

ADRIANA FRANCO PAES LEME

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA APLICAÇÃO TÓPICA PROFISSIONAL DE
FLÚOR E DENTIFRÍCIO FLUORETADO NA DESMINERALIZAÇÃO DO
ESMALTE E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA
PLACA DENTAL *IN SITU***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção de grau de Mestre em
Odontologia, Área de Cariologia.

PIRACICABA
2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ADRIANA FRANCO PAES LEME

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA APLICAÇÃO TÓPICA PROFISSIONAL DE
FLÚOR E DENTIFRÍCIO FLUORETADO NA DESMINERALIZAÇÃO DO
ESMALTE E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA
PLACA DENTAL *IN SITU***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Odontologia, Área de Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer

Prof. Dr^a. Mônica Campos Serra

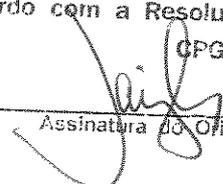
Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

PIRACICABA
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

iii

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 15/04/2002


Assinatura do Orientador

UNIDADE 30
Nº CHAMADA UNICAMP
L542 e
V EX
TOMBO BCI 49341
PROC 16.83710 e
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/06/02
Nº CPD _____

CM00168272-3

BIB ID 242084

Ficha Catalográfica

Paes Leme, Adriana Franco.

~~P3426~~
L542 e
Efeito da associação da aplicação tópica profissional de flúor e dentifício fluoretado na desmineralização do esmalte e na composição bioquímica e microbiológica da placa dental *in situ*. / Adriana Franco Paes Leme. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002. xxii, 157p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Cáries dentárias. 3. Sacarose. 4. Cálcio. 5. Fósforo. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2002, considerou a candidata ADRIANA FRANCO PAES LEME aprovada.

1. Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY

2. Profa. Dra. MÔNICA CAMPOS SERRA

3. Profa. Dra. MÁRCIA PINTO ALVES MAYER

200221538

Dedico este trabalho...

A meus pais, **Paulo e Diva**, que me ensinaram os mais nobres valores da vida e sem o amor deles eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, a **Jesus** e a **todos companheiros espirituais** por ter estado comigo iluminando e orientando meu caminho, pela força nos momentos de angústia, pela clareza nos momentos de dúvida, pela calma para resolver as dificuldades e por ter me dado nessa existência a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço aos meus pais, **Paulo** e **Diva**, por ter me ensinado a viver, por ter estado sempre muito presente, mesmo estando longe, em todos os momentos da minha vida, orientando minhas atitudes e mais do que ninguém, torcendo por mim. Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus irmãos, **Maristela**, **Marcelo** e **Ana Paula** pela força, amizade, apoio, conselhos e pelo amor que está presente em nossa família.

Agradeço ao **Marcelo**, pela compreensão e por ter estado presente em todos os momentos dando força e apoio nessa caminhada.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jaime A. Cury** por ter participado da minha formação intelectual, científica e crescimento pessoal desde a graduação. Agradeço pelos ensinamentos, presença, segurança, incentivo, dedicação, inteligência, competência e honestidade em todo esse tempo. Agradeço por ter encontrado uma pessoa tão especial como você. Você merece tudo o que representa para nós, porque você não é só excelente no que faz, você é melhor ainda como pessoa. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Prof.^a Dr.^a Cíntia P. M. Tabchoury** pela preciosa ajuda nesse estudo, seriedade, competência, apoio em todos os momentos, pela amizade... Obrigada por tudo!

À **Rosane** por ter estado sempre presente em todos os momentos, pela ajuda nesse estudo, companheirismo e pela amizade. Saudades...

À **Roberta** por ter me ajudado muito nesse estudo, pela alegria e pela amizade. Saudades...

À minha família de pós-graduação da Bioquímica: **Mitsue, Ynara, Celso, Lívia, Augusta, Paulo, Silvana, Mello, Rose**; e da graduação: **Carolina, Carla, Lilia, Renato, Daniela, Magda, Gustavo, Rodrigo** pela amizade, apoio, companheirismo, ajuda, carinho e por tornar o trabalho mais agradável.

À minhas amigas de graduação **Luciana, Lívia e Isabella** pelos bons momentos durante a graduação, pela força, apoio e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da UNICAMP, Prof. Dr. Hermano de Medeiros Ferreira Tavares.

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, Diretor da FOP-UNICAMP.

À Prof^ª. Dr^ª Altair A. Del Bel Cury, Coordenadora Geral da Pós-Graduação, pela ajuda, pela participação desse estudo e amizade.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, por sempre estar pronto a ajudar, pela competência, apoio, ensinamentos e orientação na análise microbiológica desse estudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Corrêa Alves, Analista de Sistemas da ESALQ-USP, pela realização da análise estatística desse estudo, pela seriedade, competência, paciência em ensinar e esclarecer todas as dúvidas.

À banca da qualificação: Prof^ª. Dr^ª. Altair Del Bel Cury, Prof^ª. Dr^ª. Marinês Nobre dos Santos e Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Machado Tabchoury pela participação e colaboração.

À Mariza pela competência, carinho, amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao Waldomiro pela seriedade, competência e ajuda durante a realização desse estudo.

Ao Alfredo pela ajuda e amizade.

À D. Jose, à Eliza, ao José Carlos, ao Feliciano e à Shirley, sempre prontos a ajudar.

À Érica, funcionária da pós-graduação, pela atenção, simpatia, auxílio e boa vontade em ajudar.

À Marilene pela ajuda com a normatização da dissertação.

À Waded Antônio, pela revisão da Língua Portuguesa.

À FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa, na concessão da Bolsa de Mestrado (Proc. Nº 99/12080-0).

Aos amigos do mestrado: Luciane, Viviane, André, Lidiany, Vanessa, Andréa, Simone, Fábio M., Iriana, Fábio K. e Marcelle pela amizade e agradável convívio.

Aos amigos que não mediram esforços para a realização dessa pesquisa: Celso, Daniela, Danilo, Dany, Flávia, Juliana C., Juliana M., Luciane, Mitsue, Patrícia, Poliana, Rodrigo, Rosane, Simone, Ynara pela seriedade, esforço e dedicação.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Não desanimes.

Persista mais um tanto.

Não cultives pessimismo

Centraliza-se no bem a fazer.

Esqueça as sugestões do medo destrutivo.

Siga adiante, mesmo varando na sombra dos próprios erros.

Avance ainda que seja por lágrimas.

Trabalhe constantemente.

Edifique sempre.

Não consintas que o gelo desencanto te entorpeça o coração.

Não te impressiones a dificuldade.

Convença-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a dia.

Não desistas da paciência.

Não creias em realização sem esforço.

Silêncio para a injúria.

Perdão às ofensas.

O trabalho será sempre o prodígio da vida, criando reconforto e progresso, alegria e renovação.

Allan Kardec e Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
3. PROPOSIÇÃO	61
4. MATERIAL E MÉTODOS	63
5. RESULTADOS	95
6. DISCUSSÃO	109
7. CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	147

RESUMO

A associação de métodos de uso de flúor tem sido indicada para indivíduos ou grupos considerados de alto risco de cárie, mas o efeito somatório dessa associação não está claramente estabelecido. Assim, a combinação de métodos de uso de flúor foi avaliada *in situ* quando o desafio cariogênico foi aumentado pela frequência de exposição à sacarose. Dezesesseis voluntários utilizando dispositivos palatinos contendo quatro blocos de esmalte bovino participaram desse estudo cruzado, dividido em quatro fases de 14 dias. Os voluntários foram submetidos aos tratamentos: dentifício placebo de flúor (DP), dentifício fluoretado (DF), aplicação tópica profissional de flúor (ATF) + DP e ATF + DF. A ATF foi utilizada como pré-tratamento nos blocos de esmalte e dentifício, fluoretado ou não, (1:3) foi gotejado sobre os blocos 3x/dia. Solução de sacarose a 20% foi gotejada 4x/dia em dois dos quatro blocos e 8x/dia, nos outros dois blocos para simular o desafio cariogênico. Ao final dos 14 dias, a microdureza de superfície e do esmalte seccionado longitudinalmente e concentração de flúor foram avaliadas no esmalte. As concentrações de F, Ca, P, polissacarídeo insolúvel (PI) e contagens de estreptococos do grupo mutans foram avaliadas na placa dental. Os resultados mostraram efeito estatisticamente significativo da frequência de exposição à sacarose na desmineralização do esmalte e na concentração de F, Ca e PI na placa dental ($p < 0,05$). DF apresentou maior eficácia que ATF+DP na redução da desmineralização do esmalte e no aumento da concentração de F e Ca na placa dental ($p < 0,05$). O efeito da combinação de ATF+DF na desmineralização do esmalte, na

concentração de flúor e composição da placa dental não foi estatisticamente diferente de DF ($p>0,05$). Conclui-se que a combinação de métodos (ATF+DF) não diminui a cariogenicidade da placa dental e não apresenta efeito adicional na redução da desmineralização do esmalte, sugerindo que em adição ao uso de flúor, outras medidas para interferir nos fatores responsáveis pela doença devem ser simultaneamente utilizadas para seu controle completo.

ABSTRACT

The combination of methods of fluoride use has been suggested for high caries risk individuals or groups, but its additive effect on dental caries is not clearly established. Thus, this combination was evaluated *in situ* under high cariogenic challenge induced by the frequency of sucrose exposure. Sixteen volunteers, using a palatal acrylic appliance containing four bovine dental enamel blocks, took part in this crossover study done in four phases of 14 days each. The volunteers were subjected to the following groups of treatments: 1 - Non-fluoridated dentifrice (PD); 2 - Fluoridated dentifrice (FD); 3 - Acidulated phosphate fluoride gel (APF) and PD (APF+PD); 4 - APF+FD. APF was applied to the enamel before the experimental period and the dentifrices (a slurry 1:3) were dripped onto the blocks 3x/day. A 20% sucrose solution was dripped onto 2 of the blocks 4x/day and 8x/day onto the other two, simulating an increase in the cariogenic challenge. Surface and cross-sectional microhardness and F uptake were evaluated in the enamel. F, Ca, P, insoluble polysaccharide (IP) and mutans streptococci in dental plaque were determined after 14 days. The results showed effect statistically significant of the frequency of sucrose exposure on enamel demineralization and F, Ca, IP concentration in dental plaque ($p<0.05$). FD was more efficient than APF+PD in reducing enamel demineralization and in increasing F and Ca concentration in dental plaque ($p<0.05$). The effect of the combination APF+FD on enamel demineralization, F uptake and composition of dental plaque was not different from FD treatment ($p>0.05$). In conclusion, the combination of methods (APF+FD) neither decreases the cariogenicity of dental plaque nor has an

additional effect on reducing enamel demineralization, suggesting that in addition to fluoride use, other measures to interfere with the factors responsible for the disease must be simultaneously used to its complete control.

1. INTRODUÇÃO

O declínio de cárie ocorrido no Brasil (NARVAI *et al.*, 1999) e no mundo (CLARKSON *et al.*, 2000) nas últimas décadas tem sido atribuído principalmente ao amplo uso do flúor. Entre os métodos tópicos de uso de flúor que contribuíram para esse fato, o dentifrício fluoretado tem sido considerado o mais importante (BRATTHALL *et al.*, 1996).

Entretanto, grupos de indivíduos continuam apresentando alta atividade da doença (ØGGARD *et al.*, 1994; HAUSEN, 1997). Em termos mundiais, estima-se que 20-25% das crianças e adolescentes apresentam 60-80% do total de cárie da população (KASTE *et al.*, 1996; MILNES, 1996; POWELL, 1998; FEATHERSTONE, 1999). Em acréscimo, há relato que 17% de crianças de uma amostra brasileira de 6-36 meses apresentam 46% do total das lesões de cárie de uma população estudada (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996).

Vários fatores podem estar contribuindo para que um grupo de indivíduos continue a apresentar alta atividade da doença cárie. Muitos estudos têm sido realizados para definir os fatores que determinam o risco de cárie (TINANOFF, 1995; VARSIO & VEKALAHTI, 1996; HAUSEN, 1997; BOWDEN, 1997; POWELL, 1998), entre eles, pode-se citar: alto consumo de açúcar, altos níveis de microrganismos cariogênicos, experiência passada de cárie, qualidade de higiene oral, condição sócio-econômica e padrão

familiar (TINANOFF, 1995). Cárie é uma doença bacteriana dieta-dependente, e a sacarose é considerada como responsável pelo aumento de cárie nas populações industrializadas (LOESCHE, 1985; SHEIHAM, 1991; 2001; BURT, 1993). Sacarose apresenta um atributo único, pois além de ser fermentável em ácidos, é transformada em polissacarídeos extracelulares na placa dental (NEWBRUN, 1967). A placa dental formada na presença de sacarose, além de ser mais porosa, pela presença de glucanos insolúveis na sua matriz, apresenta baixas concentrações de Ca, P e F. (CURY *et al.*, 1997). Os glucanos insolúveis são produzidos por bactérias do grupo mutans, e a habilidade dessas bactérias produzirem esses polissacarídeos tem sido uma das explicações para o desenvolvimento de cárie em crianças (MATTOS-GRANER *et al.*, 2000). Assim, cárie dental está diretamente relacionada à frequência do consumo diário de sacarose (KÖNIG *et al.*, 1968; BOWEN *et al.*, 1980; SHEIHAM, 1987; RODRIGUES & SHEIHAM, 2000; DUGGAL *et al.*, 2001; SHEIHAM, 2001). Portanto, a alta frequência de consumo de sacarose deve ser considerada fator de risco de cárie, quer seja pelo aspecto físico-químico da desmineralização superar a remineralização do esmalte devido às ciclagens de pH, como pela mudança bioquímica-microbiológica promovendo maior cariogenicidade da placa dental formada.

Quando em situações de alto risco de cárie, a associação de métodos de uso de flúor tem sido indicada, como bochecho ou aplicação tópica profissional em adição a água fluoretada e dentifrício fluoretado (MURRAY, 1986; ØGGARD *et al.*, 1994). Entretanto, não há um consenso com relação à somatória de efeitos. Estudos comparando várias combinações de métodos de uso de flúor têm mostrado que a efetividade em prevenir cárie

é parcialmente aditiva, e o benefício é menor que a soma dos efeitos dos métodos individuais (MURRAY, 1986; MARTHALER, 1990). Embora alguns estudos mostrem um benefício adicional quando se associam métodos de uso de flúor (BEISWANGER *et al.*, 1978; RIPA, 1990; ADAIR, 1998), outros estudos sugerem que a combinação não apresenta maior eficácia que cada método utilizado isoladamente (MAINWARING & NAYLOR, 1978; BLINKHORN *et al.*, 1983).

Em acréscimo, nenhum estudo experimental verificou o efeito da associação de métodos de uso de flúor no desenvolvimento de cárie e na cariogenicidade da placa dental, na presença de diferentes frequências de exposição à sacarose. Sendo assim, o objetivo deste estudo *in situ* foi avaliar o efeito da associação de aplicação tópica profissional de flúor e dentifrício fluoretado, quando o desafio cariogênico é aumentado pela frequência de exposição a sacarose, na composição orgânica, inorgânica e microbiológica da placa dental e no desenvolvimento de cárie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Com a finalidade de facilitar a compreensão e discussão, a revisão foi subdividida em alguns itens, não havendo a preocupação de esgotar o assunto, mas sim situar o leitor.

2.1. Doença Cárie e seu declínio

2.2. Fatores de risco de cárie

Exposição à carboidratos

Cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose

O papel dos estreptococos do grupo mutans na placa dental formada na presença de sacarose

2.3. Associação de métodos de uso de flúor

Efeito físico-químico do flúor tópico no processo de cárie

Efeito antimicrobiano do flúor

2.1. Doença Cárie e seu declínio

O desenvolvimento da cárie dental, considerada uma doença de origem multifatorial (MARSH, 1995), envolve três fatores indispensáveis: microbiota específica, dieta cariogênica e hospedeiro (KEYS, 1962).

Evidências suportam o conceito de que a cárie é uma doença bacteriana infecciosa causada principalmente por uma dieta rica em carboidratos, que permite o crescimento de uma microbiota e o aumento das quedas de pH e do potencial cariogênico, modificando as proporções de microrganismos acidúricos e acidogênicos (VAN HOUTE, 1994). Esses microrganismos aderidos vão formar uma placa patogênica levando a perdas minerais do esmalte (MARSH, 1994). O desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização no esmalte vai levar ao desenvolvimento de cárie (CLARKSON & McLOUGHLIN, 2000).

Em um estudo clássico de cárie experimental em humanos idealizado por VON DER FEHER *et al.* (1970), os estudantes que interromperam a escovação dental por 23 dias e bochecharam sacarose 9 vezes por dia, apresentaram lesões iniciais de cárie. Porém, quando retomaram a escovação e reduziram a exposição à sacarose, as lesões desapareceram. Concluíram que houve remineralização das lesões, a qual foi ativada pelo bochecho de flúor que os voluntários utilizaram.

Atualmente, o flúor é considerado o maior responsável pela redução da prevalência de cárie através do controle da progressão das lesões de cárie, inibindo a

desmineralização e ativando a remineralização do esmalte (FEATHERSTONE *et al.*, 1986; CLARKSON *et al.*, 2000).

O uso da fluoretação da água é um dos sistemas de promoção de saúde mais aceito e reconhecido por autoridades de saúde, por sua segurança e efetividade (CLARKSON *et al.*, 2000). Esse método começou a ser empregado na década de 50 nos países desenvolvidos, e na década de 80 expandiu no Brasil. Para estabelecer a concentração de flúor adequada na água, GALAGAN & VERMILION (1957) relacionaram a média anual das máximas temperaturas diárias em uma região à quantidade de água ingerida.

Além disso, a Organização Mundial da Saúde, em 1994, definiu normas para fluoretação de água: deve ser usada em áreas onde há risco moderado a alto de cárie dental, onde a economia pode custeá-la com tecnologia disponível, em áreas onde o fornecimento de água é bem organizado, ter flúor disponível e pessoas treinadas para o controle do sistema.

Com o objetivo de verificar a importância da presença do flúor na água de abastecimento, NOBRE dos SANTOS & CURY (1988) realizaram em estudo comparando a concentração de flúor na placa dental de crianças que estavam bebendo regularmente água fluoretada e após a paralisação temporária da fluoretação. Mostraram que a suspensão da fluoretação da água promoveu uma diminuição da concentração de flúor na placa dental, o que deve contribuir para a redução do efeito cariostático de flúor.

Entretanto, o efeito da fluoretação da água tem sido diluído por outras medidas para o controle da cárie e seu impacto se reduziu para valores de 20%, com tendência a decrescer. Embora, a sua relevância tenha diminuído, o método continua sendo importante para comunidades de baixo nível sócio-econômico ou para alguns países (EUA, Reino Unido) (CURY, 2001).

De acordo com KONIG (1993), em um estudo sobre fluoretação, foi encontrado que depois de 15 anos, o total de cárie em crianças na faixa etária de 12-14 anos diminuiu 50-63% na década de 50. Similarmente altas reduções foram observadas em outros estudos, mas a relação do declínio de cárie com água fluoretada tem diminuído substancialmente. Em 1986-1987, crianças que foram expostas à água fluoretada tinham CPO-S na ordem de 18% menor que aquelas que nunca viveram em cidades com água fluoretada. Para crianças com 15 anos de idade, a diferença foi de somente 8%. Em acréscimo, na região oeste dos EUA, crianças que receberam água fluoretada durante toda vida apresentaram CPO-S de 2,86, e crianças em comunidades não fluoretadas apresentaram CPO-S de 2,69. Quando as crianças que receberam suplementos ou aplicações tópicas profissionais foram eliminadas da amostra, a média de CPO-S em áreas fluoretadas foi somente 25% menor que em áreas não fluoretadas. Considerando a discrepância entre o efeito da água fluoretada na década de 50 e 1986-1987, assume-se que o dentifrício fluoretado contribuiu consideravelmente para o declínio da prevalência de cárie.

Dados preliminares do levantamento de cárie feito no estado de São Paulo também confirmaram um declínio de cárie independentemente da fluoretação de água. Entretanto, a condição de saúde bucal nas cidades onde esse método tem sido utilizado é

melhor, pois nos municípios sem água fluoretada, crianças com 12 anos apresentam um dente a mais atacado por cárie (NARVAI & CASTELLANOS, 1999).

Em acréscimo, PEREIRA *et al.* (1998) mostraram que, em 1991, as crianças de Piracicaba, onde a água é fluoretada, tinham uma prevalência de cárie 50% menor que Iracemápolis, que não tinha fluoretação da água, mas a diferença foi reduzindo-se chegando a 30% em 1997. Essa diferença poderia ser ainda menor se a prevalência de cárie em Piracicaba não estivesse também em declínio. Esses dados confirmam outros levantamentos que apontam para uma redução de cárie no Brasil e sugerem que os dentifrícios fluoretados de alguma forma têm tido participação nessa tendência. NARVAI *et al.* (1999) sugerem que a redução dos valores do índice CPO-D, aos 12 anos de idade, na ordem de 57,8% entre 1980-1996 no Brasil é atribuída à combinação de fluoretação de água + dentifrício fluoretado + programas de saúde.

Sendo assim, o amplo uso de flúor é o principal responsável pelo declínio de cárie ocorrido no Brasil e no mundo nas últimas décadas (CLARKSON *et al.*, 2000), e dentifrício fluoretado é considerado o método de uso de flúor mais importante na redução de cárie (BRATTHALL *et al.*, 1996).

Muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de verificar o efeito do dentifrício fluoretado no desenvolvimento de cárie. Com objetivo de verificar a eficácia do flúor utilizado diariamente, voluntários utilizaram dispositivos acrílicos durante 14 dias contendo blocos de esmalte humano com lesões de cárie. Os blocos com lesão foram submetidos a tratamentos com solução de fluoreto de sódio ou dentifrício contendo

monofluorfosfato de sódio. A saliva conseguiu remineralizar até 20 μm da superfície, e 1 minuto de solução de fluoreto de sódio *in vitro* e *in vivo* durante 14 dias conseguiu remineralizar todo o corpo da lesão. Portanto, verificou-se a capacidade remineralizante da saliva e o potencial de enxaguatórios diários e dentifrícios na prevenção ou reversão das lesões iniciais de cárie (FEATHERSTONE *et al.*, 1982).

Para verificar o efeito do flúor em ativar a remineralização e inibir a desmineralização, FEATHERSTONE *et al.* (1986) realizaram um experimento *in vivo* e *in vitro*. Foram fixados braquetes em dentes de voluntários que apresentavam pré-molares indicados para extração por razão ortodôntica e receberam tratamentos durante 4 semanas: 1) dentifrício (1100 ppm F como NaF); 2) dentifrício e bochecho (0,05% F) diários; 3) dentifrício + ATF (1,23% F, uma vez por semana; 4) dentifrício+bochecho+ATF. No experimento com ciclagens de pH, os dentes foram submetidos a solução desmineralizante (6 horas diárias), 5 minutos de tratamento com suspensão de dentifrício (3:1), NaF ou MFP e solução remineralizante (17 horas diárias) durante 2 semanas. Os resultados mostraram que o uso do flúor freqüente em baixas concentrações foi eficaz no controle do desenvolvimento de cárie tanto nos estudos *in vivo* como *in vitro*. Além disso, a presença de flúor em concentrações baixas (0,1-0,5mg/l) na saliva foi capaz de inibir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte.

Também para verificar o efeito do dentifrício (NaF, contendo 1100 ppm F) em ativar a remineralização e inibir a desmineralização do esmalte. WHITE & FEATHERSTONE (1987) realizaram ciclagens de pH utilizando coroas de esmalte humano com áreas isoladas, que permaneceram seis horas em solução desmineralizante e 17 horas

em solução remineralizante durante 14 dias (2 dias em solução remineralizante). Através do cálculo da perda mineral (ΔZ) ou progressão da lesão (% vol. mineral x μm), mostraram que o dentifrício foi eficaz na redução da progressão de cárie, diminuição da profundidade da lesão e aumento do conteúdo de mineral da lesão.

Em acréscimo, WHITE (1987) avaliou a capacidade do dentifrício fluoretado em reparar lesões artificiais de cárie através de ciclagens de pH durante 12 dias. Foi provocada lesão artificial de cárie em blocos de esmalte humano previamente às ciclagens. Durante as ciclagens os blocos receberam tratamento quatro vezes por dia com suspensão de dentifrício fluoretado (3:1), entre os tratamentos os blocos ficavam imersos em saliva humana, sendo que duas horas por dia ficavam imersos em solução desmineralizante. Confirmou-se que os dentifrícios fluoretados contendo flúor iônico são eficazes em ativar a remineralização e aumentar o conteúdo de flúor nas lesões de cárie, aumentando a resistência ao desafio cariogênico, como também inibir a progressão da lesão antes ou após o desafio cariogênico, simulando a escovação antes ou após uma dieta cariogênica (ten CATE *et al.*, 1988).

MURRER *et al.*, 1994 realizaram um estudo *in situ*, no qual voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo blocos de esmalte humano restaurados com resina composta e protegidos com tela plástica para o acúmulo de placa, gotejaram sacarose 8x ao dia durante 28 dias e utilizaram dentifrícios com ou sem flúor. Os blocos que receberam apenas dentifrício não fluoretado apresentaram lesões de mancha branca e perda de mineral na lesão de cárie de 60%. Entretanto, os blocos que receberam dentifrício fluoretado não apresentaram lesões de mancha branca, e a perda de mineral foi na ordem de

10%. Considerando que todos voluntários estavam utilizando água fluoretada, observou-se o maior efeito do dentifício fluoretado em inibir a progressão das lesões de cárie.

Para verificar a capacidade do dentifício fluoretado (1100 ppm F, como NaF) em remineralizar lesões de cárie, foi realizado um estudo, no qual voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo blocos de esmalte humano com lesão de cárie artificial, protegidos com tela plástica para acúmulo de placa, durante 45 dias. Os blocos que receberam dentifício fluoretado apresentaram 73% de remineralização e menor extensão de cárie em relação ao dentifício sem flúor, que apresentaram 43% de remineralização. Concluiu-se que o flúor do dentifício aumentou a capacidade de reposição mineral da saliva em duas vezes (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 1998). De acordo com CURY (2001), a eficácia do flúor é maior quanto menor a perda mineral. Desse modo, a eficiência do dentifício fluoretado assenta-se na regularidade de escovação, uma vez que o flúor interfere na dinâmica do processo de cárie. Assim, ao mesmo tempo que a placa é desorganizada periodicamente, diminuindo seu potencial patogênico, o flúor ajuda a saliva a repor minerais perdidos do dente (CURY, 2001).

Para verificar o efeito do flúor associado ao CaCl_2 , KOO & CURY (1998) estudaram o efeito do dentifício monofluorofosfato de sódio (SMFP) e SMFP- CaCl_2 na incorporação de flúor e remineralização. Oito voluntários utilizaram dispositivos contendo blocos de esmalte humano com lesão de cárie artificial, protegidos com tela plástica, durante 45 dias. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os dois dentifícios testados nas análises de remineralização superficial, na extensão da lesão de cárie e

concentração de flúor no esmalte, porém ambos diferiram do dentifício sem flúor, confirmando o efeito do flúor em ativar a remineralização.

O dentifício fluoretado também foi testado associado ao bicarbonato de sódio na desmineralização e remineralização do esmalte, visto que essa substância poderia inibir ou neutralizar o ácido produzido pelas bactérias, aumentando o efeito anticariogênico do flúor. Voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo dois blocos com lesão de cárie artificial e dois blocos hígidos, nestes gotejavam sacarose a 10% 3x ao dia. Os resultados mostraram que o bicarbonato de sódio não aumentou nem diminuiu o efeito do dentifício fluoretado na redução da desmineralização e ativação da remineralização (CURY *et al.*, 2001a).

Sendo assim, a eficácia dos dentifícios fluoretados em interferir nos processos de cárie ativando a remineralização e inibindo a desmineralização em concentrações baixas e freqüentes está bem estabelecida (FEATHESTONE *et al.*, 1986; KONIG, 1993; BRATTHALL *et al.*, 1996; FEATHESTONE, 1999; CLARKSON *et al.*, 2000). Entretanto, estudos mostram uma prevalência de cárie alta em alguns indivíduos (STAMM *et al.*, 1991; HAUSEN, 1997).

2.2. Fatores de risco de cárie

Embora tenha havido mundialmente, inclusive no Brasil, uma expressiva redução de cárie dental, grupos de crianças continuam apresentando alta atividade da doença (STAMM *et al.*, 1991; BAWDEN, 1992; ØGAARD *et al.*, 1994; HAUSEN, 1997; HAUSEN *et al.*, 2000).

Em termos mundiais, estima-se que 20-25% das crianças e adolescentes apresentam 60-80% do total de cárie da população (KASTE *et al.*, 1996; MILNES, 1996; POWELL, 1998; FEATHERSTONE, 1999). Em acréscimo, há relato que 17% de crianças de uma amostra brasileira apresentam 46% do total de lesões de cárie da população avaliada (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996). De acordo com a Resolução SS-95 de 27/06/2000, esse fenômeno é chamado de polarização, sendo uma das características epidemiológicas da cárie dental. Ocorre em situações de baixa prevalência de cárie, em que cerca de um quarto da população concentra aproximadamente 75% das necessidades de tratamento decorrente de cárie. Esses dados demonstram a necessidade da identificação precoce das crianças com alto risco de cárie, para que sejam adotadas as medidas necessárias para o controle da doença.

De acordo com HAUSEN (1997), há três pré-requisitos básicos para o sucesso da aplicação de uma estratégia de alto risco no controle de cárie dental: a ocorrência de cárie em uma população alvo deve ser baixa suficiente, para justificar o esforço na identificação de indivíduos que se acredita desenvolverem cárie; as medidas devem apresentar exatidão, ser aceitáveis e possibilitar a identificação de pacientes de alto risco; os

esforços na prevenção que objetiva a diminuição do risco desses indivíduos devem ser baseados em medidas eficazes. Acrescenta que vários fatores podem ser levados em consideração na determinação de indivíduos de risco, como por exemplo: experiência passada de cárie, contagem de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, fluxo salivar, frequência de ingestão de sacarose, escovação e grupo social. Dentre esses seis fatores, acredita-se que o mais forte é o CPO-S, mas não há consenso do que irá definir se o indivíduo é alto risco ou não, se são aqueles que apresentam grande porcentagem de dentes, superfícies ou sítios com lesão, ou combinação desses fatores (BECK, 1998). Devido à etiologia multifatorial da cárie dental, ainda há dificuldade em determinar o risco de cárie dos indivíduos.

TINANOFF (1995) descreveu alguns fatores importantes na definição do risco de cárie: alto consumo de sacarose, altos níveis de microrganismos cariogênicos, experiência de cárie passada, qualidade da higiene oral, exposição ao flúor, condição sócio-econômica e padrão familiar.

Para avaliar se o tratamento preventivo em crianças (13 anos de idade) consideradas de risco de cárie estava sendo adequado, VARSIO & VEKALAHTI (1996) dividiram essas crianças em dois grupos: pacientes com cárie e sem cárie (com dentes intactos). Os dados foram adquiridos em clínicas públicas para avaliar a necessidade de tratamento preventivo individual, risco de cárie e o tratamento preventivo dado ao paciente. Pacientes com lesões de cárie iniciais, ou com pré-molares ou segundo molares em erupção ou experiência passada de cárie foram considerados de risco. O consumo de açúcar, placa e

teste salivar também foram levados em consideração. Os métodos preventivos usados em indivíduos considerados de risco foram: instruções de higiene oral, dieta, dentifício fluoretado e aplicação de verniz duas a quatro vezes por ano. Alguns desses métodos também foram empregados no grupo livres de cárie, dependendo da condição individual. Tratamentos preventivos apresentaram fraca ou somente moderada concordância com a necessidade individual ou risco de desenvolver cárie. A medida preventiva mais usada foi aplicação de verniz, enquanto a motivação e instrução para saúde oral foi pequena. Os resultados mostraram que a intensificação de programas de prevenção para pacientes de alto risco ainda é necessário, que o dentista deve sempre considerar o risco do paciente em desenvolver cárie, para melhorar a qualidade dos programas de prevenção. Além disso, confirmou-se que os dentistas ainda não sabem completamente o programa de prevenção apropriado para cada indivíduo.

Devido a essa dificuldade de identificação de indivíduos que apresentam risco de cárie, BOWDEN (1997) realizou um estudo para verificar se a composição microbiológica da placa e da saliva poderia ajudar o diagnóstico de atividade de doença. Mas mostrou que testes microbiológicos usados sozinhos têm um valor limitado, sendo necessários outros fatores para predizer o desenvolvimento de cárie. Por outro lado, podem ser usados para monitorar caso haja alguma alteração microbiológica devido ao início de cárie, porém pode ser apenas uma variação individual. Estudos têm mostrado uma boa correlação entre colonização de estreptococos do grupo mutans na placa e saliva, entretanto vai depender do estágio de desenvolvimento da placa dental. Outros fatores, como a virulência dos microrganismos e a pressão do ambiente, devem ser considerados no

diagnóstico de atividade de cárie ou na susceptibilidade de desenvolvê-la (VAN HOUTE, 1993).

Com o objetivo de avaliar os previsores do incremento de cárie em crianças escolares brasileiras, GAVAZZI *et al.* (1995) avaliaram os parâmetros clínicos, salivares e microbiológicos empregados na tentativa de identificar pacientes de alto risco de incremento de cárie na dentição permanente. Dessa forma, escolares brasileiros, de ambos os sexos, com idade entre 6-8 anos no início da pesquisa, foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. O grupo tratado foi submetido a aplicações tópicas de fluoreto e selantes, com revisão semestral. Os exames salivares, clínicos e microbiológicos mostraram que, entre os diversos previsores empregados para identificar pacientes de alto risco, apenas o ceos mostrou uma diferença estatisticamente significativa com o incremento de cárie na dentição permanente, sendo o único índice com alguma confiança para se prever o risco de desenvolvimento de cárie.

No sentido de verificar os fatores geralmente considerados na identificação de pacientes com predisposição a apresentar lesões de cárie, POWELL (1998) constatou em sua revisão que a experiência passada de cárie, erupção de dentes (idade), níveis de bactérias, dieta e variáveis sócio-demográficas são os fatores considerados na determinação do risco de desenvolvimento de cárie.

MATTOS-GRANER *et al.* (1998) realizaram um estudo para verificar a associação entre prevalência de cárie e variáveis clínicas, microbiológicas e dieta em crianças brasileiras de 1 a 2,5 anos de idade. Verificaram diferença estatística na

prevalência de cárie entre crianças que apresentaram placa visível ou não. Estreptococos do grupo mutans foi detectado em 80,3% das crianças. Maior prevalência de cárie foi observada em crianças com alto nível de estreptococos do grupo mutans comparadas com aquelas de baixo nível. Crianças que nunca se alimentaram com leite materno ou que alimentaram até 3 meses apresentaram maior prevalência de cárie que aquelas que se alimentaram por um tempo maior. Uma maior prevalência de cárie também foi observada entre crianças que utilizaram mamadeira com leite com sacarose e cereal que aquelas que utilizaram mamadeira com leite com ou sem sacarose. Crianças que começaram a se alimentar com uma dieta salgada depois dos 7 meses de idade apresentaram maior prevalência de cárie que crianças que começaram antes. Esses resultados mostram evidências da associação entre prevalência de cárie e nível de estreptococos do grupo mutans, fatores clínicos e da dieta.

A Resolução SS-95 de 27/06/2000 cita alguns fatores associados ao risco de cárie: 1) aspectos sócio-culturais: baixa renda média familiar, desemprego, maior concentração populacional nos domicílios, menor grau de escolaridade materna; 2) idade: maior risco entre dois e 16 anos; 3) experiência prévia de cárie: alta prevalência de cárie nos anteriores superiores aos três anos, mais de três cavidades em superfícies proximais de decíduos, oito ou mais superfícies com cárie aos 7 anos, cárie em um dente anterior aos 11 anos, valores do índice CPO-D e CPO-S acima da média apresentada pelo respectivo grupo; 4) localização da lesão: cárie em superfície proximal de incisivo ou primeiro molar aos 9-10 anos, lesões em superfícies lisas, principalmente na bateria labial inferior, duas ou mais cavidades cariadas em superfícies interproximais; 5) atividade de cárie: presença de

superfícies cariadas e de manchas brancas, lesões incipientes em superfícies lisas; 6) hábitos: baixa frequência de escovação, idade no início de escovação; 7) placa bacteriana: grande quantidade de placa visível nos dentes 11, 16, 32 e 36.

Outros autores (MESKIN, 1995; PITTS, 1998) sugerem que a condição sócio-econômica, acesso ao serviço odontológico, a história passada de cárie, raízes expostas, altos níveis de bactérias cariogênicas, má higiene dental, esmalte ou dentina mal formada, baixo fluxo salivar devido a medicamentos, radiação ou doenças, baixa capacidade tampão, pacientes com aparelhos ortodônticos podem aumentar o risco do desenvolvimento de cárie. Além disso, se esses fatores estiverem associados com uma dieta rica em carboidratos, o risco pode aumentar.

Exposição à carboidratos

Cárie é uma doença bacteriana dieta-dependente, e a sacarose é considerada responsável pelo aumento de cárie nas populações industrializadas (LOESCHE, 1985; SHEIHAM, 1991; 2001; BURT, 1993). A sacarose é, entre os carboidratos fermentáveis, considerada o de maior potencial cariogênico, pois, além de resultar em produção de ácido quando metabolizada pelos microrganismos, é um substrato para a síntese de glucanos extracelulares (NEWBRUN, 1967).

Evidências laboratoriais mostram que a sacarose tem um papel especial no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e proximal devido à sua habilidade de produzir

polissacarídeos extracelulares na presença de estreptococos do grupo mutans, aumentando a aderência da placa ao esmalte dental (BURT, 1993). Por outro lado, referir-se à cárie como “doença sacarose-dependente” é muito amplo, mas pode ser parcialmente verdade para cárie de superfície lisa (LOESCHE, 1985).

Nesse mesmo estudo, BURT (1993) refere-se ao decréscimo de cárie nos EUA devido ao aumento do consumo de monossacarídeos em substituição à sacarose. Entretanto, em um estudo (SCHEINEN *et al.*, 1976) verificou-se que um grupo que consumia doces à base de frutose apresentou o mesmo número de lesões de cárie que o outro grupo que consumia doces à base de sacarose. FROSTELL *et al.* (1991) descreveu um estudo, no qual pré-escolares que consumiram doces com a mistura de glicose + frutose apresentaram apenas uma leve diminuição no desenvolvimento de cárie em relação ao grupo que consumiu sacarose. Entretanto, esses estudos não conseguiram manter as condições experimentais necessárias, pois foi realizado em uma população sem controle adequado da dieta.

CURY *et al.* (2000) realizaram um estudo *in situ* para verificar a composição bioquímica e a cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose ou de glicose + frutose. Doze voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo quatro blocos de esmalte humano durante 28 dias, protegidos com tela plástica para o acúmulo de placa. Soluções de sacarose 20% ou glicose 10% + frutose 10% foram gotejadas nos blocos 8x ao dia, sendo que o grupo controle gotejava água. Os resultados mostraram que tanto a sacarose como a mistura de monossacarídeos foram mais cariogênicas que o controle, porém observaram maior cariogenicidade da placa formada na presença de sacarose pela

maior concentração de polissacarídeos extracelulares, menor concentração inorgânica, maior perda de mineral na superfície dental e maior extensão da lesão de cárie.

Além do consumo de açúcar ser fator determinante na prevalência de cárie (SHEIHAM, 1991), há uma correlação positiva entre a frequência de ingestão de sacarose e incidência de cárie (BOWEN *et al.*, 1980).

O incremento de cárie em relação ao aumento da frequência de consumo de sacarose foi constatado por RODRIGUES & SHEIHAM (2000), quando avaliaram o efeito do guia de dieta na ingestão de açúcar em berçários e outros fatores de risco de cárie, em um estudo longitudinal com crianças de 3 anos de idade. De acordo com os resultados, as crianças que não seguiram as orientações do guia para diminuir a ingestão de açúcar apresentaram maior risco de cárie. Portanto, o incremento de cárie observado foi fortemente relacionado ao aumento da frequência de sacarose.

TINANOFF & PALMER (2000) também verificaram que a frequência de ingestão de açúcar é um dos fatores que afetam o desenvolvimento de cárie dental. Descreveram que a cárie dental em pré-escolares é devido a uma combinação de fatores: colonização do dente por bactérias cariogênicas, tipo de alimento, frequência de exposição e susceptibilidade do dente. Além disso, o risco de cárie é aumentado se açúcares são consumidos em alta frequência e ficam retidos na boca por longos períodos. A sacarose é considerada a mais cariogênica por permitir a síntese de glucanos e facilitar a aderência de bactérias ao dente, aumentando a difusão ácida na interface dente-placa. Recomenda-se a

educação nutricional para redução de cárie, além do hábito de higiene oral e uso apropriado de flúor.

Outros estudos confirmaram que a frequência de sacarose está diretamente relacionada com o desenvolvimento de cárie (KONIG *et al.*, 1968; BOWEN *et al.*, 1980; TABCHOURY *et al.*, 1998). KONIG *et al.* (1968) realizaram um experimento, no qual ratos receberam alimentação programada da dieta 580 (67% sacarose) 12, 18, 24 ou 30 vezes por dia. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a frequência da alimentação e incidência de cárie. BOWEN *et al.* (1980) realizaram um experimento em ratos com alimentação programada para verificar a cariogenicidade de vários alimentos. Os ratos receberam a dieta básica através de incubação gástrica. Concluíram que o número de lesões que desenvolveram estavam diretamente relacionadas à frequência de consumo de sacarose.

Outro estudo também mostrou que a frequência de exposição à sacarose interfere no desenvolvimento de cárie, pois observou-se mancha branca em dentes expostos à sacarose 4x e 8x/dia, quando comparado ao controle e 2x/dia. Nesse estudo, 12 voluntários usaram dispositivos acrílicos durante 28 dias em quatro fases, contendo quatro blocos de esmalte humano. Solução de sacarose 20% foi gotejada 0, 2, 4, 8 vezes ao dia nos blocos. Os resultados mostraram que a placa dental formada na presença de sacarose 8x ao dia apresentou 3x mais glucanos insolúveis e menor concentração de F, P e Ca, que foram, respectivamente, 7, 10 e 3 vezes menores que a placa formada na ausência de sacarose (CURY *et al.*, 1997). Em outro estudo semelhante, confirmou-se que a placa dental

formada na frequência de 8x/dia resultou em maior perda mineral quando comparada ao controle e as frequências de 2 e 4x/dia (CURY *et al.*, 2001b).

Entretanto, de acordo com uma revisão realizada por BURT & PAI (2001), com o objetivo de responder se alta ingestão de açúcar aumenta a severidade de cárie, apenas dois artigos mostraram uma relação forte entre consumo de sacarose e desenvolvimento de cárie, 16 artigos mostraram uma relação moderada e 18, nenhuma relação. Concluiu-se que, atualmente, a relação entre consumo de açúcar e cárie é mais fraca pela exposição frequente ao flúor e que o controle no consumo de açúcar é justificável na prevenção de cárie, entretanto não é o aspecto mais importante.

Por outro lado, TABCHOURY *et al.* (1998) mostraram que mesmo na presença de flúor o aumento da frequência de ingestão de sacarose influencia na atividade de cárie. Esse estudo foi realizado em ratos com alimentação programada, sendo que um dos objetivos foi verificar o efeito cariostático do flúor em diferentes frequências de desafio cariogênico. Concluíram que o efeito do flúor diminuiu com o aumento do número de exposições à sacarose e que não inibiu totalmente o desenvolvimento das lesões, mas reduziu a sua progressão. Além disso, confirmou que a frequência de exposição a sacarose influencia a atividade de cárie.

DUGGAL *et al.* (2001) também observaram que o aumento da frequência de sacarose interfere na desmineralização dental. Em um estudo investigaram o efeito da frequência consumo de carboidratos na desmineralização do esmalte na presença ou não de dentifrício fluoretado. Oito voluntários utilizaram dispositivos acrílicos mandibulares

contendo blocos de esmalte humano com lesões de cárie artificial protegidos com tela plástica durante 5 dias, sendo que dois dias antes utilizaram os dispositivos para o acúmulo de placa. Os voluntários bochecharam sacarose a 12% uma, 3, 5, 7, 10 vezes/dia durante 2 minutos e escovaram seus dentes duas vezes por dia utilizando dentífrico com ou sem flúor. Os resultados mostraram que, quando os voluntários utilizaram dentífrico fluoretado, a desmineralização foi evidente somente na frequência de 7 e 10x/dia e, quando utilizaram dentífrico sem flúor, a desmineralização foi observada a partir da frequência de sacarose de 3x/dia. Esse estudo demonstra a importância do dentífrico fluoretado nos processos de des e remineralização na presença de diferentes frequências de ingestão de carboidratos.

De acordo com SHEIHAM (1987) evidências bioquímicas e microbiológicas em estudos clínicos e epidemiológicos realizados em animais e humanos mostram que a sacarose está diretamente relacionada à cárie dental. O risco de cárie está relacionado tanto à frequência como à quantidade de sacarose consumida. Algumas evidências da importância da sacarose na cariogenicidade dental são: substrato para síntese de polissacarídeo extracelular, sendo que sem esses polímeros os estreptococos do grupo mutans não podem colonizar a superfície dental em alta quantidade, a relação entre a presença de sacarose em alimentos e cárie, a relação entre cárie e frequência de sacarose e que a diminuição do consumo de sacarose diminui o risco de desenvolvimento de cárie.

Em acréscimo, SHEIHAM (2001) descreve que o consumo de sacarose acima de quatro vezes por dia aumenta o risco de desenvolvimento de cárie. A relação dose-resposta entre cárie e açúcar sugere que o nível de açúcar acima de 60g/pessoa/dia para adolescentes e adultos promove um incremento de cárie. Assim, além do uso do dentífrico

fluoretado, uma estratégia importante para uma redução de cárie, é reduzir a frequência de ingestão de açúcar na dieta.

Portanto, o consumo de açúcar, particularmente a sacarose, está entre os fatores etiológicos da cárie mais importantes, sendo que a frequência de exposição à sacarose é relevante no incremento de cárie (SHEIHAM, 1987; SHEIHAM, 2001).

Cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose

O estudo de Vipeholm (GUSTAFSSON *et al.*, 1954) mostrou evidências que provam a correlação entre o consumo de sacarose e cárie dental. Entretanto, nesse estudo não se verificou o que levaria a sacarose a ser mais cariogênica.

O estudo pioneiro da importância da dieta na formação da placa foi realizado por CARLSSON (1965), e a maior contribuição para entender a bioquímica e estrutura da placa foi realizada por GUGGENHEIN (1970), mostrando que grande parte do volume de placa formada na presença de sacarose era polissacarídeo (dextrano e glucano), que são produzidos pelos estreptococos do grupo mutans a partir da sacarose. A alta energia de hidrólise da sacarose pode ser utilizada pelos estreptococos do grupo mutans para síntese desses glucanos (NEWBRUN, 1967), através da glicosiltransferase (GTF), tendo um importante papel na adesão destes na superfície da hidroxiapatita (RØLLA *et al.*, 1983). A solubilidade dos glucanos depende da ligação dos resíduos de glicose α (1,3) e α (1,6), que, respectivamente, apresentam baixa solubilidade e alta solubilidade em água (RØLLA *et al.*,

1985). Foi mostrado que mutantes de estreptococos do grupo mutans que não produzem glucanos insolúveis apresentam patogenicidade reduzida em modelos de cárie (TANZER *et al.*, 1974).

Também relacionando a cariogenicidade da placa dental e polissacarídeo extracelular produzido na presença de sacarose, DIBDIN & SHELLIS (1988) concluíram que ocorreu um aumento da porosidade e conseqüentemente maior difusão do substrato e queda de pH na superfície do esmalte, e com isso observou-se um aumento no desafio cariogênico.

Além desses fatores considerados da cariogenicidade da placa dental, outros foram verificados por MARGOLIS *et al.* (1988) em um estudo comparando a composição orgânica e inorgânica do fluido de placa em repouso, de indivíduos sem cárie e susceptíveis à cárie, em que voluntários ficaram sem escovar os dentes durante 48 horas antes da coleta de placa. Os resultados mostraram que o fluido da placa é supersaturado em relação ao esmalte, apresentando-se mais saturado em indivíduos sem cárie, sugerindo um maior potencial de remineralização. Essa diferença de saturação pode estar relacionada a diferenças de pH e à produção de NH₃, que podem refletir na composição de diferentes espécies de microrganismos. Em continuação a esse estudo, MARGOLIS & MORENO (1992) investigaram a composição orgânica e inorgânica do fluido da placa de indivíduos sem cárie e com cárie, nos tempos 7, 15, 30, e 60 minutos após bochecho com solução de sacarose. Observaram que a queda de pH e concentração de ácido láctico foram maiores em indivíduos com cárie, apresentando maior potencial cariogênico.

Por outro lado, a produção de ácido, a partir da fermentação de carboidratos na placa dental não leva, necessariamente, à desmineralização do esmalte adjacente. Acreditava-se que o pH tamponado pelos constituintes da placa seria superado, permitindo a queda abaixo do pH crítico, levando à desmineralização. Entretanto, o valor de pH crítico não é fixo, é modulado pelos íons presentes na placa dental durante ciclos de pH. A reserva de íons fosfato de cálcio na placa pode saturar o fluido da placa em relação ao esmalte e nem sempre com quedas de pH excede o valor crítico. A presença de flúor também irá influenciar a dissolução do esmalte através da dissolução de hidroxiapatita e precipitação de fluorapatita, que é provavelmente o mecanismo mais importante da inibição da dissolução mineral (PEARCE, 1991).

Em acréscimo, CURY *et al.* (1997) também mostraram a importância da composição inorgânica na placa dental. Realizaram um estudo *in situ* com 12 voluntários, que utilizaram dispositivos acrílicos contendo quatro blocos de esmalte humano protegidos com tela plástica durante 28 dias. Solução de sacarose 20% foi gotejada 0, 2, 4, 8 vezes ao dia nos blocos. Os resultados mostraram que a placa dental formada na presença de sacarose 8x ao dia apresentou 3x mais glucanos insolúveis e menor concentração de F, P e Ca, que foram, respectivamente, 7, 10 e 3 vezes menor que a placa formada na ausência de sacarose. Com isso, concluíram que a cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose não pode ser atribuída somente à maior porosidade, mas também à menor concentração inorgânica encontrada com o aumento da frequência de sacarose.

Em um estudo semelhante, CURY *et al.* (2000) compararam a cariogenicidade e composição bioquímica da placa formada na presença de sacarose e de glicose+frutose.

Verificaram perda de dureza de 3,3% no controle, 44,2% no grupo tratado com glicose+frutose e 73,4% no grupo tratado com sacarose. Concluíram que apesar dos resultados sugerirem que a cariogenicidade da sacarose se deve principalmente à alta concentração de glucanos insolúveis, a menor concentração inorgânica e de proteínas também devem ser consideradas.

Portanto, a sacarose aumenta a cariogenicidade da placa dental, pelo aumento da porosidade e diminuição da composição inorgânica (CURY *et al.*, 1997). Em acréscimo, ocorre uma modificação na composição microbiológica da placa dental com o aumento do consumo de carboidratos (DE STOPPELAR *et al.*, 1970).

O papel dos estreptococos do grupo mutans na placa dental formada na presença de sacarose

O freqüente consumo de carboidratos fermentáveis está associado com o aumento do risco de cárie (LOESCHE, 1985). Essa dieta leva ao aumento das proporções de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, com concomitante queda dos níveis de outros estreptococos, especialmente o grupo de estreptococos oralis, que inclui *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis* (DE STOPPELAR *et al.*, 1970). O metabolismo da placa também muda de um padrão heterofermentativo para outro em que os açúcares são convertidos principalmente em ácido lático (MARSH, 1994).

De acordo com TANZER (1989), dentre os fatores que tornam as bactérias cariogênicas estão: capacidade de sintetizar polissacarídeos a partir da sacarose facilitando a adesão à estrutura dental, transporte de sacarose e outros açúcares simples, formação de polissacarídeos de reserva e o fato de serem acidogênicas e acidúricas.

A transição da placa associada à saúde para doença está associada a mudanças na composição e atividades metabólicas da população bacteriana. Essas mudanças ecológicas resultam no aumento da proporção de microrganismos patogênicos, que possuem determinantes enzimáticos e estruturais que os tornam mais virulentos que microrganismos associados à saúde oral. Para o desenvolvimento de cárie, ocorrem repetidos ciclos de quedas de pH na placa, selecionando as bactérias mais ácido-resistentes. Para desenvolver a doença, os estreptococos do grupo mutans têm capacidade de se aderir à superfície do dente e acumular em número suficiente. Além disso, possuem um sistema de transporte de alta afinidade pelo açúcar, eficiente sistema glicolítico, habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares e estocá-los quando em excesso (BURNE, 1998).

Além da capacidade de estocar polissacarídeo intracelular de reserva, podem metabolizá-lo provocando a desmineralização do esmalte. Para verificar esse efeito, ZERO *et al.* (1986a) realizaram um estudo, em que voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo blocos de esmalte bovino cobertos com uma placa artificial. A placa artificial foi preparada a partir de cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, que foram cultivadas por 18 horas em caldos com concentrações diferentes de glicose 0,25 a 2,2 %. O dispositivo foi utilizado durante 45 minutos, sendo realizado bochecho com solução de sacarose ou glicose 10%. Os resultados mostraram que as placas de *S. mutans* cultivadas

com 2,2 % de glicose provocaram maior desmineralização e queda de pH. Essa produção de ácido de origem endógena pela placa bacteriana pode ser importante na etiologia de cárie dental. Um menor efeito foi observado em *S. sanguis* e *S. mitis* e não foi observado em *S. salivarius*.

Outra característica determinante da virulência dos estreptococos do grupo mutans é a capacidade de síntese de polissacarídeos extracelulares. Nesse estudo foi determinado o papel da matriz extracelular sintetizada a partir da sacarose pelos estreptococos do grupo mutans em alterar potencial de desmineralização da placa dental. Voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo blocos de esmalte bovino cobertos com placa artificial, suplementada durante o preparo com diferentes concentrações de sacarose. A produção de ácidos das massas bacterianas foi avaliada *in vitro* e a desmineralização determinada *in situ*. Os resultados mostraram menor produção de ácido *in vitro* e maior desmineralização *in situ* que o estudo anterior, devido à grande quantidade de matriz extracelular sintetizada. Observaram que o aumento da proporção de matriz extracelular, em relação à densidade de microrganismos (1:19), aumentou o potencial de desmineralização do esmalte, devido à alteração nas propriedades de difusão da placa dental e queda de pH mais prolongada (ZERO *et al*, 1986b).

De acordo com VAN HOUTE (1994), as mudanças provocadas pela dieta rica em carboidratos na proporção de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos na placa dental, estão diretamente relacionadas à alta capacidade ácido-tolerante desses microrganismos. Essa característica pode oferecer vantagens seletivas ao crescimento

durante freqüentes episódios com quedas de pH. Com isso, o aumento da freqüência de ingestão de carboidratos leva ao aumento da proporção desses microrganismos.

Alguns estudos (DE STOPPELLAR *et al.*, 1970; STAAT *et al.*, 1975) mostraram uma correlação positiva entre a presença de sacarose na dieta e níveis de estreptococos do grupo mutans na placa dental. SCHEIE *et al.* (1984) encontraram uma pequena diferença na prevalência de estreptococos do grupo mutans na placa formada após três semanas, em que voluntários foram submetidos à alta e baixa freqüência de sacarose. Por outro lado, CARLSSON (1989) mostrou que a sacarose não afeta os níveis de estreptococos do grupo mutans na placa dental em humanos.

Entretanto, DUCHIN & VAN HOUTE (1978) verificaram que a placa dental formada em superfície com lesão de cárie apresentou maior proporção de estreptococos do grupo mutans que a placa formada sobre esmalte hígido adjacente à lesão, porém os lactobacilos não foram detectados em placas de lesões iniciais e foram isolados em pequeno número em superfícies híginas. Descrevem ainda que não se pode assumir que baixas proporções de estreptococos do grupo mutans constituem um desafio bacteriano insuficiente, por outro lado, não podem ser responsáveis por qualquer desenvolvimento de cárie.

De acordo com MACPHERSON *et al.* (1990a), os estreptococos do grupo mutans e lactobacilos foram encontrados em locais com maior perda mineral do esmalte. Esse estudo *in situ* foi realizado em três fases de 21 dias com o objetivo de estudar a microbiota associada às lesões de cárie iniciais. Voluntários utilizaram dispositivos intra-

orais contendo secções de esmalte humano com superfícies isoladas. Os tratamentos foram: 1) grupo controle; 2) aplicação de sacarose 10% extra-oral, 9x ao dia; 3) inoculação estreptococos do grupo mutans de cada voluntário no sítio testado e sacarose extra-oral, 9x ao dia. Realizou-se contagem de vários microorganismos, dentre eles, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos e verificou-se a desmineralização através do cálculo de ΔZ . Os resultados sugeriram que a maior desmineralização ocorreu no grupo 3 e relacionado à presença de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Em outro estudo, não encontraram diferenças estatísticas na contagem da microbiota total e estreptococos do grupo mutans entre placa normal e formada na presença de sacarose. Encontrou-se maior contagem de estreptococos do grupo mutans quando esse microorganismo foi inoculado (MACPHERSON *et al.*, 1996b).

Por outro lado, CURY *et al.* (2001b) não mostraram relação entre cárie e contagem de estreptococos do grupo mutans na placa dental. Nesse estudo investigaram a relação entre frequência de exposição à sacarose, níveis de estreptococos do grupo mutans e cárie dental através de um estudo *in situ*, em que 12 voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo blocos de esmalte humano durante quatro fases de 28 dias. Gotejaram solução de sacarose 20% na superfície dos blocos zero, dois, quatro e oito vezes por dia. Os resultados mostraram uma maior perda mineral, quando os blocos foram expostos à sacarose 8x ao dia, e que a frequência de sacarose não influenciou os níveis de estreptococos do grupo mutans. Concluíram que o aumento da perda mineral provocada pela alta exposição à sacarose pode ser mais bem explicado pelas mudanças na estrutura e composição da matriz da placa dental que pelo número de microorganismos. Evidências

recentes sugerem que os glucanos insolúveis produzidos por estreptococos do grupo mutans têm sido uma das explicações para o desenvolvimento de cárie em crianças (MATTOS-GRANER *et al.*, 2000).

Portanto, a alta frequência de consumo de sacarose deve ser considerada fator de risco de cárie, quer seja pelo aspecto físico-químico da desmineralização superar a remineralização do esmalte devido às ciclagens de pH, como pela mudança bioquímica-microbiológica da placa dental formada. Nessas situações de risco de cárie, tem sido sugerida a associação de métodos de uso de flúor.

2.3. Associação de métodos de uso de flúor

Apesar do declínio de cárie, a manifestação dessa doença continua alta em alguns grupos de crianças consideradas de alto risco, que é determinada por vários fatores, por ser uma doença de origem multifatorial, como foi relatado. Nessas situações de alto risco, tem sido sugerida a associação de métodos de uso de flúor (ØGAARD *et al.*, 1994).

BEISWANGER *et al.* (1978) realizaram um estudo com o objetivo de verificar se a combinação de um dentifrício contendo Sn₂F-CPP e aplicação tópica profissional de flúor fosfato acidulado (ATF) poderia ter um efeito anticariogênico maior do que quando utilizados isoladamente. Foi realizado com um total de 2172 crianças entre 7 e 14 anos de idade, durante dois anos. A água de abastecimento apresentava 0,3 ppm F. Os voluntários foram divididos de acordo com o sexo, idade e CPO-S, e estratificados nos seguintes

tratamentos: 1) dentifrício com Sn₂F-CPP, 2) ATF, 3) ATF + dentifrício com Sn₂F-CPP. Os resultados mostraram que a combinação de ATF + dentifrício com Sn₂F-CPP diminuiu o número de novas lesões em 15-20% nos dentes erupcionados e em 25-30% nos dentes em erupção, sendo estatisticamente significativa. Concluíram que a combinação de métodos promoveu um benefício anticariogênico maior do que quando utilizados isoladamente.

Entretanto, MAINWARING & NAYLOR (1978) verificaram que a redução de cárie obtida pela combinação de métodos não foi estatisticamente significativa maior que o dentifrício fluoretado utilizado isoladamente. Para esse estudo clínico de 3 anos, participaram 1718 crianças de 11-12 anos, que receberam os seguintes tratamentos: 1) controle (dentifrício e gel sem flúor); 2) DF (0,8% de MFP); 3) ATF+DP; 4) ATF+DF e flúor fosfato acidulado na inibição de cárie em um estudo clínico. Em outro estudo clínico de 3 anos, do qual participaram 714 crianças de 14-15 anos, BLINKHORN *et al.* (1983) também observaram que não houve efeito adicional na combinação dos métodos de dentifrício fluoretado e 0,05% de fluoreto de sódio. Sugere-se que a combinação não apresenta maior eficácia que cada método utilizado isoladamente.

Por outro lado, em um estudo realizado por FEATHERSTONE *et al.* (1986), verificou-se a eficácia da associação de métodos. Foram fixados braquetes em pré-molares indicados para extração por razões ortodônticas para verificar a desmineralização. Os voluntários foram divididos em 4 grupos: 1) dentifrício fluoretado-DF (1000 ppm F como NaF), 2) DF+ bochecho com 0,05% NaF (uma vez por dia), 3) DF+ ATF (flúor fosfato acidulado 1,23% F, realizado uma vez por semana) e 4) DF+ bochecho+ ATF. Ao final de

quatro semanas, os dentes foram extraídos, seccionados e embutidos para realizar a microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente nas distâncias de 25, 40, 50, 75, até 300 μm . Os resultados mostraram que o grupo DF apresentou uma perda de volume mineral de apenas 5-15% até 75 μm ; DF+bochecho e DF+ ATF inibiu completamente a desmineralização, apresentando remineralização, sendo estatisticamente significativa até 75 μm em relação ao DF; DF+ bochecho+ ATF inibiu completamente a desmineralização e mostrou uma hipermineralização na distância 25 μm . Concluíram que uma freqüente aplicação de baixas concentrações de flúor é eficaz no controle do desenvolvimento de cárie, mesmo em situações com alto desafio cariogênico, porém a associação de métodos promoveu a inibição completa da desmineralização.

Em acréscimo, O'REILLY & FEATHERSTONE (1987) investigaram em um estudo similar, o efeito da associação de métodos em pacientes utilizando braquetes ortodônticos. Os pacientes foram divididos em 4 grupos (os mesmos citados acima). Observaram que o grupo DF apresentou 15% de desmineralização até 50 μm da superfície e que os outros grupos promoveram a remineralização e/ou inibiram a desmineralização. Concluíram que a associação de métodos pode promover uma proteção adicional na inibição da desmineralização.

Em outro estudo, com o objetivo de verificar o efeito de DF + bochecho de 0,05% F e DF + flúor fosfato acidulado (ATF) na formação de lesões de mancha branca durante o tratamento ortodôntico, GEIGER *et al.* (1988) verificaram que a aplicação diária de flúor 0,05% reduziu a incidência e a severidade das lesões de manchas brancas e que o

ATF mostrou apenas um pequeno benefício na redução de incidência de mancha branca. Por outro lado, em uma revisão, RIPA (1990) mostrou efeito na redução de cárie após aplicações tópicas profissionais. A redução do CPO-S, após aplicações tópicas de fluoreto de sódio, fluoreto estanhoso e flúor fosfato acidulado foi, respectivamente, na ordem de 29, 32 e 28%.

Em uma revisão, MARTHALER (1990) concluiu que tanto a alta frequência como a alta concentração de flúor resultam em aumento da eficácia da aplicação tópica. Em um dos estudos, os voluntários foram divididos em grupos: 1) dentifício placebo, 2) Dentifício (0,1%F)-DF, 3) Gel (1,25%F, aplicado em intervalos de seis meses), 4) Gel+DF. Os resultados mostraram, respectivamente, 8,27; 6,85; 7,10; 6,42 de incremento do CPO-S, ou seja, as reduções do DF, Gel e Gel +DF foram, respectivamente, de 17%, 14% e 22%. Concluiu-se que o efeito cariostático do dentifício foi independente se as crianças receberam ou não gel. Mesmo a maior redução observada na combinação de métodos, um grande benefício não foi observado, quando comparado ao forte efeito do método utilizado isoladamente.

O efeito do dentifício fluoretado também foi verificado em um estudo realizado na Finlândia, em que VEHKALATI *et al.* (1991) investigaram a saúde oral entre 1976-1986, e mostraram que crianças consideradas de alto e baixo risco receberam aplicações tópicas com a mesma frequência. Em ambos os grupos, a prevalência de cárie diminuiu em um período de 10 anos. Entretanto, de acordo com o autor, a maior contribuição para o declínio de cárie foi a presença dos dentifícios fluoretados.

O método de escolha utilizado no controle do desenvolvimento de cárie, deve ser aquele que permita a maior disponibilidade de flúor no ambiente oral. Com o objetivo de investigar a concentração de flúor na placa, saliva e no ducto salivar após aplicações de vários métodos tópicos, ZERO *et al.* (1992b) realizaram um estudo em que participaram 10 voluntários que ficaram dois dias sem escovação, e foram divididos em quatro tratamentos: dentifrício placebo (DP), dentifrício fluoretado-DF (0,24% NaF), bochecho de flúor (0,05% NaF), gel (1,1% NaF). Logo após, foi feita a coleta de saliva e placa em vários tempos até 24 horas após a aplicação. Os resultados mostraram que a concentração de flúor seguiu o mesmo padrão na saliva e na placa, com G>B>DF>DP. Após duas horas, a concentração de flúor apresentou na saliva: G>B>DF>DP, na placa G>DF; G, B, DF>DP, no ducto G>DF; G, B, DF>DP. Com isso, o método de liberação de flúor, a concentração e o tempo de aplicação (dia ou noite) são fatores importantes que influenciam o nível de flúor no ambiente oral.

ERONAT *et al.* (1993), comparando a incorporação de flúor de vários métodos tópicos, realizaram um estudo com aplicação de flúor fosfato acidulado (ATF) e neutro, Duraphat® e Flúor Protector®, em 60 dentes permanentes e 20 dentes decíduos. Utilizou a técnica de remoção por ácido, em 30 e 60 segundos. Todas as aplicações promoveram incorporação de flúor comparada com o controle, entretanto ATF e Duraphat® foram mais efetivos em incorporar flúor. Por outro lado, FEJERSKOV *et al.* (1981) sugeriram que a atividade iônica do flúor é mais eficaz na prevenção da dissolução do esmalte que a concentração de flúor no esmalte, o que justifica um estudo realizado por SEPPÄ & TOLONEN (1990), comparando a eficácia de aplicações de Duraphat® duas ou quatro

vezes ao ano, nenhuma diferença na prevenção de cárie em crianças de alto risco foi encontrada, nem mesmo naquelas com o CPO-S inicial mais alto.

Com objetivo de determinar, através de um estudo clínico de 3 anos, a eficácia da aplicação tópica profissional de flúor em intervalos de seis meses ou anualmente, JOHNSTON & LEWIS (1995) realizaram um estudo com crianças de 6-7 e 10-11 anos consideradas de alto risco de cárie. Além disso, verificaram se é necessária a realização da profilaxia prévia à aplicação tópica. Os resultados mostraram que nenhum dos dois efeitos, a presença ou ausência da profilaxia prévia, e bianual ou anual aplicação de gel, resultaram em uma redução significativa de cárie. Entretanto, de acordo com WEI & YIU (1993), em uma revisão do efeito anticárie do gel fluoretado, muitos estudos mostram uma correlação positiva entre a aplicação tópica de flúor e redução de cárie. Em um dos estudos a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (ATF), realizada duas vezes por ano, mostrou uma redução de cárie na ordem de 26,3%.

Para comparar o efeito da combinação de dentifício fluoretado e ATF no esmalte com lesões iniciais de cárie, foi provocada lesão de cárie em blocos de esmalte bovino, que foram submetidos a ciclagens de pH. Os blocos receberam os seguintes tratamentos: dentifício placebo (DP), dentifício fluoretado (DF), ATF+DP, ATF+DF. ATF foi realizado previamente às ciclagens. Os blocos foram tratados 4x por dia com dentifício durante 1 minuto. Entre os tratamentos, os blocos ficavam imersos em saliva humana. Para simular desafio cariogênico, os blocos ficaram imersos na solução desmineralizante durante 2 horas por dia. Os resultados sugeriram que o DF foi mais

eficiente que o DP em remineralizar a superfície do esmalte e a lesão de cárie, e um efeito aditivo do ATF+DF não foi observado. Concluindo que, apesar do tratamento com ATF depositar grande quantidade de flúor no esmalte, aplicações frequentes de flúor em baixas concentrações são mais importantes que uma única aplicação de alta concentração de flúor (PAES LEME *et al.*, 2002, *In press*).

Outro aspecto a ser considerado é se a aplicação tópica profissional de flúor está sendo indicada corretamente. De acordo com um simpósio realizado em 1992, o efeito da aplicação tópica profissional de flúor está bem documentado, entretanto questiona-se se está sendo utilizada de maneira seletiva e apropriada. Nesse contexto, os pacientes devem ser divididos em três categorias: baixo (sem atividade de cárie), moderado (alguma atividade de cárie) e alto risco (alta atividade de cárie). Aplicação tópica profissional de flúor deve ser usada em pacientes de risco moderado e alto risco. O flúor fosfato acidulado deve conter 1,23% F, pH 3,5 e aplicado durante 4 minutos. O fluoreto estanhoso deve conter 8% SnF₂. Ambos devem ser aplicados em intervalos de seis meses ou maior frequência é apropriada. Deve-se ter um cuidado especial em realizar aplicações tópicas em crianças menores de 6 anos de idade. Essas aplicações podem ser realizadas em conjunto com bochechos de flúor. O bochecho diário de 0,05% NaF tem mostrado eficácia e é recomendado a pacientes considerados de moderado e alto risco. Não é recomendado para crianças menores de 6 anos. Não há nenhum estudo comparativo entre a eficácia de aplicações diárias de flúor como bochechos com 0,05 % NaF e gel 1,1% NaF, entretanto, quando usados como teste, foram capazes de controlar o desenvolvimento de cárie e pacientes de alto risco. Aplicação semanal de 0,2% de NaF é eficaz em prevenir cárie,

entretanto não é recomendado em populações que ingerem água fluoretada. Conclui-se que o dentifício fluoretado deve ser utilizado por todas as pessoas e aplicações profissionais e bochechos devem ser corretamente indicados. Além disso, questiona a eficácia da aplicação profissional de flúor realizada em intervalos de seis meses e se é realmente capaz de controlar o desenvolvimento de lesões em pacientes de alto risco (BAWDEN, 1992).

Em acréscimo, ØGGARD *et al.* (1994) relatam que programas utilizados, como bochechos, têm sido substituídos pela aplicação tópica profissional de flúor (ATF) em indivíduos de alto risco. Comparando com a situação do passado, em que quase toda população apresentava lesões de cárie, hoje em dia, existe uma pequena porcentagem com alta prevalência de cárie. Aplicações tópicas de flúor devem ser utilizadas como suplemento ao dentifício fluoretado, principalmente em indivíduos de alto risco. Os agentes tópicos mais populares são solução ou gel de fluoreto de sódio a 2%, flúor fosfato acidulado 1,23% F, solução ou gel de fluoreto estanhoso a 8 - 10%F e solução ou gel de fluoreto de amina a 1,0-1,25%F e verniz fluoretado a 0,7-2,26%F. O flúor fosfato acidulado deve ser aplicado de seis em seis meses, e é o mais utilizado. O fluoreto estanhoso tem um efeito na acidogenicidade da placa, mais pela presença de estanho que do flúor, entretanto pode pigmentar o dente e apresenta um sabor desagradável. Apesar da variada concentração e pH desses agentes, a inibição de cárie parece similar. O método de escolha depende do custo, conveniência, aceitação do paciente e segurança. O uso diário de dentifícios fluoretados é sem dúvida o regime básico indicado para todas as pessoas, e a adição de métodos adicionais depende da condição individual.

ADAIR (1998) recomenda bochechos com flúor em pacientes com aumento ou alto risco de cárie, sendo que esses programas escolares devem ser utilizados somente em comunidades de alto índice de cárie. Os bochechos de flúor provaram a sua efetividade em controlar cárie em estudos clínicos, reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização do esmalte adjacente a bandas ortodônticas e braquetes.

VAN RIJKOM *et al.* (1998) realizaram uma meta-análise de estudos clínicos para investigar o efeito da aplicação tópica de flúor em gel na inibição de cárie em crianças de 6-15 anos de idade, e os estudos mostraram uma redução de cárie na ordem de 22%. As variáveis: regime de flúor, método de aplicação (moldeira e escova) e frequência (uma ou duas vezes por ano) não mostraram influência significativa. Concluíram que, do ponto de vista de custo e eficácia, a adição de aplicação tópica de gel em populações com baixo a moderado risco de cárie deve ser questionado.

Com o objetivo de investigar o tratamento realizado em crianças de alto risco, HAUSEN *et al.* (2000) realizaram um estudo com o objetivo de determinar se o tratamento realizado em crianças com baixa prevalência de cárie também poderia beneficiar crianças consideradas alto risco de cárie. Para esse estudo foram selecionadas crianças de alto e baixo risco. Para serem consideradas alto risco, deveriam apresentar uma dessas características: número de novas cavidades depois de um ano ≥ 2 ; média de fluxo salivar $\leq 0,7$ ml/min e score da capacidade tampão = 1; duas ou mais lesões de cárie na dentina; uma ou mais lesões de cárie na dentina na proximal dos incisivos; uma lesão de cárie na dentina e número de lactobacilos ≥ 3 e estreptococos do grupo mutans ≥ 2 ; número de lactobacilos

=4 e estreptococos do grupo mutans =3. Então os grupos foram divididos em 1) crianças alto risco que receberiam tratamento intensivo (HRI): aplicação de verniz de seis em seis meses, orientação da dieta, orientação de escovação, aplicação de gel de clorexidina-flúor em crianças com altos níveis de estreptococos do grupo mutans, escovação duas vezes por dia; 2) crianças alto risco que receberiam o mesmo tratamento das crianças de baixo risco (HRB) e crianças baixo risco (LRB): selantes uma vez por ano, princípios de higiene oral e dieta sem detalhá-las. Os resultados mostraram que, após três anos, houve incremento de CPO-S de 2,0; 4,4; 5,1 para respectivamente, crianças LRB, HRI e HRB. A pequena diferença existente entre grupos HRI e HRB mostra que as medidas de prevenção adotadas não mostraram benefícios adicionais, ou seja, se tivesse sido oferecida a todas as crianças a mesma prevenção básica, o mesmo efeito seria obtido, mas com menor esforço e custo.

Embora alguns estudos mostrem um benefício adicional quando se associam métodos de uso de flúor, outros estudos sugerem que a combinação não apresenta maior eficácia que cada método utilizado isoladamente. A importância da aplicação tópica profissional de flúor é baseada na formação de produtos na superfície, tipo fluoreto de cálcio, que funciona como reservatório para liberação de flúor durante os desafios cariogênicos (SAXEGAARD & RÖLLA, 1988).

Efeito físico-químico do flúor tópico no processo de cárie

De acordo com MARGOLIS & MORENO (1990), quando a superfície do esmalte está exposta ao flúor fosfato acidulado ou mesmo neutro, uma leve dissolução irá

ocorrer, com uma subsequente formação de precipitado tipo fluoreto de cálcio (“CaF₂”) na superfície.

O papel do “CaF₂” no mecanismo cariostático do flúor tem sido intensamente investigado. RÖLLA (1988) e RÖLLA & SAXEGAARD (1990) descreveram que nos primeiros estudos acreditava-se que o fluoreto de cálcio formado durante aplicações tópicas de flúor era benéfico, pois poderia proteger diretamente a superfície do esmalte ou fornecer íons livres de flúor para subsequente incorporação na estrutura da hidroxiapatita. Entretanto, outra fase de estudos sugeriu que o “CaF₂” era solúvel na saliva, que poderia ser rapidamente perdido na cavidade oral e que o efeito clínico do flúor estaria relacionado com apenas a formação de flúor fortemente ligado ao esmalte. Nesse período, muitos autores mostraram que ocorreria a perda de “CaF₂” durante 24 horas após a aplicação tópica. Atualmente, tem sido mostrado em vários laboratórios que o fluoreto de cálcio é estável na saliva em pH neutro, tendo fosfato e proteínas adsorvidos na superfície do cristal, diminuindo a sua dissolução. Baixo pH (< 5) provoca a perda do fosfato e dissolução do “CaF₂”. Os cristais de fluoreto de cálcio podem então servir como reservatório de flúor controlado pelo pH, no esmalte e na placa dental e liberar flúor durante os desafios cariogênicos. Sugere-se que o “CaF₂” é uma fase essencial que explica os mecanismos da aplicação tópica de flúor.

Em outro estudo, SAXEGAARD & RÖLLA (1988) estudaram a aquisição de flúor pelo esmalte humano, após aplicações de flúor *in vitro* em diferentes concentrações, intervalos de tempo e pH. O efeito do pré-tratamento do esmalte com Ca⁺⁺ e do ataque ácido também foi estudado. A quantidade de fluoreto de cálcio no esmalte aumentou com o

tempo, concentração da solução, decréscimo do pH e disponibilidade de cálcio. O tempo de exposição pareceu ser o principal fator. A quantidade de flúor fracamente ligado formada foi maior que o fortemente ligado, sendo que a quantidade de fluoreto de cálcio formada depende da disponibilidade de cálcio. Sugere-se que a quantidade de fluoreto de cálcio formada no esmalte pode proteger a superfície de esmalte e servir como reservatório de flúor.

WHITE & NANCOLAS (1990), em uma revisão, descreveram algumas considerações físicas e químicas do papel do flúor fracamente e fortemente ligado na prevenção de cárie. Pesquisas têm mostrado que a fluorapatita (FAP) é um produto de reação finita da fluoretação do esmalte/apatita com ou sem fluoreto de cálcio, sugerindo que o "CaF₂" sempre deve ser considerado como suplemento à formação da FAP. Tanto a FAP como "CaF₂" podem fornecer flúor para solução para ativar a remineralização e retardar a desmineralização da hidroxiapatita (HAP). A FAP fornece mais flúor em condições de baixo pH, enquanto o "CaF₂", em pH neutro e baixo. Além disso, a reatividade do flúor do esmalte hígido e cariado difere significativamente. O esmalte cariado adquire mais flúor e mais rápido, podendo agir como fonte de flúor em comparação com o esmalte hígido. A questão mais importante em relação à reatividade do flúor é em relação a ativar a remineralização ou retardar a desmineralização. Isso é influenciado não somente pelos produtos de reação, flúor fortemente ou fracamente ligado, mas também pela natureza do substrato e frequência de aplicação do agente tópico. Todos os fatores que influenciam a eficiência do método de fluoretação devem ser considerados na prevenção de cárie.

Com o objetivo de verificar o efeito do tempo de exposição na incorporação de flúor no esmalte humano, através de diferentes soluções aciduladas, CRUZ & RÖLLA (1992) realizaram um estudo *in vitro*. As variáveis foram diferentes intervalos de tempo e pH das soluções. O experimento foi realizado com dentes humanos expostos a soluções de NaF 2% em pH 3,5 e 5,5, por 30 segundos, 60 segundos, 5 minutos, 60 minutos. As quantidades de flúor fracamente e fortemente ligado foram determinadas. Os resultados mostraram que os dois níveis de pH causaram deposição de grande quantidade de fluoreto de cálcio e que a quantidade depositada aumentou com o tempo de exposição. O flúor fortemente ligado foi incorporado ao dente somente com 60 minutos de aplicação.

ten CATE (1997) realizou uma revisão baseada nos mecanismos do “CaF₂” na prevenção de cárie. Após tratamentos como aplicação tópica profissional, bochechos e dentífricos, os níveis salivares de flúor diminuem exponencialmente em poucas horas. Para que os tratamentos sejam eficazes por mais tempo, o flúor deve ser depositado e ser liberado em pequenas concentrações. O “CaF₂” funciona como reservatório de flúor e na presença de fosfato e proteínas em sua superfície, apresenta-se menos solúvel em condições *in vivo*. O flúor é liberado com a diminuição do pH, ativando a remineralização e inibindo a desmineralização durante os desafio cariogênicos.

TAKAGI *et al.* (2000) realizaram um estudo para investigar o efeito do flúor fortemente ligado na desmineralização do esmalte. Seções de esmalte foram imersas em solução remineralizante (SR) durante 5 dias e foram aleatoriamente divididos em três tratamentos: 1) grupo sem tratamento; 2) grupo ATF recebeu cinco ciclos de 4 minutos, seguidos por dois dias em SR; 3) grupo DCPD (fosfato dicálcico diidratado)+ATF cinco

ciclos de 4 minutos, seguidos por dois dias em SR. Após esses ciclos, o flúor fracamente ligado foi removido. Em seguida, foram submetidos a ciclagens de pH (6 horas de desmineralização e 18 horas de remineralização cada dia, durante 5 dias). A perda mineral foi analisada utilizando microrradiografia e os grupos 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, 91,2; 41,3; 21,2 de perda mineral. O mesmo foi realizado com dente de tubarão que apresenta alta concentração de flúor fortemente ligado e apresentou 4,4 de perda mineral. Os resultados mostraram um aumento na resistência do esmalte em desenvolver lesão com o aumento do flúor fortemente ligado. Além disso, esmalte de tubarão é muito mais resistente à desmineralização que o esmalte humano.

Para comparar a resistência da fluorapatita (esmalte de tubarão) e hidroxiapatita a desmineralização, foi realizado um estudo *in vivo*, em que voluntários utilizaram fragmentos de dente humano e de tubarão durante um mês. Os resultados mostraram que tanto o esmalte humano como o esmalte de tubarão (fluorapatita) apresentaram desmineralização. Foi observada uma limitada resistência à desmineralização pelo esmalte de tubarão, apesar da maior concentração de flúor no esmalte (ØGGARD *et al.*, 1988).

Em uma revisão, ØGGARD (2001) descreveu que, durante processos de cárie dental ou ciclagens de pH, o flúor em baixas concentrações pode incorporar-se no esmalte e estabilizar sua estrutura mineral. Em altas concentrações, o principal produto formado é o fluoreto de cálcio, que funciona como reserva de flúor que é liberado durante desafios cariogênicos, agindo nos processos de des e remineralização. Observaram que uma concentração de flúor de 300 ppm F (pH 7,2) e 100 ppm F (pH 5,0) inicia espontaneamente a formação de “CaF₂”. A dissolução desse composto é pH dependente. Esse mecanismo é

controlado por fosfato e proteínas que cobrem suas partículas estabilizando-as em pH neutro.

Como objetivo de investigar a influência da saliva na formação de CaF_2 no esmalte humano, LARSEN & RICHARDS (2001) realizaram um estudo *in vitro*. Metade dos dentes permaneceu durante 5 minutos em saliva humana e a outra metade em água destilada. Receberam os seguintes tratamentos: 1) água destilada (controle), 2) 0,2% NaF neutro, 3) 2% NaF neutro e 4) 2% NaF acidulado. Os resultados sugeriram que a quantidade de “ CaF_2 ” formada dependeu da concentração de flúor, da acidez da solução e da presença de saliva. Além disso, mais produto foi formado na presença de saliva.

HEBLING *et al.* (1995) avaliaram a aquisição de flúor na forma de fluoreto de cálcio após aplicação de ATF *in vitro*. Dois produtos na forma de gel apresentando concentrações semelhantes de íon flúor foram aplicados em três períodos experimentais de 1, 4, 60 minutos sobre superfícies hígidas de esmalte humano. Esse estudo demonstrou que a quantidade de fluoreto de cálcio formada na superfície do esmalte hígido aumentou com o tempo de aplicação, contudo entre períodos curtos (1 e 4 minutos), a diferença da concentração de fluoreto de cálcio não foi significativa.

Para avaliar se o tempo de aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (ATF) e neutro interferem na resistência de esmalte à desmineralização e incorporação de flúor DELBEM & CURY (2002, *In press*) realizaram um estudo em que foram utilizados 192 blocos de esmalte humano e 144 foram tratados com gel, acidulado ou neutro, durante um ou quatro minutos. Noventa e seis tratados com flúor e 24 controles foram submetidos a

alto desafio cariogênico (6 horas em solução desmineralizante e 18 horas em solução remineralizante) durante 10 dias. Os resultados mostraram que a concentração de flúor no esmalte foi maior nos blocos que receberam ATF. Os blocos que receberam ATF foram mais eficientes em reduzir a desmineralização do esmalte submetido ao desafio cariogênico que os blocos que receberam tratamento com gel neutro. O tempo de aplicação foi significativo em termos de incorporação de flúor, mas isso não levou à maior resistência à desmineralização.

Efeito antimicrobiano do flúor

O flúor pode inibir o metabolismo de muitos microrganismos *in vitro* (HAMILTON & BOWDEN, 1988), pode reduzir o transporte de açúcar, atividade glicolítica e tolerância ácida de muitas espécies gram-positivas (MARSH & BRADSHAW, 1990). Em áreas que apresentam diferentes níveis de flúor natural na água, não há diferença significativa na composição bacteriana na placa dental. Entretanto, aplicação tópica em altas concentrações de flúor tem mostrado efeito na composição bacteriana (BROWN *et al.*, 1983).

LOESCHE *et al.* (1973) estudaram o efeito do ATF em *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* em amostras de placa interproximal. Voluntários receberam 5-10 aplicações de ATF, durante duas semanas, com tempo de aplicação de 10 minutos. A análise microbiológica foi realizada antes, após 6 dias, 6 e 12 semanas após a aplicação de ATF. Seis dias após o tratamento, os níveis de *S. mutans* reduziram em aproximadamente

75% e permaneceram em níveis baixos, em no mínimo, 12 semanas; nenhum efeito foi observado nos níveis de *S. sanguis*. Concluíram que a aplicação de ATF pode ter um efeito antibacteriano nos *S. mutans*.

Em continuação a esse estudo, LOESCHE *et al.* (1975) realizaram um estudo para verificar o efeito do ATF em *S. mutans* e *S. sanguis* presentes na placa interproximal e oclusal. Voluntários receberam ATF em aplicações diárias durante duas semanas e foi feita a coleta da placa 1, 6 e 12 semanas após ATF. Os resultados mostraram uma redução de *S. mutans* na placa oclusal em 45-75%, 1, 6 e 12 semanas após ATF, mas não verificaram nenhum efeito na placa interproximal. Justificaram esse não-efeito devido a baixa porcentagem de *S. mutans* encontrada na placa interproximal antes do tratamento. Além disso, também não verificaram efeito na contagem de *S. sanguis*, exceto uma semana após a aplicação de ATF, as amostras interproximais apresentaram um aumento desses microrganismos. Os resultados sugerem que ATF pode ter efeito antimicrobiano em *S. mutans*.

Com o objetivo de verificar o efeito do flúor na estabilidade das comunidades bacterianas, MARSH & BRADSHAM (1990) realizaram um estudo *in vitro*. Nove espécies bacterianas relevantes em relação à saúde e doença foram utilizadas nesses estudos. Cresceram em um sistema fechado controlado até 14 gerações, permitindo a estabilização de cada espécie. Esse sistema tentou simular situações *in vivo*. No primeiro estudo, foram feitos pulsos de glicose 10 dias consecutivos, com ou sem controle do pH. Antes dos pulsos, a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus casei* era baixa, predominando outras espécies, como *S. sanguis*, *S. mitior*, *Bacteróides intermedius* e *Fusobacterium nucleatum*.

Após o pulso com controle de pH, *S. mutans* e *Lactobacillus casei* continuaram em baixa quantidade, ou sem controle do pH foram as espécies predominantes. Além disso, sem o controle do pH aumentou a espécie *Veilonella dispar*. Após voltar ao pH 7,0, os *S. mutans* e *Veilonella dispar* continuaram em alta quantidade, entretanto *Lactobacillus casei* diminuíram. No segundo estudo, adicionou-se flúor na concentração de 19 ppm durante os pulsos de glicose. Observou-se que o grupo que recebeu flúor mostrou uma diminuição de *S. mutans* e *S. sanguis*, entretanto *Lactobacillus casei* e *Veilonella dispar* não diminuíram. Concluíram que o flúor em baixas concentrações pode inibir a atividade glicolítica, reduzindo a queda de pH, e, com isso, impedir a seleção de espécies acidúricas e acidogênicas. Sendo assim, através desse mecanismo o flúor pode ter uma contribuição significativa na prevenção de cárie.

Em uma revisão, VAN LOVEREN (1990) descreveu que a produção de ácido é inibida pelo flúor. Entretanto, a importância clínica dessa inibição pode ser questionada e pode depender do tipo de aplicação. A produção de ácido pela placa formada na superfície do esmalte tratado com flúor será inibida, entretanto essa inibição é somente observada por um período de tempo pequeno. Portanto, aplicação tópica profissional de flúor realizada em intervalos de seis meses não tem papel importante na redução de cárie. Sendo assim, a importância clínica da inibição do metabolismo depois de uma única aplicação de flúor é irrelevante. A adaptação ao flúor pode reduzir o potencial cariogênico da placa dental, mas essa adaptação nunca foi demonstrada *in vivo*. A exposição da placa dental à água fluoretada e à dentifrícios não tem mostrado interferir na inibição da produção de ácido. Assim sendo, nenhum dado mostra até que ponto a acidogenicidade da placa dental é

afetada por aplicações diárias de flúor (dentifícios), programas semanais na escola ou aplicação profissional a cada seis meses.

Em um estudo, ZAHRADNIK *et al.* (1978) demonstraram que o pré-tratamento com ATF reduz a desmineralização do esmalte induzida pela colonização de *S. mutans*, mas não foi eficaz na redução da desmineralização em soluções de lactato. Em acréscimo, foi observado que quando fluoreto de cálcio foi removido pela extração de KOH, a proteção contra desmineralização induzida por microrganismos foi perdida. Então, sugere-se que o efeito do fluoreto de cálcio formado pelo tratamento com ATF é responsável pelo efeito no metabolismo microbiano, reduzindo a produção de ácido e a aderência desses microrganismos.

Em alguns estudos têm sido investigado a relação entre o flúor liberado de restaurações de ionômero de vidro e a inibição de estreptococos do grupo mutans. SVANBERG *et al.* (1990) realizaram coleta de placa dental na interproximal de dentes restaurados com ionômero de vidro e amálgama. Observou-se que a placa formada sobre restaurações de ionômero de vidro apresentou menor número de estreptococos do grupo mutans que a formada sobre amálgama. Sugerindo que restaurações de ionômero de vidro têm potencial para reduzir o desenvolvimento de cáries secundárias. Em um estudo similar, FORSS *et al.* (1991) compararam o crescimento bacteriano em restaurações de ionômero de vidro (RIV) e resina (RS). Foram cimentados braquetes em molares com esses dois materiais e permitiram o acúmulo de placa durante 14 dias. A placa foi coletada 14, 28 e 42 dias após a cimentação. Os resultados mostraram que em relação à RIV, houve um decréscimo da concentração de flúor (19985, 5788, 5019 ppm, respectivamente) e aumento

da contagem de estreptococos do grupo mutans em função dos dias de coleta. A concentração de flúor na placa formada sobre as RS foi de aproximadamente de 200 ppm durante todo estudo e a contagem de estreptococos do grupo mutans aumentou em função dos dias de coleta. Sugerem que a concentração de flúor na placa formada sobre RIV é maior que em RS e que pode afetar os níveis de estreptococos do grupo mutans na placa dental.

Nesse estudo, com o objetivo de estudar o efeito da aplicação tópica de flúor no esmalte em impedir a desmineralização, quando a bactéria é flúor-resistente, VAN LOVEREN *et al.* (1993) realizaram um estudo *in vitro*, utilizando blocos de esmalte bovino que receberam os seguintes tratamentos: 1) controle, 2) aplicação de verniz e 3) aplicação de verniz + remoção com KOH. Foi preparada uma placa artificial com cepas de estreptococos do grupo mutans e *S. sobrinus* resistentes e não resistentes ao flúor. Foi colocada na superfície do esmalte através de um tubo fechado a 37°C e, após 22 horas, a placa foi removida, sendo esse procedimento repetido quatro vezes. Na placa foram realizadas as análises de cálcio e ácido láctico, e no esmalte foi determinada a concentração de flúor. Os dois tratamentos (2 e 3) promoveram uma significativa proteção ao esmalte dental. Para os *S. mutans* a inibição da desmineralização não dependeu da sensibilidade das cepas e para *S. sobrinus* ocorreu redução da proteção à desmineralização pelas cepas resistentes. Somente no grupo 2 a quantidade de flúor inibiu o metabolismo bacteriano devido, possivelmente, à dissolução "CaF₂". Concluíram que a possível adaptação de *S. mutans* ao flúor não diminuiu, necessariamente, o efeito preventivo da aplicação tópica de flúor.

BENELLI *et al.* (1993) compararam a quantidade de flúor na placa dental formada na presença de ionômero de vidro ou compósito, avaliando o efeito do flúor liberado no crescimento da microbiota, incorporação de flúor e formação de cárie secundária através de um estudo *in situ*. Voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo quatro blocos de esmalte humano restaurados com ionômero ou compósito durante 28 dias. Os dispositivos foram imersos em solução de sacarose a 20%, 8x/dia. Os resultados mostraram uma maior concentração de flúor e menor quantidade de estreptococos do grupo mutans na placa formada sobre os blocos restaurados com ionômero e menor perda mineral nos mesmos. Concluíram que o cimento de ionômero de vidro apresenta um efeito anticariogênico e pode prevenir cárie secundária, mesmo em condições de alto desafio cariogênico.

Por outro lado, VAN DIJKEN *et al.* (1997) realizaram um estudo em que voluntários receberam restaurações classe III, de resina modificada por ionômero de vidro, compômero e resina composta. Um ano após as restaurações, foi feita a coleta de placa. Os resultados mostraram que foram encontrados baixos níveis de flúor em todas as amostras, enquanto na resina modificada por ionômero de vidro se apresentou em maior quantidade. A distribuição de estreptococos orais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, não diferiu entre as superfícies e não apresentou correlação com os níveis de flúor nas amostras. Concluíram que a concentração de flúor liberada *in vivo* após um ano não é alta suficientemente para afetar os níveis de bactérias como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos associadas a cárie.

Em 1999, IGNÁCIO *et al.* avaliaram o efeito de um dentifício contendo bicarbonato de sódio na contagem de estreptococos do grupo mutans, acidogenicidade e composição da placa dental. Voluntários escovaram os dentes 3x ao dia com formulações fluoretadas (1500 ppm F), contendo sílica, carbonato de cálcio ou carbonato de cálcio mais bicarbonato de sódio, dividido em 3 etapas de 30 dias. No 28º dia, 8 a 12 horas após a última escovação, foi realizada a contagem de estreptococos de grupo mutans na saliva. No 30º dia (após dois dias, nos quais os voluntários bochecharam 3x ao dia uma suspensão do dentifício e 6x ao dia sacarose a 10%), analisou-se a placa dental após 10 a 12 horas do último bochecho de dentifício. Os resultados demonstraram que, embora o dentifício contendo bicarbonato de sódio tenha apresentado, coletivamente, uma tendência a influenciar positivamente nos diversos fatores relacionados à cárie dental, como contagem de estreptococos do grupo mutans, acidogenicidade da placa na presença de desafio cariogênico, concentração de flúor e polissacarídeo insolúvel na placa, não diferiu dos dentifícios contendo carbonato de cálcio ou sílica como abrasivo.

Com o objetivo de investigar o efeito antimicrobiano de bochechos fluoretados em estreptococos do grupo mutans (SM) e lactobacilos (LB), YOSHIHARA *et al.* (2001) realizaram um estudo com 414 escolares de 7, 10 e 12 anos. Dentre estes, 243 receberam bochechos fluoretados desde 5 anos de idade e o restante não recebeu. Os níveis de SM e LB foram medidos utilizando Dentocult SM Strip e Dentocult LB, respectivamente. Os resultados mostraram uma diferença na média de CPO-D entre os dois grupos em todas as idades. Crianças que utilizaram flúor apresentaram menores níveis de SM, entretanto, não

houve relação entre bochecho de flúor e níveis de LB. Concluíram que o bochecho com flúor pode contribuir para a redução dos níveis de SM.

Em uma revisão, VAN LOVEREN (2001) descreveu que há muitos mecanismos em que o flúor pode interferir no metabolismo bacteriano e na acidogenicidade da placa dental. A atividade antimicrobiana do flúor é aumentada quando o flúor está associado com cátions como Sn^{2+} e amina. Muitos estudos mostram que o flúor inibe a enolase e a translocação de prótons pela ATPase. Por outro lado, há dúvida se essa inibição ocorre *in vivo*. Além disso, sugere-se que o Al^{3+} pode ser necessário nessa inibição. Outra alternativa para inibir o metabolismo de carboidratos na presença de flúor é a acidificação do citoplasma, sendo que a enolase e outras enzimas são sensíveis à acidificação do citoplasma. Enquanto em um experimento *in vitro* 19 ppm F foram suficientes para prevenir o crescimento de estreptococos do grupo mutans, *in vivo* somente altas concentrações de flúor reduzem o número desses microrganismos. Em acréscimo, atenção tem sido dada a outras bactérias além dos estreptococos do grupo mutans que são encontradas em uma placa cariogênica. Foi demonstrado (VAN STRIJP *et al.*, 1997) em um estudo *in situ* que a desmineralização da dentina ocorreu mesmo com estreptococos do grupo mutans suprimidos pela clorexidina. Conclui-se que é necessário uma melhor avaliação da atividade antimicrobiana do flúor e sua importância *in vivo*. Em acréscimo, um modelo de desmineralização e remineralização deve ser desenvolvido para promover uma maior relação entre estudos *in vitro* e *in vivo*.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito anticariogênico da associação da aplicação tópica profissional de flúor e dentifício fluoretado quando o desafio cariogênico é aumentado pela frequência de exposição à sacarose e verificar:

* No esmalte:

- a porcentagem de perda de dureza de superfície;
- a extensão da lesão de cárie através da microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente;
- a concentração de flúor.

* Na placa dental:

- a concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo insolúvel em água;
- a porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos

totais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo *in situ* foi do tipo cruzado, duplo cego, dividido em 4 fases de 14 dias, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (ANEXO 1). O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da associação de métodos de uso de flúor quando o desafio cariogênico é aumentado pela frequência de exposição à sacarose. Esse estudo foi casualizado em blocos (voluntário) com arranjo fatorial em níveis de tratamento e frequência de sacarose. As variáveis de resposta foram porcentagem de perda de dureza de superfície, extensão da lesão de cárie através da microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente e concentração de flúor no esmalte e análise bioquímica e microbiológica na placa dental.

Participaram dezesseis voluntários utilizando dispositivos palatinos contendo quatro blocos de esmalte bovino hígidos e foram divididos aleatoriamente em quatro tratamentos: dentifício placebo de flúor (controle negativo), dentifício fluoretado (DF), aplicação tópica profissional de flúor (ATF) + dentifício placebo (DP) e ATF + DF. Os blocos de esmalte alojados nos dispositivos com dureza de superfície conhecida foram casualizados de acordo com os tratamentos. Foi realizado um pré-tratamento com ATF nos blocos de esmalte, e dentifício fluoretado, ou não, foi utilizado diariamente durante o

experimento, de acordo com o delineamento feito. Em acréscimo, os voluntários gotejaram sobre os blocos uma suspensão de dentífrico (1:3) no ato da escovação. Solução de sacarose a 20% foi gotejada quatro vezes ao dia em dois dos quatro blocos e oito vezes ao dia, nos outros dois blocos para simular o desafio cariogênico. Foi feito um intervalo de 10 dias entre os tratamentos para eliminar possível efeito residual dos mesmos. Ao final de cada fase de 14 dias, os blocos foram removidos dos dispositivos e avaliada no esmalte a porcentagem de perda de dureza de superfície expresso em número de dureza Knoop, extensão da lesão de cárie através da microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente expresso em porcentagem de volume mineral x distância da superfície e área de perda mineral na lesão de cárie e concentração de flúor expresso em ppm F. Na placa dental foi avaliado as concentrações de flúor ($\mu\text{g/g}$), cálcio (mg/g), fósforo (mg/g) e polissacarídeo insolúvel (mg/g), estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans expresso em UFC/g e porcentagem de estreptococos do grupo mutans.

4.2 MATERIAIS

4.2.1 – Dentes bovinos

Para este estudo foram utilizados 400 dentes incisivos bovinos, obtidos junto ao frigorífico Angelelli (Santa Terezinha-Piracicaba, SP). Foi escolhido o dente bovino por apresentar composição e resposta a desafios cariogênicos mais uniformes e por apresentar um esmalte com menor curvatura, quando comparado ao dente humano. O dente humano apresenta influências genéticas, das condições do ambiente e da idade na sua composição. Em acréscimo, o esmalte bovino é mais poroso que o humano, resultando em uma resposta

mais rápida frente a um processo de desmineralização. Por outro lado, o dente bovino e humano apresentam diferenças quantitativas e não qualitativas. Por essas razões, o dente bovino é considerado uma alternativa aceitável e pode oferecer vantagens para estudos *in situ* pela diminuição do tempo e da variabilidade de resposta do substrato ao modelo adotado (MELLBERG, 1992; ZERO,1995).

Os dentes bovinos foram submetidos à remoção de restos teciduais por raspagem e armazenados à temperatura ambiente em formol 2% pH 7,0 durante 30 dias para desinfecção antes de qualquer procedimento experimental (CURY *et al.*, 1997; 2000; 2001a,b). Após desinfecção, os dentes foram seccionados, polidos, e a microdureza inicial de superfície foi determinada objetivando a seleção dos dentes e posterior comparação após os tratamentos. Depois deste procedimento, foram selecionados 320 blocos (4 x 4 x 2 mm) de esmalte bovino.

4.2.2 – Dentifrícios

Os dentifrícios utilizados no estudo foram preparados pela Kolynos do Brasil (São Bernardo do Campo, SP) seguindo as orientações do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP. As formulações experimentais preparadas continham 1100 ppm F (p/p), como NaF, e sílica como abrasivo. Dentifrício placebo de flúor (DP) foi preparado para ser utilizado durante o período pré-experimental e no intervalo entre as fases, para ser utilizado como controle negativo e para eliminar efeitos residuais dos tratamentos.

O tubo do dentifrício foi identificado com uma fita adesiva colorida. Os tratamentos DP, DF, DP+ATF e DF+ATF apresentavam, respectivamente, cor vermelha, azul, verde e rosa.

4.3. MÉTODOS

4.3.1 – Preparo dos blocos de esmalte dental bovino

Para a obtenção dos blocos de esmalte bovino foi utilizada cortadeira elétrica (Buehler-Isomet), discos diamantados de dupla face (Buehler® Diamond Wafering Blade nº 11-4243 da série 15 HC). Após a secção da porção radicular, as coroas dentais foram fixadas com cera pegajosa (Kerr®) em placas acrílicas para secção da porção palatina da coroa. Utilizou-se o mesmo disco descrito acima. Em seguida, a porção vestibular da coroa foi novamente fixada à placa de acrílico para remoção da fatia central do esmalte utilizando dois discos, separados por um espaçador de 4 mm. Realizado o corte no sentido longitudinal, a placa de acrílico foi reposicionada no suporte da cortadeira para realização do corte no sentido transversal. Os cortes foram feitos sob refrigeração com água destilada e deionizada (dd) para evitar trincas no esmalte.

Para obtenção de um bloco de esmalte de 2 mm de altura e com maior área possível de esmalte plano, foi necessária a planificação da porção dentinária. Para tal a maior área de esmalte plano foi fixado com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3 cm x 8 mm). A dentina foi planificada utilizando-se lixa de

granulação 320 (Carbimet[®] Paper Discs – nº 30-5108-320 Buelher[®]) e politriz APL-4 Arotec[®]. A espessura do bloco foi verificada utilizando-se uma régua milimetrada.

Após a planificação da dentina, o bloco foi removido e, a seguir, foi fixado novamente no centro do disco, com a superfície da dentina voltada para o acrílico, onde foi feito um desgaste e polimento para obter uma superfície plana, paralela à base do acrílico, necessária para realização da microdureza de superfície. Para tal, utilizou-se na politriz, lixa de granulação 600 (Carbimet[®] Paper Discs - nº 30-5108-600-10 Buelher[®]) com refrigeração com água. Após o polimento com a lixa 600, os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som (T7, Thornton[®]), em água dd durante dois minutos, com o objetivo de remover as partículas de lixa para não prejudicar o polimento seguinte, que será realizado com uma lixa de menor granulação. A seguir, colocou-se na politriz lixa de granulação 1200 (Microcut - nº 30-5538-012-100 Buelher[®]). Novamente os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som, imersos em água dd durante dois minutos. Para o polimento final, foi utilizado na politriz disco de papel feltro (Polishing Cloth Buelher[®] nº 40-7618) e suspensão de diamante (Metadi[®] Diamond Suspension um micron – Blue Color Polish Spray – Water Base nº 40-6530). Nessa fase não foi utilizada água dd para refrigeração, apenas uma quantidade de solução suficiente para umedecer totalmente o papel feltro. Em seguida, os blocos foram lavados em água dd corrente, durante três minutos. Os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som, durante dois minutos, imersos na solução (Ultramet[®] Sonic Cleaning Solution) diluída na proporção 20:1 em água dd. Finalmente, os blocos foram lavados em água dd corrente durante três minutos e armazenados em recipientes plásticos fechados, cobertos com

papel absorvente umedecido com água dd e conservados em geladeira a 4°C até ser realizada a análise de microdureza de superfície.

4.3.2. - Seleção dos blocos e determinação de microdureza inicial de superfície do esmalte

Previamente à determinação de microdureza de superfície, realizava-se uma inspeção em toda superfície dos blocos para descartar aqueles que apresentavam trincas. Na parte central do bloco foram realizadas 5 impressões, separadas entre si por uma distância de 100 µm, como mostra o diagrama apresentado na figura 1.

Para essa análise foi utilizado o microdurômetro Future-Tech FM (Future-Tech Corp., Tóquio, Japão) acoplado a um software FM-ARS (Future-Tech Corp.), e penetrador tipo KNOOP com carga estática de 50 gramas e tempo de cinco segundos.

A microdureza de superfície foi utilizada para selecionar os blocos dentais e para avaliar lesões iniciais de cárie (WHITE, 1987; ZERO *et al.*, 1992a; ZERO, 1995) através da porcentagem de perda de dureza de superfície, pois estudos mostram que o conteúdo mineral apresenta correlação linear com o comprimento ou penetração das impressões (ARENDS *et al.*, 1980; KOULOURIDES & HOUSCH, 1983). Além disso, WHITE (1987) mostrou uma boa correlação (0,94) entre as mudanças observadas na dureza durante a remineralização através da microdureza de superfície e pela microrradiografia.

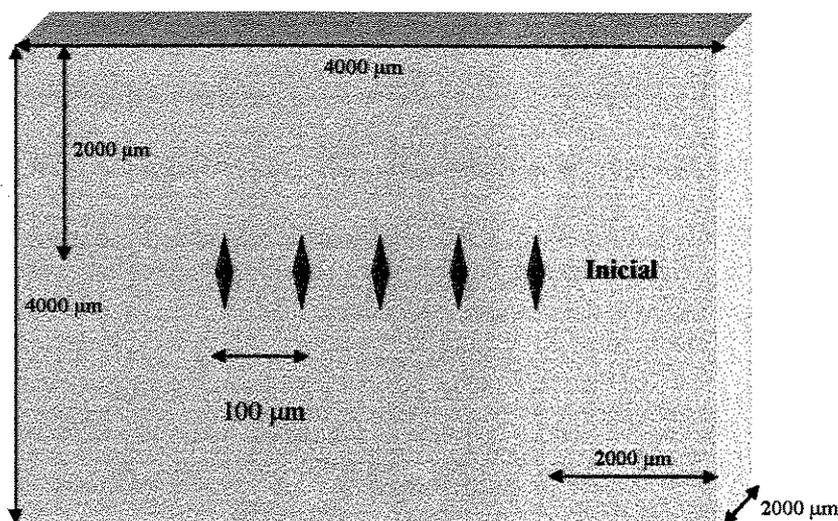


Figura 1: Representação esquemática das impressões que foram realizadas para seleção e determinação da dureza inicial de superfície.

Essa análise foi realizada previamente à colocação dos blocos de esmalte no dispositivo intra-oral, sendo selecionados 320 blocos com dureza de $360,5 \pm 24,0$ KHN (Número de Dureza Knoop). Esses blocos foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 160 blocos cada, usando o método de loteria, sendo que um grupo receberia ATF, e outro grupo não. Esses dois grupos não apresentaram diferença estatística, cujas médias \pm dp foram, respectivamente, $358,6 \pm 24,4$ e $362,7 \pm 23,3$ ($p= 0,1503$). Esses 160 blocos foram novamente divididos pelo mesmo processo, em 3 grupos. As médias dos grupos (ATF= $356,0 \pm 27,1$; ATF+DP= $360,3 \pm 20,1$; ATF+DF= $360,9 \pm 14,4$) e (hígido= $354,8 \pm 23,5$; DP= $363,5 \pm 16,9$; DF= $364,8 \pm 14,7$) não foram estatisticamente significantes, $p=0,7017$ e $0,3392$, respectivamente. As médias da dureza de cada tratamento (DP= $363,5 \pm 16,9$; DF= $364,8 \pm 14,7$; ATF+DP= $360,3 \pm 20,1$; ATF+DF= $360,9 \pm 14,4$) não apresentaram

diferença estatística ($p=0,5440$). Em cada tratamento, os blocos dentais foram divididos em frequências de exposição à sacarose 4x e 8x/dia, cujas médias não apresentaram diferença estatística dentro do mesmo tratamento DP, DF, ATF+DP, ATF+DF, apresentando, respectivamente, $p=0,2725$; $0,9816$; $0,1432$ e $0,2142$. Com isso, o processo de casualização realizado produziu unidades experimentais similares.

4.3.3 - Fase clínica

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (ANEXO 1), dezesseis voluntários adultos (23-31 anos) foram selecionados para participarem desta pesquisa. Todos os voluntários eram residentes em Piracicaba, cidade que apresenta regularidade na fluoretação da água (0,6 - 0,8 ppm F). Os critérios de seleção de voluntários foram: 1) apresentar bom estado de saúde geral e oral; 2) não ter tomado antibióticos nos últimos dois meses, pois afetam a microbiota oral e, com isso, a resposta ao modelo adotado; 3) não serem fumantes; 4) não ter tomado medicamentos que afetam o fluxo salivar (ZERO, 1995).

Atendendo a considerações éticas, os voluntários poderiam apresentar consentimento ou não, antes ou durante a pesquisa. Sendo assim, antecedendo a fase experimental, foi realizada uma reunião com a participação de todos os voluntários e a pesquisadora, na qual foi apresentado o projeto de pesquisa, seus objetivos e o delineamento experimental.

Todas as recomendações e informações sobre os procedimentos a serem realizados durante o experimento, bem como o cronograma das atividades foram impressos e entregues a cada um dos voluntários (ANEXO 2). Atendendo a Resolução Nº 196 de 10/03/1996 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, Brasília, DF, os voluntários assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 3).

Os voluntários receberam recomendações e orientações por escrito: a) utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir; b) remover o dispositivo intra-oral durante as refeições ou consumo de qualquer bebida ácida, que pode levar a desmineralização (FUSHIDA & CURY, 1999) para padronizar o desafio cariogênico, ou chá preto que pode conter flúor (HAIACIBARA *et al.*, submetido¹). Porém, ao removê-lo da boca devem conservá-lo dentro do recipiente fornecido com algodão umedecido, com o objetivo de manter as bactérias da placa viáveis e impedir o ressecamento dos blocos; c) durante o experimento utilizar apenas o dentífrício fornecido pela pesquisadora; d) não utilizar substâncias fluoretadas ou antimicrobianas.

Os voluntários foram orientados a não escovar os dispositivos na região em que estavam localizados os blocos, ou seja, deveriam escovar apenas a superfície que ficava em contato com o palato e quando fossem enxaguar não deveriam colocá-los diretamente embaixo da água.

¹ HAIACIBARA, M.F. *et al.*. Estimated intake of fluoride and aluminium from teas and herbal teas. Submetido à revista *Community Dental Oral Epidemiology* em 29/11/2000.

Os voluntários receberam um estojo que continha uma escova de dente macia, um dentífrico, um frasco com solução da sacarose a 20% e um recipiente com algodão umedecido, onde os voluntários conservariam o dispositivo durante as refeições.

Após informações e assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pesquisa clínica em seres humanos, iniciou-se a fase clínica experimental. Os voluntários foram divididos aleatoriamente em quatro grupos.

4.3.3 - 1. Preparo do dispositivo intra-oral palatino

Os dispositivos intra-orais palatinos foram confeccionados em resina acrílica autopolimerizável a partir do molde da arcada superior dos voluntários. Cada dispositivo continha quatro cavidades de 4 x 4 x 3 mm localizadas na região dos molares, sendo duas de cada lado, que serviram para a fixação dos blocos de esmalte bovino com cera pegajosa. Telas plásticas foram sobrepostas individualmente em cada cavidade com resina acrílica, deixando um espaço de 1 mm entre a tela e a superfície do esmalte para o acúmulo de placa. Foram utilizadas resinas acrílicas incolor e vermelha para fixar as telas plásticas, onde os blocos receberiam, respectivamente, solução de sacarose 4x e 8x ao dia.

No início de cada fase, todos os voluntários receberam o dispositivo intra-oral contendo os quatro blocos de esmalte. As telas plásticas foram sobrepostas 30 minutos após os dispositivos serem colocados na boca, pois a ATF deveria ser realizada sem a tela sobre os blocos. Com isso padronizou-se a sua colocação após 30 minutos para todos os voluntários, independente do tratamento.

A tela plástica facilita o acúmulo de placa e altera a difusão de íons para a superfície do esmalte. Com isso, ocorre um alto desafio cariogênico, pelo aumento da massa bacteriana e pela alteração das características de difusão dos constituintes salivares, que não são capazes de alcançar as camadas mais profundas da placa em contato com a superfície do esmalte. De acordo com ZERO (1995), esse modelo reproduz a condição existente nas áreas interproximais e fissuras.

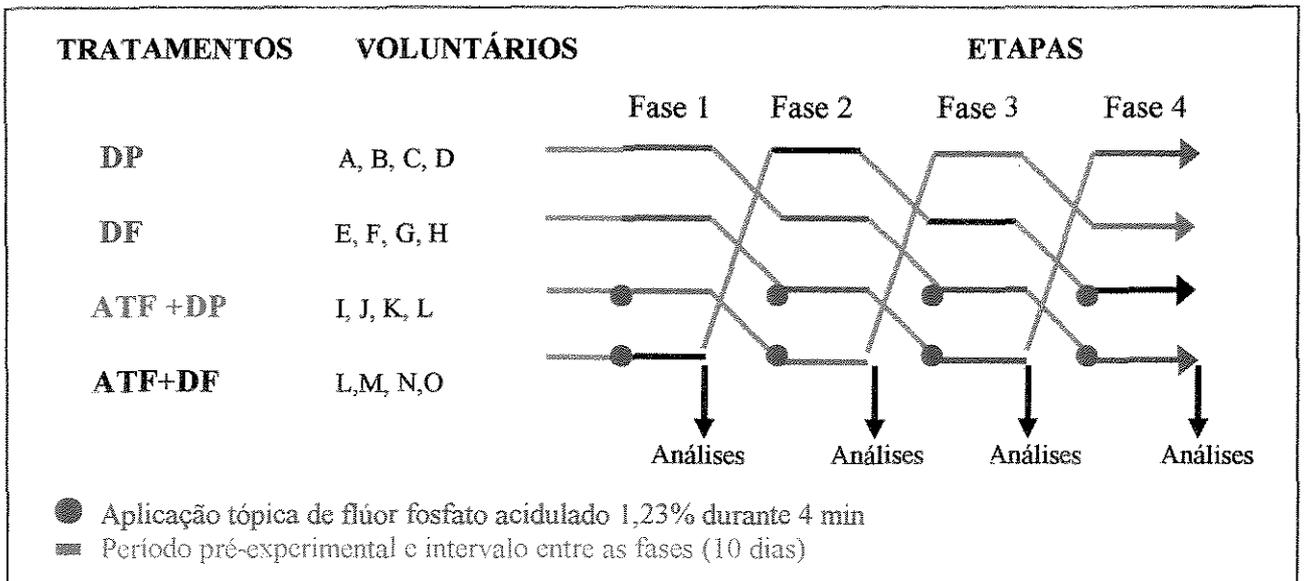
4.3.3 - 2. Fase Experimental

Dez dias antes do experimento, os voluntários começaram a usar dentifício não fluoretado com a mesma composição do dentifício placebo utilizado durante o experimento e preparado especialmente para pesquisa pela Kolynos do Brasil. No Laboratório de Bioquímica Oral foi determinada a concentração de flúor solúvel total no dentifício placebo ($<10,0$ ppm F), no dentifício fluoretado ($1149,3 \pm 9,8$ ppm F) e no gel ($13507,0 \pm 29,6$ ppm F).

Dezesseis voluntários foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de tratamentos de 14 dias cada, os quais utilizaram dispositivos intra-orais palatinos contendo 4 blocos de esmalte. Os voluntários receberam os seguintes tratamentos:

- **Tratamento 1:** Dentifício placebo (DP)
- **Tratamento 2:** Dentifício fluoretado (DF)
- **Tratamento 3:** Aplicação tópica profissional de flúor + dentifício placebo (ATF+DP)
- **Tratamento 4:** Aplicação tópica profissional de flúor + dentifício fluoretado (ATF+DF)

Considerando o delineamento cruzado deste estudo foi estabelecido um intervalo de 10 dias entre os tratamentos, para eliminar o possível efeito residual dos mesmos. Ao final do experimento todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos, de acordo com o fluxograma abaixo:



❖ TRATAMENTO COM ATF

A aplicação tópica profissional de flúor foi realizada após prévia secagem das superfícies dentárias do voluntário e do dispositivo. Os voluntários apenas escovaram os dentes com dentifício placebo previamente à aplicação, e não foi feita profilaxia (RIPA *et al.*, 1984; ØGGARD *et al.*, 1994). O gel flúor fosfato acidulado (gel Dentisply® 1,23% F, como fluoreto de sódio e ácido fluorídrico, em 0,1 M de ácido fosfórico, pH 3,6-3,9) foi distribuído em moldeiras descartáveis. O gel foi colocado sobre os blocos de esmalte alojados no dispositivo fora da boca. Em seguida, o dispositivo e as moldeiras foram colocados intra-oralmente. Após 4 minutos, as moldeiras e o dispositivo foram retirados, o

paciente expeliu o excesso de gel por 30 segundos (LECOMPTE, 1987). O voluntário permanecia com o dispositivo durante 30 minutos até a colocação da tela plástica para simular o efeito residual na saliva. Nesse período, foram orientados para não ingerirem nenhum alimento ou beber água (STOOKEY *et al.*, 1986; WEI & YIU, 1993). Ao finalizar esse procedimento, o dispositivo intrabucal era utilizado por 14 dias.

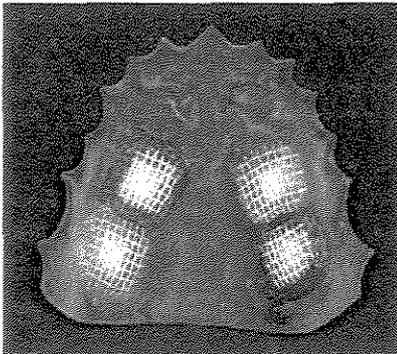
Ao final de todas as fases foi realizada uma fase extra, em que os voluntários receberam ATF durante 4 minutos, da mesma forma descrita acima, e permaneceram com o dispositivo durante 30 minutos. Após esse tempo, o dispositivo foi retirado da boca, os blocos foram removidos e armazenados em ambiente úmido para posterior análise da concentração de flúor no esmalte. Esse procedimento teve o objetivo de analisar a concentração de flúor no esmalte após o período de 30 minutos, que foi o tempo que o dispositivo permaneceu sem tela plástica para simular o efeito do flúor residual na saliva.

❖ *TRATAMENTO COM DENTIFRÍCIO*

Todos os voluntários gotejaram sobre os blocos uma suspensão de dentifrício 1:3, fluoretado (1100 ppm F) ou não (de acordo com o tratamento), três vezes ao dia no ato da escovação, sendo que, após a escovação, o dispositivo foi colocado intra-oralmente sem enxágüe. A suspensão de dentifrício apresenta-se com uma diluição semelhante à que ocorre na boca durante a escovação (FEATHERSTONE *et al.*, 1986; WHITE, 1987; PAES LEME *et al.*, 2002. *In press*).

❖ **SOLUÇÃO DE SACAROSE A 20%**

Os voluntários também foram instruídos para gotejarem uma solução de sacarose a 20% 4x e 8x ao dia nos blocos localizados em posição cruzada, esperando 5 minutos para recolocar o dispositivo na boca (FIG. 2). O gotejamento 4x ao dia foi às 8:00, 11:00, 15:30, 19:00 e 8x ao dia foi às 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00, 21:00.



- Gotejar sacarose 20% 4 x ao dia
- Gotejar sacarose 20% 8x ao dia

Figura 2: Dispositivo intra-oral com regiões específicas para gotejar sacarose 4x e 8x ao dia.

O voluntário foi orientado para colocar cada gota da solução exatamente na superfície da tela plástica do bloco, sem tocá-la e sem deixar escorrer para o lado. O recipiente fornecido deveria conter algodão para manter o dispositivo, durante os 5 minutos antes de levá-lo à boca, com os blocos posicionados para cima, garantindo a não difusão da solução para outro bloco.

4.3.4 – Análises

Ao final dos 14 dias, 10 horas após a última exposição à sacarose, as telas plásticas que recobriram os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi nº 15, e então com uma espátula plástica de ponta fina foi coletada a placa dental formada sobre os blocos de esmalte, posicionados cruzados. Os blocos antes de serem removidos dos dispositivos, foram limpos com escova, dentífrico não fluoretado e água dd. A seguir, os blocos foram fixados nos discos de acrílico, mantidos em ambiente úmido, em frascos plásticos e conservados em geladeira até as análises.

4.3.4 – 1. Determinação da Porcentagem de Perda de Dureza de Superfície (%PDS)

Após cada fase foi feita novamente a determinação de dureza de superfície como realizada inicialmente, cinco impressões abaixo (100 µm) e cinco acima (100 µm) das iniciais (FIG. 3) para determinar a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), através da fórmula:

$$\% \text{ PDS} = \frac{\text{Dureza após o tratamento} - \text{Dureza inicial}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$

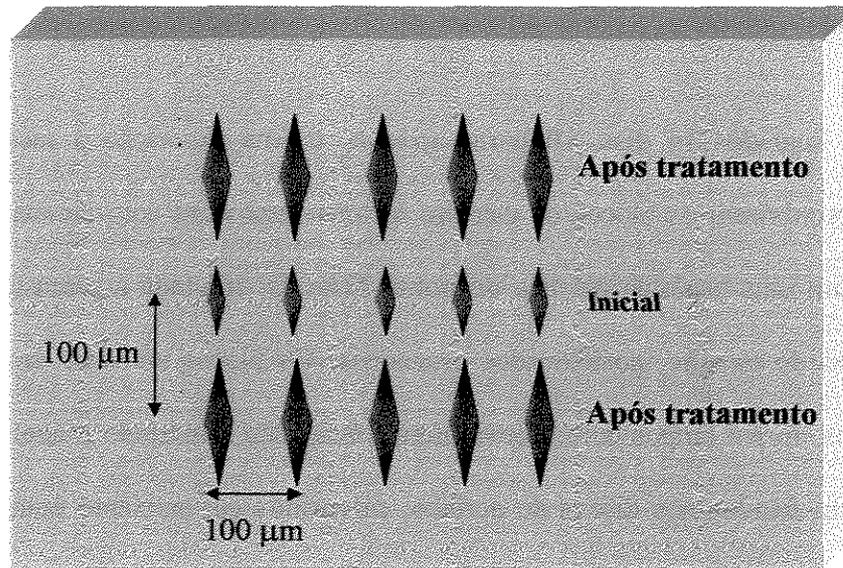


Figura. 3: Representação esquemática das impressões que foram realizadas após cada fase.

Cada dispositivo continha quatro blocos, sendo que em dois foi gotejado sacarose a 20% 4x ao dia e nos outros dois, 8x ao dia. Como a unidade experimental é o voluntário, calculou-se a % PDS de cada bloco e foi feita uma média dos dois blocos da mesma frequência de exposição à sacarose para apresentação dos resultados.

4.3.4 – 2. Determinação da Dureza do Esmalte Seccionado Longitudinalmente

Para a análise do efeito dos tratamentos em termos de desmineralização sub-superficial do esmalte, todos os blocos foram seccionados por corte longitudinal utilizando-se disco diamantado acoplado à cortadeira elétrica. Em uma metade de cada bloco foi determinada a dureza para análise do perfil da lesão de cárie, e a outra metade foi destinada à análise da concentração de flúor no esmalte. Após a secção, os hemiblocos foram embutidos (embutidora Arotec Pre 30[®]) com resina acrílica incolor Clássico[®], ficando a parte seccionada exposta. Para possibilitar a análise da lesão de cárie, a superfície

seccionada do esmalte foi lixada e polida com lixas de granulação 320, 600, 1200 e feltro com suspensão de um micron, semelhante ao polimento de superfície, e em seguida a microdureza foi determinada. As impressões foram realizadas no centro do bloco, às distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 μm da superfície anatômica do esmalte. Mais duas séries de impressões foram repetidas 100 μm acima e 100 μm abaixo (FIG. 4). Todas as impressões foram feitas utilizando-se carga de 25 gramas e tempo de 5 segundos. As médias das durezas nas três posições de cada hemibloco foram calculadas a cada distância da superfície do esmalte.

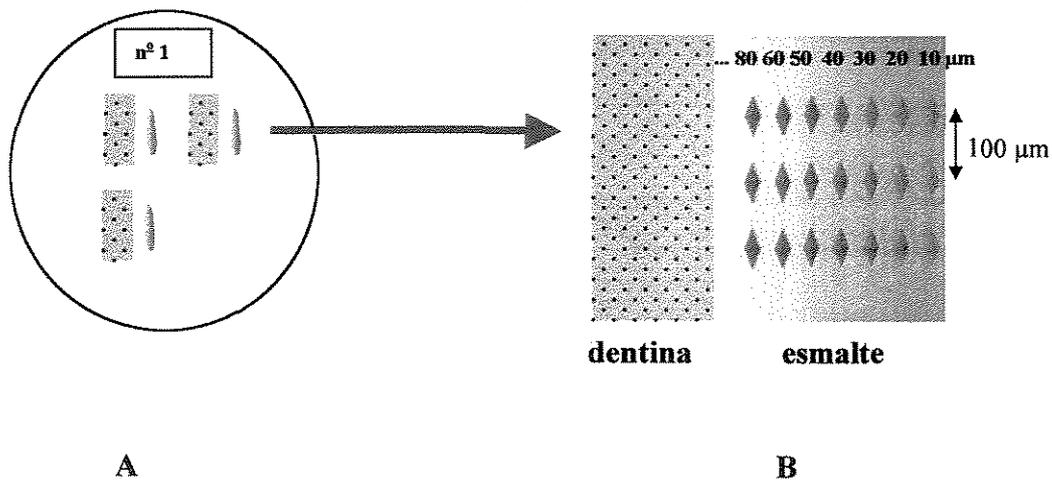


Figura. 4: A- Diagrama de um corpo de prova mostrando como foram embutidos os blocos após serem seccionados. B- Esquema das impressões que foram realizadas no bloco de esmalte.

A análise de microdureza do esmalte em secção longitudinal foi usada, pois existe uma boa correlação (0,91) entre microdureza do esmalte e porcentagem de mineral

determinado pela microrradiografia nas lesões de cárie (FEATHERSTONE *et al.*, 1983). Dessa forma, o número de dureza KNOOP pode ser convertido em % de volume mineral ($\% \text{ de vol. mineral} = 4,3 (\text{KHN})^{1/2} + 11,3$). Através do cálculo da % de vol. mineral x μm encontra-se a área integrada. É possível determinar a área integrada do esmalte hígido através de projeção da % volume mineral do esmalte normal, que é considerado por WHITE & FEATHERSTONE (1987), sendo 85% de volume mineral. A diferença entre a área integrada de determinado grupo de tratamento e área integrada do esmalte normal é o valor da perda mineral (ΔZ) como mostra a figura 5. Os resultados da microdureza do esmalte em secção longitudinal deste estudo serão apresentados em % de volume de mineral em função da distância da superfície (μm) e em perda mineral através do ΔZ .

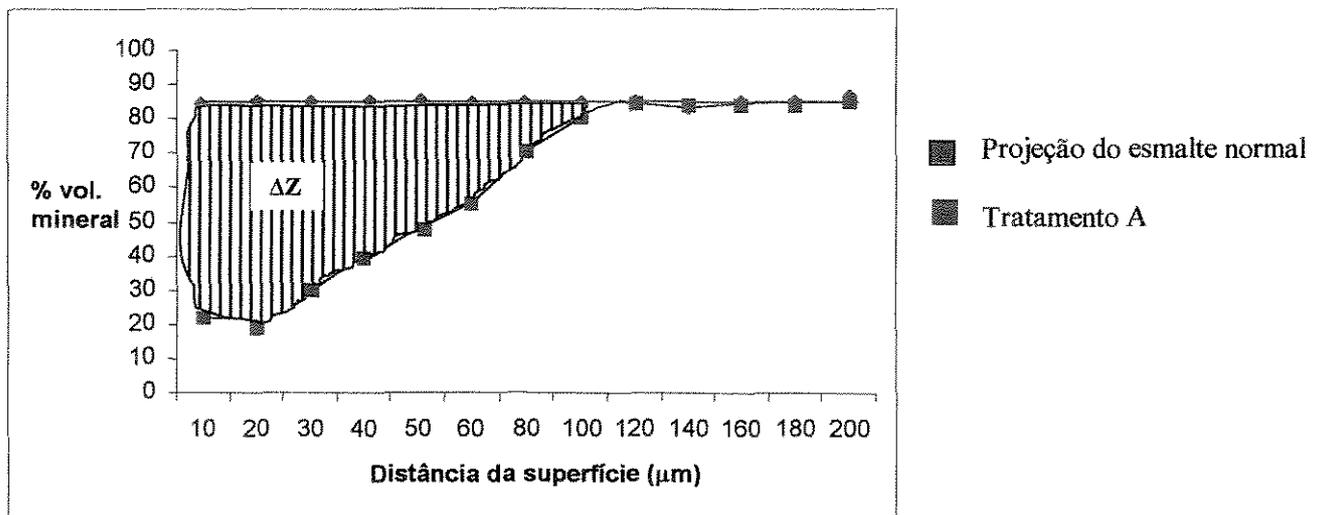


Figura 5: Diagrama representativo da diferença entre a projeção da % de vol. mineral do esmalte normal e % de vol. mineral do tratamento A.

4.3.4 – 3. Análise da concentração de flúor no esmalte dental

A concentração de flúor no esmalte dental foi avaliada na metade de cada um dos quatro blocos usados pelos voluntários. Depois de seccionados, os blocos foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo®), isolados com verniz para unhas, ficando exposta apenas a superfície do esmalte. Dos blocos, 3 camadas de esmalte dental foram seqüencialmente removidas por imersão em 0,25 mL de HCl 0,5 M nos tempos de 15, 30, 60 segundos sob agitação. Após cada ataque ácido foi feito o tamponamento com igual volume de TISAB (tampão acetato 1 M, pH 5,0, contendo NaCl 1 M e CDTA a 0,4%), adicionado de NaOH (20 g/l). Nos blocos hígidos e nos blocos em que foi feita ATF durante 4 min e removidos após 30 minutos, a análise de flúor foi realizada nas mesmas condições descritas acima.

A quantidade de flúor removida de cada camada de esmalte foi determinada usando eletrodo específico ORION® 96-09 acoplado a um analisador de íons ORION® EA-940, previamente calibrados com padrões de 0,0625 a 4,0 µg/mL. As leituras (mV) das amostras foram transformadas µg/mL através de regressão linear da curva de calibração. A massa de esmalte removida durante cada ataque ácido foi estimada a partir da dosagem de fósforo inorgânico, o qual foi determinado pelo método de FISKE & SUBARROW (1925). Para o cálculo da massa de esmalte assumiu-se um teor de P no esmalte de 17,4%. Dividindo-se a quantidade de flúor (µg F) pela massa de esmalte removida foi obtida a concentração de flúor (ppm), e para o cálculo da espessura de camada de esmalte removida assumiu-se um valor de densidade do esmalte bovino de 2,92 (LAZZARI, 1976).

4.3.4 – 4. Análise bioquímica da placa dental

❖ Metodologia da Análise da Placa Dental

Ao final dos 14 dias, 10 horas após a última exposição aos carboidratos, as telas plásticas que recobriram os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi n° 15 e a placa formada sobre dois blocos localizados em posições cruzadas, foi imediatamente transferida para tubos de microcentrífuga pré-pesados para análise da composição inorgânica e polissacarídeo insolúvel em água (PI).

Após serem pesadas, as amostras da placa dental foram tratadas com HCl 0,5 M na proporção 0,5 ml/10 mg de placa (CURY *et al.*, 1997; 2000). Depois de três horas em temperatura ambiente sob constante agitação, o mesmo volume de TISAB (tampão acetato 1 M, pH 5,0, contendo NaCl 1 M e CDTA a 0,4%), adicionado de NaOH (20 g/L) foi usado como tampão. As amostras foram centrifugadas (11000 g) duas vezes de 3 minutos, e no sobrenadante foram determinados flúor, fósforo, cálcio solúveis em ácido. Ao precipitado foi adicionado NaOH M (1 ml/ 10 mg de placa dental). As amostras foram homogeneizadas e mantidas sob agitação por três horas em temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas duas vezes de 3 minutos, e o polissacarídeo insolúvel em água foi determinado no sobrenadante.

- Determinação da concentração de flúor

A concentração de flúor (F) solúvel em ácido foi determinada usando eletrodo específico Orion® 96-09 acoplado a um analisador de íons Orion® EA-940, previamente

calibrados com padrões de 0,025 a 0,5 µg F/ml preparados em TISAB II, pH 5,0 (adicionado 20 g NaOH/l) e HCl M. As leituras (mV) das amostras foram transformadas µg/g através de regressão linear da curva de calibração.

- Determinação da concentração de cálcio

A concentração de cálcio (Ca) nas amostras foi determinada através de espectrofotometria de absorção atômica, utilizando lantânio para suprimir a interferência de fosfato, por um processo no qual os constituintes de uma amostra são decompostos e convertidos a partículas atômicas. Para tal foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica Spectra A 50 Varian[®], previamente calibrado com padrões de 0,2 a 2,0 ppm Ca.

- Determinação da concentração de fósforo

A determinação da concentração de fósforo (P) solúvel em ácido na placa dental foi realizada pelo método de FISKE & SUBARROW (1925), cujo princípio é a transformação do fósforo dos fosfatos minerais em fosfomolibdato, o qual é em seguida reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de cor foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-70[®] a 660 nm, previamente calibrado com padrões de 3 a 24 µg de fósforo/ml.

- Determinação da concentração de polissacarídeo insolúvel em água

A determinação da concentração de polissacarídeo solúvel em álcali (PI) foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956), que se baseia na

reação de um açúcar, quando na presença de um ácido forte (ácido sulfúrico), formar compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol 5% obtêm uma coloração laranja, cuja intensidade foi medida em um espectrofotômetro Beckman DU-70[®] a 490 nm, previamente calibrado com padrões de 10 a 50 µg de glicose/ml.

4.3.4 – 5. Análise microbiológica da placa dental

❖ *Diluição, dispersão e incubação*

Ao final dos 14 dias, com uma espátula plástica esterilizada de ponta fina foram coletadas, no mínimo, 2 mg de placa dental formada sobre os blocos de esmalte posicionados cruzados, sendo imediatamente transferida para tubos criogênicos (Greiner[®]) pré-pesados esterilizados. Ao tubo foi adicionada solução salina (NaCl 0,9%) na proporção de 1 ml/mg de placa (CURY *et al.*, 2001b), agitado (Marconi[®] PA 162) até desfazer os grumos de placa e levado ao sonicador Vibra Cell[®] (BOWEN *et al.*, 1986; ROSALEN *et al.*, 1996).

O tubo contendo a placa coletada em solução salina passou pelo processo de diluição seriada em câmara de fluxo laminar (Veco[®]), partindo-se da diluição 10⁰ (obtida após homogeneização da placa) até 10³. Foi semeada (Spiral Plater[®]), em meio Ágar Mitis Salivarius a diluição 10¹ até 10³ e, em meio Ágar Mitis Salivarius Bacitracina, a diluição 10⁰ até 10², sendo todas semeadas em duplicata.

No início do processo de semeadura, observou-se a pressão da bomba (15-20 mmHg) ligada à Spiral Plater, lavou-se o sistema de sucção da Spiral Plater por oito vezes com hipoclorito de sódio 0,5% titulado e com água dd esterilizada. Para garantir a esterilidade desse sistema, no início do processo dispersava-se solução de hipoclorito de sódio 0,5% e água dd em placas de petri. Esse sistema suga aproximadamente 1,3 ml, e dispersa 50 µl de forma logarítmica em cada placa de petri, podendo semear até quatro placas de petri antes da lavagem. Entretanto, caso haja apenas duas placas para dispersar pode-se lavar o sistema descartando o restante de suspensão. Para impedir contaminação de uma placa para outra foi lavado duas vezes entre as diluições (a dispersão foi realizada da menor para maior diluição) e três a quatro vezes de um voluntário para outro. Após a dispersão, as placas permaneceram 15 minutos na bancada para impedir o escorrimento da dispersão e logo após foram incubadas em estufa com atmosfera de 10% de CO₂ a 37°C por 48 horas.

❖ ***Preparo do meio de cultura***

O meio de cultura utilizado para contagem de estreptococos totais foi o Ágar Mitis Salivarius- MSA (Difco Laboratories®) e para contagem de estreptococos do grupo mutans foi o meio Ágar Mitis Salivarius Bacitracina- MSB. O meio MSB foi preparado conforme o estudo de GOLD *et al.* (1973). Após todos os procedimentos de preparo do meio, placas de petri descartáveis (90 x 15 mm, Bioplass®) foram identificadas e, em seguida, foram distribuídos 20 ml de meio em cada uma. Após a solidificação, foram

incubadas em estufa (Jouan IG150[®]) com atmosfera de 10% de CO₂ a 37°C durante 24 horas para controle da esterilidade.

❖ *Contagem das colônias*

Após o período de incubação, as Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foram contadas com o auxílio do contador de colônias (Spiral System[®] model Hz). Foi usado para contagem, o método fornecido pela Spiral Plater (Don Whitley Scientific Limited WASP User Manual). A placa de petri é posicionada no contador de colônias, que apresenta divisórias circulares chamadas de setores: 3c, 3b, 3a, 4c, 4b e 4a (FIG. 6). Deve-se contar sempre as colônias dos setores posicionados na diagonal e fazer a somatória de colônias dos setores contados. É importante que o setor contado de um lado seja o mesmo do outro. Através de uma tabela, pode-se estimar a quantidade de colônias da placa de petri, pois essa tabela fornece, para cada somatória de determinado setor, a quantidade de colônias da placa inteira. Isso é possível, pois a Spiral Plater dispersa determinada quantidade de suspensão para cada setor.

As colônias que foram contadas apresentavam as seguintes características: cor azul escuro, com 0,1 a 1 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso ou liso, brilhante ou não (KRASSE, 1966; EDWARDSSON, 1968). Nenhum método de identificação bioquímica foi utilizado na contagem de estreptococos mutans. Os resultados foram expressos através de uma média das duplicatas e das diluições para MSA e MSB.

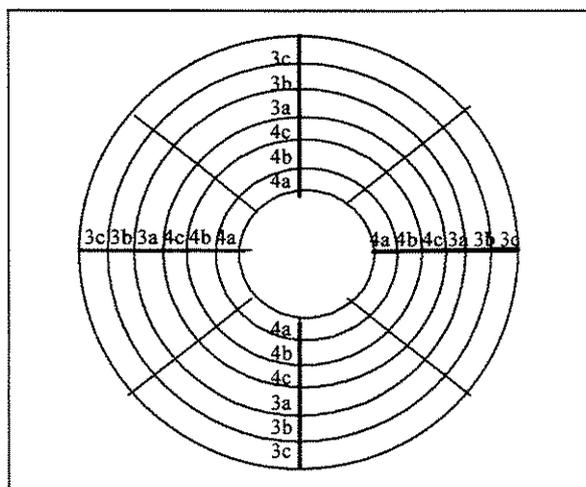


Figura 6: Setores observados no contador de colônias, onde a placa de petri foi posicionada.

4.3.4 – 6. Análise Estatística

Todas as análises foram feitas considerando o delineamento experimental cruzado neste estudo (JONES & KENWARD, 1989).

Os dados de **concentração de F, Ca, P e PI, %PDS, área de perda mineral (ΔZ), estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e % de estreptococos do grupo mutans** foram obtidos em um ensaio planejado com um delineamento experimental casualizado em blocos com arranjo fatorial dos níveis dos fatores tratamento (DP, DF, DP+ATF, DF+ATF) e frequência de sacarose (4x e 8x ao dia). Os dados de **% de volume mineral x μm e concentração de flúor no esmalte** foram analisados de acordo com um modelo adequado para dados oriundos de um delineamento em parcelas subdivididas casualizado em blocos, com os fatores tratamento e frequência de sacarose determinando

um arranjo fatorial (4x2) na parcela principal, e o fator profundidade e tempo (camada) determinando a subparcela, respectivamente, para % de volume mineral e concentração de flúor no esmalte. Para essas análises foi utilizado o programa SAS (Software Analysis System).

Além disso, foi avaliado o efeito da frequência de exposição à sacarose e de cada tratamento na microdureza de superfície comparando a microdureza de superfície inicial e final, a comparação da microdureza do esmalte seccionado a cada distância da superfície entre região hígida do blocos tratados vs. blocos tratados com DF e a comparação entre microdureza de superfície antes e após a ATF.

1. Concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo na placa dental

Para análise das concentrações de flúor, cálcio e fósforo foi constatada não homogeneidade de variância, portanto, os dados foram transformados e elevados, respectivamente, à potência de -0,1; -0,4; -0,4, e para análise de polissacarídeo os dados foram transformados utilizando a função logaritmo (log).

De acordo com a da análise de variância, observou-se efeito do *Tratamento* (F: F=107,79 com p=0,0001; Ca: F=17,76 com p=0,0001; P: F=1,44 com p=0,2372; PI: F=0,66 com p=0,5812 e da *Frequência de Sacarose* (F: F=12,14 com p= 0,007; Ca: F=10,33 com p=0,0018; P: F=3,17 com p=0,0782; PI: F=21,74 com p=0,0001) sobre as análises de F, Ca, P e PI, apresentando significância quando os fatores de probabilidade (Pr>F) são inferiores ao nível de significância estabelecida de 5%. O valor de p (Pr>F) para interação *Tratamento* Frequência de Sacarose* (F: F= 1,99 com p= 0,1208; Ca: F=2,16 com p=0,0974; P: F=0,6 com p=0,6134; PI: F=0,92 com p=0,4361) é maior que 0,5,

portanto a interação entre *Tratamento*Frequência de Sacarose* não é significativa. Diante do exposto, foi aplicado o teste de Tukey para *Tratamento* e *Frequência de Sacarose* separadamente, ao nível de significância de 5%.

2. Porcentagem de Perda de Dureza de Superfície (%PDS)

Para análise dessa variável foi constatada não homogeneidade de variância. O estudo de transformação de dados para a potência ótima revelou que a potência de 0,3 permitiu a homogeneização dos dados.

De acordo com o estudo de suposições, observou-se efeito significativo do *Tratamento* ($F=14,59$ com $p=0,0001$) e da *Frequência de Sacarose* ($F=7,72$ com $p=0,0065$) sobre os valores de %PDS, uma vez que os fatores de probabilidade ($Pr>F$) são inferiores ao nível de significância estabelecido de 5%. O valor de p ($Pr>F$) para interação *Tratamento*Frequência de Sacarose* ($F= 1,8$ com $p= 0,1520$) é maior que 0,5, portanto a interação entre *Tratamento*Frequência de Sacarose* não é significativa. Diante do exposto, foi aplicado o teste de Tukey para *Tratamento* e *Frequência de Sacarose* ao nível de significância de 5%.

3. Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente

Área de perda mineral da lesão de cárie (ΔZ)

Para análise dessa variável, foi constatada não homogeneidade de variância. O estudo de transformação de dados para a potência ótima revelou a potência 0 como

adequada. Sendo assim, utilizou-se a função logaritmo, que permitiu a homogeneização dos dados.

De acordo com a análise de variância, observou-se efeito significativo do *Tratamento* ($F=33,05$ com $p=0,0001$) e da *Frequência de Sacarose* ($F=6,08$ com $p=0,0154$), uma vez que os fatores de probabilidade ($Pr>F$) são inferiores ao nível de significância estabelecido de 5%. O valor de p ($Pr>F$) para interação *Tratamento*Frequência de Sacarose* ($F=0,26$ com $p=0,8536$) é maior que 0,5, portanto a interação entre *Tratamento*Frequência de Sacarose* não é significativa. Uma vez detectado o efeito do fator *Tratamento* e da *Frequência de Sacarose*, foi aplicado o teste de Tukey para comparar esses dois fatores de maneira independente, uma vez que a interação não foi significativa.

Porcentagem de volume mineral x μm (% vol. mineral)

Para essa análise foi constatada homogeneidade de variância. De acordo com a análise de variância, observou-se efeito significativo do fator *Tratamento* ($F=10,16$ com $p=0,0001$). Os valores de p ($Pr>F$) para *Frequência de Sacarose* ($F=3,57$ com $p=0,0619$) e interação *Tratamento*Frequência de Sacarose* ($F=1,66$ com $p=0,1796$) não foram significativos. Na subparcela os fatores *Profundidade* ($F=225,24$ com $p=0,0001$), *Tratamento*Profundidade* ($F=8,83$ com $p=0,0001$), *Sacarose*Profundidade* ($F=1,85$ com $p=0,0370$) foram significativos e *Trat*Frequência de Sacarose*Profundidade* ($F=0,38$ com $p=0,9997$) não foi significativo. Uma vez detectado o efeito do fator *Tratamento*,

Profundidade e das interações, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias com nível de significância 5%.

4. Análise do flúor incorporado no esmalte

Para análise dessa variável foi constatada não homogeneidade de variância. O estudo de transformação de dados para a potência ótima revelou a potência 0 como adequada. Sendo assim, utilizou-se função logaritmo, que permitiu a homogeneização dos dados.

O quadro de análises de variâncias revela fortes indícios de que há efeito significativo do fator *Camada* ($F=26,08$ com $p=0,0001$), que é uma co-variável que mede a porção da camada removida pelo ataque ácido, observando que há indícios de que o aumento da camada removida está associado com a variação da concentração de flúor. Incluindo o fator *camada* como causa de variação, as comparações da concentração de flúor em função dos demais fatores estão isentas do efeito da camada removida.

Observou-se efeito significativo do fator *Tratamento* ($F=72,58$ com $p=0,0001$). Os valores de p ($Pr>F$) para *Freqüência de Sacarose* ($F=1,72$ com $p=0,1932$) e interação *Tratamento*Sacarose* ($F=0,22$ com $p=0,8799$) não foram significativos. Na subparcela, os fatores *Tempo* ($F=31,14$ com $p=0,0001$), *Tratamento*Tempo* ($F=4,49$ com $p=0,0003$) foram significativos. *Sacarose*Tempo* ($F=1,21$ com $p=0,2995$) e *Trat*Sacarose*Tempo* ($F=0,58$ com $p=0,7461$) não foram significativos. Uma vez detectado o efeito do fator *Tratamento*, *Tempo* e da interação *Tratamento*Tempo*, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias com nível de significância 5%.

5. Contagens de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e % de estreptococos do grupo mutans

Para análise da contagem de estreptococos totais, os dados foram transformados através da potência 0,3, que permitiu a homogeneização dos dados. De acordo com a análise de variância, os valores de p ($Pr>F$) para *Tratamento* ($F=0,91$ com $p=0,4407$), *Frequência de Sacarose* ($F= 0,03$ com $p= 0,8724$) e interação *Tratamento* Frequência de Sacarose* ($F= 0,18$ com $p= 0,9094$) são maiores que 0,5, portanto não são significativos.

Para análise da contagem de estreptococos do grupo mutans, os dados foram transformados através da potência 0,1, que permitiu a homogeneização dos dados. De acordo com a análise de variância, os valores de p ($Pr>F$) para *Tratamento* ($F=2,53$ com $p=0,0627$), *Frequência de Sacarose* ($F= 0,22$ com $p= 0,6365$) e interação *Tratamento* Frequência de Sacarose* ($F= 0,06$ com $p= 0,9803$) são maiores que 0,5, portanto não são significativos.

Para análise da porcentagem de estreptococos do grupo mutans foi constatada não homogeneidade de variância. Os dados foram transformados através da potência 0,2, que permitiu a homogeneização dos dados. De acordo com a análise de variância, observou-se efeito significativo do *Tratamento* ($F=3,83$ com $p=0,0125$), uma vez que os fatores de probabilidade ($Pr>F$) são inferiores ao nível de significância estabelecido de 5%. Os valores de p ($Pr>F$) para *Frequência de Sacarose* ($F= 0,19$ com $p= 0,6618$) e interação *Tratamento*Sacarose* ($F= 0,08$ com $p= 0,9729$) são maiores que 0,5, portanto não são

significativos. Uma vez detectado o efeito do fator *Tratamento*, foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias.

6. Análise do efeito da frequência de exposição à sacarose e de cada tratamento na microdureza de superfície do esmalte

Para a análise dos dados de microdureza inicial e final em relação à frequência de exposição a sacarose 4x e 8x ao dia foi realizado o teste t pareado utilizando o programa Excel. De acordo com essa análise, tanto para a frequência de 4x como para a frequência de 8x, observou-se um valor de $p < 0,0001$ quando se comparou a microdureza inicial e final.

Para análise de microdureza inicial e final de acordo com os tratamentos foi realizado o teste t pareado utilizando o programa Excel. De acordo com essa análise, todos os tratamentos apresentaram um valor de $p < 0,0001$, quando se comparou a microdureza inicial e final.

7. Análise da microdureza do esmalte seccionado a cada distância da superfície: região hígida do bloco tratado vs. blocos tratado com DF

Para análise da microdureza do esmalte seccionado a cada distância da superfície comparando os blocos que não receberam tratamento (hígido) e aqueles que receberam DF durante o experimento, foi realizado o teste F e teste t para cada distância da superfície. Os dados apresentaram de acordo com as distâncias 10, 20, 30, 40, 50, 60, valores de p, respectivamente, de 0,0007; 0,0228; 0,0124; 0,0274; 0,0221; 0,0593 quando se comparou os blocos hígidos e tratados com DF.

8. Análise do efeito da ATF na microdureza de superfície do esmalte

O efeito da ATF na microdureza de superfície do esmalte foi avaliado antes e após a ATF através do teste t pareado utilizando o programa Excel. De acordo com essa análise, o valor de p foi de 0,5401, quando se comparou a microdureza de superfície do esmalte antes e logo após a ATF.

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na seguinte ordem: **1) efeito da frequência de exposição à sacarose:** na porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), extensão da lesão de cárie do esmalte seccionado longitudinalmente em área de perda mineral (ΔZ), concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo na placa dental e análise microbiológica da placa dental; **2) efeito dos tratamentos:** na %PDS, ΔZ , porcentagem de volume de mineral x μm , concentração de flúor no esmalte, concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo na placa dental e análise microbiológica da placa dental.

5.1. Efeito da frequência de exposição à sacarose

Porcentagem de perda de dureza de superfície e perda mineral da lesão de cárie

A tabela 1 mostra os resultados em termos de média e desvio padrão da microdureza de superfície inicial e final, da % de perda de dureza superficial (%PDS) e perda mineral na lesão (ΔZ) em função da frequência de exposição à sacarose. Como descrito no material e métodos, houve desmembramento da frequência de sacarose e tratamento, pois a interação entre os dois fatores não foi significativa.

Tabela 1: Médias (\pm dp, n= 64) da microdureza de superfície inicial e final, porcentagem de perda (%PDS) e área da perda de mineral do esmalte seccionado longitudinalmente (ΔZ) em função da frequência de exposição à sacarose.

Sacarose/dia	Microdureza de superfície			Microdureza do esmalte seccionado
	Inicial	Final	% PDS	ΔZ
4x	362,9 \pm 17,3 A	286,0 \pm 59,5 B	- 19,7 \pm 17,5 a	655,7 \pm 506,2 a
8x	362,0 \pm 14,9 A	255,0 \pm 82,9 B	- 29,5 \pm 24,6 b	869,8 \pm 726,3 b

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas mostram diferenças entre a dureza inicial e final para cada frequência, e letras minúsculas, entre as frequências.

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram em cada frequência de sacarose que houve diferença estatística entre dureza de superfície inicial e final (teste t pareado a $p < 0,05$). Os resultados indicam diferença estatística entre as frequências de sacarose 4x e 8x ao dia para as análises de porcentagem de perda de dureza de superfície e de perda mineral da lesão de cárie, considerando um nível de significância de 5%.

Concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo na placa dental

A tabela 2 mostra os resultados em termos de média e desvio padrão da concentração de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e polissacarídeo insolúvel em água (PI). Como descrito no material e métodos, houve desmembramento da frequência de sacarose e tratamento, pois a interação entre os dois fatores não foi significativa.

Tabela 2: Médias (\pm dp) da concentração de F, Ca, P e PI em função da frequência de exposição à sacarose/dia.

Sacarose/dia	Análises			
	F ($\mu\text{g/g}$)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	PI (mg/g)
4x	51,9 \pm 67,9 a n=60	0,7 \pm 1,3 a n=59	1,0 \pm 0,9 a n=59	29,1 \pm 17,5 a n= 60
8x	24,0 \pm 37,2 b n=61	0,5 \pm 0,7 b n=62	0,7 \pm 0,7 a n=62	44,3 \pm 25,5 b n=61

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os resultados da tabela 2 indicam que há diferença estatística na concentração de F, Ca e PI entre as frequências de sacarose 4x e 8x ao dia e não há diferença em relação à concentração de P.

Análise microbiológica da placa dental

A tabela 3 expressa os resultados da contagem de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos totais de acordo com a frequência de exposição à sacarose.

Tabela 3: Médias (\pm dp, n= 30) das contagens de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e da porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais em função da frequência de exposição à sacarose.

Sacarose/dia	estreptococos totais UFC/g, 10^6	estreptococos mutans UFC/g, 10^6	% de estreptococos mutans
4x	9,5 \pm 7,3 a	2,5 \pm 4,3 a	25,44 a
8x	10,8 \pm 9,3 a	3,1 \pm 5,5 a	25,75 a

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O fator frequência de sacarose não foi significante, portanto não houve diferença nas contagens de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e porcentagem de estreptococos do grupo mutans entre as frequências de 4 e 8x/dia ($p > 0,05$).

5.2. Efeito dos tratamentos

Porcentagem de perda de dureza de superfície e perda mineral da lesão de cárie

A tabela 4 mostra os resultados em termos de média e desvio padrão da microdureza inicial e final, da % de perda de dureza de superfície (%PDS) e área de perda mineral na lesão de cárie (ΔZ) em função dos tratamentos.

Tabela 4: Médias (\pm dp, n= 32) da microdureza de superfície inicial e final, da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e área de perda de mineral do esmalte seccionado longitudinalmente (ΔZ) em função dos tratamentos.

Tratamentos	Microdureza de superfície		Microdureza do esmalte seccionado	
	Inicial	Final	%PDS	ΔZ
DP	363,5 \pm 16,9 A	206,0 \pm 73,8 B	-40,4 \pm 27,7 a	1254,0 \pm 706,9 a
DF	364,8 \pm 14,7 A	314,4 \pm 31,5 B	-14,1 \pm 9,8 b	405,4 \pm 225,5 b
ATF + DP	360,3 \pm 20,1 A	242,4 \pm 72,1 B	-30,2 \pm 21,5 a	971,4 \pm 708,0 a
ATF + DF	360,9 \pm 14,4 A	309,6 \pm 41,4 B	-14,2 \pm 11,4 b	414,8 \pm 180,0 b

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Letras maiúsculas mostram diferenças entre a dureza inicial e final para cada tratamento, e letras minúsculas, entre os tratamentos.

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram em cada tratamento que houve diferença estatística entre dureza de superfície inicial e final (teste t pareado a $p < 0,05$). Em relação à porcentagem de perda de dureza de superfície e à área de perda mineral da lesão, os resultados mostram que blocos dentais tratados com DF e ATF+DF apresentaram menor

perda de dureza que aqueles tratados com DP e ATF+DP. Não houve diferença estatística entre DF e ATF+DF, nem entre DP e ATF+DP, considerando um nível de significância de 5%.

O gráfico 1 mostra a porcentagem de volume mineral em função dos tratamentos e da distância da superfície do esmalte.

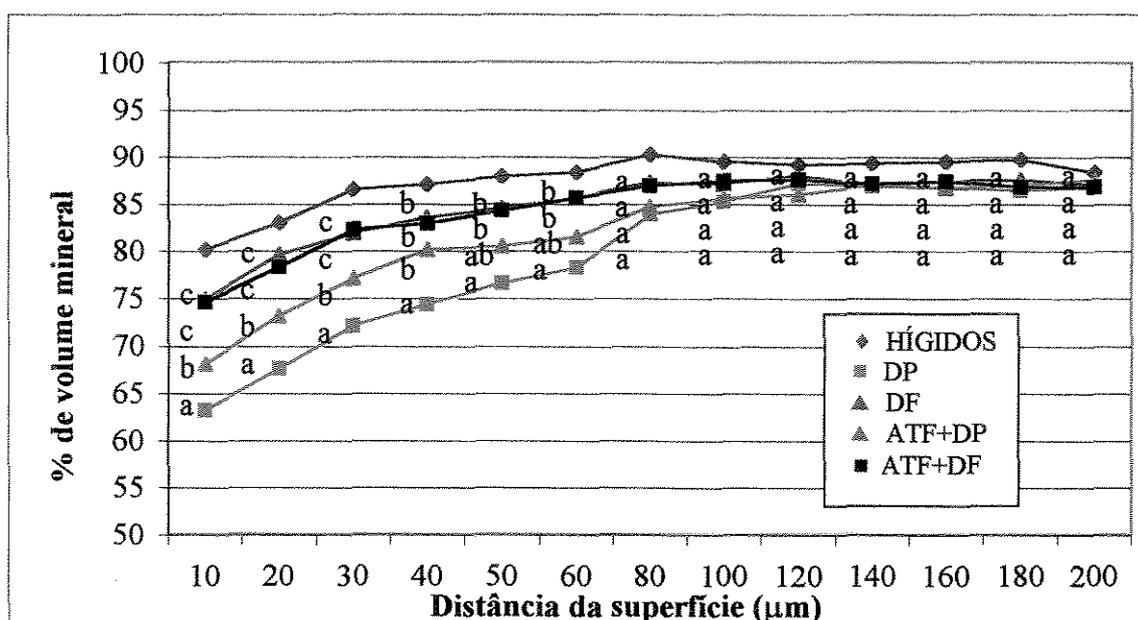


Gráfico 1: Porcentagem de volume mineral em função da distância da superfície (μm) em função dos tratamentos.

Os resultados mostram que nas distâncias de 10 a 30 μm , DF e ATF+DF diferem de ATF+DP e DP, mas não diferem entre si. A 40 μm da superfície ATF+DF, ATF+DP e DF não diferem entre si, mas diferem do DP. A 50 e 60 μm da superfície ATF+DF e DF não diferem entre si, mas diferem do DP e não diferem do ATF+DP. Nas

outras distâncias não existe diferença estatística entre os tratamentos. Para ilustração, o gráfico 1 também mostra a % de volume mineral de blocos que não foram submetidos a nenhum tratamento (hígidos).

Concentração de flúor no esmalte

A tabela 5 mostra os resultados em termos de médias e desvios padrão da concentração de flúor no esmalte em função dos tratamentos e da distância da superfície dental. O fator frequência de sacarose não foi significativo ($p > 0,05$), portanto não houve diferença na concentração de flúor entre as frequências de 4 e 8x/dia.

Tabela 5: Médias (\pm dp, $n=30$) da concentração de flúor no esmalte em função dos tratamentos e da distância da superfície (μm).

Tratamentos	Distância da superfície (μm)		
	9,2 \pm 1,9	18,8 \pm 4,2	34,0 \pm 7,8
DP	2227,2 \pm 822,6 b, A	1239,1 \pm 520,4 c, B	606,6 \pm 238,3 c, B
DF	9306,9 \pm 3015,2 a, A	4038,9 \pm 2168,0 b, B	1620,5 \pm 1069,3 b, C
ATF + DP	8892,0 \pm 3686,1 a, A	4857,5 \pm 2443,1 ab, B	2190,4 \pm 1611,5 ab, C
ATF + DF	11200,1 \pm 3556 a, A	4977,0 \pm 1645,4 a, B	2264 \pm 965,2 a, B

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Letras minúsculas mostram diferenças entre tratamentos, e maiúsculas, entre as distâncias da superfície.

Ao compararmos as médias na distância 9,2 \pm 1,9 μm , verificou-se que todos os tratamentos diferiram do DP. Na distância 18,8 \pm 4,2 e 34,0 \pm 7,8 μm , DF, ATF+DP e ATF+DF diferiram do DP, DF não diferiu do ATF+DP e este não diferiu de ATF+DF pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando as diferentes distâncias no mesmo tratamento, DP mostrou diferença da primeira camada em relação às outras duas, que não foram estatisticamente diferentes e o mesmo ocorreu em ATF+DF. Nos tratamentos DF e ATF+DP, as três camadas foram diferentes entre si.

O gráfico 2 ilustra os dados da tabela 5 e em acréscimo são mostradas as concentrações de flúor no esmalte de blocos que não receberam nenhum tratamento (hígidos) e daqueles pré-tratados com ATF (ATF), para efeito de comparação, os quais não foram submetidos ao desafio cariogênico.

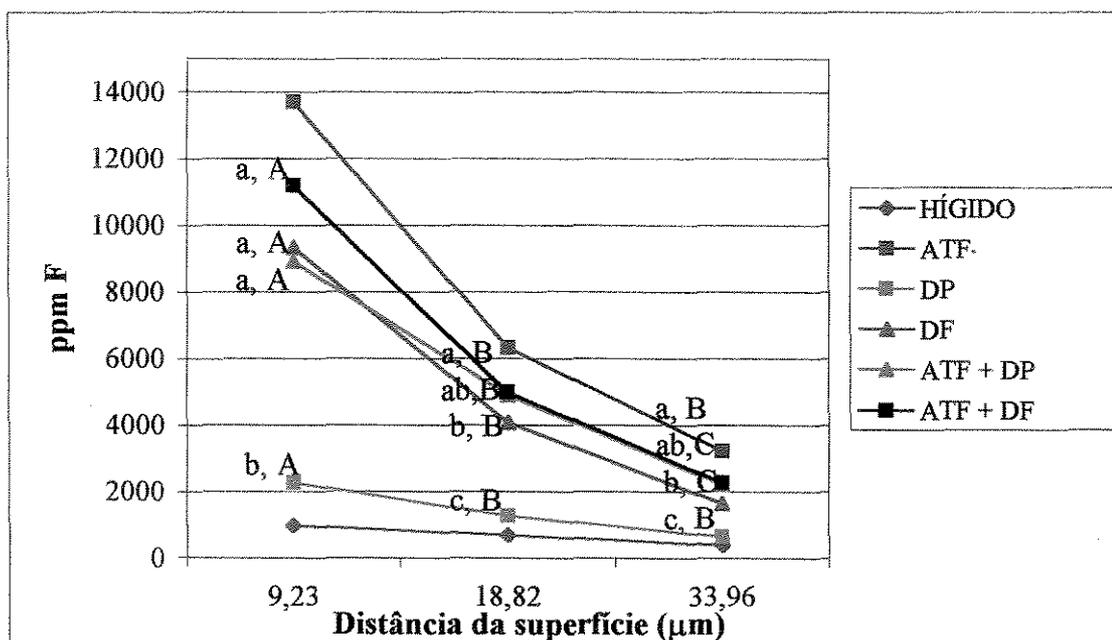


Gráfico 2: Concentração de flúor no esmalte (ppm F) em função dos tratamentos e da distância da superfície (µm).

Concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeo na placa dental

Na tabela 6 estão expressos os resultados das concentrações de flúor, cálcio e polissacarídeo insolúvel em água, de acordo com os tratamentos.

Tabela 6: Médias (\pm dp) da concentração de F, Ca, P e PI em função dos tratamentos.

Tratamentos	Análises			
	F ($\mu\text{g/g}$)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	PI (mg/g)
DP	2,3 \pm 1,3 a n= 30	0,3 \pm 0,2 a n= 30	0,8 \pm 1,0 a n= 30	42,4 \pm 27,3 a n= 30
DF	69,8 \pm 70,0 b n= 28	1,0 \pm 1,8 b n= 29	0,9 \pm 0,7 a n= 30	35,2 \pm 21,1 a n= 28
ATF + DP	11,0 \pm 18,4 c n= 32	0,4 \pm 0,3 a n= 32	0,9 \pm 0,9 a n= 32	34,0 \pm 17,4 a n= 32
ATF + DF	71,1 \pm 61,1 b n= 31	0,8 \pm 0,7 b n= 30	0,8 \pm 0,6 a n= 29	35,5 \pm 25,8 a n= 31

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Na análise da concentração de flúor, DF e ATF+DF apresentaram diferença significativa em relação ao DP e ATF+DP. Não houve diferença estatística entre DF e ATF+DF, entretanto DP e ATF+DP diferiram entre si.

Na análise da concentração de cálcio, DF e ATF+DF apresentaram diferença estatística em relação ao DP e ATF+DP; DF e ATF+DF não diferiram entre si e DP e ATF+DP também não diferiram entre si.

Na análise da concentração de fósforo e polissacarídeo, os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

Análise microbiológica da placa dental

A tabela 7 expressa os resultados da contagem de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos totais de acordo com os tratamentos.

Tabela 7: Médias (\pm dp, n= 30) das contagens de estreptococos totais, mutans e da porcentagem de estreptococos mutans em relação aos estreptococos totais em função dos tratamentos.

Tratamentos	estreptococos totais UFC/g x 10 ⁶	estreptococos mutans UFC/g x 10 ⁶	% de estreptococos mutans
DP	10,5 \pm 8,6 a	4,6 \pm 5,9 a	35,0 \pm 30,5 a
DF	9,3 \pm 9,4 a	3,9 \pm 7,1 a	35,2 \pm 35,1 a
ATF + DP	10,2 \pm 7,2 a	1,2 \pm 2,2 a	15,1 \pm 21,0 b
ATF + DF	10,6 \pm 7,9 a	1,5 \pm 1,8 a	17,8 \pm 18,4 ab

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os resultados mostram que não há diferença nas análises de estreptococos totais ($p=0,4407$) e estreptococos do grupo mutans ($p=0,0627$) em função dos tratamentos. Entretanto, em relação à porcentagem de estreptococos do grupo mutans, os resultados mostram que DF e ATF+DF não diferiram de DP. ATF+DP apresentou diferença em relação ao DP, mas não apresentou diferença em relação a ATF+DF ao nível de significância de 5%.

5.3. Avaliação conjunta dos resultados

Efeito da frequência de exposição à sacarose

O gráfico 3 ilustra os resultados das análises realizadas em função da frequência de exposição a sacarose e com sua respectiva análise estatística com nível de significância de 5%.

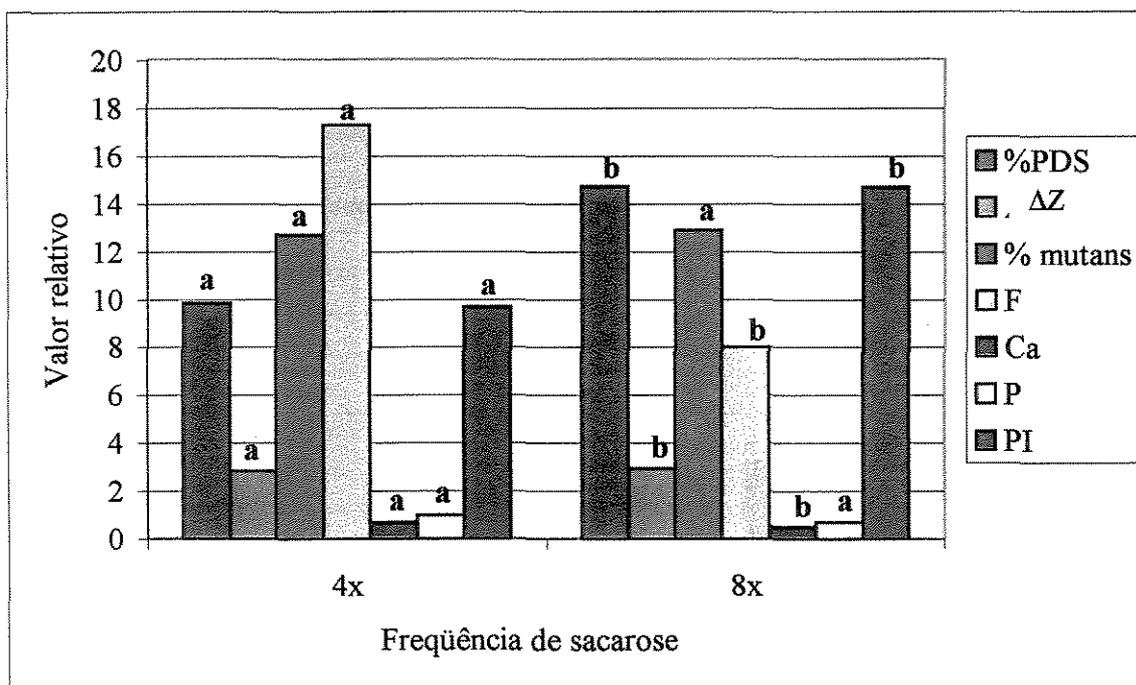


Gráfico 3: Resultados obtidos em função da frequência de exposição a sacarose/dia.

Para ilustrar essas análises no mesmo gráfico, os dados da concentração de flúor e de polissacarídeo foram divididos por 3, % de perda de dureza de superfície e % de estreptococos do grupo mutans foram divididos por dois, e a área de perda mineral da lesão foi transformada em logx.

Esse gráfico permite observar alguns dos resultados em função da frequência de exposição à sacarose. Observou-se que na frequência de sacarose 8x/dia, a perda de dureza de superfície e a área de perda mineral na lesão foram maiores, as concentrações de F, Ca na placa dental foram menores, a concentração de polissacarídeo insolúvel em água foi menor quando se compara com a frequência de sacarose 4x/dia ($p < 0,05$). As análises de % de mutans e concentração de fósforo não mostraram diferença ($p > 0,05$).

Efeito dos tratamentos

O gráfico 4 ilustra os resultados das análises realizadas em função dos tratamentos com sua respectiva análise estatística com nível de significância de 5%.

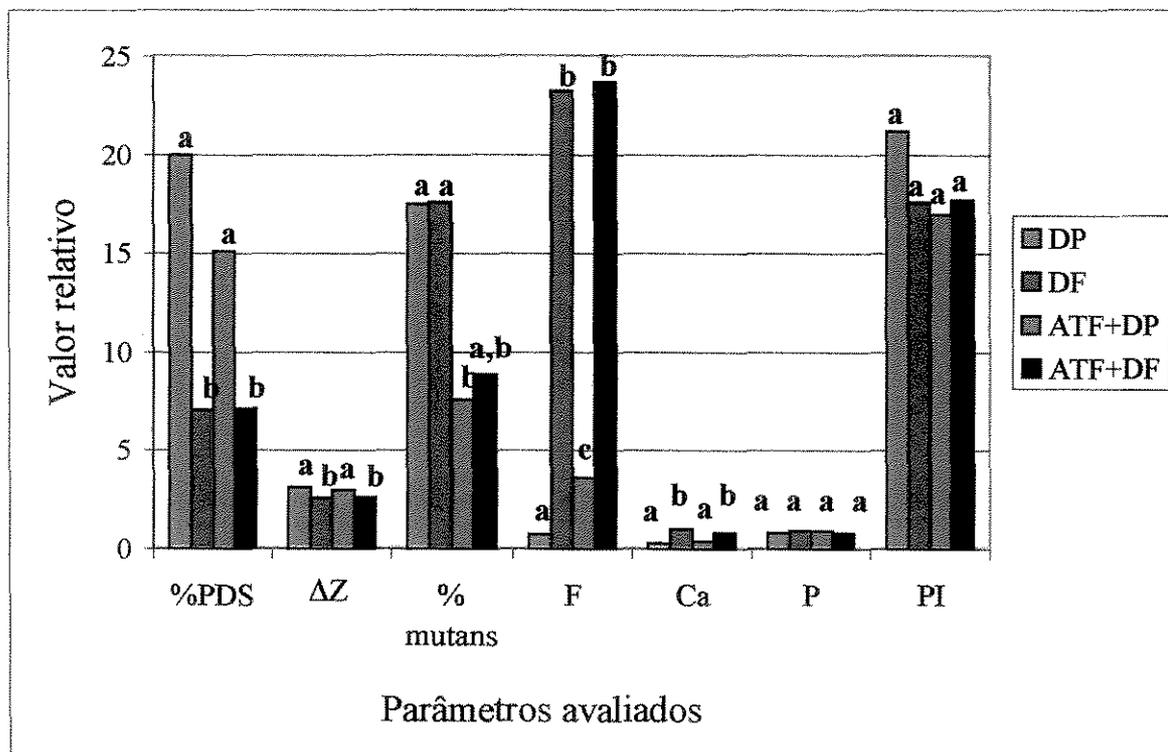


Gráfico 4: Análises realizadas em função dos tratamentos.

Para ilustrar essas análises no mesmo gráfico, os dados da concentração de flúor foram divididos por 3, os da concentração de polissacarídeo, % de perda de dureza de superfície e % de estreptococos do grupo mutans foram divididos por dois, e os da área de perda mineral da lesão foram transformados em logx.

Observa-se menor % de perda de dureza de superfície e menor área de perda mineral na lesão nos tratamentos DF e ATF+DF, menor % de estreptococos mutans em ATF+DP e ATF+DF, maior concentração de flúor e cálcio na placa dental em DF e ATF+DF ($p < 0,05$). Não houve diferença em relação à concentração de fósforo e polissacarídeo insolúvel em água ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm sido realizados para verificar a eficácia da associação de métodos de uso de flúor recomendados para indivíduos de alto risco de cárie (BEISWANGER *et al.*, 1978; MAINWARING & NAYLOR, 1978; BLINKHORN *et al.*, 1983). Em acréscimo, nenhum estudo experimental verificou o efeito dessa associação de métodos no desenvolvimento de cárie e na cariogenicidade da placa dental, quando o desafio cariogênico é aumentado pela frequência de exposição à sacarose.

Em primeiro lugar, o modelo idealizado no presente trabalho conseguiu simular o alto risco de cárie pelo aumento de exposição à sacarose, pois a cárie dental, quer seja avaliada pela perda mineral da superfície do esmalte como da lesão de cárie mostra maior perda mineral com o aumento da frequência de exposição a sacarose (TAB. 1). Os resultados obtidos estão acordo com os trabalhos experimentais de CURY *et al.* (1997; 2001b) e de DUGGAL *et al.* (2001) que observaram maior perda mineral com aumento da frequência de exposição à sacarose. Além do mais, a relação entre a frequência de exposição à sacarose, desenvolvimento inicial de cárie e sua progressão tem sido mostrada em outras condições experimentais ou epidemiológicas (KONIG *et al.*, 1968; BOWEN *et al.*, 1980; SHEIHAM, 1987; RODRIGUES & SHEIHAM, 2000; SHEIHAM, 2001).

Essa maior perda mineral observada com o aumento da frequência de sacarose pode ser explicada pela menor concentração inorgânica e maior concentração de polissacarídeo na placa dental formada (TAB. 2; GRAF. 3). Os resultados mostram uma menor concentração F, Ca e maior concentração de polissacarídeo quando ocorreu exposição à sacarose 8x/dia (TAB. 2), estando de acordo com CURY *et al.* (1997). Sugere-se que a placa formada na presença de maior frequência de sacarose é menos saturada ionicamente, permitindo uma maior perda mineral quando das sucessivas quedas de pH na placa dental. De acordo com MARGOLIS *et al.* (1988), uma maior saturação da placa dental ocorre em indivíduos sem cárie e uma menor concentração inorgânica na placa dental seria uma das razões para explicar a maior cariogenicidade da placa dental (CURY *et al.*, 2000).

Ainda com relação à cariogenicidade da placa dental, uma maior concentração de polissacarídeo extracelular foi observada na presença de sacarose 8x/dia em comparação a 4x/dia (TAB. 2), estando de acordo com CURY *et al.* (1997). Esse aumento de polissacarídeo insolúvel deve ser considerado o fator mais importante na cariogenicidade da placa dental (CURY *et al.*, 2000), pois aumenta a porosidade da placa (DIBDIN & SHELLIS, 1988) e conseqüentemente leva a maior desmineralização pela alta concentração de ácido na interface dente-placa (ZERO *et al.*, 1992a) e maiores períodos com quedas de pH (DIBDIN & SHELLIS, 1988). Sendo assim, sugerem-se três aspectos importantes em relação ao aumento da cariogenicidade da placa dental em alta frequência de sacarose: maior porosidade, facilitando a difusão de ácido (DIBDIN & SHELLIS, 1988), menor

concentração inorgânica (CURY *et al.*, 1997) e, principalmente, maior concentração de polissacarídeo, o que leva a maior desmineralização do esmalte (CURY *et al.*, 1997, 2000).

Algumas hipóteses foram elaboradas por CURY *et al.* (1997) em relação à menor concentração inorgânica da placa dental formada em alta frequência exposição à sacarose. A primeira seria que devido a constantes quedas de pH no ambiente, atribuídas à fermentação da sacarose, os minerais ligados à placa seriam liberados, podendo difundir para a saliva. Por outro lado, no presente estudo a placa foi coletada 10 horas após a última exposição à sacarose e haveria tempo suficiente para repor os minerais perdidos para a saliva. A segunda explicação seria que o esmalte dental poderia captar os íons da placa, entretanto, os resultados mostraram que a concentração de flúor no esmalte não diferiu em relação a 4 e 8x/dia. Outra explicação seria que a alta concentração de polissacarídeo extracelular diminuiria a densidade das bactérias e, com isso, os íons ligados nestas, o que não foi constatado, pois no presente trabalho não houve diferença em relação à contagem de estreptococos totais de acordo com a frequência de exposição à sacarose (TAB. 3).

Assim sendo, o aumento da frequência de exposição à sacarose deve ser considerado um fator de risco de cárie explicada pelo aumento da cariogenicidade da placa dental, por apresentar maior concentração de polissacarídeos e menor concentração inorgânica na placa dental. Desse modo, a proposta do presente estudo foi avaliar se a associação de métodos de uso de flúor seria eficaz para controlar cárie dental nessa condição.

Considerando que o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da combinação de métodos no desenvolvimento de cárie, nem mesmo a associação de métodos (ATF+DF) impediu o desenvolvimento de cárie quando avaliada pela perda de dureza superficial. A tabela 4 mostra que ocorreu perda mineral na superfície, quando se comparou microdureza antes e ao final do experimento, independente do tratamento. Portanto, nenhum dos tratamentos com flúor foi capaz de evitar a cárie dental, o que está de acordo com o conhecimento atual que o uso isolado de flúor não é capaz de evitar a doença cárie, mas sim reduz eficientemente a sua manifestação (CURY, 2001).

Em relação ao efeito dos tratamentos no desenvolvimento de lesões iniciais de cárie, analisado através de microdureza de superfície (TAB. 4), o tratamento DF foi eficaz na redução da perda mineral na superfície quando comparado ao controle (DP), confirmando estudos que mostram que o dentifrício fluoretado é eficaz no controle das lesões iniciais de cárie (ten CATE *et al.*, 1988; ZERO, 1995). Esse efeito é justificado pela presença constante de flúor no meio ambiente bucal, comprovada nesse trabalho pela sua presença na placa dental (TAB. 6), o qual interfere com a dinâmica do processo de ativação da remineralização e inibição da desmineralização (FEATHERSTONE *et al.*, 1986). Em acréscimo, como consequência o flúor se incorpora no esmalte podendo levar a uma posterior resistência ao desenvolvimento de cárie (TAKAGI *et al.*, 2000). Por outro lado, o pré-tratamento com ATF e que recebeu DP durante o experimento (grupo ATF+DP) não mostrou efeito na redução da perda mineral em relação ao controle (DP). Entretanto, a associação de ATF+DF foi eficaz na redução da perda mineral na superfície, apresentando

diferença em relação ao controle, porém não diferiu do DF. Assim, o efeito da associação deve ser atribuído ao tratamento com DF e não ao pré-tratamento com ATF.

Essa análise, mostrando o não-efeito da ATF, foi realizada utilizando microdureza de superfície, que, de acordo com WHITE (1987) e ZERO (*et al.*, 1992a; 1995), é um método eficaz para avaliar remineralização e desmineralização em lesões iniciais de cárie. Para essa aparente não-eficácia da ATF (ATF+DP) em relação ao controle (DP), surgem duas hipóteses: ou de fato a ATF é ineficaz na redução da perda mineral de superfície ou o método de avaliação de dureza de superfície não é o mais apropriado para avaliar o efeito da ATF. Considerando que o efeito de prevenção de cárie da ATF é reconhecido (BEISWANGER *et al.*, 1978; RIPA, 1990; ADAIR, 1998) o mais provável seria uma explicação quanto a problemas metodológicos e isto deve ser justificado. A capacidade da aplicação tópica de F em reagir com o esmalte é reconhecida (RÖLLA, 1988; SAXEGAARD & RÖLLA, 1988), sendo formados mais produtos quando flúor acidulado é aplicado (DELBEM & CURY, 2002. *In press*, CRUZ & RÖLLA, 1992). Assim, isso foi confirmado no presente trabalho pela análise do gráfico 2, que mostra diferença entre F no esmalte do grupo ATF versus hígido (não tratado). Também é conhecido que esses produtos são formados às custas do próprio esmalte, pela dissolução e reprecipitação de minerais (MORENO, 1993). Desses minerais, o chamado fracamente ligado na forma de “CaF₂” tem sido considerado o responsável pelo efeito anticariogênico do flúor tópico (RÖLLA & SAXEGAARD, 1990; ten CATE, 1997). O “CaF₂” funcionaria como um reservatório de flúor que seria liberado quando dos desafios cariogênicos para interferir com os fenômenos de des e remineralização do esmalte. De fato, o gráfico 2

mostra que a concentração de F no esmalte pré-tratado com ATF e submetido ao desafio cariogênico (ATF+DP) é menor que a encontrada logo após ATF (ATF). O “CaF₂” também poderia ser dissolvido em outras condições subsaturantes do meio e se uma dissolução expressiva do produto formado ocorre sem reposição, isso pode levar a uma alteração na estrutura do esmalte modificando sua propriedade de dureza.

Assim, no presente estudo, foi verificado que após ATF, a camada superficial do esmalte (a 9,23 µm da superfície) apresentou 13665,6 ppm F, porém após o tratamento com DP durante o experimento (ATF+DP), essa concentração caiu para 8892,0 ppm F, ocorrendo uma perda de 34% de flúor da superfície (GRAF. 2). Essa alteração de dureza de superfície de esmalte pré-tratado com ATF e submetido a ciclagens de pH *in vitro* tem sido relatada recentemente (PAES LEME *et al.*, 2002. *In press*; MAIA *et al.*, submetido²). Esses autores mostraram, respectivamente, diminuição de 60 e 25% do flúor depositado na superfície de esmalte com lesão de cárie durante ciclagens de pH, quando do pré-tratamento com F acidulado ou verniz fluoretado. Nos referidos estudos laboratoriais o F liberado do esmalte foi encontrado nas soluções des-re. No presente trabalho, o F liberado, como mostra a tabela 5, foi encontrado na placa dental em concentração significativa (TAB. 6), mesmo 14 dias após ATF e do alto desafio cariogênico durante o experimento.

²MAIA, C.M *et al.* Effect of combination of fluoride dentifrice and varnish on early carious lesions *in vitro*. Submetido à European Journal of Oral Science.

Deve ser destacado, do ponto de vista de cárie, que a liberação de F pela dissolução do “CaF₂” formado pela ATF não deve ser considerado como perda de F. Esse F, participando da dinâmica do processo de cárie, parte dele se reprecipita no esmalte formando produtos mais resistentes a subseqüentes desafios cariogênicos (TAKAGI *et al.*, 2000). De fato, a concentração de F no esmalte do grupo ATF+DP é estatisticamente maior do que do grupo DP (TAB. 5), mesmo tendo havido a perda do flúor formado pelo pré-tratamento (GRAF. 2). Assim sendo, o não-efeito da ATF na redução da perda de dureza de superfície (ATF+DP vs. DP) pode ser explicado pelo rearranjo de superfície provocado quando da liberação dos produtos formados após ATF. A hipótese que alteração de dureza de superfície foi provocada pela ATF deve ser descartada, visto que não há diferença da dureza de superfície quando esta é medida logo após a ATF ($p=0,5401$; “t” pareado).

Por outro lado, a combinação do pré-tratamento com ATF seguido de dentifrício fluoretado durante a fase experimental (grupo ATF+DF) apresentou maior efeito na redução da perda mineral quando se compara com o controle (TAB. 4). Entretanto, a ATF+DF não mostrou efeito somatório na perda de dureza de superfície, pois não diferiu do DF. Três explicações para o não-efeito adicional da associação ATF+DF em termos do efeito anticariogênico avaliado por dureza de superfície, podem ser: (1) um possível desafio cariogênico baixo durante o experimento, (2) o efeito máximo da ATF + DF ou (3) o efeito do dentifrício fluoretado evitou ou compensou a dissolução dos produtos formados pela ATF. Sugere-se que a terceira hipótese responde esse fato, visto que a combinação de métodos não atingiu seu efeito máximo nem houve um baixo desafio cariogênico, que pode ser observado na tabela 4, que mostra que todos os tratamentos apresentaram perda de

dureza de superfície após o experimento. Sugere-se que o efeito adicional na perda de dureza pode ter sido mascarado pelas alterações superficiais. Além disso, a similaridade do efeito da ATF+DF e do tratamento DF em reduzir a perda de dureza de superfície pode ser atribuída à capacidade do DF em compensar o rearranjo químico provocado na superfície. Assim, o esmalte submetido ao tratamento ATF+DF apresentou perda de 18% do flúor da superfície formado pelo pré-tratamento com ATF, enquanto o submetido a ATF+DP apresentou perda de 34% (GRAF. 2). Sendo assim, ATF+DF apresentou uma retenção de flúor 20% a mais que ATF+DP. Portanto, o uso de dentifício fluoretado é importante no processo de rearranjo da superfície, pois ao mesmo tempo em que ocorreu liberação do flúor da superfície, o flúor proveniente do DF reprecipitou ou reduziu a liberação dos produtos formados por efeito de íon comum.

Desse modo, as limitações da análise de microdureza de superfície em avaliar o efeito da ATF+DP na redução de perda mineral de superfície devem ser atribuídas à liberação dos produtos formados pela ATF que provocaram uma modificação estrutural da superfície do esmalte quando no meio bucal. Assim, a cárie foi também avaliada através de perda de mineral ocorrida no interior do esmalte. No esmalte seccionado longitudinalmente foi determinada tanto a área de mineral perdido em toda extensão da lesão como a perda ocorrida a distâncias pré-determinadas da superfície dental. Com relação à área de perda mineral na lesão de acordo com tratamentos (TAB. 4), o tratamento com DF propiciou uma menor perda de mineral, quando comparado ao controle. O efeito do DF inibindo a progressão da lesão de cárie pode ser explicado pela constância de flúor no meio bucal interferindo com a des e remineralização do esmalte. Assim, mesmo após 10 horas da

última exposição ao dentifrício fluoretado foi encontrada alta concentração de F na placa dental do grupo DF (TAB. 6). Este flúor na placa dental seria mantido por produtos formados no esmalte na forma de CaF_2 , os quais liberariam flúor para interferir nos processos de des e remineralização. Como consequência o flúor se incorpora ao esmalte podendo levar a uma posterior resistência ao desenvolvimento de cárie (TAKAGI *et al.*, 2000).

Por outro lado, os resultados da área de mineral perdido na lesão não mostraram diferença entre ATF+DP e DP, o que, a princípio, confirmaria os resultados obtidos pela análise da dureza de superfície (TAB. 4). Entretanto, o aparente não efeito estatístico da ATF pode ser consequência do fato das diferenças significativas estarem limitadas à perda mineral mais próxima da superfície, as quais foram mascaradas pelo cálculo de área feito. Isso está respaldado pela análise dos dados de porcentagem de volume mineral em função da distância da superfície, os quais serão discutidos posteriormente (GRAF. 1).

Com relação ao efeito da associação, observou-se que o tratamento ATF+DF foi mais eficaz na redução da área de lesão quando comparado ao DP (TAB. 4). Os resultados mostram que o esmalte pré-tratado com ATF apresenta maior concentração de flúor quando comparado à combinação do pré-tratamento com ATF seguido de dentifrício fluoretado (ATF+DF). Essa diminuição da concentração flúor pode ser atribuída à liberação de flúor fracamente ligado (GRAF. 2), que reprecipita na forma de flúor fortemente ligado ou é liberado para o ambiente, interferindo nos processos de cárie. Portanto, o flúor retido no esmalte após ATF + DF, que é proveniente do flúor presente na placa dental fornecido pelo DF e da dissolução de produtos formados na superfície é responsável pela menor perda

mineral em relação ao controle. Entretanto, ao comparar o tratamento ATF+DF com DF não foi observada diferença entre os tratamentos, não mostrando efeito somatório. Sugere-se que essa não diferença pode ser decorrente do efeito máximo do flúor do DF ou por um baixo desafio cariogênico proposto.

Essas hipóteses e o não-efeito da ATF avaliado pela dureza de superfície e pelo cálculo de área de lesão podem ser esclarecidos pela porcentagem de volume mineral a cada distância da superfície dental (GRAF. 1). Em relação ao tratamento com DF, confirma-se sua eficácia em reduzir tanto a perda mineral de superfície como em toda extensão da lesão de cárie baseados nos mecanismos já descritos. Ao contrário da ausência de efeito anticariogênico do tratamento ATF+DP pela avaliação da perda de dureza na superfície e na área de lesão, através da porcentagem de volume por distância foi verificada redução da perda mineral na lesão, quando comparado ao controle (GRAF. 1). Esse efeito pode ser atribuído ao pré-tratamento com ATF, que permitiu formação de produtos por toda a extensão do esmalte avaliado (GRAF. 2, grupo ATF), os quais manifestaram poder anticariogênico. Esses produtos foram liberados tanto para a placa dental como para incorporar-se ao esmalte na forma de flúor fortemente ligado, o qual ficou retido em todo o esmalte (grupo ATF+DP versus DP). Observa-se o aumento da concentração de flúor em até aproximadamente 40 μm da superfície (GRAF. 2), que coincide com a redução da perda mineral verificada até 40 μm no tratamento ATF+DP, ao comparar com DP. Sugere-se que o flúor retido contribuiu para a redução da lesão de cárie, pois, como foi observado, ocorreu uma liberação de flúor do esmalte pré-tratado com ATF que se incorporou ao esmalte podendo aumentar a resistência aos desafios subseqüentes (TAKAGI *et al.*, 2000).

Em acréscimo, ATF associada ao DF permitiu redução significativa da perda mineral em toda lesão em relação ao tratamento ATF+DP (GRAF. 1). Esse maior efeito do tratamento ATF+DF pode ser explicado pelo efeito do flúor retido após ATF e pelo flúor presente na placa proveniente do DF (GRAF. 2, TAB. 6). Por outro lado, os tratamentos ATF+DF e DF não apresentaram diferença na redução da perda mineral na lesão de cárie, concordando com as outras análises. Essa ausência de diferença mostra que a associação de ATF+DF não apresenta efeito somatório em relação ao efeito isolado de DF. Duas hipóteses podem explicar esse efeito: o flúor do DF está contribuindo com seu efeito máximo ou o desafio cariogênico não foi suficiente para permitir o aumento do efeito quando os métodos são associados. O flúor do DF não apresentou efeito máximo evitando a desmineralização do esmalte, pois a % de volume mineral dos blocos pré-tratados com DF é menor do que do hígido ($p < 0,05$). Com isso, sugere-se que são necessários outros métodos complementares para o controle do desenvolvimento de cárie, que interfiram nos fatores responsáveis pela mesma (CURY, 2001).

Os dados referentes ao flúor incorporado ao esmalte (TAB. 5) demonstram em função da superfície e dos tratamentos realizados, que DF, ATF+DF e ATF+DP diferiram estatisticamente do DP à distância de $9,2 \pm 1,9 \mu\text{m}$ da superfície, porém, não diferiram entre si. Os blocos pré-tratados com ATF apresentaram perda de 34% após terem recebido tratamento com DP, o que mostra que ocorreu uma dissolução dos produtos formados no esmalte, e de 18% após DF, que sugere que o dentifício fluoretado reduziu a dissolução. Apesar da liberação do flúor após os tratamentos, não houve diferença entre ATF+DP e ATF+DF e DF. Além disso, ATF+DF e DF não diferiram entre si, pois tanto o flúor do

dentifício fluoretado foi eficaz na incorporação ao esmalte, como a ATF em reter o flúor no esmalte. Entretanto, não houve somatória de efeitos quando se compara ATF+DF e DF.

Nas outras duas distâncias, a $18,8 \pm 4,2 \mu\text{m}$ e $34,0 \pm 7,8 \mu\text{m}$ da superfície, os blocos que receberam ATF+DF e ATF+DP apresentaram maior concentração de flúor que DF, sendo que todos diferiram do DP. A concentração de flúor na segunda e na terceira camada mostra que ATF+DP não diferiu de DF e de ATF+DF. A alta concentração de flúor observada em até aproximadamente $40 \mu\text{m}$ da superfície é devido ao flúor retido após ATF, que em relação a ATF+DP foi eficaz na redução da perda mineral até $40 \mu\text{m}$, mostrando que esse flúor retido interferiu no processo de cárie (TAKAGI *et al.*, 2000). A maior concentração de flúor observada quando se associou ATF+DF em comparação ao DF é devido ao flúor retido após ATF e à presença de flúor do DF incorporado no esmalte na tentativa de impedir perda mineral da lesão, através dos processos de des e remineralização. Entretanto, essa maior concentração de flúor não mostrou efeito aditivo na redução da perda mineral da lesão de cárie.

Portanto, sugere-se que o aumento da frequência de exposição à sacarose está diretamente relacionado com o desenvolvimento inicial de cárie e com a sua progressão. Além disso, nenhum tratamento impediu totalmente o desenvolvimento da lesão de cárie. Os tratamentos DF e ATF+DF foram mais eficazes na redução da perda mineral, porém não foi observado efeito adicional quando os métodos foram associados. Sugere-se que métodos adicionais como desorganização da placa dental com escovação (THYLSTRUP, 1990; RÖLLA *et al.*, 1991) e diminuição do consumo de carboidratos fermentáveis (SHEIHAM,

1987; SHEIHAM, 2001) devem ser utilizados no controle do desenvolvimento da cárie como doença (CURY, 2001).

Em relação à análise da placa dental (TAB. 6), a concentração de flúor foi maior nos grupos que receberam DF e ATF+DF, sugerindo uma maior saturação da placa dental (LARSEN & BRUUN, 1994) na presença de flúor em baixas concentrações, o que explica a menor perda mineral na superfície e no interior da lesão. A concentração de flúor na placa dental formada sobre os blocos que receberam ATF+DP foi maior que no controle. Sugere-se que ocorreu liberação de flúor do esmalte, que foi verificado mesmo após 14 dias do pré-tratamento com ATF e tanto esse flúor liberado como o retido foram importantes na redução da lesão de cárie. Além disso, essa quantidade de flúor liberada na placa confirma que a ATF promoveu um rearranjo da superfície, e na ausência de DF não ocorreu uma compensação da liberação de flúor. Portanto, a concentração de flúor na placa dental pode explicar as reações ocorridas no esmalte.

Em relação ao cálcio presente na placa dental (TAB. 6), os resultados mostraram que os tratamentos DF e ATF+DF apresentaram maior concentração de cálcio na placa dental, quando comparados ao ATF+DP e DP. Sugere-se que flúor pode aumentar a retenção de cálcio na placa dental, reduzindo a afinidade de ligação do cálcio entre as bactérias e aumentando a capacidade de ligação pela ponte entre a bactéria e o flúor (ROSE *et al.*, 1996), o que explica a maior concentração de cálcio nesses tratamentos. Em acréscimo, os tratamentos ATF+DF e DF apresentaram diferença em relação a ATF+DP e DP na concentração de flúor e cálcio, porém não mostraram diferença em relação ao fósforo. Sugere-se que fósforo não está envolvido no mesmo mecanismo do cálcio e do

flúor, pois a concentração de fósforo não variou em função das concentrações de Ca e F. Sugere-se então que a hipótese da ligação F-Ca na bactéria pode explicar melhor a concentração desses íons na placa e formação de cristais tipo “CaF₂” na matriz da placa dental, que pelos cristais de F-Ca-P formados (CURY *et al.*, 2000). A concentração de polissacarídeo insolúvel não mostrou diferença entre os tratamentos, o que pode ser bem explicado pela não influência do flúor no metabolismo bacteriano responsável por sua formação.

Em relação à análise microbiológica da placa dental, a frequência de exposição à sacarose não interferiu na contagem de estreptococos totais e na porcentagem de estreptococos do grupo mutans (TAB. 3). Por outro lado, a frequência foi significativa no desenvolvimento de cárie e na concentração de polissacarídeo (GRAF. 3). Apesar de alguns estudos (DE STOPPELAAR *et al.*, 1970; STAAT *et al.*, 1975) mostrarem uma correlação positiva entre o aumento do consumo de açúcar e níveis de estreptococos mutans, CURY *et al.* (2001b) não encontraram diferenças no efeito da frequência de sacarose 4 e 8x/dia nos níveis de estreptococos mutans, porém observaram maior perda mineral 8x/dia. Outro estudo mostrou que a diferença na dieta entre populações não foi suficiente para afetar a contagem de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans, mas foi suficiente para mostrar diferença na prevalência de cárie (CARLSSON, 1989). Sugere-se que a frequência de sacarose não interfere no número de estreptococos mutans, porém outros fatores, como maior concentração de polissacarídeo, podem ser mais relevantes no processo de cárie, pois de acordo com ZERO *et al.* (1986b), o aumento da proporção de matriz extracelular em

relação à densidade de células está associado ao aumento da desmineralização, devido a alterações nas propriedades de difusão da placa dental.

Os resultados mostram uma maior porcentagem de estreptococos do grupo mutans no tratamento DP e DF e uma menor concentração no ATF+DP e ATF+DF (TAB. 7), estando de acordo com os estudos de LOESCH *et al.* (1973; 1975) que verificaram uma redução de aproximadamente 75% na porcentagem de *S. mutans* na placa dental interproximal e de 45-75% na placa dental oclusal após ATF.

A redução da porcentagem de estreptococos do grupo mutans observada quando os blocos receberam ATF não foi suficiente para impedir a formação de uma placa cariogênica e o desenvolvimento de cárie (GRAF. 4), sugerindo que o número de estreptococos mutans não está diretamente relacionado ao processo de cárie. De acordo com KRASSE *et al.* (1968) há uma baixa correlação entre prevalência de cárie e ocorrência de estreptococos associados à cárie. Em contrapartida, um experimento *in vitro* observou redução *S. mutans* e de cárie após ATF, sugerindo que o fluoreto de cálcio agiu diretamente no metabolismo bacteriano, reduzindo a produção de ácido e a aderência desses microrganismos à superfície dental pela alteração da superfície do esmalte (ZAHRADNIK *et al.*, 1978). Esse estudo está de acordo com os resultados obtidos em relação ao efeito da ATF na redução de estreptococos do grupo mutans, mas não na redução de cárie.

Essa redução na porcentagem de estreptococos do grupo mutans não permitiu na mesma proporção uma redução da perda mineral. Sugere-se que as mudanças ecológicas na placa dental pela exposição à sacarose aumentaram as proporções de microrganismos

patogênicos, aumentando a expressão de fatores de virulência (BURNE, 1998), permitindo o desenvolvimento de cárie mesmo em proporções menores. Em acréscimo, de acordo com MATTOS-GRANER *et al.* (2000), a habilidade de síntese de polissacarídeo extracelular é um fator de virulência importante para o desenvolvimento de cárie, possibilitando o aumento da aderência de estreptococos mutans e acúmulo de placa. Além disso, CURY *et al.* (2001b) sugerem que outros fatores, como estrutura e composição da placa dental, podem ser mais importantes do que o número de estreptococos do grupo mutans envolvidos no processo de cárie.

Portanto, o presente estudo confirmou que o aumento da frequência de consumo de açúcar é determinante de risco de cárie, pois interfere na cariogenicidade da placa dental através da diminuição da concentração de Ca e F e aumento da concentração de polissacarídeo e do desenvolvimento de lesões de cárie. DF apresentou maior eficácia que ATF+DP na redução da desmineralização do esmalte e no aumento da concentração de F e Ca na placa dental. Os tratamentos DF e ATF+DF foram eficazes na redução de perda mineral, entretanto, não foi observado efeito somatório da ATF+DF na redução do desenvolvimento de lesões iniciais de cárie e na progressão da lesão de cárie. Os resultados sugerem que a combinação de métodos (ATF+DF) não diminuiu a cariogenicidade da placa dental nem mesmo apresentou efeito adicional na redução da desmineralização do esmalte. Os resultados deste estudo sugerem que outras medidas preventivas devem ser usadas para o total controle da cárie como doença.

7. CONCLUSÃO

A combinação de uma única aplicação profissional de flúor e dentifrício fluoretado não diminui a cariogenicidade da placa dental e não apresenta efeito adicional na redução da desmineralização do esmalte, sugerindo que em adição ao uso de flúor, outras medidas para interferir nos fatores responsáveis pela doença devem ser simultaneamente utilizadas para seu controle completo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W.G. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Res**, Basel, v.14, p.190-195, 1980.

ADAIR, S.M. The role of fluoride mouthrinses in the control of dental caries: a brief review. **Pediatr Dent**, Chicago, v.20, n.2, p.101-104, 1998.

BAWDEN, J.W. Workshop report – group II: topical fluorides. **J Dent Res**, Washington, v.71, n.5, p.1221-1223, 1992.

BECK, J.D. Risk revisited. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26, p.220-225, 1998.

BEISWANGER, B.B. *et al.* Effect of an SnF₂-Ca₂P₂O₇ dentifrice and APF topical applications. **ASDC J Dent Child**, Chicago, v.45, p.33-37, 1978.

BENELLI, E.M. *et al.* *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res**, Basel, v.27, p.280-284, 1993.

BLINKHORN, A.S.; HOLLOWAY, P.J.; DAVIES, T.G.H. Combined effects of a fluoride dentifrice and mouthrinse on the incidence of dental caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.11, p.7-11, 1983.

BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.25, n.1, p.76-81, 1997.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BOWEN, W.H. *et al.* A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.100, p.677-681, 1980.

BOWEN, W.H. *et al.* The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat. *In*: LEACH, S.A.; EDGAR, W.M. **Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1986. p.243-250.

BRATTHALL, D.; HÄNSEL-PETERSSON, G.; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.104, p.416-422, 1996.

BROWN, L.M. *et al.* Effect of continuous fluoride gel use on plaque fluoride retention and microbial activity. **J Dent Res**, Washington, v.62, n.6, p.746-751, 1983.

BURNE, R.A. Oral streptococci... products of their environment. **J Dent Res**, v.77, n.3, p.445-452, 1998.

BURT, B.A. Relative consumption of sucrose and other sugars: has it been a factor in reduced caries experience? **Caries Res**, Basel, v.27, Supplement 1, p.56-63, 1993.

BURT, B.A.; PAI, S. Sugar consumption and caries risk: a systematic review. **J Dent Educ**, Washington, v.65, n.10, p.1017-1023, 2001.

CARLSSON, P. Distribution of mutans streptococci in populations with different levels of sugar consumption. **Scand J Dent Res**, Oslo, v.97, p.120-125, 1989.

CARLSSON, J. Effect of diet on the presence of *Streptococcus salivarius* in dental plaque and saliva. **Odontol Revy**, Lund, v. 16, p. 336-347, 1965.

ten CATE, J.M. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.105, p.461-465, 1997.

ten CATE, J.M. *et al.* Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization *in vitro*: a pH-cycling study. **Caries Res**, Basel, v.22, p.20-26, 1988.

CLARKSON, J.J.; HARDWICK, K.; BARMES, D. International collaborative research on fluoride. **J Dent Res**, Washington, v.79, n.4, p.893-904, 2000.

CLARKSON, J.J.; McLOUGHLIN, J. Role of fluoride in oral health promotion. **Int Dent J**, London, v.50, p.119-126, 2000.

CRUZ, R.; RÖLLA, G. The effect of time of exposure on fluoride uptake by human enamel from acidulated fluoride solutions *in vitro*. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.50, p.51-56, 1992.

CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. *In*: BARATIERI, L.N. *et al.* **Odontologia restauradora**. São Paulo: Santos, 2001. p.33-68.

CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, Basel, v.31, n.5, p.356-360, 1997.

CURY, J.A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, Basel, v.34, p.491-497, 2000.

CURY, J.A. *et al.* Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an *in situ* study. **Caries Res**, Basel, v.35, p.106-110, 2001a.

CURY, J.A. *et al.* *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.12, n.2, p.101-104, 2001b.

DE STOPPELAAR, J.D.; VAN HOUTE, J.; BACKER DIRKS, O. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. **Caries Res**, Basel, v.4, p.114-123, 1970.

DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. **Am J Dent**, San Antonio, 2002. *In press*.

DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.6, p.890-895, 1988.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.

DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.23, p.779-786, 1978.

DUGGAL, M.S. *et al.* Enamel demineralization *in situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J Dent Res**, Washington, v.80, n.8, p.1721-1724, 2001.

EDWARDSSON, S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.13, p.637-646, 1968.

ERONAT, C.; ERONAT, N.; ALPOZ, A.R. Fluoride uptake by enamel *in vitro* following application of various topical fluoride preparations. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v.17, n.4, p.227-230, 1993.

FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.27, p.31-40, 1999.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res**, Basel, v.17, p.385-391, 1983.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: LEACH, S.A.; EDGAR, W.M. **Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1986. p.243-250.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Remineralization of artificial caries-like lesions *in vivo* by a self-administered mouthrinse or paste. **Caries Res**, Basel, v.16, p.235-242, 1982.

FEJERSKOV, O.; THYSLTRUP, A.; LARSEN, M.J. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on the possible cariostatic mechanisms. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 39, p. 241-249, 1981.

FISKE, C.H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. **J Biol Chem**, Bethesda, v.66, p.375-400, 1925.

FORSS, H. *et al.* Fluoride and mutans streptococci in plaque grown on glass ionomer and composite. **Caries Res**, Basel, v.25, p.454-458, 1991.

FROSTELL, G. *et al.* Effect of partial substitution of invert sugar for sucrose in combination with Duraphat treatment on caries development in preschool children: the Malmö study. **Caries Res**, Basel, v.25, p.304-310, 1991.

FUSHIDA, C.E.; CURY, J.A. Estudo *in situ* da freqüência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.2, p.127-134, 1999.

GALAGAN, D.J.; VERMILLION, J.R. Determining optimum fluoride concentrations. **Public Health Rep**, Washington, v.72, p.491-493, 1957.

GAVAZZI, J.C. *et al.* Previsores do incremento de cárie em crianças escolares brasileiras. **Rev Assoc Cir Dent**, São Paulo, v.49, n.1, p.40-46, 1995.

GEIGER, A.M. *et al.* The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, Saint Louis, v.93, n.1, p.29-37, 1988.

GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.18, n.2, p.1357-1364, 1973.

GUGGENHEIM, B. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. **Helv Odontol Acta**, Zurich, v.14, p.89-108, 1970.

GUSTAFSSON, B.F. *et al.* The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.11, p.195-388, 1954.

HAMILTON, I.R.; BOWDEN, G.H. Effect of fluoride on oral microorganisms. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O.; SILVERSTONE, L.M. **Fluoride in dentistry**. Copenhagen : Munksgaard, 1988. p.77-103.

HAUSEN, H. Caries prediction – state of the art. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.25, p.87-96, 1997.

HAUSEN, H.; KÄRKKÄINEN, S.; SEPPÄ, L. Application of the high-risk strategy to control dental caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.28, p.26-34, 2000.

HEBLING, J.; SANTOS-PINTO, L.M.; CURY, J.A. Formação “in vitro” de fluoreto de calico sobre esmalte hígido, em função do tempo de aplicação de fluoreto acidulado. **Rev Bras Odont**, Rio de Janeiro, v.52, n.4, p.30-35, 1995.

IGNÁCIO, R.F.; PERES, P.E.C.; CURY, J.A. Efeito de um dentifrício fluoretado contendo bicarbonato de sódio na contagem de estreptococos do grupo mutans, acidogenicidade e composição da placa dental. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.1, p.43-49, 1999.

JOHNSTON, D.W.; LEWIS, D.W. Three-year randomized trial of professionally applied topical fluoride gel comparing annual and biannual applications with/without prior prophylaxis. **Caries Res**, Basel, v.29, p.331-336, 1995.

JONES, B.; KENWARD, C. **Design and analysis of cross-over trials**. London: Chapman & Hall, 1989.

KASTE, L.M. *et al.* Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age: United States, 1988-1991. **J Dent Res**, Washington, v.75, p.631-641, 1996.

KEYES, P.H. Recent advances in dental research. Bacteriology. **Int Dent J**, London, v.12, n.4, p.443-464, 1962.

KÖNIG, K.G. Role of fluoride toothpastes in a caries-preventive strategy. **Caries Res**, Basel, v.27, Supplement 1, p.23-28, 1993.

KONIG, K.G.; SCHIMID, P.; SCHMID, R. An apparatus for frequency-controlled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.13, p.13-26, 1968.

KOO, H.R.; CURY, J.A. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. **Am J Dent**, San Antonio, v.11, n.4, p.173-176, 1998.

KOULOURIDES, T.; HOUSCH, T. Hardness testing and microradiography of enamel in relation to intra-oral de- and remineralization. *In*: LEACH, S.A.; EDGAR, W.M. **Demineralisation and remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1983. p.255-272.

KRASSE, B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.11, p.429-436, 1966.

KRASSE, B. *et al.* The occurrence of certain "caries-inducing" streptococci in human dental plaque material with special reference to frequency and activity of caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.13, p.911-918, 1968.

LARSEN, M.J.; BRUNN, C. Caries chemistry and fluoride – mechanism of action. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Textbook of clinical cariology**. Copenhagen: Munksgaard, 1994. p.231-237.

LARSEN, M.J.; RICHARDS, A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. **Caries Res**, Basel, v.35, p.57-60, 2001.

LAZARI, E.P. **Dental biochemistry**. 2nd ed. London: Lea & Febiger, 1976.

LECOMPTE, E.J. Clinical application of topical fluoride products – risks, benefits and recommendations. **J Dent Res**, Washington, v.66, n.5, p.1066-1071, 1987.

LOESCHE, W.J. The rationale for caries prevention through the use of sugar substitutes. **Int Dent J**, London, v.35, p.1-8, 1985.

LOESCHE, W.J.; MURRAY, R.J.; MELLBERG, J.R. The effect of topical acidulated fluoride on percentage of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in interproximal plaque samples. **Caries Res**, Basel, v.7, p.283-296, 1973.

LOESCHE, W.J. *et al.* Effect of topical acidulated phosphate fluoride on percentage of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in plaque. **Caries Res**, Basel, v.9, p.139-155, 1975.

MACPHERSON, L.M.D.; MACFARLANE, T.W.; STEPHEN, K.W. An intra-oral appliance study of the plaque microflora associated with early enamel demineralization. **J Dent Res**, Washington, v.69, n.11, p.1712-1716, 1990a.

MACPHERSON, L.M.D. *et al.* The effect of sucrose application and implantation of mutans streptococci on the microbial composition of three-week experimental plaque – an *in situ* study. **J Dent Res**, Washington, v.69, p.1706-1711, 1990b.

MAINWARING, P.J.; NAYLOR, M.N. A three-year clinical study to determine the separate and combined caries-inhibiting effects of sodium monofluorophosphate toothpaste and an acidulated phosphate-fluoride gel. **Caries Res**, Basel, v.12, p.202-212, 1978.

MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. **J Dent Res**, Washington, v.71, n.11, p.1776-1784, 1992.

MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.606-613, 1990.

MARGOLIS, H.C.; DUCKWORTH, J.H.; MORENO, E.C. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.12, p.1468-1475, 1988.

MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, Washington, v.8, n.2, p.263-271, 1994.

MARSH, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. **Adv Dent Res**, Washington, v.9, n.3, p.244-254, 1995.

MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities *in vitro*. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.668-671, 1990.

MARTHALER, T.M. Cariostatic efficacy of the combined use of fluorides. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.797-800, 1990.

MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old brazilian children. **Caries Res**, Basel, v.32, n.5, p.319-323, 1998.

MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dent Health**, London, v.13, p.96-98, 1996.

MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J Dent Res**, Washington, v.79, n.6, p.1371-1317, 2000.

MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. **J Dent Res**, Washington, v.71, Special Issue, p.913-919, 1992.

MESKIN, L.H. Caries diagnosis and risk assessment: a review of preventive strategies and management. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.126, Supplement, p.15-245, 1995.

MILNES, A.R. Description and epidemiology of nursing caries. **J Public Health Dent**, Richmond, v.56, n.1, p.38-50, 1996.

MORENO, E.C. Role fo Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. **Int Dent J**, London, v.43, p.71-80, 1993.

MURRAY, J.J. **Appropriate use of fluorides for human health: topical fluorides**. Geneva, 1986. 131p.

MURRER, R.D.; DECICO, H.M.; CURY, J.A. Efeito de dentifrício fluoretado no desenvolvimento de cárie secundária- Estudo *in situ*. **Ans Soc Bras Pesqui Odontol**, São Paulo, v.11, p.12, 1994. Resumo, 019.

NARVAI, P.C.; CASTELLANOS, R.A. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Estado de São Paulo, 1998. **J COSEMS**, São Paulo, ano 1, n.7, p.4, 1999.

NARVAI, P.C.; FRAZÃO, P.; CASTELLANOS, R.A. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. **Odontol Soc**, São Paulo, v.1, n.1/2, p.25-29, 1999.

NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **Odontol Revy**, Lund, v.18, p.373-386, 1967.

NOBRE DOS SANTOS, M.; CURY, J.A. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. **Caries Res**, Basel, v.22, n.5, p.316-317, 1988.

NOBRE DOS SANTOS, M.; KOO, H.; CURY, J.A. Evaluación *in situ* de la incorporación de flúor y remineralización del esmalte dental con un dentífrico brasileiro fluorado comercializado para niños. **Rev Fola Oral**, São Paulo, v.4, n.12, p.110-114, 1998.

ØGAARD, B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res**, Basel, v. 35, n.1, p. 40-44, 2001.

ØGAARD, B.; SEPPÄ, L.; RØLLA, G. Professional topical fluoride applications – clinical efficacy and mechanism of action. **Adv Dent Res**, Washington, v.8, n.2, p.190-201, 1994.

ØGAARD, B. *et al.* Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.96, p.209-211, 1988.

O'REILLY, M.M.; FEATHERSTONE, J.D.B. Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an *in vivo* study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, Saint Louis, v.92, n.1, p.33-40, 1987.

PAES LEME, A.F. *et al.* Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions *in vitro*. **Am J Dent**, San Antonio, 2002. *In press*.

PEARCE, E.I. Relationship between demineralization events in dental enamel and the pH and mineral content of plaque. **Proc Finn Dent Soc**, Helsinki, v.87, n.4, p.527-539, 1991.

PEREIRA, A.C.; CUNHA, F.L.; MENEGHIM, M.C. Prevalência de cárie dentária e fluorose em escolares de áreas fluoretadas e não fluoretadas. **Ans Soc Bras Pesqui Odontol**, São Paulo, v.15, p.125, 1998. Resumo, 081.

PITTS, N.B. Risk assessment and caries prediction. **J Dent Educ**, Washington, v.62, p.762-770, 1998.

POWELL, L.V. Caries prediction: a review of the literature. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26, p.361-371, 1998.

RIPA, L.W. An evaluation of the use of professional (operator-applied) topical fluorides. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.786-796, 1990.

RIPA, L.W. *et al.* Effect of prior toothcleaning on bi-annual professional acidulated phosphate fluoride topical fluoride gel-tray treatments. **Caries Res**, Basel, v.18, n.5, p.457-464, 1984.

RODRIGUES, C.S.; SHEIHAM, A. The relationship between dietary guidelines, sugar intake and caries in primary teeth in low income Brazilian 3-year-olds: a longitudinal study. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v.10, n.1, p.47-55, 2000.

RÖLLA, G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.46, p.341-345, 1988.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.97, p.115-119, 1989.

RÖLLA, G.; ØGGARD, B.; CRUZ, R.A. Clinical effect and mechanism of cariostático action of fluoride-containing toothpastes: a review. **Int Dent J**, v. 41, n.3, p. 171-174, 1991.

RÖLLA, G.; SAXEGAARD, E. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.780-785, 1990.

RÖLLA, G.; CIARDI, J.E.; SCHULTZ, S.A. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite. Possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.91, p.112-117, 1983.

RÖLLA, G.; SCHEIE, A.A.; CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.93, p.105-111, 1985.

ROSALEN, P.L.; BOWEN, W.H.; PEARSON, S.K. Effect of copper co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.30, p.367-372, 1996.

ROSE, R.K.; SHELLIS, R.P.; LEE, A.R. The role of cation binding in microbial fluoride binding. **Caries Res**, Basel, v.30, p.458-464, 1996.

SAXEGAARD, E.; RÖLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application *in vitro*. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.96, p.523-535, 1988.

SCHEIE, A.A. *et al.* Microbial composition, pH-depressing capacity and acidogenicity of 3-week smooth surface plaque developed on sucrose-regulated diets in man. **Caries Res**, Basel, v.18, n.1, p.74-86, 1984.

SCHEINEN, A.; MAKINEN, K.K.; YLITALO, K. Turku sugar studies. V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.34, p.179-216, 1976.

SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Resolução SS-95, de 27/06/2000. Recomendações sobre o uso de produtos fluorados no âmbito do SUS/SP em função do risco de cárie dentária [on line]. Disponível em URL: http://www.saude.sp.gov.br/html/fr_sbucal.htm[2001ago21].

SEPPÄ, L.; TOLONEN, T. Caries preventive effect of fluoride varnish applications performed two or four times a year. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.98, p.102-105, 1990.

SHEIHAM, A. Dietary effects on dental diseases. **Public Health Nutr**, Wallingford, v.4, n.2B, p.569-591, 2001.

SHEIHAM, A. Sucrose and dental caries. **Nutr Health**, Berkhamsted, v.5, n.1/2, p.25-29, 1987.

SHEIHAM, A. Why free sugars consumption should be below 15 kg per person per year in industrialized countries: the dental evidence. **Br Dent J**, London, v.20, p.63-65, 1991.

STAAT, R.H. *et al.* Effect of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. **J Dent Res**, Washington, v.54, n.4, p.872-880, 1975.

STAMM, J.W. *et al.* Risk assessment for oral diseases. **Adv Dent Res**, Washington, v.5, p.4-17, 1991.

STOOKEY, G.K. *et al.* The effect of rinsing with water immediately after a professional fluoride gel application in fluoride uptake in demineralized enamel. An *in vitro* study. **Pediatr Dent**, Chicago, v.8, p.153-157, 1986.

SVANBERG, M.; KRASSE, B.; ÖRNERFELDT, H.O. Mutans streptococci in interproximal plaque from amalgam and glass ionomer restorations. **Caries Res**, Basel, v.24, p.133-136, 1990.

TABCHOURY, C.M.; HOLTT, T.; BOWEN, W.H. The effects of fluoride concentration and the level of cariogenic challenge on the caries development in desalivated rats. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.43, p.917-924, 1998.

TAKAGI, S.; LIAO, H.; CHOW, L.C. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization *in vitro*. **Caries Res**, Basel, v.34, p.281-288, 2000.

TANZER, J.M. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. **J Dent Res**, Washington, v. 68, Special Issue, p.1576-1587, 1989.

TANZER, J.M. *et al.* Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, Washington, v.10, p.197-203, 1974.

THYSLTRUP, A. Clinical evidence of the role of pre-eruptive fluoride in caries prevention. **J Dent Res**, Washington, v. 69, Special Issue, p. 742-750, 1990.

TINANOFF, N. Dental caries risk assessment and prevention. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v.39, n.4, p.709-719, 1995.

TINANOFF, N.; PALMER, C.A. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. **J Public Health Dent**, Richmond, v.60, n.3, p.197-209, 2000.

VAN DIJKEN, J.W.V. *et al.* Fluoride and mutans streptococci levels in plaque on aged restorations of resin-modified glass ionomer cement, compomer and resin composite. **Caries Res**, Basel, v.31, p.379-383, 1997.

VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Adv Dent Res**, Washington, v.7, n.2, p.87-96, 1993.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**, Washington, v.73, n.3, p.672-681, 1994.

VAN LOVEREN, C. Antimicrobial activity of fluoride and its *in vivo* importance: identification of research questions. **Caries Res**, Basel, v.35, Supplement 1, p.65-70, 2001.

VAN LOVEREN, C. The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.676-681, 1990.

VAN LOVEREN, C.; BUIJS, J.F.; ten CATE, J.M. Protective effect of topically applied fluoride in relation to fluoride sensitivity of mutans streptococci. **J Dent Res**, Washington, v.72, n.8, p.1184-1190, 1993.

VAN RIJKOM, H.M.; TRUIN, G.J.; VAN 'T HOF, M.A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. **Caries Res**, Basel, v.32, p.83-92, 1998.

VAN STRIJP, A.J.P.; VAN STEENBERGEN, T.J.M.; ten CATE, J.M. Effects of chlorhexidine on the bacterial colonization and degradation of dentin and completely demineralized dentin *in situ*. **Eur J Oral Sci**, v. 105, p. 27-35, 1997.

VARSIO, S.; VEHKALAHTI, M. Evaluation of preventive treatment by risk of caries among 13-year-olds. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.24, p.277-281, 1996.

VEHKALATI, M.; RYTOMAA, I.; HELMINEN, S. Decline dental caries and public oral health care adolescents. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.49, p.320-328, 1991.

VON DER FEHER, F.R.; LÖE, H.; THEILADE, E. Experimental caries in man. **Caries Res**, Basel, v.4, n.2, p.131-148, 1970.

WEI, S.H.Y.; YIU, C.K.Y. Evaluation of the use of topical fluoride gel. **Caries Res**, Basel, v.27, Supplement 1, p.29-34, 1993.

WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effect on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res**, Basel, v.21, p.126-140, 1987.

WHITE, D.J.; FEATHERSTONE, J.D.B. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression *in vivo*. **Caries Res**, Basel, v.21, p.502-512, 1987.

WHITE, D.J.; NANCOLLAS, G.H. Physical and chemical considerations of the role of firmly and loosely bound fluoride in caries prevention. **J Dent Res**, Washington, v.69, Special Issue, p.587-594, 1990.

YOSHIHARA, A. *et al.* Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva. **Pediatr Dent**, Chicago, v.23, n.2, p.113-117, 2001.

ZAHRADNIK, R.T.; PROPAS, D.; MORENO, E.C. Effect of fluoride topical solutions on enamel demineralization by lactate buffers and *Streptococcus mutans in vitro*. **J Dent Res**, Washington, v.57, n.9/10, p.940-946, 1978.

ZERO, D.T. *In situ* caries models. **Adv Dent Res**, Washington, v.9, n.3, p.214-230, 1995.

ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.31, n.4, p.229-234, 1986a.

ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, Washington, v.65, n.6, p.918-923, 1986b.

ZERO, D.T. *et al.* An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res**, Washington, v.71, Special Issue, p.871-878, 1992a.

ZERO, D.T. *et al.* Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. **J Dent Res**, Washington, v.71, n.11, p.1768-1775, 1992b.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
CEP-FOP-UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "estudo *in situ* do efeito da associação de métodos de utilização de flúor no desenvolvimento de cárie em função do desafio cariogênico", sob o protocolo nº **15/2000**, do(a) Pesquisador(a) **Adriana Franco Paes Leme** sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Jaime Aparecido Cury**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 05 de abril de 2000

We certify that the research project with title "*in situ* study of the effect of an association of measures to use fluoride on caries development as a function of cariogenic challenge", protocol nº **15/2000**, by Researcher **Adriana Franco Paes Leme**, responsibility by Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, April 05 2000

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO 2

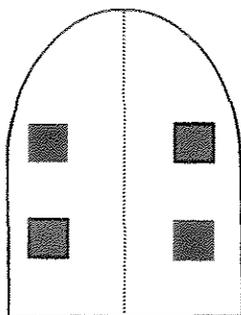
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA APLICAÇÃO TÓPICA PROFISSIONAL DE FLÚOR E DENTIFRÍCIO FLUORETADO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA PLACA DENTAL *IN SITU*

Instruções aos voluntários

- 1- O estudo será dividido em 04 etapas. Sendo cada etapa de 14 dias e com um intervalo de 10 dias entre elas, de acordo com o cronograma abaixo:
 - A) 1ª etapa : 06/08/00 a 19/08/00
 - B) 2ª etapa : 06/09/99 a 19/09/00
 - C) 3ª etapa : 06/10/00 a 19/10/00
 - D) 4ª etapa : 06/11/00 a 19/11/00
- 2- Ao final de todas as fases os voluntários terão recebido os seguintes tratamentos:
Tratamento 1: Dentifrício placebo
Tratamento 2: Dentifrício fluoretado
Tratamento 3: Aplicação tópica profissional de flúor+ dentifrício placebo
Tratamento 4: Aplicação tópica profissional de flúor + dentifrício fluoretado
- 3- A água ingerida deverá ser necessariamente de abastecimento público de Piracicaba.
- 4- Durante o período do experimento e 10 dias antes de cada etapa, não utilizar nenhum produto contendo flúor, exceto água.
- 5- Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados todo o dia, inclusive para dormir, exceto durante as refeições e higiene oral, sendo nesses períodos os aparelhos

acondicionados na caixa plástica fornecida, contendo no seu interior um algodão umedecido.

- 6- A aplicação do gel flúor fosfato acidulado 1,23% F (ATF) será feita no início de cada etapa sendo que será distribuído em moldeiras descartáveis, posicionadas sobre as arcadas dentárias. Após 4 minutos serão retiradas as moldeiras e o paciente irá expelir o excesso de gel por no mínimo 30 segundos. O voluntário não deverá ingerir nenhum alimento nem água nos 30 minutos seguintes. Após 30 minutos (tempo para simular o efeito do flúor residual na saliva) o dispositivo intraoral será novamente removido com a finalidade de posicionar a tela plástica sobre as cavidades contendo os blocos dentários. A tela plástica será fixada com resina. Finalizado esse procedimento o dispositivo intrabucal será instalado e utilizado por 14 dias.



- Gotejar sacarose 20% por 4 x ao dia
- Gotejar sacarose 20% por 8x ao dia

- 7- A escovação habitual deverá ser feita apenas com o dentifrício fornecido por nós. Os dispositivos devem ser higienizados, escovando-os somente na parte que fica em contato com o palato. Os voluntários deverão gotejar uma suspensão de dentifrício (1:3)

sobre os blocos três vezes ao dia durante a escovação, o mesmo utilizado para escovação.

- 8- Será fornecida solução de sacarose 20% em frasco conta-gotas. O voluntário deverá gotear sacarose 8x/dia sobre os blocos que apresentarem resina acrílica vermelha e 4x/dia sobre os blocos que apresentarem resina acrílica incolor e esperar 05 minutos e colocá-lo na boca. O gotejamento 4x ao dia deverá ser feito às 8:00, 11:00, 15:30, 19:00 e 8x ao dia deverá ser feito às 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00, e 21:00.

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do voluntário: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Adriana Franco Paes Leme (aluna de mestrado na Área de Cariologia), Prof. Dr. Jaime A. Cury (Orientador) e Prof^a Dra. Altair A. Del Bel Cury objetivando firmar acordo escrito mediante o qual o voluntário da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1-Título do Trabalho Experimental

Efeito da associação da aplicação tópica profissional de flúor e dentifrício fluoretado na desmineralização do esmalte e na composição bioquímica e microbiológica da placa dental *in situ*.

2-Objetivo

Avaliar a efetividade da associação de métodos de usar flúor considerando o risco de cárie em termos de frequência de uso de sacarose.

3-Justificativa

Embora tenha havido mundialmente, inclusive no Brasil, uma expressiva redução de cárie dental, grupos de crianças continuam apresentando alta atividade da doença. O ideal seria identificar estes grupos em termos de risco de cárie para adotar medidas para o controle da doença. Entretanto, até o momento não há nenhum indicador de risco confiável.

Uma das razões para esta alta atividade de cárie seria o alto consumo de açúcar. Em condições de alto risco ou atividade de cárie tem sido sugerida a associação de métodos de usar flúor com intervenção profissional. Por outro lado, o flúor interfere com a progressão de doença e não com fatores responsáveis pela mesma. Assim, o objetivo deste trabalho será avaliar a efetividade da associação de métodos de usar flúor considerando o risco de cárie em termos de frequência de uso de sacarose.

4-Procedimento da fase experimental

O estudo *in situ* será do tipo cruzado, consistindo de quatro fases de 14 dias, em que participarão 16 voluntários adultos utilizando dispositivos intra-orais contendo blocos de esmalte bovino, divididos aleatoriamente em tratamentos:

Tratamento 1: Dentifrício placebo (DP)

Tratamento 2: Dentifrício fluoretado (DF)

Tratamento 3: Aplicação tópica profissional de flúor+ dentifrício placebo (ATF+DP)

Tratamento 4: Aplicação tópica profissional de flúor + dentifrício fluoretado (ATF+DF)

Será realizado um pré-tratamento com ATF nos blocos de esmalte e dentifrício fluoretado ou não será utilizado diariamente durante o experimento de acordo com o delineamento feito. Em acréscimo, os voluntários gotejarão sobre os blocos uma suspensão de dentifrício (1:3) no ato da escovação. Solução de sacarose a 20% será gotejada quatro vezes ao dia em dois dos quatro blocos e oito vezes ao dia, nos outros dois blocos para simular o desafio cariogênico. Será feito um intervalo de 10 dias entre os tratamentos para eliminar possível efeito residual dos mesmos. Ao final de cada fase de 14 dias, os blocos serão removidos dos dispositivos e avaliada a porcentagem de perda de dureza de superfície, extensão da lesão de cárie através da microdureza do esmalte seccionado

longitudinalmente e concentração de flúor no esmalte e análise bioquímica e microbiológica na placa dental.

5- Desconforto ou riscos esperados e benefícios

Os voluntários poderão apresentar discreta halitose durante o período experimental, o que poderá ser atenuado com adequada higiene bucal bem como limpeza do dispositivo. O uso da sacarose será apenas como gotas sobre os blocos de esmalte presentes nos dispositivos intra-orais, não implicando em qualquer aumento de cárie dental nos voluntários. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Os voluntários utilizarão durante o período da pesquisa dentifrício fluoretado ou não de acordo com o tratamento. Serão orientados a realizarem uma melhor higiene bucal e, além disso, eles continuarão ingerindo água de abastecimento de Piracicaba, que é fluoretada. Em adição, os voluntários são altamente conscientizados por serem estudantes de Odontologia e entenderem a importância deste trabalho. O benefício será um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto e para a ciência como um todo.

6- Forma de acompanhamento e assistência

Haverá aconselhamento quanto ao consumo de açúcar e melhora da higienização bucal. Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para qualquer ajuste no aparelho intra-oral a fim de minimizar qualquer desconforto.

7- Garantia de esclarecimentos

O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Também os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intra-oral, por favor comunicar-nos com a maior brevidade possível.

Tel: 430-5303 (Laboratório de Bioquímica)

434-4869 (Profª. Cíntia)

433-4736 (Profª. Altair/Prof. Jaime)

434-0815 (Adriana)

8- Retirada do consentimento

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

9- Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

10- Formas de ressarcimento

Como a remoção dos blocos de esmalte deve ser feita em jejum, será oferecido um café da manhã. Os voluntários serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte para a retirada dos blocos dentais contidos nos dispositivos.

11- Formas de indenização

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Eu _____, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pela aluna de mestrado Adriana Franco Paes Leme, Prof. Dr. Jaime A. Cury (Orientador) e Prof^a Dra. Altair A. Del Bel Cury, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

Piracicaba, ____ de fevereiro de 2000

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

1^a via : Instituição

2^a via: Voluntário