971). Dentre os fosfatos estudados, o TMP mostrou atividade anticariogênica melhor que o hexametáfosfato e o ortofosfato (Harris *et al.*, 1967). Trabalhos clínicos utilizando dentifrícios com 3% TMP não associado a F mostraram uma ligeira redução nos incrementos de cárie quando comparados a um dentifrício placebo (Ständtler, 1996). Os resultados do presente trabalho *in vitro* também mostram uma redução na perda da microdureza de superfície do esmalte e ΔZ de blocos tratados com dentifrícios contendo apenas TMP. Mesmo em concentração de 0,1% TMP, já se observa diferença significativa em

relação ao placebo e esse efeito fica mais evidenciado em concentrações maiores de TMP.

Em outro trabalho clínico (Andlaw *et al.*, 1983), dentifrícios contendo 3% TMP apresentaram efetividade menor que aqueles que continham 0,8% MFP (1.060 µgF/g). No presente trabalho também se constata que a porcentagem de perda de microdureza de superfície como de perda mineral (ΔZ) é maior quando o TMP não está associado ao F. Kinkel *et al.* (1985) relataram que dentifrícios contendo a combinação de 1200 µgF/g (NaF), 420 µgF/g (MFP) e 2% de TMP apresentavam efetividade superior quando comparados a um controle de 1300µgF/g (MFP). Nossos resultados mostram que mesmo a concentração mais baixa de F (500 µg/g) associada a 0,1% de TMP já mostra redução da perda de microdureza de superfície semelhante àquela obtida com o controle positivo de 1100 µg F/g.

Segundo Gonzalez (1971), o F e o TMP não competem pelo mesmo sítio de ligação na superfície do esmalte. Os resultados mostram que o efeito de TMP pode incrementar o do F, sem interferir em sua ação.

O TMP é um composto cíclico que pode ser hidrolisado através de uma base ou um ácido forte (Gonzalez, 1971). Como se pode observar na tabela 1, sem hidrólise ácida das amostras dos dentifrícios, foi encontrado no máximo 30% da concentração de P estimada a partir da fórmula molecular do TMP. Dessa maneira, podemos sugerir que o TMP atua predominantemente sob forma inalterada, através da deposição na superfície e/ou pela sua incorporação ao esmalte. Quando incorporado à hidroxiapatita (HA) altera as trocas de minerais com o meio (MacGaughey e Stowell, 1977), diminuindo a solubilidade tornando a deposição de fosfatos de cálcio

na superfície do esmalte mais lenta (MacGaughey, 1983), favorecendo a formação de compostos químicos mais semelhantes à HA e fluorapatita (FA) (Gonzalez, 1971).

Como se pode constatar no gráfico do ΔZ (figura 1B), a remoção de uma camada de 50 μm de profundidade foi suficiente para permitir a avaliação da camada superficial da lesão, uma vez que até essa profundidade se notam as maiores diferenças entre os grupos. A incorporação de F no esmalte aumenta com a concentração de TMP presente no dentifrício e mostra uma correlação significativa com a %ASMH para os dentifrícios sem F ($r=0,8503$, $p=0,0156$) e com F ($r=0,7666$, $p=0,0438$). Houve correlação significativa também entre a concentração de F no esmalte e o ΔZ para os dentifrícios sem ($r=0,8248$, $p=0,0224$) e com F ($r=0,8788$, $p=0,00098$). Quanto ao Ca não houve correlação significativa, entretanto, observa-se uma tendência de aumento na concentração desse íon no esmalte com o aumento de TMP, quando este está associado ao F (figura 3B), o que pode ter contribuído para o aumento da microdureza de superfície e maior conteúdo mineral avaliado pela microdureza em secção longitudinal, observados no presente trabalho.

O quociente de reação para CaF_2 calculado pelo produto das concentrações molares de Ca e F presentes nas soluções de ciclagem não se altera com o aumento da concentração de TMP do dentifrício, o que sugere que o TMP não interfere na formação de fluoreto de cálcio através de alterações nas concentrações desses íons presentes nas soluções de ciclagem.

A formação de fluoreto de cálcio na superfície do esmalte em pH neutro pode ocorrer com a incorporação de fosfatos em sua composição, formando um composto mais solúvel, o que aumentaria a liberação de F ao meio (Christoffersen *et al.*, 1988).

No modelo de ciclagem de pH, entretanto, as mudanças de pH (4,7 e 7,0) das soluções levam à dissolução e reprecipitação do composto sobre a superfície do esmalte. Segundo Gonzalez *et al.* (1973), o TMP se adsorve à superfície da HA, formando uma camada protetora que torna mais lenta a desmineralização, como também as trocas iônicas entre o esmalte e o meio. Dessa maneira, com o TMP adsorvido à HA durante os tratamentos com os dentifrícios, é possível que o fluoreto de cálcio e/ou os diferentes fosfatos de cálcio formados na superfície do esmalte sejam mais preservados. Esse processo se repetiria a cada tratamento com dentifrício, resultando em maior microdureza e conteúdo mineral.

Deste modo, os resultados mostram que a ação do TMP sobre o processo da des- e remineralização aumenta com sua concentração, ao menos até 3% utilizada nesse trabalho e essa ação incrementa a eficácia do F resultando em menor perda mineral do esmalte. A adição de TMP ao dentifrício permitiu que mesmo em concentração de F de 500 µg/g se obtivesse uma eficácia semelhante ou maior que a do controle positivo de 1100 µgF/g.

CONCLUSÃO



6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com TMP na concentração de 0,25 a 3,0% proporciona a um dentifrício de 500µgF/g uma eficácia equivalente ou superior que a de um dentifrício padrão de 1100µgF/g, *in vitro*, sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Andlaw RJ, Palmer JD, King J, Kneebone SB (1983). Caries preventive effects of toothpastes containing monofluorophosphate and trimetaphosphate: a 3-year clinical trial. *Community Dent Oral Epidemiol* 11:143-147.
- Arends J, Ten Bosch JJ (1992). Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 71:924-928.
- Brighenti FL, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Oliveira FAL, Ribeiro DB, Sassaki KT (2006). *In vitro* evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 40:239-244.
- Campos GM.(2003). GMC 2002. Ribeirão Preto: School of Dentistry, n.d. Available at: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>. Accessed on feb 21.
- Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibalczye W, Perdok WG (1988). Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand* 46:325-336.
- Delbem ACB, Vieira AEM, Cury JA (2002). Cariostatic potencial evaluation of most popular Brazilian dentifrice. *Rev Bras Odontol* 59:14-18.
- Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J (1983) Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 17:385-391.
- Fiske CH, Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375-400

*De acordo com "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals "

-
- Gonzalez M (1971) Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *J Dent Res* 50:1056-1064.
- Gonzalez M, Jeanson BG, Feagin FF (1973). Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. *J Dent Res* 52:261-266.
- Harris RS, Nizel AE, Walsh BN (1967). The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 46:290-294.
- Henry CA, Navia JM (1969). Sodium trimetaphosphate influence on the early development of rat caries and concurrent microbial changes. *Caries Res* 3:326-338.
- Horowitz HS(1992). The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentration for preschool-aged children. *J Public Health Dent* 52:216-221.
- Ingram GS, Edgar WM (1994). Interaction of fluoride and non-fluoride agents with the caries process. *Adv Dent Res* 8:158-165.
- Kinkel HJ, Raich R, Weststrate J, Lamme W (1985). Caries-inhibitory effect of various fluoride containing toothpastes. *Ärztl.Kosmetol.* 15:114-118.
- Larson RH, Spalter CD, Clemmer BA, Scherp HW (1972) Continuous versus intermittent feedings of different levels of trimetaphosphate in relation to caries development in the rat. *Arch Oral Biol* 17:1537-1541.
- Mascarenhas AK (2000) Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 22:269-277
- McGaughey C, Stowell E (1997) Effects of Polyphosphates on the solubility and mineral of HA: relevance of a rationale for anticaries activity. *J Dent Res* 56:579-587.
-

-
- McGaughey C (1983). Binding of poliphosphates and phosphanates to hydroxyapatite, subsequent hydrolysis, phosphate exchange and effects on demineralization, mineralization and microcrystal aggregation. *Caries Res* 17:229-241
- Negri HMD, Cury JA (2002) Efeito dose-resposta de uma formulação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto – estudo *in vitro*. *Pesqui Odontol Bras* 16:361-365.
- Ögaard B (2001) CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 35:40-44.
- Ögaard B, Rolla G., Arends J (1988) *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res* 22:302-305.
- O'Mullane DM, Kavanagh D, Ellwood RP, Chesters RK, Schafer F, Huntington E, Jones PR (1997) A Three-year clinical trial of a combination of trimetaphosphate and sodium fluoride in silica toothpaste. *J Des Res*. 76:1776-1781.
- Pendrys DG, Stamm JW (1990). Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. *J Dent Res* 69:529-538.
- Saxegaard E, Rolla G (1988). Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application *in vitro*. *Scand J Den. Res* 96:523-535.
- Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE (1999a) Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamel on dentifrice *J Clin Dent* 10 (Spec. n. 1) 9-12.
- Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM, Winston, AE (1999b) Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients.
-

J Clin Dent 10 (Spec. n. 1) 13-16.

Ständtler P, Müller-Bruckschwaiger K, Schäfer F, Huntington E (1996). The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res* 30:418-422.

Sullivan RJ, Fletcher R, Bachiman R, Penugonda B, LeGeros RZ (1995). Intra-oral comparison and evaluation of the ability of fluoride dentifrices to promote the remineralization of caries-like lesions in dentin and enamel. *J Clin Dent* 6:135-138.

Ten Cate JM, Mundorff-Shrestha SA (1995). Working group report 1: laboratory models for caries (*in vitro* and animal models). *Adv Dent Res* 9:332-334.

Ten Cate JM (2004). Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res* 38: 254-257.

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

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

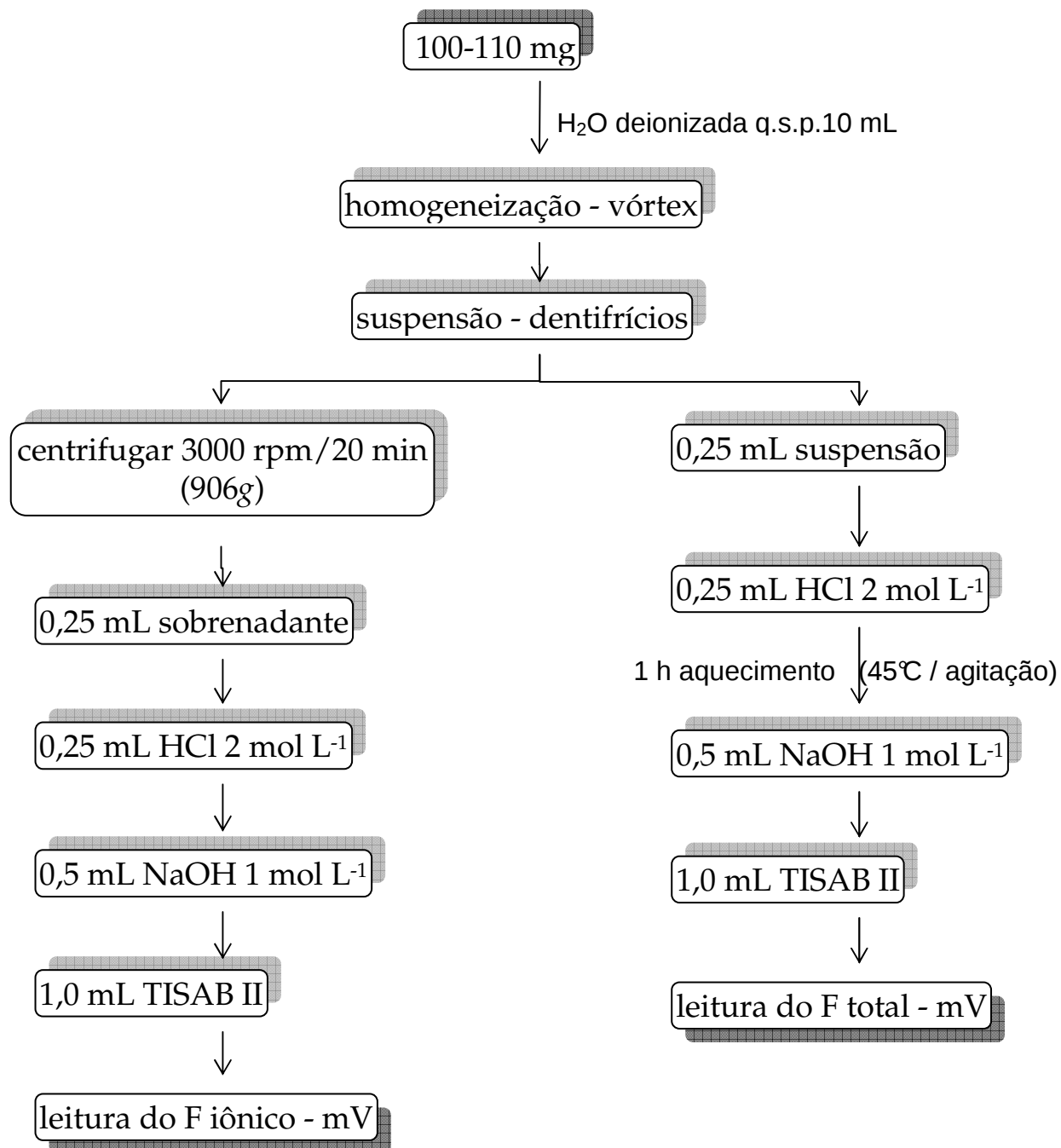
White DJ (1995). The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res* 9:175-193.

ANEXOS



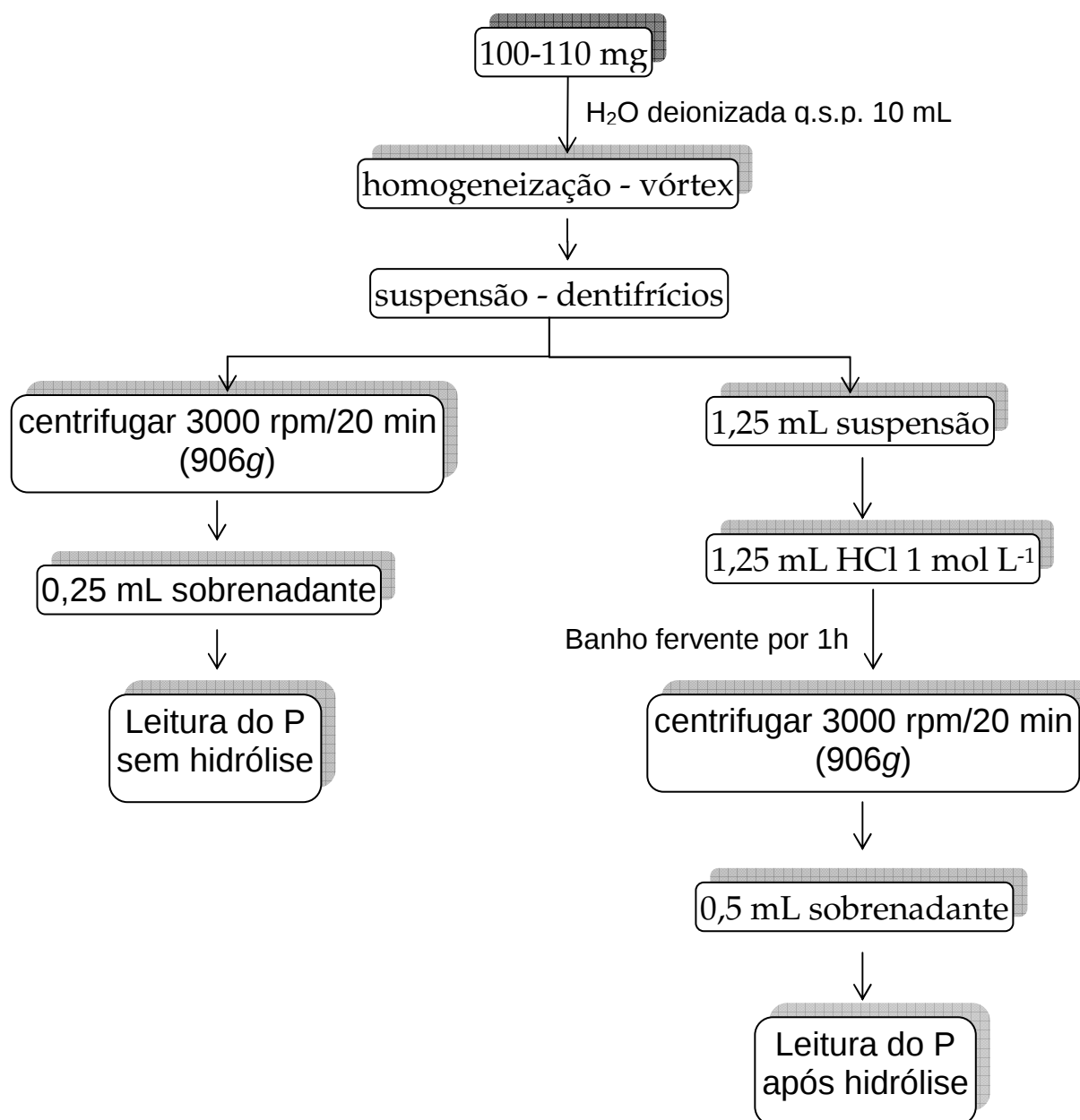
ANEXO A

DOSAGEM DE F NOS DENTIFRÍCIOS



ANEXO B

DOSAGEM DE P NOS DENTIFRÍCIOS



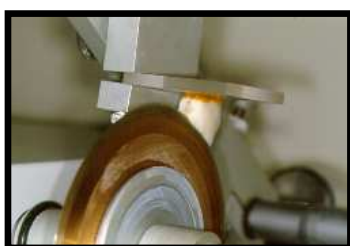
ANEXO C

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

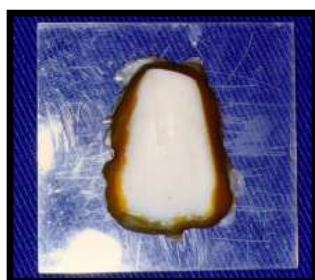
Confecção dos blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm)



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



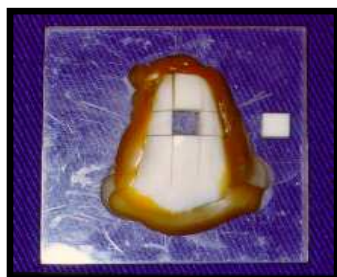
2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



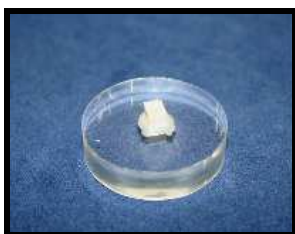
4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond -n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida,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

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Planificação da dentina e polimento do esmalte

1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), 2 pesos, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



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

Seqüência do polimento de esmalte:

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

ANEXO E

ANÁLISE DE MICRODUREZA



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

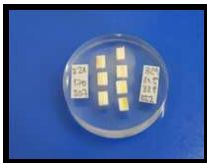
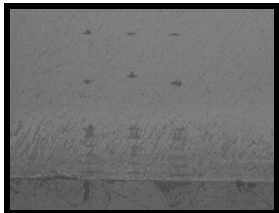
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da microdureza de superfície.



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

ANEXO F

MICRODUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL

	1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 gramas de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, USA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 minutos e mais 7 minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola adesiva (Super Bonder – Loctite).
	2. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.
	3. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMSWIN (NewAge Industries, USA).
	4. Fotomicrografia das impressões para análise de microdureza de secção longitudinal nas diferentes distâncias. (Aumento: 100x).

Seqüência do polimento de esmalte:

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

ANEXO G

ANÁLISE DE CONTEUDO DE F, Ca, P NO ESMALTE



1. Micromotor acoplado à peça reta (N 270, Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

2. Bloco de esmalte adaptado ao mandril, sendo submetido à microabrasão, com desgaste de 10 e 40 μm , para análise da incorporação de F, Ca e P no esmalte.



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

ANEXO H

MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

Valores obtidos a partir da análise de microdureza de superfície (Knoop) inicial e final

Microdureza inicial

Microdureza final

Placebo														
Blocos						Média	Blocos						Média	
1	363	359	356	343	363	356,8	1	50	66	40	21	21	39,6	
2	341	347	339	345	352	344,8	2	28	49	34	50	50	42,2	
3	352	363	356	361	359	358,2	3	49	63	55	66	82	63,0	
4	363	363	366	354	352	359,6	4	42	36	46	44	51	43,8	
5	347	350	350	345	345	347,4	5	55	38	44	43	43	44,6	
6	350	359	354	359	352	354,8	6	59	41	29	56	29	42,8	
7	359	356	366	350	356	357,4	7	49	51	45	48	53	49,2	
8	366	354	361	352	359	358,4	8	43	36	46	47	40	42,4	
9	341	345	347	343	350	345,2	9	47	50	45	43	49	46,8	
10	345	345	345	341	347	344,6	10	64	52	52	44		53,0	
						média							média	46,7
						dp							dp	6,9
Dentifrício - 0 ppmF 0,1%TMP														
Blocos						Média	Blocos						Média	
11	345	345	359	345	335	345,8	11	37	24	33	27	25	29,2	
12	350	356	347	350	347	350,0	12	83	71	99	98	85	87,2	
13	361	352	352	350	350	353,0	13	39	30	30	38	63	40,0	
14	352	359	366	354	368	359,8	14	88	78	87	87	86	85,2	
15	343	345	347	339	339	342,6	15	61	60	79	61	58	63,8	
16	361	368	350	356	366	360,2	16	60	88	68	74	84	74,8	
17	347	350	354	359	350	352,0	17	55	62	51	47	52	53,4	
18	350	363	359	359	356	357,4	18	34	28	23	24	20	25,8	
19	350	347	345	354	361	351,4	19	41	39	35	41	38	38,8	
20	345	354	341	350	350	348,0	20	76	51	57	60	47	58,2	
						média							média	55,6
						dp							dp	22,2
Dentifrício - 0 ppmF 0,25%TMP														
Blocos						Média	Blocos						Média	
21	345	333	343	347	347	343,0	21	73	66	78	50	54	64,2	
22	350	366	361	366	345	357,6	22	61	42	47	60	63	54,6	
23	345	343	361	350	361	352,0	23	81	88	65	104	109	89,4	
24	341	352	354	361	359	353,4	24	60	48	49	49	65	54,2	
25	352	354	350	368	363	357,4	25	60	88	68	74	84	74,8	
26	350	356	347	347	366	353,2	26	74	80	96	90	85	85,0	
27	354	345	359	345	359	352,4	27	62	58	48	66	54	57,6	
28	366	359	359	352	350	357,2	28	54	68	47	55	59	56,6	
29	347	350	350	359	352	351,6	29	70	74	90	71	96	80,2	
30	356	350	350	354	352	352,4	30	97	77	86	67	95	84,4	
						média							média	70,1
						dp							dp	14,1
Dentifrício - 0 ppmF 0,5%TMP														
Blocos						Média	Blocos						Média	
31	345	359	354	361	366	357,0	31	65	68	93	77	58	72,2	
32	366	361	361	352	354	358,8	32	57	60	61	53	64	59,0	
33	347	347	343	333	345	343,0	33	64	74	101	128	142	101,8	
34	341	347	345	350	345	345,6	34	83	65	73	84	79	76,8	
35	366	356	352	354	363	358,2	35	88	86	52	42	57	65,0	
36	333	335	339	341	343	338,2	36	98	97	99	98	80	94,4	
37	354	359	352	350	356	354,2	37	77	72	52	50	62	62,6	
38	341	343	335	341	339	339,8	38	76	58	59	66	74	66,6	
39	350	354	354	352	363	354,6	39	103	119	129	86	71	101,6	
40	350	356	352	359	350	353,4	40	100	103	87	105	104	99,8	
						média							média	80,0
						dp							dp	17,5

*Microdureza inicial**Microdureza final*

Dentifrício - 0 ppmF 1%TMP													
Blocos	Média					Blocos	Média						
41	366	352	341	352	347	351,6	41	82	103	60	80	79	80,8
42	356	356	354	356	361	356,6	42	123	81	91	108	136	107,8
43	356	356	352	350	350	352,8	43	94	83	60	75	51	72,6
44	350	361	350	341	347	349,8	44	87	67	62	80	98	78,8
45	343	356	350	343	350	348,4	45	93	82	93	92	74	86,8
46	347	352	345	350	352	349,2	46	65	69	95	110	110	89,8
47	350	361	359	366	352	357,6	47	96	96	85	83	76	87,2
48	343	343	341	345	335	341,4	48	158	167	158	158	165	161,2
49	359	354	363	352	354	356,4	49	87	82	70	62	63	72,8
50	356	352	343	347	345	348,6	50	66	78	73	80	79	75,2
					média	351,2						média	91,3
					dp	4,9						dp	26,7

Dentifrício - 0 ppmF 2% TMP													
Blocos	Média					Blocos	Média						
51	343	350	345	352	361	350,2	51	113	135	131	132	136	129,4
52	363	361	343	359	354	356,0	52	125	111	130	128	128	124,4
53	352	354	345	359	361	354,2	53	94	82	81	100	86	88,6
54	350	347	350	347	359	350,6	54	96	110	93	110	77	97,2
55	356	359	359	350	350	354,8	55	131	141	139	131	131	134,6
56	356	350	354	350	347	351,4	56	111	113	102	98	97	104,2
57	350	345	347	350	347	347,8	57	114	163	131	120	118	129,2
58	359	356	352	350	359	355,2	58	133	149	118	107	150	131,4
59	335	337	331	341	345	337,8	59	131	129	132	129	142	132,6
60	350	352	347	352	347	349,6	60	129	105	107	102	92	107,0
					média	350,8						média	117,9
					dp	5,3						dp	16,9

Dentifrício - 0 ppmF 3% TMP													
Blocos	Média					Blocos	Média						
61	350	350	354	345	350	349,8	61	152	163	155	154	135	151,8
62	350	345	347	347	350	347,8	62	132	118	116	131	142	127,8
63	343	350	350	352	347	348,4	63	111	107	107	109	111	109,0
64	343	350	350	347	347	347,4	64	143	157	156	160	160	155,2
65	352	366	350	341	343	350,4	65	116	127	137	128	120	125,6
66	347	333	335	341	343	339,8	66	139	151	139	148	150	145,4
67	356	361	363	366	356	360,4	67	145	149	135	131	151	142,2
68	359	350	354	350	356	353,8	68	170	177	186	159	178	174,0
69	350	366	354	343	359	354,4	69	120	117	127	123	120	121,4
70	351	354	354	347	361	353,4	70	107	110	101	100	100	103,6
					média	350,6						média	135,6
					dp	5,5						dp	22,0

Dentifrício - 500 ppmF													
Blocos	Média					Blocos	Média						
71	359	368	363	343	361	358,8	71	188	186	194	197	194	191,8
72	343	341	339	347	363	346,6	72	173	183	170	174	158	171,6
73	370	361	361	363	356	362,2	73	180	161	140	179	147	161,4
74	361	363	359	368	366	363,4	74	157	140	179	190	136	160,4
75	335	339	339	347	345	341,0	75	127	126	125	170	168	143,2
76	350	354	363	350	359	355,2	76	147	152	143	157	142	148,2
77	345	341	343	350	341	344,0	77	165	171	166	175	165	168,4
78	341	333	337	335	337	336,6	78	193	157	165	152	158	165,0
79	350	341	345	341	352	345,8	79	151	152	175	190	143	162,2
80	359	343	343	350	347	348,4	80	196	170	181	168	186	180,2
					média	350,2						média	165,2
					dp	9,2						dp	14,2

*Microdureza inicial**Microdureza final*

Dentifricio - 500 ppmF 0,1% TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
81	361	363	366	354	368	362,4	81	191	195	200	200	193	195,8
82	352	363	350	361	363	357,8	82	190	199	196	181	185	190,2
83	363	354	352	366	345	356,0	83	194	186	195	188	194	191,4
84	341	341	347	343	352	344,8	84	173	172	207	170	211	186,6
85	337	341	337	343	341	339,8	85	207	224	197	194	183	201,0
86	356	356	359	368	359	359,6	86	203	200	212	210	205	206,0
87	352	354	361	366	352	357,0	87	207	194	200	188	212	200,2
88	350	350	347	352	354	350,6	88	218	210	198	188	207	204,2
89	347	363	359	356	345	354,0	89	216	218	193	211	203	208,2
90	345	363	363	366	361	359,6	90	170	181	194	197	196	187,6
média						354,2	média						197,1
dp						7,1	dp						7,9

Dentifricio - 500 ppmF 0,25% TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
91	341	341	361	366	339	349,6	91	201	213	215	200	222	210,2
92	341	343	347	343	341	343,0	92	205	213	209	210	213	210,0
93	350	341	352	345	347	347,0	93	231	233	233	233	211	228,2
94	354	366	366	361	363	362,0	94	206	213	218	214	216	213,4
95	361	345	354	354	347	352,2	95	217	226	203	199	206	210,2
96	345	366	363	368	352	358,8	96	197	217	209	183	191	199,4
97	356	350	352	347	350	351,0	97	201	220	200	211	209	208,2
98	341	343	337	337	341	339,8	98	190	203	199	194	187	194,6
99	361	363	350	352	356	356,4	99	227	200	218	204	218	213,4
100	352	356	363	361	350	356,4	100	213	195	212	191	197	201,6
média						351,6	média						208,9
dp						7,0	dp						9,2

Dentifricio - 500 ppmF 0,5%TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
101	354	343	345	341	363	349,2	101	215	194	213	220	220	212,4
102	363	361	354	350	359	357,4	102	261	247	241	251	238	247,6
103	359	366	354	354	354	357,4	103	238	229	215	241	235	231,6
104	333	345	333	343	331	337,0	104	213	222	209	203	229	215,2
105	343	366	366	363	368	361,2	105	216	211	211	201	246	217,0
106	356	366	356	361	361	360,0	106	209	211	215	205	209	209,8
107	361	354	368	359	359	360,2	107	205	226	248	233	216	225,6
108	350	359	359	350	352	354,0	108	205	224	236	207	246	223,6
109	356	350	347	354	356	352,6	109	221	217	211	210	208	213,4
110	356	350	352	350	347	351,0	110	229	218	227	213	227	222,8
média						354,0	média						221,9
dp						7,2	dp						11,3

Dentifricio - 500 ppmF 1%TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
111	356	347	350	341	356	350,0	111	215	215	243	207	207	217,4
112	361	361	356	361	350	357,8	112	237	239	230	248	261	243,0
113	345	343	356	347	350	348,2	113	233	247	230	236	241	237,4
114	359	352	345	359	356	354,2	114	221	231	217	217	212	219,6
115	339	347	343	356	352	347,4	115	212	271	257	220	241	240,2
116	356	366	356	356	359	358,6	116	214	205	209	231	248	221,4
117	354	350	345	361	347	351,4	117	213	233	265	246	246	240,6
118	366	363	354	363	363	361,8	118	231	211	217	233	220	222,4
119	350	345	347	350	347	347,8	119	221	233	215	213	231	222,6
120	356	350	350	361	352	353,8	120	227	224	225	230	221	225,4
média						353,1	média						229,0
dp						5,0	dp						10,0

*Microdureza inicial**Microdureza final*

Dentifício - 500 ppmF 2%TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
121	354	354	359	350	352	353,8	121	248	257	252	241	238	247,2
122	350	354	363	354	356	355,4	122	258	230	232	235	247	240,4
123	350	359	352	350	352	352,6	123	235	255	251	252	233	245,2
124	347	343	341	354	345	346	124	224	238	233	242	254	238,2
125	359	350	361	354	361	357	125	232	227	229	231	236	231,0
126	359	350	361	354	361	357	126	254	271	254	239	258	255,2
127	345	339	333	347	343	341,4	127	211	235	222	233	236	227,4
128	341	347	341	350	350	345,8	128	236	212	226	238	248	232,0
129	352	366	352	350	356	355,2	129	237	236	232	230	238	234,6
130	366	366	352	359	352	359	130	237	235	239	242	233	237,2
						média							média
						dp							dp
						352,3							237,2
						5,9							8,4

Dentifício - 500 ppmF 3%TMP													
Blocos						Média	Blocos						Média
131	361	356	343	363	352	355,0	131	217	248	254	226	254	239,8
132	341	363	354	350	354	352,4	132	238	236	229	238	215	231,2
133	361	345	359	352	361	355,6	133	243	268	271	280	250	262,4
134	335	337	343	341	341	339,4	134	229	215	237	209	217	221,4
135	356	359	361	350	343	353,8	135	224	250	227	231	233	233,0
136	363	366	368	366	363	365,2	136	274	274	271	257	265	268,2
137	347	356	359	356	354	354,4	137	268	235	235	280	254	254,4
138	335	339	333	335	339	336,2	138	211	233	212	254	233	228,6
139	363	347	350	361	356	355,4	139	238	236	241	251	238	240,8
140	350	359	361	361	359	358,0	140	243	235	258	245	245	245,2
						média							média
						dp							dp
						352,5							242,5
						8,6							15,2

Crest													
Blocos						Média	Blocos						Média
141	363	356	350	363	341	354,6	141	172	239	255	241	203	222,0
142	354	345	350	366	341	351,2	142	205	220	225	218	236	220,8
143	361	350	359	359	343	354,4	143	224	235	218	190	225	218,4
144	359	363	368	368	363	364,2	144	185	194	152	179	216	185,2
145	361	366	363	352	347	357,8	145	163	177	167	188	175	174,0
146	345	343	333	350	343	342,8	146	207	181	171	208	190	191,4
147	361	363	359	356	345	356,8	147	233	229	223	231	143	211,8
148	359	361	356	345	356	355,4	148	238	242	238	200	197	223,0
149	352	354	359	361	366	358,4	149	193	198	222	195	188	199,2
150	347	350	354	352	347	350,0	150	192	182	227	250	188	207,8
						média							média
						dp							dp
						354,6							205,4
						5,7							17,2

ANEXO I

MICRODUREZA EM SECÇÃO LONGITUDINAL

Valores de % de volume mineral (%vol.min.) e ΔZ

Placebo									
	10 μm	30 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	220 μm	330 μm	ΔZ
1	30,7	31,8	58,3	75,7	83,6	89,9	91,6	88,4	-4047,2
2	38,2	34,2	55,5	79,9	87,0	91,4	87,3	88,0	-4218,9
3	32,7	41,5	61,1	76,2	84,1	89,1	89,6	86,4	-4132,4
4	31,5	37,2	57,9	76,9	88,9	92,7	91,1	89,5	-3623,2
5	36,2	36,9	53,6	68,6	83,1	88,0	90,0	85,4	-4601,3
6	37,0	35,5	59,1	73,6	87,7	92,6	91,3	95,5	-3317,4
7	37,3	47,1	56,3	73,6	84,5	92,1	91,0	90,4	-3553,1
8	29,9	35,1	65,1	79,2	83,0	90,0	87,5	87,7	-4278,0
9	32,8	37,5	53,7	71,0	87,3	91,3	90,4	88,2	-4080,2
10	28,5	31,3	64,6	78,7	88,3	87,0	85,3	90,6	-4557,6
média	33,5	36,8	58,5	75,3	85,7	90,4	89,5	89,0	-4040,9
dp	3,5	4,7	4,1	3,7	2,3	1,9	2,1	2,8	337,6

Dentifrício - 500 ppmF									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	64,6	67,1	82,0	90,9	89,7	91,6	90,9	92,3	-1852,3
2	65,1	77,5	82,1	87,7	91,4	92,3	92,0	90,8	-1581,9
3	62,2	76,4	81,7	86,6	90,4	93,7	90,2	95,2	-1541,6
4	65,4	69,5	78,8	90,7	90,8	94,5	91,5	90,4	-1691,7
5	64,9	73,3	80,1	90,2	92,7	92,5	90,8	91,8	-1695,8
6	62,5	67,3	80,3	89,5	90,1	91,7	91,1	92,7	-1869,0
7	62,6	72,2	82,1	91,1	93,5	95,2	93,7	91,0	-1215,4
8	62,9	65,1	81,4	86,7	88,6	89,8	94,8	93,2	-1672,7
9	57,6	65,7	73,1	82,9	89,2	93,8	91,8	91,2	-2110,2
10	58,0	65,2	74,7	86,9	88,9	92,4	91,9	91,8	-2054,4
média	62,6	69,9	79,6	88,3	90,5	92,8	91,9	92,0	-1728,5
dp	2,8	4,6	3,2	2,6	1,6	1,6	1,4	1,4	260,8

Dentifrício - 0 ppmF 0,1%TMP									
	10 μm	30 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	220 μm	330 μm	ΔZ
1	38,0	47,5	59,6	76,8	88,4	90,9	90,8	89,2	-3489,8
2	43,2	51,3	52,0	60,3	81,3	89,8	91,7	92,1	-3795,0
3	49,5	53,6	61,5	78,3	73,1	81,5	91,9	92,9	-3776,7
4	40,5	42,7	63,1	71,3	90,4	89,7	91,3	88,2	-3643,5
5	35,8	34,1	55,5	61,1	89,2	93,1	92,7	92,2	-3651,4
6	31,0	30,4	50,0	72,5	85,5	93,0	93,0	90,4	-3796,4
7	34,1	44,7	60,7	75,7	87,3	90,0	90,9	92,5	-3484,3
8	44,5	50,0	73,6	79,6	81,8	84,7	90,4	84,5	-3883,2
9	37,0	41,6	70,2	75,1	90,9	90,2	90,8	88,1	-3501,2
10	37,9	39,6	67,1	74,7	87,3	91,3	90,4	88,2	-3644,4
média	39,1	43,5	61,3	72,5	85,5	89,4	91,4	89,8	-3666,6
dp	5,4	7,5	7,6	6,7	5,4	3,6	0,9	2,7	101,3

Dentifrício - 500 ppmF 0,1% TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	69,6	65,9	79,5	88,9	90,9	93,0	91,2	92,7	-1740,7
2	64,4	71,5	78,1	90,0	93,0	92,1	92,6	91,6	-1620,0
3	65,6	68,9	78,3	90,2	91,4	91,8	91,6	91,9	-1789,5
4	66,6	75,1	83,5	90,5	92,0	91,4	92,5	92,5	-1428,9
5	63,8	68,2	76,8	86,8	91,7	92,4	91,6	91,5	-1897,1
6	63,7	76,4	84,9	84,3	87,7	94,1	94,5	93,5	-1167,8
7	65,6	72,0	86,4	88,5	91,2	91,8	90,7	92,6	-1659,6
8	68,5	74,7	79,1	88,4	92,1	93,0	91,8	91,5	-1571,6
9	65,9	75,9	79,1	85,9	91,2	93,3	92,4	92,5	-1509,7
10	65,9	76,7	84,7	86,6	91,0	93,4	92,0	91,0	-1493,3
média	66,0	72,5	81,0	88,0	91,2	92,6	92,1	92,1	-1587,8
dp	1,9	3,8	3,5	2,1	1,4	0,9	1,0	0,7	206,3

Dentifrício - 0 ppmF 0,25%TMP									
	10 μm	30 μm	50 μm	70 μm	90 μm	110 μm	220 μm	330 μm	ΔZ
1	50,3	55,8	74,0	87,2	87,5	90,7	89,2	86,4	-3072,6
2	52,1	56,1	75,7	85,5	91,1	91,5	90,3	91,1	-2538,8
3	36,9	40,4	58,6	77,4	84,4	87,8	90,5	91,5	-3846,6
4	41,2	37,8	50,4	68,7	85,2	91,3	93,0	92,1	-3634,3
5	41,4	39,6	56,1	82,2	90,9	93,1	92,7	93,3	-2945,0
6	36,6	48,7	63,6	75,6	88,3	90,2	90,7	87,9	-3554,2
7	41,5	40,9	63,0	80,9	83,8	90,1	94,3	91,5	-3074,6
8	37,8	41,3	48,7	69,4	86,8	91,1	90,8	91,0	-3904,0
9	37,2	34,6	64,8	77,5	86,5	91,4	91,5	89,3	-3559,5
10	46,7	50,9	53,1	69,4	86,8	91,5	92,1	91,1	-3355,9
média	42,2	44,6	60,8	77,4	87,1	90,9	91,5	90,5	-3348,6
dp	5,7	7,7	9,2	6,7	2,4	1,4	1,5	2,1	434,0

Dentifrício - 500 ppmF 0,25% TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	70,8	74,0	81,6	89,4	92,7	92,5	93,6	92,1	-1286,9
2	71,5	77,1	85,0	91,4	91,6	93,5	92,2	92,6	-1194,7
3	71,3	76,3	83,5	89,1	92,0	91,6	91,1	93,0	-1494,1
4	72,6	76,2	88,1	88,8	93,9	91,9	91,9	94,1	-1198,8
5	70,8	78,7	85,8	90,3	93,7	92,9	92,8	91,2	-1172,0
6	71,7	76,9	88,3	88,5	92,5	92,7	91,9	94,3	-1160,5
7	72,0	75,3	80,1	86,9	92,8	91,6	92,8	93,7	-1377,1
8	70,9	72,1	83,8	88,8	92,9	90,9	92,1	92,5	-1526,1
9	68,7	75,0	83,2	87,9	94,4	92,4	94,0	92,4	-1195,5
10	74,7	78,6	81,6	94,7	93,8	91,3	92,3	91,8	-1262,5
média	71,5	76,0	84,1	89,6	93,0	92,1	92,5	92,8	-1286,8
dp	1,5	2,0	2,7	2,2	0,9	0,8	0,9	1,0	134,4

Dentifrício - 0 ppmF 0,5%TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	44,1	49,9	58,7	82,4	88,9	91,9	90,7	90,3	-3160,8
2	52,4	52,8	61,9	82,6	90,3	91,0	92,2	92,1	-2725,0
3	44,0	46,2	59,5	80,8	88,4	90,2	90,0	90,2	-3461,5
4	48,0	42,3	73,0	83,7	87,9	87,5	91,7	90,6	-3150,6
5	49,1	31,0	71,1	81,3	88,7	91,4	90,4	90,0	-3356,3
6	48,1	51,9	67,5	76,6	88,9	89,3	90,9	91,2	-3117,7
7	50,6	46,8	72,9	88,1	89,6	91,4	88,4	84,4	-3363,3
8	48,3	41,6	73,9	84,1	89,3	91,0	92,5	92,8	-2657,6
9	47,9	43,3	64,9	81,8	88,9	92,2	91,1	87,1	-3266,4
10	48,6	49,0	74,8	80,4	86,8	91,7	88,2	86,7	-3390,4
média	48,1	45,5	67,8	82,2	88,8	90,7	90,6	89,5	-3165,0
dp	2,6	6,4	6,2	2,9	1,0	1,4	1,4	2,6	274,6

Dentifrício - 500 ppmF 0,5%TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	75,4	76,8	80,5	91,4	92,2	91,4	93,8	94,2	-1106,2
2	72,4	76,0	81,9	91,2	92,3	93,2	91,9	93,4	-1261,0
3	72,0	76,0	86,4	91,0	92,2	92,4	92,1	93,8	-1198,1
4	73,5	75,1	86,1	89,5	94,9	91,7	92,4	92,4	-1266,9
5	74,2	76,9	87,8	91,8	92,8	94,2	93,2	92,7	-920,6
6	74,7	80,9	89,4	90,5	93,5	91,7	93,2	92,1	-1010,6
7	71,8	75,1	85,5	89,8	92,1	93,9	93,0	93,3	-1089,3
8	75,1	76,7	85,0	92,3	91,5	91,3	93,3	92,8	-1161,2
9	73,1	71,1	85,1	91,9	93,6	92,5	92,6	92,8	-1253,8
10	74,9	79,2	89,6	91,0	94,5	92,9	93,2	90,3	-1033,5
média	73,7	76,4	85,7	91,0	93,0	92,5	92,9	92,8	-1130,1
dp	1,3	5,7	3,2	0,7	0,6	0,3	0,4	1,7	118,5

Dentifrício - 0 ppmF 1%TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	53,7	51,3	73,7	82,5	89,6	91,4	89,7	91,3	-2812,9
2	49,8	64,5	76,3	81,2	85,2	90,8	90,3	88,5	-2772,6
3	47,0	55,6	73,1	87,6	89,7	90,1	90,2	89,0	-2851,0
4	48,9	63,0	79,7	80,7	87,5	90,5	90,2	91,5	-2575,4
5	47,9	59,0	75,4	82,5	91,3	90,8	91,9	92,3	-2386,5
6	52,6	48,2	63,5	81,3	92,1	90,2	92,9	92,4	-2724,5
7	52,5	63,6	74,2	82,0	88,3	89,0	92,8	89,9	-2492,0
8	54,0	54,0	61,6	71,0	83,4	95,0	94,3	92,5	-2544,3
9	52,4	63,0	76,8	84,4	89,3	88,9	85,7	89,8	-3181,0
10	52,5	49,5	66,2	82,3	84,0	86,9	93,7	93,0	-2885,8
média	51,1	57,2	72,0	81,5	88,0	90,4	91,2	91,0	-2722,6
dp	2,5	6,3	6,1	4,2	3,0	2,1	2,5	1,6	231,8

Dentifrício - 0 ppmF 2% TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	52,8	49,4	70,2	82,9	89,5	89,5	90,6	91,3	-2943,3
2	45,7	57,5	70,3	86,6	93,3	92,2	92,1	90,6	-2403,2
3	56,3	53,3	71,6	84,4	91,1	91,9	90,6	88,8	-2727,0
4	51,3	61,7	75,8	90,1	90,7	89,2	90,7	91,0	-2457,4
5	62,3	69,6	68,6	76,9	87,7	91,9	87,7	93,8	-2661,2
6	47,3	47,3	74,3	87,8	87,9	90,8	91,0	89,0	-2897,8
7	50,1	69,8	91,5	88,3	90,6	90,6	91,1	86,0	-2173,5
8	60,5	52,5	73,8	80,1	83,2	88,1	92,4	89,4	-2922,7
9	49,2	55,6	73,4	84,9	90,5	95,2	89,8	91,5	-2436,3
10	56,3	57,0	67,1	84,2	88,9	92,2	91,7	90,7	-2545,7
média	53,2	57,4	73,6	84,6	89,3	91,2	90,8	90,2	-2616,8
dp	5,5	7,7	6,8	4,0	2,7	2,0	1,3	2,1	257,9

Dentifrício - 0 ppmF 3% TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	54,4	66,1	87,4	89,4	89,6	89,1	90,9	90,1	-2180,5
2	53,7	63,9	76,6	85,2	91,1	89,5	90,2	91,6	-2469,9
3	51,9	54,0	68,0	84,4	89,0	88,4	93,0	90,4	-2739,0
4	53,9	55,4	72,6	86,9	92,0	92,8	92,4	92,7	-2150,9
5	51,6	54,6	65,5	75,5	89,0	92,3	92,6	92,7	-2632,4
6	55,4	60,3	71,2	93,5	91,7	91,6	93,2	90,6	-2051,5
7	56,5	58,9	61,9	85,5	92,6	93,1	90,8	92,2	-2468,1
8	56,8	58,5	68,6	79,1	89,5	92,9	91,8	91,4	-2473,6
9	53,5	51,8	71,9	86,9	90,5	93,4	90,3	92,2	-2489,8
10	54,4	48,9	70,1	90,4	91,7	91,3	90,7	91,8	-2599,1
média	54,2	57,2	71,4	85,7	90,7	91,4	91,6	91,6	-2425,5
dp	1,7	5,4	6,9	5,2	1,3	1,8	1,1	0,9	225,3

Crest									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	73,0	75,0	77,0	89,2	91,6	92,8	93,7	93,5	-1257,7
2	71,7	76,7	83,8	91,9	92,4	90,9	92,7	93,3	-1267,2
3	74,0	80,9	84,2	87,1	94,0	91,4	94,0	92,5	-1080,0
4	71,0	78,3	81,5	89,5	91,9	92,8	94,2	93,7	-1037,5
5	75,1	72,7	79,9	89,5	91,8	90,8	92,3	91,6	-1601,4
6	74,2	78,1	89,2	90,4	89,6	92,4	90,2	92,5	-1414,4
7	73,7	82,2	91,3	91,0	91,7	91,7	89,6	93,1	-1318,8
8	75,0	74,5	79,5	89,7	91,4	92,7	91,2	92,0	-1550,3
9	73,8	76,3	87,6	89,6	91,9	91,4	91,6	91,0	-1456,9
10	73,0	77,7	77,1	91,6	93,2	92,6	93,8	93,7	-1114,1
média	73,4	77,3	83,1	89,9	91,9	91,9	92,3	92,7	-1309,8
dp	1,3	2,9	5,0	1,4	1,2	0,8	1,6	0,9	195,9

Dentifrício - 500 ppmF 1%TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	79,8	80,2	86,6	93,0	92,8	93,0	94,0	92,1	-822,5
2	79,9	72,7	89,0	91,5	95,3	93,8	93,0	93,3	-899,1
3	77,3	82,1	89,9	91,1	92,8	92,9	91,4	91,9	-1090,8
4	78,5	85,0	89,8	91,2	93,8	93,1	92,2	91,3	-927,0
5	79,7	81,2	89,5	93,9	93,2	92,8	94,6	92,8	-628,1
6	80,3	78,7	91,0	94,2	92,0	92,2	93,9	92,9	-763,1
7	79,7	79,8	89,7	92,2	93,5	93,0	93,2	92,9	-810,5
8	79,9	80,2	90,9	92,9	93,5	91,2	91,6	94,3	-988,9
9	80,9	79,7	88,9	91,9	94,0	94,1	94,0	92,8	-656,4
10	78,9	82,2	88,5	92,5	93,5	93,0	92,0	92,2	-961,3
média	79,5	80,2	89,4	92,4	93,4	92,9	93,0	92,7	-854,8
dp	1,0	3,2	1,3	1,1	0,9	0,8	1,2	0,8	153,4

Dentifrício - 500 ppmF 2% TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	87,4	84,0	92,0	93,4	94,9	91,1	93,7	91,2	-717,8
2	88,1	83,9	93,0	93,0	92,3	91,1	92,8	92,8	-766,5
3	89,2	86,0	90,7	91,0	93,3	92,9	91,7	92,9	-772,9
4	89,6	80,5	89,7	91,2	92,5	94,0	94,5	92,0	-578,5
5	87,9	81,9	91,2	92,5	93,3	92,2	92,7	91,8	-832,2
6	89,1	82,7	92,0	91,4	93,6	91,2	93,2	92,9	-752,7
7	89,2	86,2	89,9	92,2	92,9	92,4	91,0	92,1	-916,2
8	88,2	87,7	92,7	91,9	92,3	93,5	93,0	92,2	-571,1
9	89,0	83,5	89,1	91,0	93,2	91,8	91,5	92,3	-986,7
10	86,8	83,8	89,8	92,2	92,4	92,6	92,3	91,9	-863,3
média	88,4	84,0	91,0	92,0	93,1	92,3	92,6	92,2	-775,8
dp	0,9	2,1	1,4	0,8	0,8	1,0	1,1	0,6	133,3

Dentifrício - 500 ppmF 3%TMP									
	10 µm	30 µm	50 µm	70 µm	90 µm	110 µm	220 µm	330 µm	ΔZ
1	90,6	89,5	93,8	91,5	92,2	93,6	92,5	93,0	-496,1
2	91,4	87,1	91,6	91,4	92,5	92,2	92,5	92,0	-722,0
3	90,8	88,7	91,9	91,6	90,8	92,2	92,3	92,0	-747,9
4	89,0	89,5	91,4	90,2	90,4	90,8	92,5	92,5	-829,3
5	90,7	90,2	91,5	90,6	93,7	91,1	92,1	90,9	-850,8
6	88,8	87,6	92,3	90,7	92,7	93,5	92,9	92,6	-579,2
7	90,1	88,7	90,6	90,2	92,1	94,5	94,9	91,5	-375,8
8	90,9	87,6	90,7	90,5	92,7	92,0	92,9	91,9	-724,6
9	90,9	87,8	93,0	92,3	92,4	92,7	92,8	91,6	-622,6
10	90,0	87,5	90,9	94,0	92,4	94,6	93,2	93,5	-382,3
média	90,3	88,4	91,8	91,3	92,2	92,7	92,9	92,1	-633,1
dp	0,8	1,1	1,0	1,2	0,9	1,3	0,8	0,8	172,0

ANEXO J

ANÁLISE DE MICRODUREZA - %ASMH e ΔZ Tabela 1 – Porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%ASMH) e perda mineral (ΔZ) dos grupos submetidos à ciclagem de pH (média $\pm$ epm, n=10)

Dentifrícios	%ASMH		ΔZ	
	0 $\mu\text{gF/g}$	500 $\mu\text{gF/g}$	0 $\mu\text{gF/g}$	500 $\mu\text{gF/g}$
0% TMP	-86,7 $\pm$ 2,0 ^a	-52,8 $\pm$ 4,0 ^e	-4040 $\pm$ 106,8 ^a	-1728,5 $\pm$ 82,5 ^e
0,1% TMP	-84,2 $\pm$ 6,2 ^{a,b}	-44,3 $\pm$ 2,6 ^f	-3666,6 $\pm$ 32,0 ^b	-1587,8 $\pm$ 65,2 ^{e,f}
0,25% TMP	-80,1 $\pm$ 4,0 ^{b,c}	-40,6 $\pm$ 2,8 ^{f,g}	-3348,6 $\pm$ 137,2 ^{b,c}	-1286,8 $\pm$ 42,5 ^{f,g,j}
0,5% TMP	-77,1 $\pm$ 5,2 ^c	-37,3 $\pm$ 3,1 ^{g,h,i}	-3165,0 $\pm$ 85,8 ^c	-1130,1 $\pm$ 37,5 ^{g,h}
1% TMP	-77,8 $\pm$ 3,3 ^c	-35,1 $\pm$ 3,2 ^{g,h}	-2722,6 $\pm$ 73,3 ^d	-854,8 $\pm$ 48,5 ^{h,i}
2% TMP	-66,4 $\pm$ 5,0 ^d	-31,2 $\pm$ 3,2 ^h	-2616,8 $\pm$ 81,5 ^d	-775,8 $\pm$ 42,1 ^{h,i}
3% TMP	-61,3 $\pm$ 6,3 ^d	-32,2 $\pm$ 2,1 ^h	-2425,5 $\pm$ 71,2 ^d	-663,1 $\pm$ 54,4 ⁱ
Crest		-42,1 $\pm$ 5,1 ^{f,i}		-1309,8 $\pm$ 61,9 ^j

Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$).

ANEXO L

VALORES MÉDIOS DO CONTEÚDO DE F, Ca E P NO ESMALTE ($\mu\text{mol}/\text{mm}^3$)

	F		Ca		P	
	0 $\mu\text{gF/g}$	500 $\mu\text{gF/g}$	0 $\mu\text{gF/g}$	500 $\mu\text{gF/g}$	0 $\mu\text{gF/g}$	500 $\mu\text{gF/g}$
0% TMP	0,070 $\pm$ 0,004 ^a	0,127 $\pm$ 0,009 ^{b,c,e}	22,30 $\pm$ 2,4 ^{a,b}	20,47 $\pm$ 2,3 ^{a,b}	7,84 $\pm$ 1,6 ^{a,d}	24,63 $\pm$ 4,5 ^{b,c,d}
0,1% TMP	0,081 $\pm$ 0,005 ^{a,b}	0,131 $\pm$ 0,008 ^{c,e}	16,57 $\pm$ 1,5 ^a	35,33 $\pm$ 7,4 ^{a,b}	11,31 $\pm$ 4,3 ^{a,b,d}	16,61 $\pm$ 2,5 ^{a,b,c,d}
0,25% TMP	0,084 $\pm$ 0,004 ^{a,b,d}	0,128 $\pm$ 0,010 ^{c,d,e}	21,23 $\pm$ 2,5 ^{a,b}	30,06 $\pm$ 6,2 ^{a,b}	8,38 $\pm$ 2,0 ^{a,d}	18,08 $\pm$ 2,7 ^{a,b,c,d}
0,5% TMP	0,073 $\pm$ 0,004 ^a	0,132 $\pm$ 0,008 ^{c,e}	19,96 $\pm$ 1,8 ^{a,b}	27,97 $\pm$ 5,0 ^{a,b}	6,97 $\pm$ 1,2 ^a	18,78 $\pm$ 2,5 ^{a,b,c,d}
1% TMP	0,083 $\pm$ 0,009 ^{a,b,d}	0,154 $\pm$ 0,009 ^{e,f}	19,65 $\pm$ 1,8 ^{a,b}	26,89 $\pm$ 4,9 ^{a,b}	12,98 $\pm$ 2,1 ^{a,b,d}	19,80 $\pm$ 3,4 ^{a,b,c,d}
2% TMP	0,089 $\pm$ 0,007 ^{a,b,c}	0,160 $\pm$ 0,010 ^{e,f}	20,02 $\pm$ 1,4 ^{a,b}	34,49 $\pm$ 7,5 ^{a,b}	8,26 $\pm$ 2,0 ^{a,d}	21,24 $\pm$ 3,5 ^{a,b,c,d}
3% TMP	0,97 $\pm$ 0,00125 ^{a,b,c}	0,181 $\pm$ 0,014 ^f	21,44 $\pm$ 2,6 ^{a,b}	41,37 $\pm$ 8,2 ^b	14,21 $\pm$ 1,1 ^{a,b,d}	29,54 $\pm$ 4,8 ^{c,d}
Crest		0,167 $\pm$ 0,013 ^{e,f}		24,19 $\pm$ 5,1 ^{a,b}		22,03 $\pm$ 3,6 ^d

Média $\pm$ epm seguidas de letras indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

ANEXO M

 ΔF e ΔCa NAS SOLUÇÕES APÓS CICLAGEM DE pH ($\mu g/g$)

	ΔF		ΔCa	
	0 $\mu gF/g$	500 $\mu gF/g$	0 $\mu gF/g$	500 $\mu gF/g$
0% TMP	-0,027 $\pm$ 0,002 ^{a,b}	0,010 $\pm$ 0,003 ^{c,e}	163,69 $\pm$ 57,50 ^{a,b,d}	-32,15 $\pm$ 90,57 ^d
0,1% TMP	-0,031 $\pm$ 0,002 ^{a,b}	-0,004 $\pm$ 0,001 ^{c,d}	314,34 $\pm$ 28,23 ^{a,c}	274,72 $\pm$ 29,48 ^{a,b,c,e,f}
0,25% TMP	-0,025 $\pm$ 0,002 ^{a,b}	0,004 $\pm$ 0,003 ^{c,d}	179,06 $\pm$ 55,37 ^{a,b,d}	-0,84 $\pm$ 129,8 ^{d,e,g}
0,5% TMP	-0,020 $\pm$ 0,005 ^{a,d}	-0,006 $\pm$ 0,004 ^d	321,89 $\pm$ 45,05 ^{a,b,c}	115,50 $\pm$ 149,40 ^{d,g}
1% TMP	-0,027 $\pm$ 0,002 ^{a,b}	0,001 $\pm$ 0,002 ^{c,d}	207,82 $\pm$ 43,24 ^{b,d}	188,84 $\pm$ 72,66 ^{a,b,d}
2% TMP	-0,037 $\pm$ 0,004 ^b	0,008 $\pm$ 0,005 ^{c,d,e}	265,81 $\pm$ 38,72 ^{a,b,c,f}	155,18 $\pm$ 40,93 ^{d,f,g}
3% TMP	-0,038 $\pm$ 0,003 ^b	-0,004 $\pm$ 0,002 ^{c,d}	406,25 $\pm$ 46,85 ^c	298,91 $\pm$ 72,62 ^{a,b,g}
Crest	0,019 $\pm$ 0,003 ^e		486,96 $\pm$ 201,40 ^{a,b,g}	

Média $\pm$ epm seguidas de letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

ANEXO N

QUOCIENTE DE REAÇÃO PARA CaF₂

	Des		Re (1° a 5° dia)		Re (6° e 7° dia)	
	0 µgF/g	500 µgF/g	0 µgF/g	500 µgF/g	0 µgF/g	500 µgF/g
0% TMP	1,26.10 ⁻¹⁴ ± 1,92.10 ⁻¹⁵ a,d	1,88.10 ⁻¹⁴ ± 2,6.10 ⁻¹⁵ e,f	7,03.10 ⁻¹⁵ ± 1,27.10 ⁻¹⁶ a,c	1,73.10 ⁻¹⁴ ± 1,82.10 ⁻¹⁵ b,e	1,23.10 ⁻¹⁴ ± 2,03.10 ⁻¹⁵ a,b,c,d	1,97.10 ⁻¹⁴ ± 2,92.10 ⁻¹⁵ b,c,d,g
0,1% TMP	9,26.10 ⁻¹⁵ ± 4,39.10 ⁻¹⁶ b	1,91.10 ⁻¹⁴ ± 3,25.10 ⁻¹⁵ e,f	4,17.10 ⁻¹⁵ ± 4,26.10 ⁻¹⁶ a	1,4.10 ⁻¹⁴ ± 1,83.10 ⁻¹⁵ b	9,65.10 ⁻¹⁵ ± 3,6.10 ⁻¹⁶ a,c,d	1,69.10 ⁻¹⁴ ± 2,51.10 ⁻¹⁵ c,d,e,f,g
0,25% TMP	9,5.10 ⁻¹⁵ ± 2,87.10 ⁻¹⁶ b,c	1,83.10 ⁻¹⁴ ± 2,36.10 ⁻¹⁵ f,g	4,65.10 ⁻¹⁵ ± 2,76.10 ⁻¹⁶ a	1,76.10 ⁻¹⁴ ± 1,81.10 ⁻¹⁵ b,e	9,63.10 ⁻¹⁵ ± 6,21.10 ⁻¹⁶ a,c,d	1,83.10 ⁻¹⁴ ± 2,3.10 ⁻¹⁵ d,e,g
0,5% TMP	1,36.10 ⁻¹⁴ ± 3,22.10 ⁻¹⁵ a,c	1,83.10 ⁻¹⁴ ± 3,67.10 ⁻¹⁵ e,f	5,07.10 ⁻¹⁵ ± 5,67.10 ⁻¹⁶ a,d	1,34.10 ⁻¹⁴ ± 1,87.10 ⁻¹⁵ b,c	1,03.10 ⁻¹⁴ ± 1,04.10 ⁻¹⁵ a,c,d	1,52.10 ⁻¹⁴ ± 3,01.10 ⁻¹⁵ a,d,g
1% TMP	1,34.10 ⁻¹⁴ ± 1,09.10 ⁻¹⁵ a,e	1,53.10 ⁻¹⁴ ± 1,06.10 ⁻¹⁵ e,f	3,82.10 ⁻¹⁵ ± 2,66.10 ⁻¹⁶ a	1,13.10 ⁻¹⁴ ± 1,29.10 ⁻¹⁵ b,c,d	9,51.10 ⁻¹⁵ ± 6,02.10 ⁻¹⁶ a,c,d	1,15.10 ⁻¹⁴ ± 8,12.10 ⁻¹⁶ a,d
2% TMP	9,25.10 ⁻¹⁵ ± 1,67.10 ⁻¹⁵ b,c,d	1,79.10 ⁻¹⁴ ± 1,31.10 ⁻¹⁵ f,g	2,79.10 ⁻¹⁵ ± 1,83.10 ⁻¹⁶ a	1,47.10 ⁻¹⁴ ± 1,36.10 ⁻¹⁵ d,e	9,35.10 ⁻¹⁵ ± 1,51.10 ⁻¹⁵ a,c	9,87.10 ⁻¹⁵ ± 6,62.10 ⁻¹⁶ a,e
3% TMP	1,05.10 ⁻¹⁴ ± 2,47.10 ⁻¹⁶ b,c,d	1,68.10 ⁻¹⁴ ± 1,21.10 ⁻¹⁵ f,g	3,87.10 ⁻¹⁵ ± 6,6.10 ⁻¹⁶ a	1,17.10 ⁻¹⁴ ± 1,04.10 ⁻¹⁵ b	6,67.10 ⁻¹⁵ ± 3,54.10 ⁻¹⁶ e	8,84.10 ⁻¹⁵ ± 3,19.10 ⁻¹⁶ a,f
Crest		2,99 .10 ⁻¹⁴ ± 5,33.10 ⁻¹⁵ g		2,1.10 ⁻¹⁴ ± 2,18.10 ⁻¹⁵ e		2,12.10 ⁻¹⁴ ± 3,07.10 ⁻¹⁵ g

Média±epm seguidas de letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, p<0,05).