RENATA VALVANO CEREZETTI

POTENCIAL ANTICÁRIE DE MEIOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA PROFISSIONAL DE FLUORETO

ANTICARIES POTENTIAL OF PRODUCTS FOR PROFESSIONAL TOPICAL FLUORIDE APPLICATION

PIRACICABA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

RENATA VALVANO CEREZETTI

POTENCIAL ANTICÁRIE DE MEIOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA PROFISSIONAL DE FLUORETO

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna, e orientada pela Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

_____
Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C334p

Cerezetti, Renata Valvano, 1979-
Potencial anticárie de meios para aplicação tópica profissional de fluoreto / Renata Valvano Cerezetti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Livia Maria Andaló Tenuta.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Flúor. 3. Desmineralização. I. Tenuta, Livia Maria Andaló, 1976- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anticaries potential of products for professional topical fluoride application
Palavras-chave em Inglês:
Dental caries
Fluorine
Demineralization
Área de concentração: Odontopediatria
Titulação: Doutora em Odontologia
Banca examinadora:
Livia Maria Andaló Tenuta [Orientador]
Carlos Alberto Feldens
Branca Heloísa de Oliveira Martins Vieira
Silvia José Chedid
Marines Nobre dos Santos Uchoa
Data da defesa: 16-02-2012
Programa de Pós-Graduação: Odontologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 16 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata RENATA VALVANO CEREZETTI aprovada.

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO FELDENS

Profa. Dra. BRANCA HELOÍSA DE OLIVEIRA MARTINS VIEIRA

Profa. Dra. SILVIA JOSÉ CHEDID

Profa. Dra. MARINES NOBRE DOS SANTOS UCHOA

À **Deus** e aos **meus pais**, por estarem sempre presentes em minha vida. Instruindo sempre meus passos com muito amor e sabedoria. Por toda oportunidade dada.

Ao meu marido, **Valdemir dos Santos**, pela ajuda, compreensão e amor em todos os momentos.

Ao meu irmão **Fernando** e minha cunhada **Karina**,
por fazerem parte deste trabalho com muito amor.

Meu eterno agradecimento, que Deus os abençoe sempre.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**, por ter sido minha orientadora durante a minha pós-graduação, responsável pela minha formação científica, exemplo de dedicação à docência. Obrigada por sempre me incentivar a superar os limites, através das exigências na busca do conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante a pós-graduação, também responsável pela minha formação científica, exemplo de ética e docência.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, pelos ensinamentos transmitidos e pela colaboração inesgotável durante o experimento.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (Processo no 2008/01727-3; vigência da bolsa: 01/07/2008 a 30/06/2011) **e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** (vigência da bolsa: 01/09/2011 a 16/02/2012), pela contribuição ao estudo por meio da bolsa, sem as quais a realização desse trabalho não seria possível.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury**, a quem agradeço também pelos ensinamentos transmitidos durante a Pós-Graduação.

As **professoras da Área de Odontopediatria**, **Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos, Profa. Dra. Regina Maria Puppin Rontani** por terem me recebido desde o primeiro momento com muito carinho, engrandecendo minha vida profissional. Em especial a **Profa.**

Dra. Cecília Gatti Guirado (In memoriam) por toda amizade e incentivo a vida acadêmica dada.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pela dedicação a docência.

Aos **voluntários** que participaram desta pesquisa, pelo senso de cooperação, desprendimento e dedicação.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP/UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva** e a secretária **Maria Elisa dos Santos**, pela atenção e prontidão em ajudar.

Aos meus **colegas da Pós-Graduação da Odontopediatria e da Bioquímica** pelos momentos passados.

As minhas **amigas, Karla Evelyn, Lívia Helena, Amanda, Nádia, Alhethea e Tais Barbosa** pela amizade e pelos bons momentos passados.

A todas as demais pessoas que foram importantes para a execução do trabalho.

RESUMO

O efeito anticárie da aplicação tópica profissional de fluoreto (ATPF) tem sido associado à formação do mineral tipo fluoreto de cálcio ("CaF_2") na estrutura dental. Entretanto, os diferentes produtos para ATPF existentes variam em concentração de fluoreto, pH e veículo, o que poderia resultar em diferentes reatividades com o esmalte dental e efeito anticárie. Objetivando avaliar a reatividade de produtos comerciais com o esmalte dental e seu efeito anticárie, foram delineados dois estudos. O primeiro teve por objetivo testar *in vitro* a reatividade de produtos para ATPF com o esmalte humano e bovino, já que este tem sido usado como substituto do humano em pesquisas odontológicas. No segundo, o efeito anticárie dos produtos para ATPF foi avaliado utilizando um modelo *in situ* de curta duração. No estudo *in vitro* (cego), blocos de esmalte humano e bovino foram tratados com: Controle (sem tratamento), gel de fluoreto de sódio (NaF) a 2% neutro (0,9% F); gel de F fosfato acidulado (FFA) (1,23% F) ou FFA espuma. A concentração de "CaF_2" (µg F/cm^2) inicialmente presente (controle) e formado nos blocos de esmalte humano (0,2±0,0; 1,1±0,4; 4,2±1,0; 2,7±1,3, para os grupos descritos acima, respectivamente) foi significativamente menor ($p<0,05$) do que no bovino (0,3±0,0; 3,5±0,9; 30,2±18,9; 18,2±3,8, respectivamente), com diferenças significativas entre todos os grupos ($p<0,05$). No esmalte humano, os tratamentos não foram capazes de aumentar a concentração de fluorapatita em relação ao controle ($p>0,05$), porém no bovino essa concentração aumentou seguindo a mesma tendência de reatividade observada para o "CaF_2". Os resultados sugerem que ambos os substratos podem ser usados em estudos de reatividade do fluoreto, porém o esmalte bovino é mais reativo. No estudo *in situ,* cruzado e duplo cego, blocos de esmalte bovino foram tratados com os mesmos produtos acima descritos, além de um verniz de NaF a 5% (2,25% F) e de um verniz bifluoretado (NaF a 6% + CaF_2 a 6%, 5,6% F). Após ATPF, metade dos blocos foi exposto à saliva artificial por sete dias. Em seis fases experimentais, 12 voluntários utilizaram um dispositivo palatino contendo oito blocos de esmalte (quatro recém-tratados e quatro expostos à saliva), com dureza

de superfície (DS) pré-determinada, cobertos por uma 'placa teste' de *S. mutans* IB1600. A liberação de F para o fluido da 'placa teste' a partir da dissolução do "CaF_2" formado/retido, determinada após 30 min de uso do dispositivo, indicou menores concentrações de F após exposição à saliva em relação aos grupos recém-tratados ($p<0,05$). Nos blocos submetidos a um desafio cariogênico *in situ* com solução de sacarose a 20%, todos os grupos tratados com F foram capazes de diminuir a porcentagem de perda de DS (%PDS) em relação ao controle ($p<0,05$), mesmo após exposição à saliva por sete dias. Após a ATPF, a menor %PDS foi observada para os grupos vernizes F e FFA; após exposição à saliva artificial, a menor %PDS foi observada para os vernizes F ($p<0,05$). Os resultados sugerem que todos os produtos fluoretados são capazes de diminuir a desmineralização do esmalte, mesmo sete dias após a aplicação.

Palavras-chave: Fluoreto, Fluoreto de cálcio, Aplicação tópica de Fluoreto

ABSTRACT

The anticaries effect of professional topical fluoride application (PTFA) has been associated with the formation of a calcium fluoride-like mineral ("CaF_2") on the tooth structure. However, there are different products commercially available for PTFA, with different concentrations, pH and vehicles, which can distinctly react with enamel and present distinct anticaries potentials. To evaluate the reactivity of commercial products with dental enamel and their anticaries effect, two studies were conducted. Since bovine enamel has been used as a substitute of human enamel in dental research, the first study (blind design) aimed to test the *in vitro* reactivity of human and bovine enamel with PTFA products. Blocks of human and bovine enamel were treated with: Control (untreated), 2% sodium fluoride (NaF) gel (0.9% F), acidulated phosphate fluoride (APF) gel (1.23% F) or APF foam. The concentration of "CaF_2" (µg F/cm^2) formed on the human blocks (0.2±0.0; 1.1±0.4; 4.2±1.0; 2.7±1.3, for the groups mentioned above, respectively) was significantly lower ($p<0.05$) than on bovine blocks (0.3±0.0; 3.5±0.9; 30.2±18.9; 18.2±3.8, respectively), with significant differences between all groups ($p<0.05$). PTFA did not increase fluorapatite concentration in human enamel when compared with the control ($p>0.05$), but in the bovine enamel de concentration increased following the same trend observed for "CaF_2". These results suggest that both substrates can be used to study fluoride reactivity with enamel, but the higher reactivity of bovine enamel should be considered. In the second study (crossed and double-blind), the anticaries effect of PTFA products was tested using a short-term *in situ* model, either immediately after application or after exposure of treated blocks to artificial saliva for seven days. Bovine enamel blocks were previously treated with the same products used in the first study, with the addition of a F varnish (2.25% F) and a bifluoride varnish (6% NaF + 6% CaF_2, 5.6% F). After PTFA, half of the blocks were immersed in artificial saliva for seven days. In six experimental phases, 12 volunteers used a palatal appliance containing eight blocks of enamel (4 recently treated and 4 exposed to the artificial saliva) with surface hardness (SH) predetermined, covered by a S. *mutans* IB-1600 'test

plaque'. F release from the dissolution of "CaF_2" formed/retained to the fluid phase of the test plaque was determined after 30 min of appliance use, and indicated lower F concentration in groups exposed to saliva in relation to those recently treated with PTFA ($p<0.05$). After an in situ cariogenic challenge by a 20% sucrose solution, all F-treated groups presented lower percentage of loss of SH (%SHL) than the control group ($p<0.05$), even after seven days in saliva. After PTFA, the lower %SHL was observed for groups F varnishes and APF; after saliva exposure, lower %SHL was found in the F-varnishes treated blocks ($p<0.05$). The results suggest that all F products are capable of reducing enamel demineralization, even seven days after application.

Key words: Fluoride, Calcium fluoride, Topical fluoride application

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
3	PROPOSIÇÃO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO 1	67
	ANEXO 2	68

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença biofilme-açúcar dependente (Paes Leme *et al*., 2006), decorrente de frequentes episódios de desmineralização da estrutura dental devido à produção de ácidos por bactérias do biofilme, quando exposto a carboidratos fermentáveis (ten Cate *et al*., 2003). Nas últimas décadas a prevalência e gravidade da doença cárie vêm sofrendo declínio, tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, e este deve ser atribuído ao uso disseminado de fluoreto (F) (Clarkson, 2000; Cury *et al*., 2004).

Mais precisamente, o importante em termos de prevenção de cárie é manter o F constante no meio bucal, ou seja, o F deve estar presente na saliva e no biofilme, para interferir com os processos de desmineralização e remineralização da estrutura dental (ten Cate, 1997). Dentre os meios de disponibilização do F para a saliva e biofilme destacam-se a água F e o dentifrício F, os quais têm contribuído significantemente para a redução de cárie em todo o mundo. Entretanto, ainda existem indivíduos com alta prevalência da doença. Para eles, a aplicação tópica profissional de F (ATPF) tem sido recomendada como meio adicional de uso de F (Zimmer *et al*., 2001), no intuito de aumentar a disponibilidade do íon F na cavidade bucal. A ATPF é considerada um método efetivo de prevenção de cárie (Marinho *et al*., 2011e) segundo revisão sistemática da literatura.

Dentre os distintos produtos para ATPF destacam-se os géis, soluções, vernizes e espumas. Todos são frequentementes utilizados na clínica odontológica, visando aumentar o efeito anticárie nos pacientes que possuem ainda alta atividade da doença cárie. Os produtos em géis são mais utilizados do que em soluções, pois são de mais fácil aplicação e aceitação pelos pacientes, mas ambos têm se mostrado eficazes contra a cárie (Ripa, 1990). Os géis têm sido largamente utilizados na prevenção de cárie nos programas escolares nas últimas décadas. As espumas F também vêm sendo utilizadas nas últimas décadas e se mostraram eficazes em reduzir a cárie na dentição decídua (Jiang *et*

al., 2005; Evans, 2007), sendo consideradas seguras (Jiang *et al*., 2005) devido a menor quantidade de material aplicado para recobrir uma mesma área de superfície dental (Whitford *et al*., 1995). Os vernizes foram desenvolvidos para aderir na superfície do esmalte e permanecer por maior período de tempo, e também possuem inúmeras vantagens, como segurança, aceite pelos pacientes, menor tempo na cadeira, fácil e rápida aplicação (Seppä *et al*., 1982b; Bruyn & Arends, 1987; Ripa, 1990; Weintraub, 2003). Assim, os vernizes têm sido indicados para crianças em idade pré-escolar (Holm, 1979) e estudos demonstram sua efetividade anticárie (Klimek *et al*., 1985; Marinho *et al*., 2011a). Entretanto, revisão sistemática da literatura apontou a necessidade de mais estudos clínicos de qualidade avaliando os vernizes fluoretados (Marinho *et al*., 2011a).

O mecanismo de ação dos meios de uso profissional de F está relacionado com a formação de produtos fluoretados no esmalte e dentina (Ögaard *et al*., 1994), devido a alta concentração de F (>100 ppm) que possuem. Os produtos para ATPF são capazes de reagir com a estrutura dental, formando fluorapatita (FA) (também denominada fluoreto fortemente ligado, incorporado à estrutura do esmalte) e minerais tipo fluoreto de cálcio ("CaF_2") (também denominado fluoreto fracamente ligado, adsorvido ao esmalte) (Saxegaard & Rölla, 1988).

Por muitos anos a FA foi considerada a principal responsável pelo efeito anticárie da ATPF. Esse efeito estaria relacionado com a menor solubilidade da FA em relação à hidroxipatita (HA) em qualquer pH. Dessa forma, a FA seria mais desejável ao "CaF_2", que se perderia em 24 horas após a aplicação tópica por ser mais solúvel do que a FA no ambiente bucal (Brudevold *et al*., 1967; McCann, 1968).

No entanto, a formação de "CaF_2" como resultado da ATPF e seu efeito anticárie tem sido demonstrado (Rölla, 1988; Ögaard *et al*., 1990); ele funciona como um reservatório lábil de F sobre o dente (Ögaard, 2001), que libera o íon para interferir com o processo de cárie dental. Além disso, estudos já demonstraram que ele pode permanecer por diversos dias na superfície do

esmalte (Ögaard *et al*., 1983; Saxegaard *et al*., 1988). De fato, Tenuta *et al*., 2008, utilizando um modelo de desenvolvimento de cárie *in situ,* no qual o fator biofilme dental e sua exposição a açúcar são controlados (Zero *et al*., 1992), demonstraram que quanto maior a concentração de CaF_2 formado no esmalte, maior seu efeito anticárie.

Considerando que os produtos para ATPF possuem diferentes concentrações de F, pHs e veículos, espera-se que resultem em diferentes reatividades com o esmalte dental e distintos potenciais anticárie, uma vez que a capacidade do F tópico de formar reservatórios de F no esmalte depende da concentração de F do meio de aplicação e de seu pH (Duke & Forward, 1978; Saxegaard & Rölla, 1988). No entanto, embora diversos estudos já tenham demonstrado distintas reatividades de produtos para ATPF com o esmalte dental (Retief *et al*., 1980; Larsen *et al*., 1981; Dijkman *et al*., 1982; Retief *et al*., 1983; Larsen & Jensen, 1986; Saxegaard & Rölla, 1988; Larsen & Richard, 2001; Hayacibara *et al*., 2004), a comparação do efeito anticárie desses produtos é inconclusiva (Marinho *et al*., 2011c).

Além disso, quando o "CaF_2" formado por ATPF é exposto à cavidade bucal, ocorre diminuição gradativa de sua concentração (Dijkman *et al*., 1983; Serra *et al*., 1989), o que poderia gerar distintos potenciais anticárie e também ser estudado utilizando este modelo. Isso é relevante, uma vez que a ATPF é normalmente realizada na freqüência semestral (Holm, 1979; Seppä *et al*., 1982b; Bijella *et al*., 1985; Seppä *et al*, 1995; Jiang *et al*., 2005).

Considerando que o mecanismo de ação da ATPF está embasado na reatividade do F do produto com o substrato dental, esta pode ser usada como um indicador do efeito anticárie dos diversos produtos para ATPF. De fato, diversos estudos foram conduzidos no intuito de verificar a reatividade dos produtos para ATPF com o esmalte (Retief *et al*., 1980; Dijkman *et al*., 1982; Dijkman & Arends, 1988; Serra *et al*., 1989; Attin *et al*., 1995; Hayacibara *et al*., 2004). Alguns deles utilizaram substrato dental bovino, que tem sido largamente utilizado em pesquisas odontológicas como substituto do humano (Valk *et al*., 1985; Attin *et al*.,

1995; Maia *et al*., 2003; Paes Leme *et al*., 2003; Hayacibara *et al*., 2004; Paes Leme *et al*., 2004; Tenuta *et al*., 2008), devido a sua semelhança e maior facilidade de acesso. No entanto, o substrato bovino apresenta uma maior porosidade em relação ao humano (Arends & Jongebloed, 1978), o qual poderia acarretar em diferenças na reatividade dos produtos para ATPF com esse substrato. Entretanto, esse tema não tem sido estudado na literatura.

Neste trabalho, o efeito anticárie de produtos para ATPF foi avaliado utilizando um modelo de desenvolvimento de cárie controlável. Em acréscimo, um estudo sobre a reatividade desses produtos com o esmalte humano ou bovino foi realizado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reatividade do Flúor (F) com o esmalte dental

Gerould em 1945 realizou um estudo onde imergiu espécimes de esmalte em solução aquosa de fluoreto de sódio (NaF) a 4% durante um mês. Ele demonstrou a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio (CaF_2) sobre o esmalte através de raios-X e elétron difração. Esses depósitos de CaF_2 formados após aplicação tópica de fluoreto conferiram proteção ácida ao esmalte realizado através de ataque ácido com 10 N de HCl por 10 segundos. Aparentemente, a exposição prolongada em solução neutra de NaF causou a dissolução da hidroxiapatita e precipitação na forma de fluorapatita (FA) no esmalte.

Em 1955, em um experimento *in vitro*, **Mc Cann & Bullock** estudaram a reação entre o fluoreto (F) e o esmalte e a dentina pulverizada com uma ampla série de concentrações de F. Demonstraram que quando da utilização de uma alta concentração de F (> 2.000 ppm F) a formação de CaF_2 é favorecida. Entretanto, concentrações de F de 100 ppm F ou menores concentrações favorecem a formação de FA. A aplicação tópica de F forma CaF_2, que poderia ser convertido em FA. Naquela época, os autores consideraram o mecanismo de inibição de cárie pelo F ainda controverso.

Um pouco mais adiante, **Gray *et al***., 1958, confirmaram a formação do CaF_2 sobre o esmalte após aplicação tópica com solução de NaF a 0,2% por 10 minutos, com variação do pH de 3 a 7, através de microscopia eletrônica e elétron difração. Observaram a influência do pH na solução na formação de CaF_2, pois quanto menor foi o pH da solução, maior foi a formação de CaF_2, atribuindo a liberação do cálcio (Ca) mais rapidamente do dente para reagir com o fluoreto. A superfície de esmalte tratada com solução de NaF em pH 3 ficou quase completamente coberta com pequenos cristais, os quais obliteraram completamente a estrutura do dente.

Em, 1966, **Mellberg *et al***. já se preocupavam em estudar a aquisição e perda do F após aplicação tópica com Flúor Fosfato Acidulado (FFA) por 4

minutos. Assim, realizaram dois estudos sendo um *in vitro* e o outro *in vivo*. Verificaram a aquisição do F no esmalte, mas também observaram que tanto *in vitro* quanto *in vivo* o F adquirido foi perdido rapidamente. Todo F adquirido foi perdido em uma semana após exposição na água. Parte do F adquirido no esmalte também foi perdido quando exposto na saliva por 24 horas ou sete dias. Assim, o F total adquirido tende-se a se perder após algum tempo seja na saliva ou na água.

Um ano após, **Brudevold *et al***. (1967) realizaram um estudo *in vivo* seguido de um *in vitro*. No estudo *in vivo* foram utilizados quatro pré-molares com extração indicada dos dentes. Um dos dentes foi classificado como controle e os demais receberam diferentes tratamentos, com diferentes concentrações de fluoreto e pHs, sendo realizadas as extrações dos dentes após 5 minutos e 14 dias após os tratamentos. A partir dos dentes extraídos, blocos de esmalte foram confeccionados e a concentração de F nos blocos foi determinada após extração ácida. No estudo in *vitro*, blocos de esmalte humano foram tratados com soluções de fluoreto com diferentes concentrações e pHs, sendo que alguns blocos receberam ataque ácido previamente ao tratamento. Os blocos foram colocados em água por oito dias e a concentração de Ca, fósforo (P) e F foi determinada na solução. Os resultados demonstraram que após a aplicação de solução fluoretada sobre os dentes e os blocos houve a formação de CaF_2 e FA. Entretanto, a maior parte do CaF_2 formado foi perdido em algumas horas e apenas a FA foi retida no esmalte, mas em uma concentração pequena. Sendo assim, sugeriram de que o CaF_2 formado após aplicação tópica de fluoreto é perdido em poucas horas e, portanto, teria pouca relevância no controle da cárie dental.

Ainda acreditando na FA como única responsável pelo efeito anticárie, **McCann** em 1968 descreveu que o CaF_2 era rapidamente perdido da superfície do esmalte e que sua solubilidade seria a mesma em saliva ou na água. Ressaltou a importância da FA no efeito anticárie, e que a relevância clínica do CaF_2 seria apenas de disponibilizar F no meio através de sua dissolução e assim haver a

precipitação de FA. Assim, o mecanismo de ação do F na inibição da cárie estaria relacionado com a estabilidade da FA em contato com os fluidos orais.

Algum tempo após, em 1977, as dúvidas a respeito de quem seria o responsável pela inibição da cárie ainda permaneciam e acreditava na FA como um permanente efeito anticárie. **Grön** relatou em seu artigo que o F se difunde no esmalte após aplicação de fluoreto na superfície. Mas, que a maior reação formada no dente quando da aplicação de F era o CaF_2. Entretanto, estudos viam demonstrando que muito do F formado era perdido em 24 horas. Uma das medidas de sucesso da aplicação tópica de flúor (ATF) era o de aumentar a concentração de F no esmalte. Estudos vinham sendo feitos com produtos para ATF para investigar o papel anticárie.

Entretanto, **Myers** em 1977, começou a acreditar que o CaF_2 formado após aplicação tópica de F tinha algum papel no efeito anticárie. Mas, ainda acreditava que a dissolução do CaF_2 resultaria em outros produtos que tivessem papel no controle da cárie, sendo importante sua formação após aplicação tópica de fluoreto.

Retief *et al.*, 1980, determinaram *in vitro* a incorporação, distribuição e retenção do F pelo esmalte humano após aplicação dos produtos FFA, Duraphat e Flúor Protector. Após 3 minutos de aplicação com os produtos, todos os dentes tratados foram colocados em saliva artificial por 1 ou 24 horas. Os resultados demonstraram que nos dentes tratados com vernizes F após as 24 horas de exposição na saliva houve um aumento na concentração de F. Os autores sugerem a importância do contato entre os vernizes F e a superfície do dente por um longo período, simulando a situação clínica de 24 horas. Entretanto, à medida que os dentes foram ficando na saliva os resultados também indicaram que o F adquirido no esmalte não é retido permanentemente, mas que ocorre uma diminuição gradual desse F adquirido. Após uma aplicação tópica de F com os produtos vernizes F e FFA a incorporação, distribuição e retenção do F se mostrou geralmente maior nos dentes tratados com os vernizes F e por último para a FFA. A incorporação e distribuição do F são aumentados pelo prolongado tempo de

contato dos vernizes F com o esmalte, e a retenção do F é diminuída pela exposição em saliva artificial.

Em 1981, **Larsen *et al***. realizaram um estudo *in vivo*, no intuito de investigar a reatividade dos produtos 0,2% e 2% de NaF e solução de FFA a 2,73% pH 3,0 com o esmalte bovino. Metade dos espécimes foi colocada em 0,01 mol de solução de ácido acético contendo 0,5 mmol de cálcio e 0,3 mmol de fosfato, pH 5,2. Então, confeccionaram um dispositivo intrabucal onde fixaram os espécimes hígidos e pré-desmineralizados e inseriram na boca do voluntário e aplicaram os produtos F por 5 minutos. Os espécimes foram removidos após 0, 1,2, 4, 8, 16 e 24 horas e realizada a determinação de CaF_2 nos espécimes. Observaram que após a aplicação dos produtos F houve a formação de CaF_2 sobre os esmaltes pré-desmineralizados e hígidos, dependente do tipo de solução do tratamento. O principal fator que influenciou a formação de CaF_2 foi a concentração de F e pH. A dissolução do CaF_2 variou com o tratamento dos dentes e o tipo de solução tópica. Assim, a concentração de CaF_2 diminuiu rapidamente no esmalte hígido. Mas, quando o FFA foi usado ou o esmalte pré-desmineralizado o CaF_2 persistiu por longo período de tempo.

Em 1982, **Dijkman *et al***. realizaram um estudo *in vitro* no intuito de verificar a reatividade da aplicação tópica pelos produtos FFA, Duraphat e Flúor Protector com o esmalte humano. Os vernizes F foram aplicados por 24 horas e mantidos em ambiente úmido, já o FFA gel foi aplicado por 5 minutos. Os autores observaram que os três produtos formaram CaF_2 e FA no esmalte. Com valores de formação para o CaF_2 maior para o produto Flúor Protector, seguido pelos grupos FFA e Duraphat. Quanto a profundidade das camadas removidas para determinação da FA a concentração de F na quantidade total de F avaliado foi maior respectivamente para o Flúor Protector, Duraphat e FFA gel.

Ainda em 1982, **Benediktsson *et al***. quiseram testar *in vitro* o efeito do tempo de contato entre o esmalte e o FFA na reatividade. Os autores observaram que após uma aplicação do FFA houve a formação no esmalte de CaF_2 e FA, e que o tempo de aplicação foi proporcional a concentração total de F formado.

Entretanto, para uma “ótima” fixação da FA foi verificado após 6 horas de contato FFA-esmalte. E para o CaF_2 resultou em um tempo de contato produto-esmalte de 2 horas, ao contrário do verniz F que precisa ficar 24 horas sobre o esmalte.

Também em 1982a, **Seppä *et al***. investigaram *in vivo*, a concentração de F no esmalte após aplicações semianuais com vernizes F Duraphat (2,2% F) e Flúor Protector (0,7% F) e compararam a concentração de F no dente tratado com a eficácia dos vernizes F na reatividade. Após 6 meses da última aplicação (cinco aplicações totais) foi realizada a determinação da concentração de F e observaram que houve um aumento na concentração de F no esmalte para ambos os tratamentos. Porém, a maior concentração de F foi achada nos dentes tratados com F Protector. Os autores reconheceram que devido as análises serem realizadas após seis meses do estudo a composição de F solúvel no esmalte foi “removida” e que o aumento na concentração de F achada representou principalmente fluorapatita.

Em um estudo *in vivo*, **Ögaard *et al***. (1983) verificaram a retenção do CaF_2 e da FA no esmalte. Em 15 pacientes foram colocadas bandas ortodônticas, cujos pré-molares foram extraídos por razões ortodônticas. Estas foram mantidas por quatro semanas, para criar um acúmulo de biofilme entre as bandas e o esmalte e após este período, um dos dentes foi extraído como controle e no outro foi realizado uma aplicação tópica com solução de NaF 0,05% neutro diariamente ou solução de NaF 2% neutro por 4 min e mantidos na cavidade bucal por mais duas semanas. Após a realização do experimento as concentrações de CaF_2 e FA foram determinadas e observou-se um aumento na concentração de F, para ambos os produtos, mesmo após 2 semanas, sugerindo que o CaF_2 permanece na superfície do esmalte por um tempo maior do que o considerado anteriormente. Entretanto, mesmo sendo considerada expressiva a presença do fluoreto de cálcio após duas semanas de tratamento a relevância anticárie do método foi atribuída à fluorapatita.

Retief *et al*., 1983 determinaram a incorporação, distribuição e retenção do F *in vitro* pelo esmalte humano após uma simples aplicação e reaplicação de

FFA, verniz F Duraphat e verniz F Flúor Protector, após imersão na saliva artificial por um período de um mês. Os autores demonstraram que a principal reação dos vernizes F com o esmalte foi a fluorapatita. Entretanto, a principal reação do FFA com o esmalte se mostrou para o fluoreto de cálcio.

Em 1983, **Dijkman *et al***. realizaram um estudo *in vivo* com esmalte humano no intuito de quantificar o CaF_2 e a FA formados após aplicação tópica com FFA gel 1,23% pH 4 por 5 minutos e os vernizes Duraphat (NaF 5%) e F Protector (F silano 2%) por 24 horas. Os blocos foram fixados em um dispositivo parcial ou total e os voluntários utilizaram por 1, 4 e 12 semanas. Os resultados demonstraram que uma alta quantidade de CaF_2 foi perdido pelos três tratamentos já na primeira semana na saliva. Sendo a maior quantidade perdida de CaF_2 formado pelos produtos FFA e Duraphat. A FA também foi perdida com o tempo para o FFA e Duraphat e para o F Protector a FA aumentou com o tempo. Assim, os produtos diferiram no comportamento após exposição na saliva.

Em um estudo in vivo, **Ögaard *et al***., 1984, avaliaram a retenção do CaF_2 e da FA no esmalte hígido e desmineralizado após aplicação com verniz F Duraphat. Para avaliação da reatividade nos dentes hígidos oito pacientes participaram do estudo, no qual um dos pré-molares foi extraído, como controle e o outro recebeu aplicação de Duraphat. No outro grupo foi colocada uma banda ortodôntica por quatro semanas para criar uma desmineralização no esmalte e após este período um dos pré-molares foi removido, como controle, e no outro aplicado Duraphat. Após duas semanas os dentes hígidos e desmineralizados foram extraídos e determinada a concentração de CaF_2 e FA. Os resultados demonstraram um incremento no esmalte na concentração de CaF_2 e FA tanto no esmalte hígido como no dês-.

Em 1985, **Valk *et al***. investigaram a retenção do F após aplicação com solução de FFA e neutra em esmalte bovino hígido e desmineralizado. Os espécimes foram tratados por 4 minutos e deixados em água corrente por 0, 1, 2, 4 e 8 semanas. Então foi determinada a concentração de F retido no esmalte por biópsia. Os resultados indicaram que a perda do F retido ocorreu principalmente

durante a primeira semana, sendo que durante as semanas seguintes nenhuma mudança significante na concentração do F retido pode ser detectada.

Larsen & Jensen em 1986, avaliaram a reatividade de várias soluções utilizadas na aplicação tópica de F e de bochechos com o esmalte humano, confirmando que a formação de fluoreto de cálcio depende mais da concentração de F livre e atividade do F e também do baixo pH do que a concentração de F total na solução.

Christoffersen *et al*. (1988) avaliaram *in vitro* a cinética de dissolução e formação dos cristais de fluoreto de cálcio e a influência do fosfato nesses processos. A presença de fosfato na solução forma cristais de fluoreto de cálcio contaminados por fosfatos, entretanto, o grau de contaminação depende das condições do meio em que foi formado, por exemplo, o pH da solução. Dessa forma, os autores sugeriram que o CaF_2 formado no esmalte após a aplicação tópica com soluções de fluoreto aciduladas em alta concentração é na verdade um mineral contaminado por fosfato. Este mineral mostrou-se mais solúvel em comparação ao fluoreto de cálcio puro, o que possibilita uma maior liberação de fluoreto para o meio. Assim, mais F estaria disponível para interferir no processo de cárie, após a formação de CaF_2 por produtos F acidulados.

Em 1988, **Saxegaard & Rölla** realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a reatividade da aplicação tópica com solução de NaF com diferentes tempos de aplicação, concentrações e pHs com o esmalte humano. Também avaliaram a disponibilidade de Ca realizada através de um pré-tratamento com solução de cloreto de cálcio a 200 mmol/L por 5 minutos e ácido fosfórico a 37% por 1 minuto. Em seus resultados verificaram que após uma aplicação tópica com NaF houve a formação de CaF_2 sobre o esmalte e FA no esmalte. Sendo que o CaF_2 foi principal produto da reação do esmalte com o meio tópico de aplicação do flúor (> 70%). A formação do CaF_2 aumentou com o tempo, a concentração e diminuição do pH. No entanto, o maior fator de impacto na formação do fluoreto de cálcio no estudo foi o tempo. Os autores relacionaram o longo tempo de aplicação do produto verniz F sobre o esmalte com o seu efeito cariostático, formando mais

CaF_2, e aconselharam o uso de formulações aciduladas de fluoreto, que em média possui um pH ácido em torno de 3,5, ao invés de soluções neutras por permitirem maior formação do CaF_2.

Dijkman & Arends (1988) discutem o papel e a importância do CaF_2 depositado sobre o esmalte. Assim, um estudo *in situ* foi realizado para avaliação da reatividade dos produtos para aplicação tópica de FFA em gel, Duraphat e Flúor Protector com o esmalte. Os blocos de esmalte foram tratados por 4 minutos para o FFA e 24 horas para os vernizes F. Vinte voluntários adultos participaram do experimento e utilizaram uma prótese removível de acrílico por uma semana. A concentração de CaF_2 no esmalte foi determinada após aplicação dos produtos F e após o experimento. Os resultados demonstraram que o FFA gel e Duraphat apresentaram concentrações similares na formação dos depósitos de CaF_2, demonstrando que esses produtos possuem eficácia semelhante quanto a formação do CaF_2. Entretanto, o Flúor Protector mesmo após uma semana manteve 40% dos valores iniciais de CaF_2.

Serra *et al*., 1989, avaliaram *in vitro* a deposição de F no esmalte e dentina humano imediatamente após aplicação tópica de FFA por 1 minuto e sua retenção em saliva artificial após sete dias, associado a diferentes tratamentos. Verificaram que após aplicação tópica com FFA houve a formação de CaF_2 e FA no esmalte e dentina. Também verificaram que após uma semana de exposição dos dentes na saliva artificial houve uma redução estatisticamente significante na concentração de CaF_2, mas sem afetar a FA. A presença de baixa concentração de F na saliva não impediu a solubilização do CaF_2. Mas, a associação de métodos tópicos em esmalte e dentina, diminui a solubilização do CaF_2 e aumentou a retenção da FA.

Em 1995, **Attin *et al***. investigaram *in vivo* a deposição e incorporação do F no dente bovino, após aplicação de verniz F com CaF_2 (Bifluorid 12: NaF a 6% + CaF_2 a 6%). Cinco voluntários utilizaram dispositivos mandibulares com espécimes de esmalte bovino tratados com verniz F com e sem acúmulo de biofilme sobre os espécimes. Os espécimes foram removidos do dispositivo

imediatamente após aplicação, 1, 3 e 5 dias após experimento. Sendo um espécime como controle. Após o experimento foi determinada a concentração de F nos espécimes. A microscopia de escaneamento eletrônica demonstrou que no espécime logo após aplicação do verniz F se formou uma densa camada de glóbulos com diferentes tamanhos. E que houve uma pequena diferença entre os espécimes sem ou com acúmulo de biofilme na incorporação e retenção do CaF_2. Entretanto, em ambas as condições houve um decréscimo de CaF_2 de acordo com o tempo de experimento. Sendo que após cinco dias apenas 20% do CaF_2 inicial restou. A concentração de FA diminuiu continuamente da camada mais superficial para as mais profundas. Os autores concluíram que após aplicação do Bifluorid 12 uma grande quantidade de CaF_2 foi depositada sobre o esmalte, mas sem aumento na sua retenção no esmalte e não houve modificação na estrutura na incorporação da FA no esmalte desmineralizado.

Whitford *et al*., 1995 verificaram em crianças de 8 a 12 anos, *in vivo*, a retenção e deposição do F no esmalte após aplicação dos produtos FFA 1,23% em gel e espuma com moldeiras por 4 minutos. Os resultados demonstraram que o paciente ficou menos exposto ao F quando da aplicação da espuma. Uma maior quantidade de F foi introduzida na boca com o gel e subsequentemente mais F foi retido. Os dois produtos depositaram F sobre o esmalte de modo equivalente. Os autores concluíram que quando o produto espuma foi utilizado a exposição e a retenção do F pelos pacientes foi menor do que quando o gel foi usado, mas os dois produtos depositaram o F sobre o esmalte de maneira igual. A espuma evidenciou uma margem maior de segurança e aceite pelos pacientes.

Em um estudo *in vitro,* **Larsen & Richard**, 2001, avaliaram a influência da saliva na formação do CaF_2 sobre o esmalte humano. Estes realizaram aplicação de solução de NaF por 2 minutos com concentrações de 0,2% e 2% e em mais um grupo adicionaram 0,1 mol/L H_3PO_4 (pH 4) na solução de NaF a 2%. Verificaram que após a aplicação com o produto acidulado e com maiores concentrações de F houve uma maior formação de CaF_2 sobre o esmalte. Quanto aos resultados da saliva, os autores recomendam da não necessidade da

remoção do biofilme antes do tratamento, para que haja uma maior formação de CaF_2.

Já em 2004, **Hayacibara *et al***. em um estudo *in vitro* avaliaram a reatividade da aplicação tópica profissional com os produtos FFA gel, FFA espuma e verniz F com o esmalte bovino. Os produtos FFA foram aplicados por 4 minutos e o verniz F por 24 horas sobre os blocos mantidos em ambiente úmido e sua remoção foi realizada com espátula e acetona. Os resultados demonstraram que todos os produtos F foram capazes de formar CaF_2 sobre o esmalte. Uma maior reatividade em relação a concentração de CaF_2 nos blocos bovinos foi encontrada na espuma, seguido do gel e verniz F. Os autores atribuem os resultados obtidos ao pH e ao veículo dos produtos utilizados do que a concentração de F encontrada nos produtos.

Villena *et al*., 2009, avaliaram *in situ* o efeito do tempo de aplicação do FFA gel sobre a redução da desmineralização do esmalte permanente e o F formado e retido no esmalte. O estudo foi cruzado, cego e composto de três fases de 28 dias cada. Quinze voluntários utilizaram um dispositivo palatino com blocos tratados com FFA gel por 1 ou 4 minutos ou controle (sem tratamento). Dois blocos foram removidos após a aplicação tópica para determinação da concentração do F. Três vezes ao dia o dispositivo foi imerso em solução de sacarose a 10% por 10 minutos. Os resultados demonstraram que os grupos F foram mais eficientes em reduzir a desmineralização do esmalte do que o grupo controle. Não houve diferença estatística para os grupos 1 ou 4 minutos. Após o experimento um maior aumento na concentração de F foi achada na primeira camada de esmalte removida para os blocos tratados com 1 ou 4 minutos em relação ao controle, sem diferença estatística entre os grupos F. Os autores sugeriram um similar efeito na redução de desmineralização após aplicação tópica com FFA gel por 1 ou 4 minutos.

Em 2011, **Calvo *et al***. também realizaram um estudo *in situ* para avaliar o efeito de uma aplicação tópica de FFA por 1 minuto versus 4 minutos no esmalte desmineralizado, desta vez usando esmalte decíduo e permanente. Dezesseis

voluntários participaram do estudo utilizando um dispositivo intra-oral em três fases de 14 dias cada. Nos blocos decíduos e permanentes foram aplicados FFA gel por 1 ou 4 minutos ou grupo controle (sem tratamento). Solução de sacarose foi gotejada 8 vezes ao dia. Os resultados demonstraram que houve a formação de CaF_2 e FA no esmalte decíduo e permanente, com uma maior concentração de CaF_2 nos grupos F do que no controle. O tempo de aplicação de FFA por 1 minuto ou 4 minutos não influenciou na formação ou retenção do F antes ou após o experimento. Quando da avaliação da desmineralização após aplicação por 1 ou 4 minutos não houve diferença estatística para o esmalte decíduo ou permanente. Os autores sugeriram que 1 e 4 minutos sob desafio cariogênico providenciaram efeito similar na inibição da desmineralização.

2.2 Uso do F

2.2.1 Mecanismo de ação do F

Em 1942, **Cheyne**, já se mostrava preocupado em esclarecer a importância do F na cárie. Alguns estudos vinham apontando a possibilidade do F ser usado no combate à cárie no dente humano. Ainda havia uma forte discussão se o mecanismo de ação do F seria local ou sistêmico. Estudos apontavam da importância da água como responsável pela incorporação do F no osso e dentes. Em 1940, Cheyne realizou um estudo com crianças de 4-6 anos e as dividiu em dois grupos: teste (aplicação de F: KF_2H_2O) e o controle (profilaxia). Os resultados indicaram que após um ano as crianças do grupo controle tiveram mais cárie do que as do grupo teste. O total de superfícies com novas lesões/criança foi de 6,04 para o controle 3,09 para o teste. Os autores concluíram que o F age na prevenção de novas lesões e retarda o progresso da cárie.

Anos depois, em 1982, **Koch *et al***. investigaram a cinética do F no esmalte decíduo através da determinação da concentração do F no esmalte de crianças pré-escolares de 4-5 anos após uma simples aplicação de Duraphat (NaF 0,5%) por 24 horas. As crianças foram selecionadas para realizar a biópsia (para determinação da concentração de F), logo após a aplicação, e após uma semana,

um mês, três meses e seis meses. Os resultados demonstraram que a aplicação de F resultou em um aumento de F na superfície e subsuperfície do esmalte, mas a concentração de F no esmalte sofreu um decréscimo de acordo com o tempo passado da aplicação. Os achados suportam a hipótese de que a cinética do F no esmalte decíduo é importante no efeito preventivo da cárie.

Em 2008, **Tenuta *et al***. realizaram um experimento *in situ* de curta duração, duplo-cego e cruzado. Blocos de esmalte bovino foram previamente tratados com uma solução não fluoretada (grupo controle negativo) ou uma solução de NaF 0,5 M (pH 3,5). Para que o esmalte apresentasse diferentes concentrações de "CaF_2", os blocos tratados com F foram: não envelhecidos, ou envelhecidos precocemente por 6 h e 48 h em fluxo contínuo de saliva artificial. Em duas fases experimentais, dez voluntários utilizaram um dispositivo palatino contendo 8 blocos de esmalte com microdureza de superfície pré-determinada (quatro blocos de cada tratamento em cada lado), cobertos por uma 'placa teste' de *S. mutans* IB1600. Aos 30 minutos de uso, a 'placa teste' em contato com dois blocos de cada tratamento foi coletada. Os blocos restantes foram submetidos a um desafio cariogênico, realizado com solução de sacarose a 20%, e após 45 min a 'placa teste' e os blocos foram coletados para análises. Os resultados desse estudo demonstraram haver relação de dose resposta entre as diferentes concentrações de fluoreto de cálcio no esmalte, a liberação de fluoreto para o fluido do biofilme e o efeito da inibição da desmineralização. Assim os autores concluíram que efeito anticárie da aplicação de F profissional deve ser atribuída a liberação de F dos reservatórios de "CaF_2" do esmalte para o fluido do biofilme.

2.2.2 Uso tópico de F

Em 1987, algumas dúvidas a respeito dos vernizes fluoretados ainda permaneciam. Então, **Bruyn & Arends** fizeram uma revisão sobre os vernizes. Observaram que ainda havia uma forte discussão quanto as vantagens da aplicação, quanto a incorporação do F no esmalte, a perda dos produtos formados, tempo de aplicação e seu efeito anticárie. Assim, descreveram em sua

revisão que os vernizes são totalmente seguros, sendo liberados lentamente, pouca quantidade é aplicada e que a concentração de F no plasma é baixo em relação a outros produtos fluoretados (exemplo: FFA gel, onde grande quantidade é ingerida). Como vantagens descreveram que o tempo na cadeira do dentista é menor que quando de outras aplicações de F, não é necessário profilaxia, é rápido e fácil de ser aplicado e é recomendado para pacientes de alto risco. Concluíram que os vernizes F são seguros e eficientes na prevenção da cárie.

Em 2003, **Maia *et al***. realizaram um estudo *in vitro* onde avaliaram a combinação do efeito do dentifrício F e da aplicação do verniz F na remineralização e incorporação do F no esmalte bovino sob regime de pH. Os tratamentos no esmalte foram: controle (sem tratamento), verniz F, dentifrício (placedo – sem F (DP)), dentifrício F (DF) (NaF 1.100 ppm F), verniz F + DP e verniz F + DF. Os vernizes F foram aplicados por 24 horas e mantidos em ambiente úmido. Os blocos foram imersos em dentifrícios por 1 minuto, 4x ao dia (exceto os blocos do controle e o do grupo verniz F sozinho) e entre os tratamentos com os dentifrícios, foram imersos em saliva artificial. Duas horas por dia os blocos foram colocados em solução ácida. Os resultados demonstraram um aumento na incorporação do F nos grupos DF e verniz F + DF, mas sem diferença estatística entre eles. Os autores sugeriram que uma simples aplicação de verniz F foi capaz de aumentar a concentração de F no esmalte desmineralizado, entretanto, o uso frequente de dentifrício F aumentou a remineralização da superfície, com um efeito similar na incorporação do F quando comparado com o verniz F + DF e uma aplicação de verniz F. Assim, os autores confirmaram que a associação de verniz F com o uso de dentifrício F não representou efeito adicional no controle da cárie.

Paes Leme *et al*., 2004 realizaram um experimento *in situ*, onde avaliaram a combinação do produto FFA 1,23% F gel (aplicado por 4 minutos) e dentifrício F na desmineralização do esmalte pelo acúmulo de biofilme e exposição à solução de sacarose 20% em diferentes freqüências (4 ou 8 vezes ao dia). Dezesseis voluntários adultos usaram um dispositivo intrabucal palatino contendo

blocos de esmalte bovinos com quatro fases de 14 dias cada. Os voluntários foram randomizados nos seguintes grupos de tratamento: dentifrício F (NaF 1100 ppm F à base de sílica), dentifrício não F, FFA associado com dentifrício F e FFA associado com dentifrício não F. Os resultados demonstraram que a associação dos meios de aplicação tópica de F não representou diminuição da perda mineral ocorrida no esmalte comparada com o uso do FFA ou do dentifrício F isoladamente. Por outro lado, foi observada, após 10 horas da escovação com dentifrício F, uma concentração de F no biofilme 30 vezes maior do que o grupo controle. Da mesma forma, o FFA foi responsável pela alta concentração de F no biofilme mesmo após 14 dias de estudo *in situ*.

Em 2007, **Paes Leme *et al***. publicaram os resultados relativos à incorporação de F no esmalte dental. No mesmo delineamento do estudo anterior, 16 voluntários adultos utilizaram um dispositivo intrabucal palatino contendo blocos de esmalte durante quatro fases a um alto desafio cariogênico (acúmulo de biofilme e sacarose 8x ao dia) de 14 dias cada. Os grupos de tratamentos foram: dentifrício não F (DP), dentifrício F (DF), ATPF associado com DP e ATPF associado com DF. A ATPF foi aplicada por 4 minutos. Os dentifrícios foram utilizados 3x ao dia. Ao final de cada fase, os blocos foram coletados para análise do F incorporado ao esmalte, resultando em incorporação do F no esmalte após ATPF. Mas não foi observado efeito aditivo na retenção de F quando o esmalte foi tratado com ATPF + DF. Assim, os autores confirmaram que a associação de ATPF com o uso de dentifrício F não representou efeito adicional no controle da cárie. No entanto, os autores concluíram que embora os dados confirmem o efeito isolado da ATPF e do dentifrício F, ressaltaram que no estudo o dentifrício F foi utilizado 3x ao dia, e que essa freqüência pode estar sendo negligenciada em pacientes de alto risco de cárie, para os quais um método adicional de F profissional continua sendo recomendado.

2.2.3 F em Odontopediatria

Em 1963, **Wellock & Brudevold**, já se preocupavam em estudar o efeito inibitório da cárie através de uma simples aplicação tópica de solução de FFA por 4 minutos em crianças de 8 a 11 anos, quais foram divididas em dois grupos: grupo teste (receberam a aplicação de FFA) e grupo controle (sem tratamento). As crianças foram monitoradas pelos dois anos seguintes. Os autores verificaram uma diferença no aumento de cárie de 67% para o grupo controle em relação ao grupo teste com relação ao CPOD, e de 70% no aumento de cárie para o grupo controle para o grupo teste com relação ao CPOS após 2 anos. Concluíram que a solução de FFA possuiu efeito terapêutico, não causou descoloração ou irritação na gengiva e foi bem aceito pelas crianças.

Pameijer *et al*. também em 1963, verificaram o efeito cariostático de aplicações tópicas de NaF 2% e NaF 2% com 0,15 M de ácido fosfórico em crianças de 4 a 10 anos. As aplicações foram realizadas em diferentes lados da cavidade bucal, sendo realizados quatro tratamentos totais em 2 semanas. As crianças foram reavaliadas com intervalos diferentes de tempo após aplicação tópica de F de 3 a 15 meses. Os autores verificaram durante o estudo novas lesões de cárie nas crianças, sendo 67% após tratamento com NaF 2% e 33% NaF 2% acidulado. O aumento de lesões diminuiu em torno de 50% com o tratamento de NaF 2% acidulado. Assim, o menor pH, a concentração de F e fosfato na solução de NaF 2% acidulado aparentemente influenciou uma significante redução de cárie. As soluções não causaram descoloração nos dentes ou gengivas e foram toleráveis e não causaram efeitos desagradáveis nas crianças.

Englander *et al*., 1967, investigaram o efeito anticárie dos géis NaF acidulado 0,5% F, pH 4,5 e NaF 0,5%, pH 7,0 em crianças. Assim, conduziram um estudo com crianças de 11 a 14 anos e as dividiram quanto às idades e sexos e em três grupos: NaF acidulado, NaF neutro e controle (sem tratamento) com aplicações em moldeiras por 6 minutos. Os resultados demonstraram que após 21 meses de estudo a média de aplicação dos géis para criança foram de 245 aplicações e que o aumento de cárie nos grupos dos géis NaF foi significante

menor do que no grupo controle. Nos dentes esfoliados foi determinado o F total adquirido que resultou em uma maior quantidade nos grupos NaF do que no esmalte não tratado nas quatro camadas extraídas. O NaF acidulado gel adquiriu mais F total em todas as camadas do que no NaF neutro. Assim, frequentes e prolongadas exposições de F favorece a permanência de alto nível de F no esmalte por longos períodos.

Reportando estudo anterior acima realizado por **Englander *et al***. em 1967 com crianças de 11 a 14 anos que receberam aplicação tópica de géis NaF acidulado e neutro por 6 minutos, em 1969, **Englander *et al***. publicaram outro artigo sobre a reavaliação realizada em 1968 nessas mesmas crianças quanto ao efeito anticárie residual após 23 meses do estudo anterior. Apenas 6 molares decíduos das crianças que receberam NaF acidulado gel puderam ser coletados para análise. A análise mostrou alta concentração de F residual nas quatro camadas de esmalte. Os autores demonstraram um significante efeito anticárie após 23 meses do estudo primário.

Em 1979, **Holm** investigou o efeito preventivo do verniz fluoretado (Duraphat) na cárie em crianças pré-escolar. O verniz Duraphat foi aplicado duas vezes ao ano, sendo que a primeira aplicação ocorreu aos 3 anos e permaneceu até os 5 anos. Holm em seus resultados demonstrou que a redução de cárie foi mais pronunciada na superfície oclusal e em seu estudo houve uma redução de cárie de 44% em relação ao grupo controle (sem tratamento). Assim, o Duraphat mostrou ser um produto efetivo na cárie quando aplicado duas vezes ao ano nos dentes decíduos e ser um tratamento barato e de fácil aplicação que pode ser usado por crianças em idade pré-escolar.

Seppä *et al*., 1982b, avaliaram por três anos crianças de 11 a 13 anos com alta atividade de cárie e expostas a água fluoretada que receberam semi-anuais aplicações de F com Duraphat (2,2% F) e Flúor Protector (0,7% F). Os resultados demonstraram que quando da aplicação do Duraphat houve uma redução de cárie de 30% e quando da aplicação do F Protector de 11%. Assim, o Duraphat providenciou adicionais benefícios para as crianças com alta atividade

de cárie, mesmo quando há incorporação de F por outras formas consideradas ótimas, por exemplo, a água F. Os vernizes foram bem aceitos pelas crianças e sua aplicação é mais rápida do que com solução ou gel de F.

Bijella *et al*. em 1985, avaliaram o efeito anticárie do produto FFA em crianças de 7 a 10 anos com semi-anual aplicação. Os autores concluíram que a ATF foi efetiva na prevenção de cáries e que a omissão de profilaxia antes da ATF não afetou significantemente o efeito preventivo na cárie.

Também em 1985, **Klimek *et al***. estabeleceram um programa preventivo sobre a cárie e gengivite para crianças de 12-13 anos por dois anos. As crianças foram divididas em grupo teste, as quais visitaram um higienista cinco vezes ao ano para receber profilaxia e instruções de escovação e fio dental e duas aplicações anuais de Duraphat e as crianças do grupo controle que não receberam nenhum tratamento. Após dois anos a média no aumento da cárie para as superfícies cariadas e obturadas foi de 2,7 para o grupo teste e de 5,0 para o grupo controle. Houve uma alta redução de cárie na superfície proximal (59%). O estudo demonstrou que o programa preventivo foi efetivo em reduzir a inflamação gengival e o desenvolvimento de novas lesões de cárie em crianças, com redução de cárie de 46% durante os dois anos.

Um estudo em 1995 conduzido por **Seppä *et al***. teve como intuito comparar a efetividade anticárie dos produtos verniz fluoretado (Duraphat) 2,2% F e FFA gel 1,23% por 4 minutos. Crianças de 12-13 anos receberam semi-anuais aplicações de um dos produtos por três anos. Os autores concluíram que o verniz F foi tão efetivo quanto o gel em prevenir cáries na superfície proximal e pequenas diferenças em favor do gel foram observadas na superfície oclusal. Ambos os métodos foram aceitos pelas crianças. Entretanto, a técnica de aplicação do verniz F se mostrou mais rápida e de mais fácil aplicação.

Zimmer *et al.*, 1999, avaliaram a efetividade de um programa preventivo em escolas primárias de uma comunidade carente por quatro anos. As crianças de 7 a 10 anos foram divididas em grupo teste, as quais receberam instruções de higiene oral e aplicações de verniz fluoretado (Duraphat) de três a

quatro vezes ao ano e grupo controle, as quais receberam apenas instruções de higiene oral. Os autores verificaram que o mínimo de duas aplicações de F por ano foram efetivas para prevenir cárie em crianças com alta atividade de cárie e que o Duraphat resultou em 37% na inibição da cárie em crianças com alto risco de cárie.

Já em 2001, **Zimmer *et al***. avaliaram o efeito de um programa preventivo em crianças de alto risco de cárie. As crianças com idade de 9 anos foram separadas em dois grupos. O primeiro que recebeu a cada três meses aplicação tópica de verniz fluoretado (F Protector) 0,1% F e instruções de higiene oral e motivação e o segundo grupo que era o controle que apenas recebeu instruções e motivação. Os autores demonstraram que após dois anos de estudos não foi possível prevenir o desenvolvimento de lesões cavitadas em crianças com alto risco pelo programa. Mas houve um efeito preventivo sobre as lesões incipientes e o efeito do longo tempo de programa não pode ser descartado.

Em 2005, **Khattak *et al***. avaliaram *in vitro* a efetividade da ATF com os produtos FFA 1,23% gel (pH 3,0) e espuma (pH 3,5) por 1 minuto e verniz F (NaF 5%) e controle (sem tratamento) por uma e duas semanas em desafio ácido (gel ácido, 22,5 ºC, pH 5,1) e compararam a efetividade destes produtos no esmalte decíduo e permanente desmineralizado após desafio ácido. A desmineralização foi avaliada antes da aplicação do F, uma semana após aplicação do F e desafio ácido e duas semanas após o desafio ácido através da reflexão da luz em imagem no computador. Os resultados indicaram que não houve diferença entre os três produtos na prevenção da desmineralização após uma semana de desafio ácido. Não houve diferença estatística significante na desmineralização entre o esmalte decíduo e permanente após duas semanas. Após duas semanas de desafio ácido o verniz F mostrou maior proteção contra a desmineralização.

Também em 2005, diante da falta de estudos relacionados ao efeito preventivo do FFA na forma de espuma no desenvolvimento da cárie na primeira dentição, **Jiang *et al***. resolveram estudar o efeito bi-anual deste produto por dois anos. As crianças com idade entre 3 a 4 anos foram divididas em dois grupos:

FFA espuma 1,23% (marca Laclede) e grupo placebo (Laclede, sem F). A aplicação foi realizada por 4 minutos seguidos de 1 minuto de expectoração do produto. As crianças que receberam quatro aplicações totais fizeram parte do estudo. Os resultados demonstraram que a bi-anual aplicação de FFA espuma foi efetiva em prevenir cárie dental na primeira dentição (24%). Entretanto, a bi-anual aplicação de FFA foi significantemente eficaz em reduzir o aumento de cárie na superfície proximal, mas não mostrou significância na superfície oclusal. O FFA espuma se mostrou um produto de aplicação com uma técnica segura.

Evans, 2007, realizou um estudo *in vivo*, duplo cego, em que aplicou FFA 1,23% na forma de espuma nos dentes das crianças de 3 a 4 anos. O controle foi um placebo do produto (sem F). A aplicação foi realizada duas vezes ao ano. Foi demonstrado um aumento de cárie após dois anos de estudo (CPOS), mas com decréscimo no aumento na cárie para o grupo FFA espuma (38,3%) e para o grupo controle (26,5%). Os autores concluíram que a aplicação bianual de FFA espuma foi efetiva em reduzir o aumento de cárie na dentição decídua.

Marinho *et al*., 2011a, na sua revisão sistemática realizada para verificar a efetividade e segurança dos vernizes fluoretados na prevenção da cárie em crianças e adolescentes (menores de 16 anos) comentaram do uso extensivo dos vernizes F nas aplicações tópicas nas últimas décadas como uma intervenção preventiva na cárie. Na revisão 2709 crianças foram incluídas, compondo nove estudos controlados. Destes, sete foram incluídos na meta-análise, com estimado 46% na prevenção de cárie no CPOS e em 33% para o ceos. Os autores sugeriram que o verniz F aplicado duas a quatro vezes por ano foram efetivos em reduzir o aumento de cárie na dentição decídua e permanente. Entretanto, os estudos não apresentaram grupo controle, muitos se mostraram pobres em qualidade e com largo intervalo de confiança no efeito. Assim, eles sugerem a necessidade de mais estudos com alta qualidade e que incluíssem a avaliação dos efeitos adversos, como descoloração dos dentes, reações alérgicas orais, entre outros.

Em 2011b, **Marinho *et al***. em sua revisão sistemática sobre a efetividade e segurança dos géis fluoretados na prevenção de cárie em crianças e adolescentes (até 16 anos) verificaram 25 estudos controlados (7.747 crianças), sendo 23 os quais contribuíram para a meta-análise, com aproximado 28% de prevenção de cárie (CPOS). Destes, 19% mostraram um maior efeito do F quando estudos controlados sem placebo foram usados. Os autores sugeriram que o efeito na inibição da cárie do gel é evidente. Entretanto, faltam estudos na dentição decídua, sobre os efeitos adversos ou a aceitação do tratamento e efeito associado a frequência de aplicação, sendo os estudos pobres e com falta de detalhes metodológicos e antigos. Os géis têm sido largamente utilizados na prevenção de cárie nos programas escolares nas últimas décadas.

Em sua revisão sistemática, **Marinho *et al***., 2011c, sobre a comparação da efetividade de uma das formas de aplicação de flúor tópico versus uma outra forma na prevenção da cárie em crianças e adolescentes (16 anos ou menores), com 17 estudos controlados, sendo 15 utilizados na meta-análise. Os resultados demonstraram que os dentifrícios não foram significantemente diferentes do bochecho ou gel ou ambos. Quanto aos estudos do uso do dentifrício com o verniz F tinha apenas um estudo e esse era inconclusivo. Quanto ao verniz F e bochecho não houve diferença significante. A comparação entre verniz F com gel e gel com bochecho os estudos foram inconclusivos. Os autores concluíram que os dentifrícios em comparação com os bochechos ou géis aparecem ter uma efetividade igual na prevenção de cárie em crianças. As evidências para comparar a efetividade dos vernizes F e géis e bochechos e géis são inconclusivas. Nenhuma conclusão adversa dos efeitos pode ser achada, devido nenhum dado ser suportado nos estudos.

Na revisão sistemática em que **Marinho *et al***., 2011d, compararam a efetividade de duas formas de aplicação tópica de flúor combinadas com apenas uma forma sozinha (especialmente o dentifrício) na prevenção de cárie em crianças e adolescentes (até 16 anos), 12 estudos controlados foram selecionados, sendo 11 para a meta-análise. Destes, nove estudos

providenciaram dados do efeito do F em bochechos, géis ou vernizes F usados na combinação com dentifrícios (envolvendo 4026 crianças). A redução de cárie foi de 10% em favor destas combinações. Na comparação dos géis ou bochechos combinados com dentifrício versus só o dentifrício, não houve diferença estatística na efetividade. Quando do verniz F e dentifrício poucos estudos existem. Somente a combinação dos géis e bochechos foi favorecida na comparação com o gel sozinho, o qual apresentou resultado estatisticamente significante. Entretanto, os autores concluíram que o F tópico usado em acréscimo ao dentifrício apresentou uma modesta redução da cárie quando comparado com o dentifrício sozinho. Mas para as crianças de alto risco de cárie a combinação de aplicação de F com dentifrício poderia ser indicada. Novos estudos deveriam ser realizados.

Marinho *et al*., 2011e, em sua revisão sistemática sobre as formas de ATF na prevenção de cárie em crianças e adolescentes comentaram que nas últimas décadas a terapia de ATF nas formas de verniz F, gel, bochechos ou dentifrícios tem sido usada extensivamente como uma intervenção preventiva da cárie e objetivaram determinar a efetividade e seguridade das formas na prevenção da cárie em crianças. Os estudos selecionados para a revisão foram 144 estudos controlados, sendo 133 considerados na meta-análise. Esses estudos compararam as formas de F com placebo ou nenhum tratamento em crianças até 16 anos no último um ano. Seus principais resultados foram de que o efeito do F tópico variou de acordo com o tipo de grupo controle usado, tipo e modo de ATF utilizado, nível inicial de cárie e intensidade da ATF, mas sem a influência da exposição da água F ou outras formas de F. Os autores concluíram que os estudos controlados vêm demonstrando os benefícios da ATF, com uma porcentagem de prevenção de cárie (CPOS) estimada em 26%, mas eles deveriam ser interpretados com cautela, devido a heterogeneidade dos estudos. Com relação aos efeitos adversos, os dados são escassos para os autores chegarem a alguma conclusão definitiva.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a reatividade dos produtos para ATPF com o esmalte humano e bovino e examinar de forma controlada o mecanismo de ação anticárie de diferentes produtos para ATPF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em dois estudos: o **estudo 1** teve por objetivo estudar a reatividade (formação do fluoreto de cálcio ("CaF_2") e fluorapatita (FA)) de produtos para ATPF com o esmalte humano e bovino; o **estudo 2** objetivou avaliar o efeito anticárie destes produtos para ATPF logo após a aplicação e seu efeito residual simulando exposição à cavidade bucal por uma semana, em um modelo controlado de desenvolvimento de cárie.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP (Protocolo nº 084/2006).

4.2 ESTUDO 1

4.2.1 Delineamento Experimental

O estudo comparou *in vitro* a reatividade dos produtos para ATPF com o esmalte humano e bovino. Trinta e dois blocos de esmalte humano e 32 de esmalte bovino foram divididos em quatro grupos de acordo com os produtos testados: controle (sem tratamento), NaF (fluoreto de sódio) a 2% em gel neutro (0,9% F, pH 7,0, DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil), FFA (flúor fosfato acidulado) gel (1,23% F, pH 3,5, DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil) e FFA espuma (1,23% F, pH 3,5, Laclede, Rancho Dominguez, USA) (Figura 1). Os géis e a espuma foram aplicados por 4 minutos, seguido de lavagem com água purificada por 30 segundos. A concentração de "CaF_2" e FA formados pelos tratamentos foram determinadas em eletrodo específico de F, após extração com álcali e ácido, respectivamente.

Figura 1: Produtos utilizados no estudo, da esquerda para a direita: FFA espuma, FFA gel e NaF 2% gel

4.2.2 Preparo dos blocos de esmalte

Após a obtenção dos dentes humanos (terceiros molares irrompidos) e bovinos (Figura 2), estes foram armazenados em uma solução de formol a 2% pH 7,0 por pelo menos 30 dias (Cury *et al*., 2000). Sessenta e quatro blocos de esmalte humano e bovino foram confeccionados utilizando a cortadeira elétrica (BUEHLER-ISOMET^{TM}, USA), aparelhada com discos diamantados dupla face previamente ajustados para cortar blocos dentais com dimensão de 3 x 3 mm (Figura 3).

Para o polimento dos blocos foi utilizada a politriz (AROTEC APL-4) com lixas de granulação 600 e 1200. Entre uma lixa e outra os blocos foram lavados em ultra-som (T7,THORNTON) durante 2 minutos, utilizando água purificada.

Figura 2: Dente bovino e humano (terceiro molar irrompido)

Figura 3: cortadeira elétrica (BUEHLER-ISOMET^{TM}, USA) aparelhada com discos diamantados

4.2.3 Aplicação dos tratamentos

Todos os blocos foram isolados com cera 7, ficando somente exposta a superfície de esmalte para reatividade. A reatividade dos géis e espuma com o esmalte foi avaliada pela aplicação dos produtos por 4 minutos com Microbrush (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil), seguida de lavagem por 30 segundos com água purificada, para a remoção do excesso de produto na superfície do bloco, e secos em lenço de papel (Figura 4).

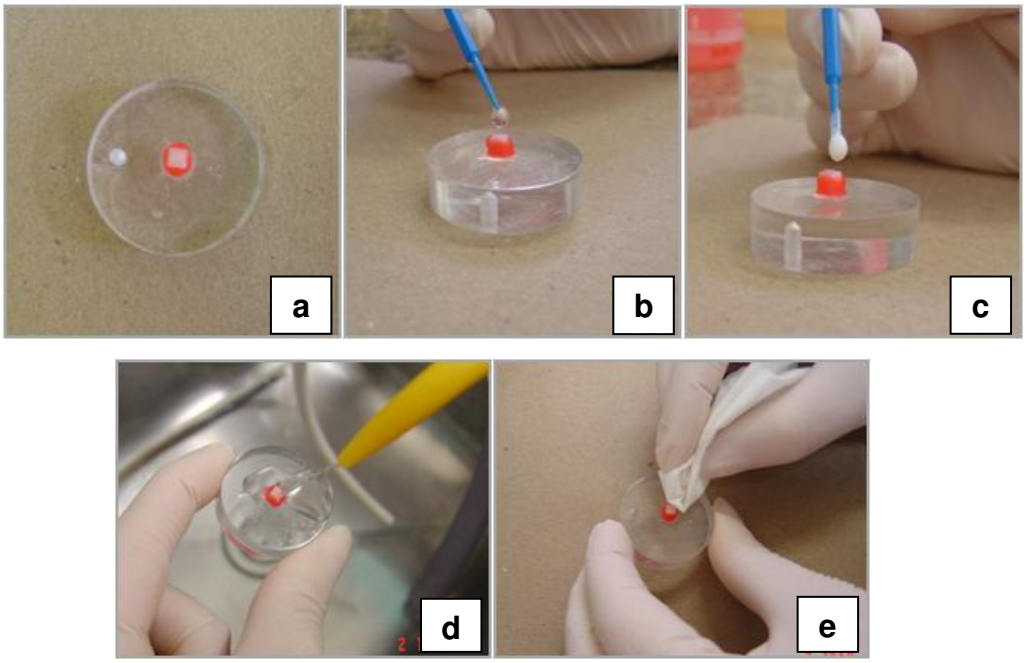

Figura 4: **a**: bloco isolado com cera 7; **b**: aplicação dos géis (FFA e NaF 2%); **c**: aplicação da espuma (FFA); **d** e **e**: lavagem por 30 segundos com água purificada e secagem com lenço de papel

4.2.4 Determinação da reatividade do F dos produtos no esmalte ("CaF_2" e FA)

Após a ATPF os blocos foram deslocados do acrílico e individualmente imersos em tubos contendo 0,4 mL de KOH M, onde ficaram sob agitação (83 rpm) por 24 horas (Caslavska *et al*., 1975). Após a neutralização da solução com 0,4 mL de TISAB II contendo HCl M os blocos de esmalte foram lavados com água purificada e secos em lenço de papel. Novamente os blocos foram imersos em tubos contendo 0,2 mL de KOH M, sob agitação por 24 horas e neutralizados com 0,2 mL de TISAB II contendo HCl M (Figura 5). A concentração de F foi determinada nessas soluções, utilizando um eletrodo específico de F e um eletrodo de referência (Thermo Scientific, USA, 9409BN e Orion 900100, USA, respectivamente) acoplado a um analizador de íons (Orion Research EA-940). Padrões com concentração conhecida de F foram preparados nas mesmas condições utilizadas nas amostras e utilizados para a construção das curvas de calibração. A concentração de F nos padrões (transformada em log base 10) foi

correlacionada linearmente ($r^2 \geq 0,999$) com a milivoltagem aferida no potenciômetro e uma regressão linear (y = a + b.x) foi utilizada para determinação da concentração de F nas amostras. A concentração de F como "CaF_2" formado em cada bloco de esmalte foi calculada e expressa como µg F/cm^2.

Após a extração do "CaF_2", uma camada de esmalte foi removida pela imersão em HCl 0,5 M (0,3 mL) sob agitação por 30 s (Koo & Cury, 1998) para extração da FA. Após neutralização com TISAB II contendo NaOH 0,5 M (0,3 mL), a concentração de F foi determinada utilizando a mesma metodologia descrita acima, com exceção de que os padrões de F continham os mesmos reagentes utilizados nessas amostras. A concentração de F como FA foi expressa em µg F/cm^2 (Figura 6).

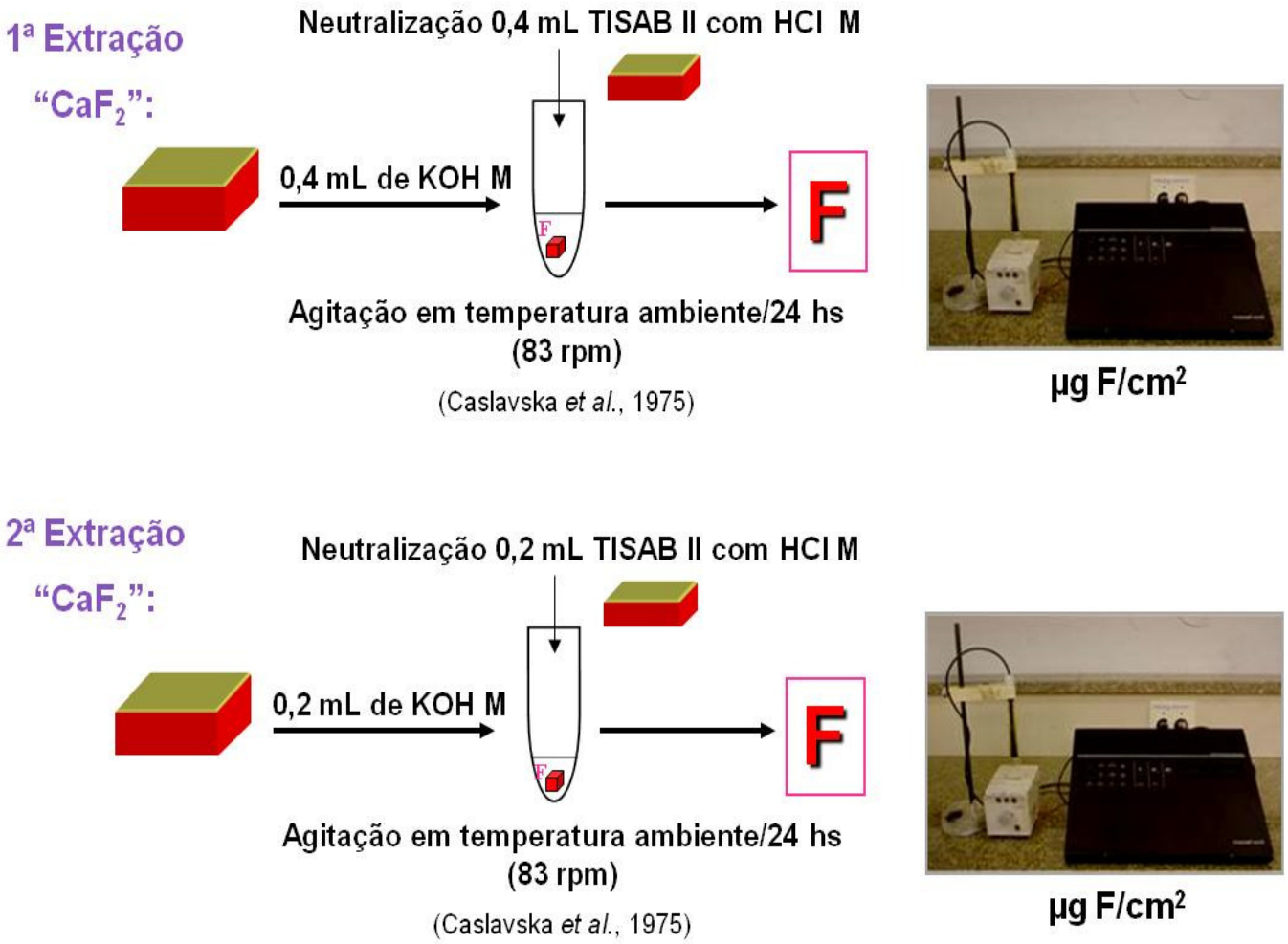

Figura 5: Determinação da concentração de F como "CaF_2" no esmalte. Foram realizadas duas extrações seguidas para a determinação da concentração de "CaF_2". A primeira extração foi realizada com volume de 0,4 mL de KOH M e após 24 horas neutralizada com o mesmo volume de TISAB II com HCl M e a segunda extração foi realizada com um volume de 0,2 mL

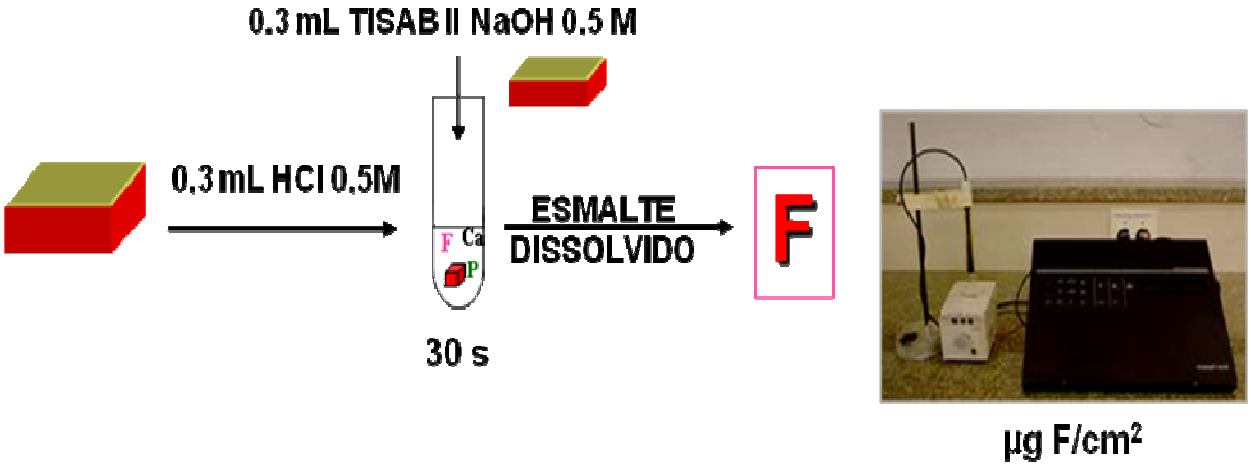

Figura 6: Determinação da concentração de F como FA no esmalte. Para a determinação da concentração da FA foi removida uma camada de esmalte com 0,3 mL de HCl 0,5 M e após 30 s neutralizado com 0,3 mL de TISAB II com NaOH 0,5 M

4.2.5 Análise estatística

Os dados da concentração de F como "CaF_2" e FA formado nos blocos foram utilizados utilizando um delineamento fatorial 2 x 4, considerando os fatores, substratos de esmalte (2 níveis) e produtos fluoretados (4 níveis). Para atender as pressuposições da ANOVA, os dados de "CaF_2" foram transformados ao inverso da raiz quadrada e os dados de FA foram transformados ao logaritmo base 10. O limite de significância foi fixado em 5% e o software SAS (versão 9.2) usado para as análises.

4.3 ESTUDO 2

4.3.1 Delineamento Experimental

O estudo comparou o efeito anticárie dos produtos para ATPF logo após a aplicação e após sete dias exposto à saliva artificial utilizando um modelo *in situ* de curta duração (Zero *et al.*, 1992) (Figura 7), em um delineamento experimental duplo cego, cruzado e boca dividida (Figura 8). Doze voluntários utilizaram, em seis fases distintas, um dispositivo palatino contendo oito blocos de

esmalte bovino tratados com diferentes produtos F: controle (sem tratamento), NaF 2% gel neutro (0,9% F, pH 7,0, DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil), FFA gel (1,23% F, pH 3,5, DFL, Jacarepaguá, RJ Brasil); FFA espuma (1,23% F, pH 3,5, Laclede, Rancho Dominguez, USA), NaF a 5% verniz (2,25% F, Duraphat®, Colgate, São Paulo, SP, Brasil) e verniz bifluoretado (NaF a 6% + CaF_2 a 6%, 5,6% F, Duofluorid XII, FGM, Joinville, SC, Brasil) (Figura 9). Após a ATPF metade dos blocos de cada voluntário foi exposto na saliva artificial por sete dias para avaliar o efeito residual da ATPF (simulando envelhecimento na cavidade bucal) (Figura 10). Quatro blocos recém tratados e 4 expostos à saliva por sete dias foram montados em um dispositivo intrabucal palatino e cobertos por uma 'placa teste' preparada *in vitro* a partir de *S. mutans*. Para estimar a liberação de F a partir dos reservatórios formados no esmalte pela ATPF e retidos após exposição à saliva artificial, após 30 min de uso do dispositivo, a 'placa teste' de dois blocos de cada tratamento foi coletada para determinação da concentração do F em sua porção fluida. O dispositivo foi reinserido na boca e um desafio cariogênico foi conduzido por bochecho de 1 min com solução de sacarose a 20%. Após 45 min de uso, a 'placa teste' e os dois blocos remanescentes de cada grupo de tratamento foram coletados. A perda mineral foi determinada pela porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS).

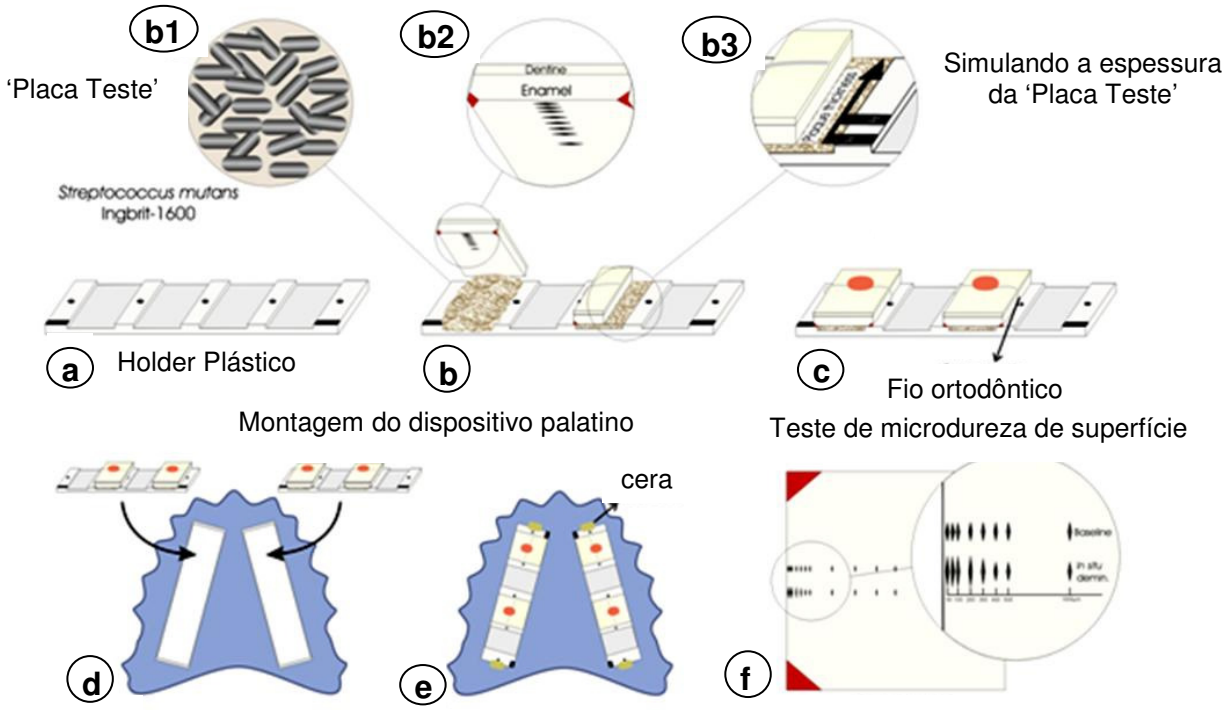

Figura 7: Ilustração da metodologia do modelo *in situ* de curta duração utilizado (Cury *et al*., 2003). (**a**) suporte acrílico (holder plástico), (**b**) seqüência da montagem do suporte contendo a 'placa teste' e os blocos dentais; (**b1**) 'placa teste' – *S.mutans* IB 1600; (**b2**) blocos dentais mostrando as indentações realizadas para determinação da dureza inicial; (**b3**) simulação da espessura de placa pela difusão de saliva e sacarose pela porção da placa teste exposta à cavidade bucal, (**c**) montagem completa dos blocos de esmalte com a 'placa teste' no suporte fixado com fio ortodôntico (a figura ilustra 2 blocos por holder, porém no presente estudo foram utilizados 4 blocos/holder), (**d**) montagem do dispositivo palatino, (**e**) suporte acrílico fixado no dispositivo palatino com cera pegajosa, (**f**) ilustração esquemática das indentações realizadas pós-tratamento.

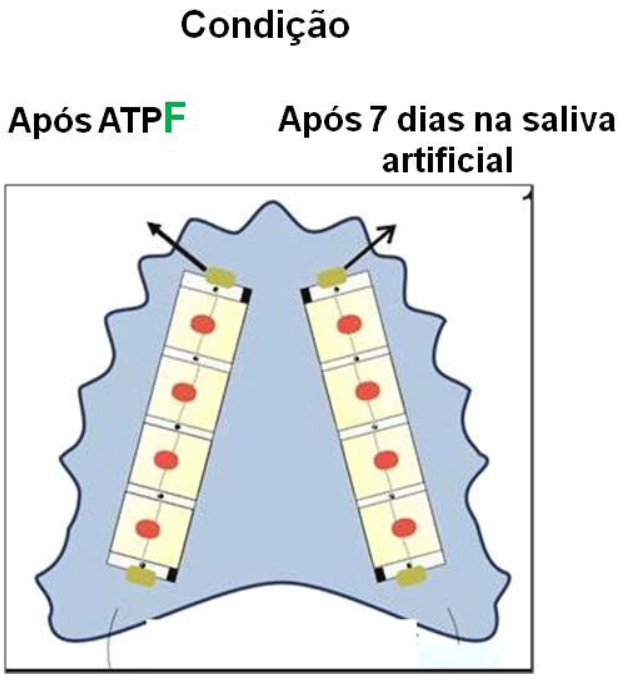

Figura 8: Boca dividida: 4 blocos após ATPF e 4 blocos expostos à saliva artificial por sete dias presos em um suporte acrílico montados em um dispositivo palatino

Figura 9: Produtos utilizados no estudo, da esquerda para a direita: FFA espuma, FFA gel, NaF 2% gel, verniz F e verniz bifluoretado

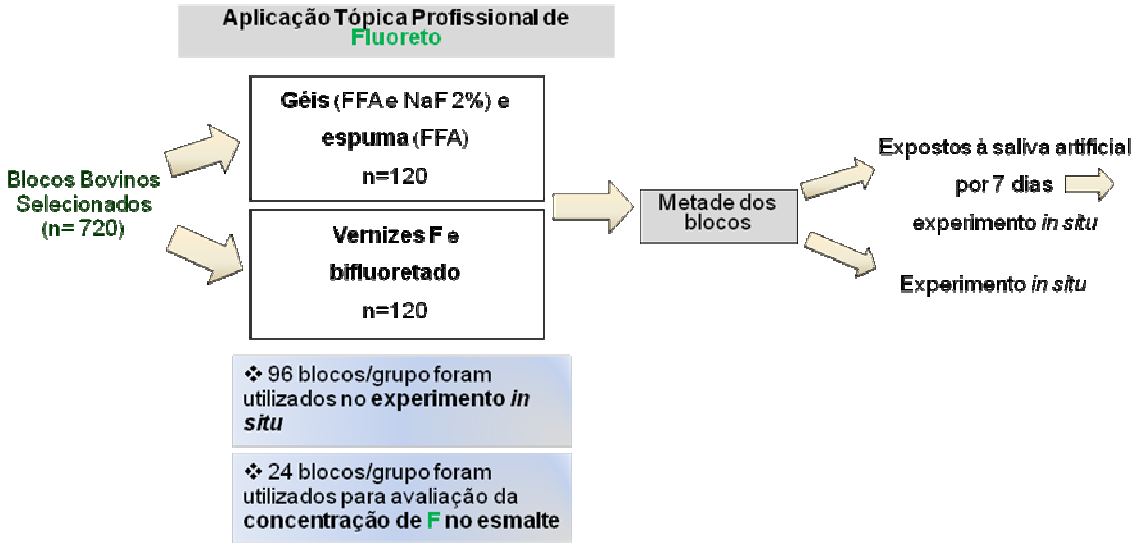

Figura 10: Fluxograma de blocos dentais no experimento

4.3.2 Seleção de voluntários

Doze voluntários adultos, com idades entre 20 e 32 anos de ambos os sexos e dentro dos critérios de inclusão da pesquisa (adultos saudáveis, com fluxo salivar normal e não utilizando antibióticos ou aparelho intrabucal fixo ou removível, e com habilidade de compreender o protocolo experimental) foram selecionados. Os voluntários foram devidamente informados sobre o experimento e aqueles que aceitaram participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução Nº 196 de 10/03/1996, do Ministério da Saúde.

4.3.3 Preparo dos blocos de esmalte

Setecentos e vinte blocos de esmalte bovino (5 x 5 x 2 mm) foram preparados conforme descrito em Tenuta *et al.*, 2008. Blocos com dureza padronizada (média 350,1 ± 12,6 Kg/cm^2) foram incluídos no experimento. Os blocos foram aleatoriamente divididos em seis grupos de 120 espécimes cada, correspondentes aos produtos a serem testados. Destes, 96 de cada grupo foram utilizados no experimento *in situ* e 24 foram utilizados para determinação da

concentração de "CaF_2" e FA formados pelos tratamentos e retidos após exposição à saliva artificial.

4.3.4 Aplicação dos tratamentos e exposição à saliva artificial

Os blocos do grupo controle foram tratados com jato de água purificada por 30 s, seguido de secagem com lenço de papel. Para os géis e espuma, os produtos fluoretados foram aplicados conforme descrito no estudo 1. Para a aplicação do verniz, optou-se por simular a aplicação clínica por 24 h, mediante exposição a fluxo de saliva. Em um estudo piloto, foi padronizada a aplicação de 15 (±1,0) mg de verniz fluoretado, e imersão dos blocos em fluxo contínuo de saliva artificial (ten Cate & Duijsters, 1982), utilizando volume de 10 mL por bloco e renovação contínua da saliva num fluxo de 0,5 mL/min/bloco (Edgar *et al*., 2004). Esse protocolo foi utilizado no presente estudo, com correção para os volumes a serem utilizados, uma vez que 5 blocos foram tratados com verniz e expostos a saliva artificial de uma só vez. Assim, 15,0 (±1,0) mg do produto foi aplicado na superfície de cada bloco em balança analítica (Figura 11) e 5 blocos (4 a serem utilizados no experimento *in situ* e um para determinação da concentração de F formado no esmalte) foram imersos em 50,0 (± 10) mL de saliva artificial acoplado a uma bomba peristáltica com renovação contínua (2,5 mL/min) de saliva artificial, por 24 h. Após 24 h o verniz foi removido usando haste de algodão embebida em acetona (Hayacibara *et al*., 2004; Bruun & Givskov, 1991), os blocos foram lavados por 30 s com acetona seguido de lavagem por mais 30 s com água purificada, e secos em lenço de papel.

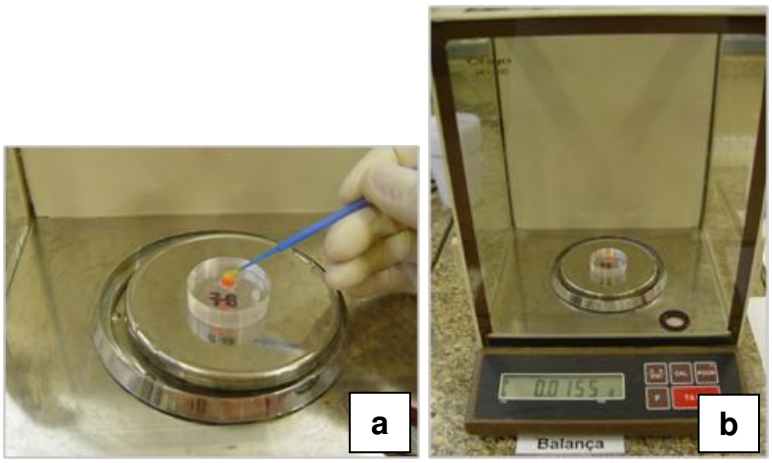

Figura 11: Figuras **a** e **b**: aplicação do verniz em balança analítica

Considerando o delineamento boca-dividida utilizado, que simulou o efeito anticárie em blocos recém-tratados com os produtos para ATPF e em blocos expostos à saliva por sete dias (Dijkamn *et al*., 1983; Serra *et al*., 1989), metade dos blocos tratados foram imersos em saliva artificial (6 mL/mm^2/bloco), por sete dias, sob agitação (Figura 12), com renovação diária de 1/3 da saliva.

Para se evitar distintas condições entre as fases experimentais, que foram realizadas ao longo de 6 semanas, os blocos foram tratados e expostos à saliva imediatamente antes de cada fase.

Figura 12: Blocos imersos em saliva artificial por sete dias sob agitação, para simulação de exposição à cavidade bucal. Cada frasco continham 5 blocos de cada tratamento, referente aos blocos que seriam utilizados por cada voluntário na fase experimental

seguinte (n=4) mais um bloco utilizado para determinar a concentração de "CaF_2" e FA retidos após esse procedimento.

4.3.5 Determinação da dureza inicial do esmalte

Após a ATPF e exposição de metade dos blocos à saliva artificial por sete dias, porém antes do teste intraoral, a dureza inicial do esmalte foi determinada, realizando-se onze indentações a partir de 50 um de uma das bordas do bloco, que foi marcada para futura referência, até o centro do bloco (2.500 um). As distâncias utilizadas para a determinação da dureza (50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500) permitem um mapeamento da superfície do bloco para posterior determinação da perda de dureza simulando espessura crescente da 'placa teste' (Zero, 1995; Cury *et al.*, 2003, Figura 7). Para determinação da dureza, foi utilizado um microdurômetro Future-Tech FM, com carga de 50 g, por 5 s.

4.3.6 Montagem do Dispositivo Palatino

A 'placa teste' foi preparada a partir de *Streptococcus mutans* Ingbrit-1600 cultivados no caldo Todd Hewitt (THB) suplementado com sacarose 1%, em CO_2 a 10% (estufa Jouan IG 150, França) por 18 horas a 37°C. O sedimento contendo células e polissacarídeos extracelulares ('placa teste') foi coletado e centrifugado (3000 *g*, 35 min, 4°C), sendo lavado duas vezes com tampão refrigerado a 4ºC (100 mM KCL; 20 mM $KHCO_3$, pH 7,0) e colocado em um filtro de papel para remover o excesso de umidade (Figura 13). A 'placa teste' resultante foi mantida a baixa temperatura sobre gelo moído até ser posicionada nos dispositivos intrabucais e utilizada no máximo em 30 minutos após o preparo.

Figura 13: ‘Placa teste’ preparada a partir de *Streptococcus mutans* Ingbrit-1600, sobre filtro de papel para remoção do excesso de umidade.

A ‘placa teste’ foi aplicada nos recessos de dois holders plásticos, e sobre ela foram fixados os blocos de esmalte, utilizando fio ortodôntico. Os blocos foram montados e os holders posicionados no dispositivo palatino de modo que a borda dos blocos a partir da qual a avaliação da microdureza foi realizada ficasse colocada voltada para o centro do dispositivo palatino (Cury *et al*., 2003). A cada fase experimental, blocos tratados com o mesmo produto foram testados, sendo montados em um dos holders os blocos recém tratados (4 blocos) e no outro os blocos que foram expostos à saliva artificial por sete dias (4 blocos) (Figura 14).

Figura 14: Dispositivo palatino com os holders contendo os blocos dentais, em contato com a placa teste. Os blocos foram fixados com fio ortodôntico. As terminações de cada fio foram protegidas com cera 7

4.3.7 Análises de F no Fluido da Placa

Amostras da 'placa teste' coletadas aos 30 min do experimento foram inseridas em uma ponteira com óleo mineral e centrifugadas para separação da fração fluida e sólida da 'placa teste' (Vogel *et al.*, 1997) (Figura 15). A concentração de F foi imediatamente analisada. Amostras da fração fluida foram aplicadas na superfície do cristal sensível a fluoreto do eletrodo íon-específico invertido, sob óleo mineral, utilizando micropipetas. Sob microscópio, um microeletrodo de referência foi trazido em contato com cada uma das amostras,

fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto através de um potenciômetro (Vogel *et al*., 1997; Tenuta *et al*., 2006).

Previamente à determinação da concentração de F nas amostras de fluido, foi necessário o tamponamento com TISAB III (total ionic strenght adjustment buffer). Para essa diluição, alíquotas de TISAB III foram aplicadas na superfície do eletrodo, sendo as amostras de fluido aplicadas sobre essas alíquotas, em volume proporcional a 10 partes de amostra para 1 parte de TISAB III. Previamente à diluição das amostras, o operador calibrado aferiu a diluição, utilizando um padrão de concentração conhecida, tolerando um máximo de 3% de variação entre a concentração esperada e a obtida.

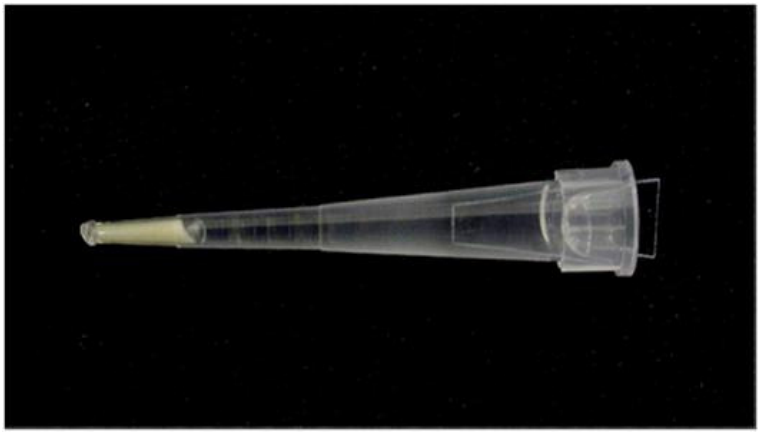

Figura 15: Ponteira com óleo mineral com a fração sólida e fluida (pequena gota) da 'placa teste'

4.3.8 Análise da Perda Mineral do Esmalte

A microdureza superficial final dos blocos utilizados *in situ* foi realizada a 100 µm das indentações iniciais, nas mesmas distâncias da borda do bloco (Figura 16). A partir da borda do bloco a solução de sacarose e a saliva tinham acesso à superfície de esmalte coberta pela 'placa teste', simulando a espessura da 'placa teste' de 50 a 2500 um (Zero, 1995, Figura 7). A % de perda de dureza da superfície foi calculada em cada distância pela fórmula: [%PDS= (Dureza final – Dureza inicial) x 100/ Dureza inicial].

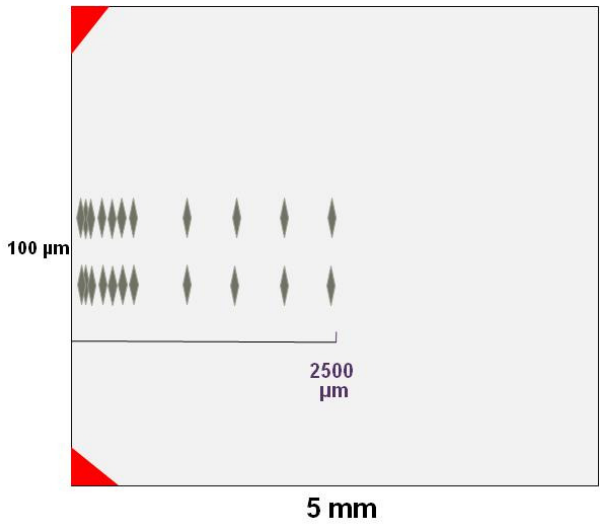

Figura 16: Ilustração esquemática das indentações iniciais e finais realizadas no bloco *in situ* para determinação da %PDS

4.3.9 Determinação de "CaF_2" e FA no esmalte

A determinação da concentração de F como "CaF_2" seguiu o mesmo protocolo descrito para o estudo 1. Os blocos foram individualmente imersos em 1,0 mL de KOH M, sendo a solução neutralizada com 1,0 mL de TISAB II contendo HCl M após 24 h. Para a segunda extração os blocos foram imersos em 0,5 mL de KOH M e neutralizados com o mesmo volume de TISAB II contendo HCl M. A concentração de F como "CaF_2" formado em cada bloco de esmalte foi calculada e expressa como µg F/cm^2.

Após a extração em KOH, a concentração de F como FA foi estimada da mesma forma descrita no estudo 1, utilizando 1,0 mL de HCl 0,5 M para a remoção de uma camada de esmalte. Assim, a concentração de FA foi calculada e expressa como µg F/cm^2.

4.3.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando ANOVA, num delineamento fatorial 6 x 2 (produtos para ATPF em 6 níveis x condição em 2 níveis (recém-

tratados ou após exposição a saliva)), com □=5%. Os voluntários foram usados como blocos estatísticos. Para atender as pressuposições da ANOVA, os dados de F no fluido aos 30 minutos e "CaF_2" foram transformados ao logaritmo base 10 e os dados de FA foram elevados à potência de 0,3. O nível de significância foi predeterminado em 5% e o software SAS (versão 9.2) foi utilizado em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo 1

A figura 17 mostra a concentração de F como "CaF_2" (µg F/cm^2) formado no esmalte humano e bovino. Não houve interação entre os fatores tratamento e substrato ($p>0,05$). Para todos os grupos, uma maior concentração de F foi encontrada no substrato bovino em relação ao humano ($p<0,05$). Na comparação entre os tratamentos, houve maior formação de "CaF_2" no grupo FFA gel, seguido do FFA espuma, NaF 2% gel e grupo controle, com diferenças significativas entre si ($p<0,05$).

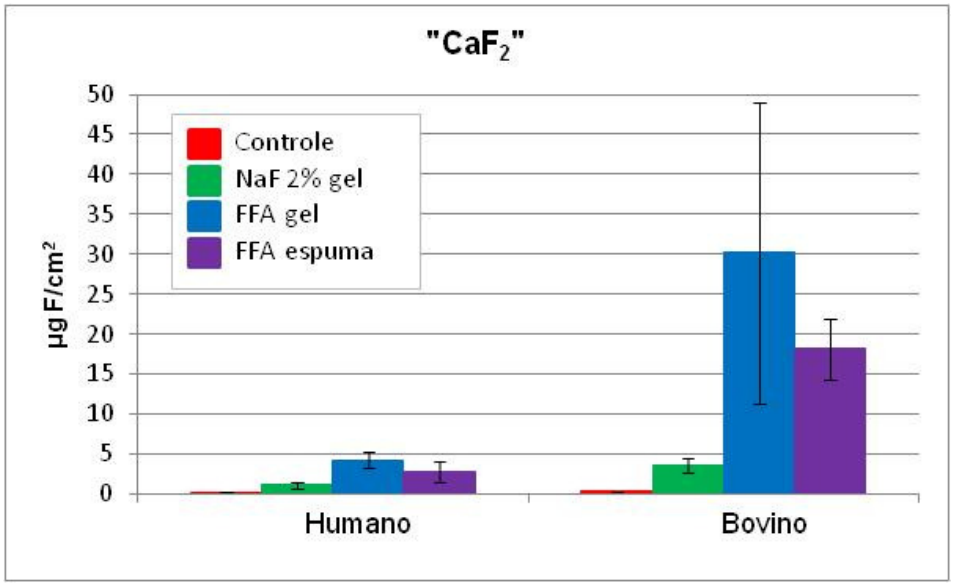

Figura 17: Concentração de F como "CaF_2" nos substratos humano e bovino (média ± DP, n=8). Maior concentração de F foi observada para o substrato bovino do que para o humano ($p<0,05$), com diferenças significativas entre todos os tratamentos ($p<0,05$).

A concentração de F como FA formada nos blocos humano e bovino está descrita na figura 18. Houve interação significativa entre os fatores tratamentos e substrato ($p<0,05$). Uma maior concentração de F foi observada no

grupo controle do substrato humano que em relação ao bovino (p<0,05). Quando da ATPF o substrato humano não diferiu do bovino, exceto para o FFA gel (p<0,05), que apresentou maior concentração no substrato bovino. Na comparação dentro de cada substrato, a ATPF não foi capaz de aumentar a concentração de F no esmalte humano em relação ao controle (p>0,05). Já no substrato bovino todos os produtos F formaram FA no esmalte em relação ao controle, exceto o gel NaF 2% (p>0,05), que também não diferiu do FFA espuma.

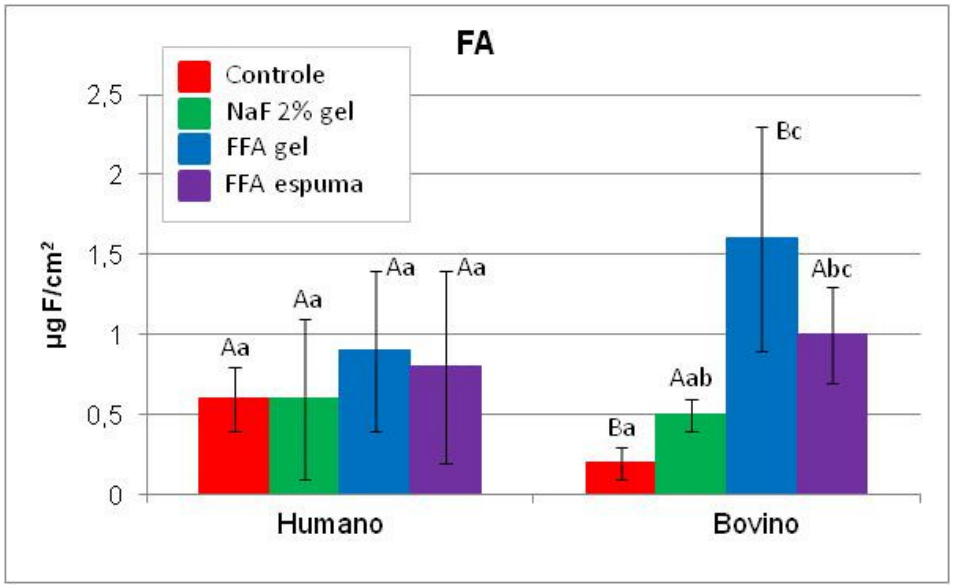

Figura 18: Concentração de F como FA nos substratos humano e bovino (média ± DP, n=8). Letras maiúsculas representam as diferenças entre substratos, dentro de cada produto. Letras minúsculas representam as diferenças entre produtos, dentro de cada substrato.

5.2 Estudo 2

A figura 19 demonstra o "CaF_2" formado e retido após sete dias em saliva artificial nos blocos tratados com os diferentes produtos para ATPF e grupo controle. A ATPF aumentou a concentração de "CaF_2" para todos os tratamentos em relação ao grupo controle (p<0,05). A maior concentração de "CaF_2" foi formada nos blocos tratados com FFA gel e vernizes. O tratamento com a espuma de FFA resultou em concentração significativamente menor do que o FFA gel

(p<0,05), porém semelhante àquela formada pelo verniz fluoretado (p>0,05). O NaF 2% gel apresentou os menores valores de "CaF_2" formado (p<0,05). O processo de envelhecimento por sete dias em saliva artificial foi capaz de reduzir o "CaF_2" formado em todos grupos tratados com F (p<0,05), porém sem efeito no grupo controle (p>0,05). Nesse momento, a maior concentração de "CaF_2" retido foi observada para o grupo verniz bifluoretado, seguido do verniz fluoretado (p<0,05). Os grupos FFA gel, espuma e F neutro não diferiram entre si (p>0,05).

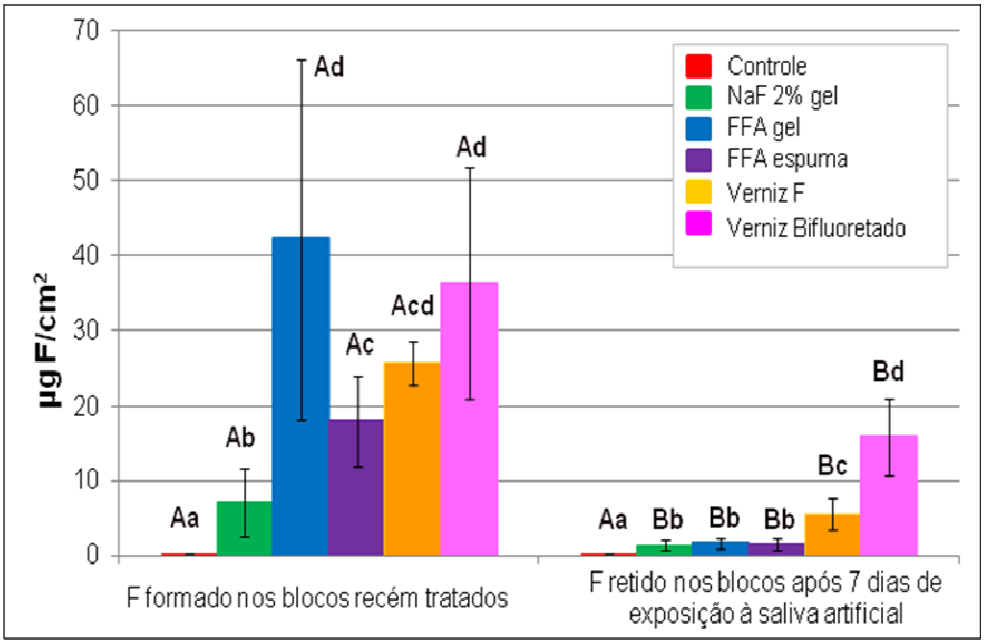

Figura 19: Concentração de F como "CaF_2" nos blocos recém tratados com ATPF ou após sete dias de exposição à saliva artificial (média ± DP, n=12). Letras maiúsculas representam as diferenças entre as condições, dentro de cada produto. Letras minúsculas representam as diferenças entre produtos, dentro de cada condição.

A concentração de FA formada e retida após sete dias em saliva artificial é apresentada na Figura 20. A ATPF aumentou a concentração de FA em todos os grupos em relação ao controle, exceto para o NaF 2% gel (p>0,05). Concentrações gradativamente maiores foram encontradas para os grupos NaF 2% gel, FFA espuma, FFA gel, verniz fluoretado e verniz bifluoretado. Após exposição à saliva, a concentração de FA aumentou significativamente para os

grupos controle, NaF 2% gel e verniz bifluoretado, e diminuiu para o grupo FFA espuma ($p<0,05$). Nesse momento, na comparação entre os tratamentos, o NaF 2% gel não diferiu do controle ($p>0,05$), os FFA gel e espuma apresentaram concentração intermediárias e os maiores valores foram observados para os vernizes.

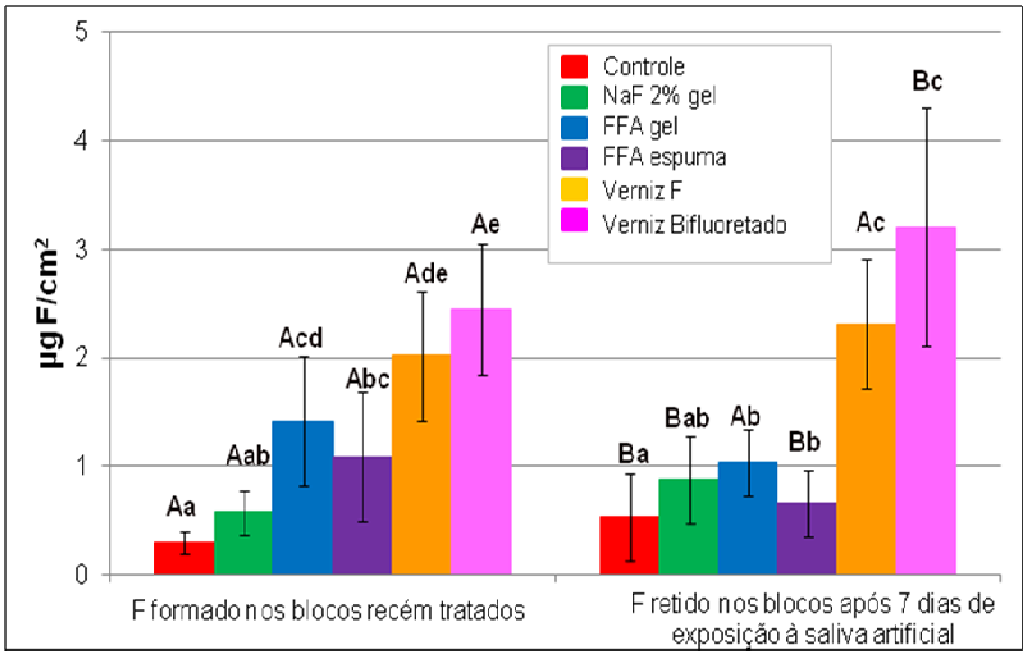

Figura 20: Concentração de F como FA nos blocos recém tratados com ATPF ou após sete dias de exposição à saliva artificial (média ± DP, n=12). Letras maiúsculas representam as diferenças entre as condições, dentro de cada produto. Letras minúsculas representam as diferenças entre produtos, dentro de cada condição.

Após o contato dos blocos com a 'placa teste' *in situ* por 30 min (Figura 21), os blocos recém tratados foram capazes de aumentar a concentração de F no fluido da placa teste em relação ao controle, sendo que aqueles tratados com os produtos FFA gel e espuma e os vernizes não diferiram entre si ($p>0,05$) e concentrações intermediárias foram observadas para os blocos tratados com o NaF 2% gel. Para os blocos expostos à saliva artificial, a liberação de F para o fluido da 'placa teste' foi significativamente menor para todos os grupos tratados

com F (p<0,05). A maior concentração de F no fluido para os blocos expostos à saliva foi observada para os grupos tratados com vernizes (p>0,05), seguido do FFA gel, FFA espuma e NaF 2% gel, sendo que este último não diferiu significativamente do grupo controle e do grupo FFA espuma (p>0,05).

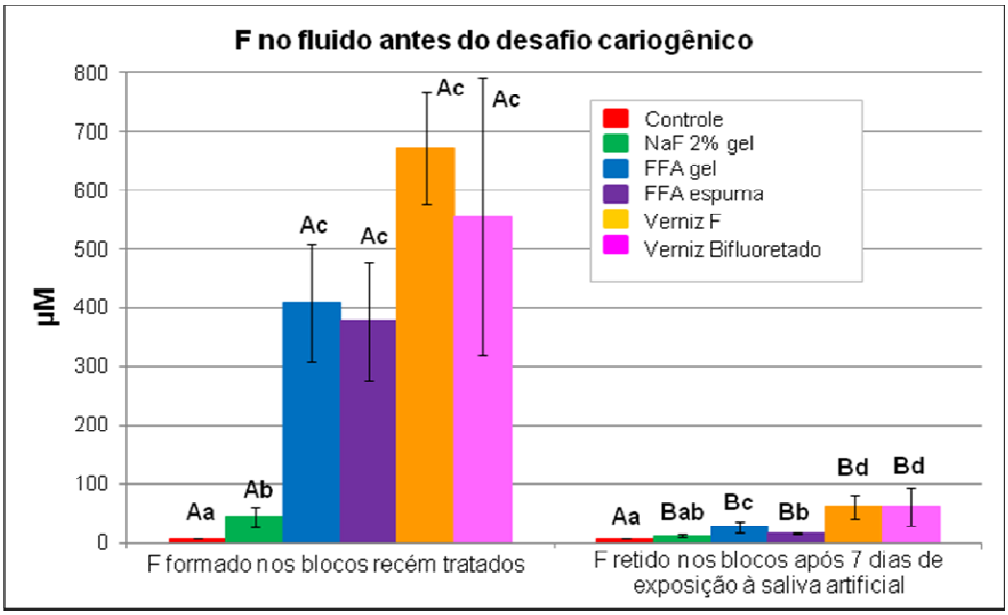

Figura 21: Concentração de F no fluido da 'placa teste' aos 30 min nos blocos recém tratados com ATPF ou após sete dias de exposição à saliva artificial (média ± DP, n=12). Letras maiúsculas representam as diferenças entre as condições, dentro de cada produto. Letras minúsculas representam as diferenças entre produtos, dentro de cada condição.

As figuras 22 e 23 apresentam os resultados de %PDS para os blocos utilizados *in situ*, recém tratados com ATPF ou expostos à saliva, respectivamente. Para os blocos recém tratados (figura 22) a maior desmineralização do esmalte foi encontrada no grupo controle, seguida do NaF 2% gel . Os menores valores de %PDS foram observados para os grupos FFA gel, espuma e vernizes, que não diferiram entre si (p>0,05).

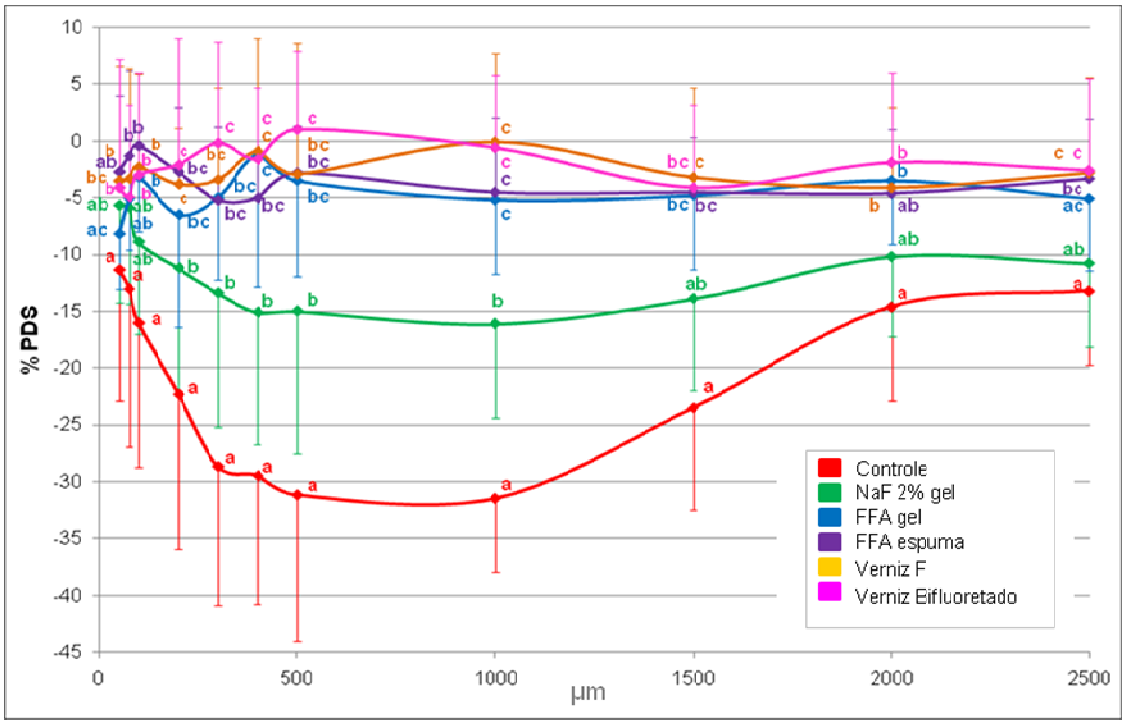

Figura 22: % PDS nos blocos utilizados imediatamente após a ATPF, de acordo com os grupos de tratamento e distância da borda do bloco (50 a 2500 µm), simulando espessura de placa teste (média ± DP, n=12). Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, em cada distância ($p<0,05$).

Para os blocos expostos à saliva artificial (figura 23) uma maior desmineralização do esmalte também foi encontrada no grupo controle, porém os grupos FFA gel, espuma e NaF 2% gel, em algumas das distâncias da borda do bloco avaliadas, não diferiram do controle ($p>0,05$). Ao menor %PDS nos blocos expostos a saliva foi observada para os vernizes.

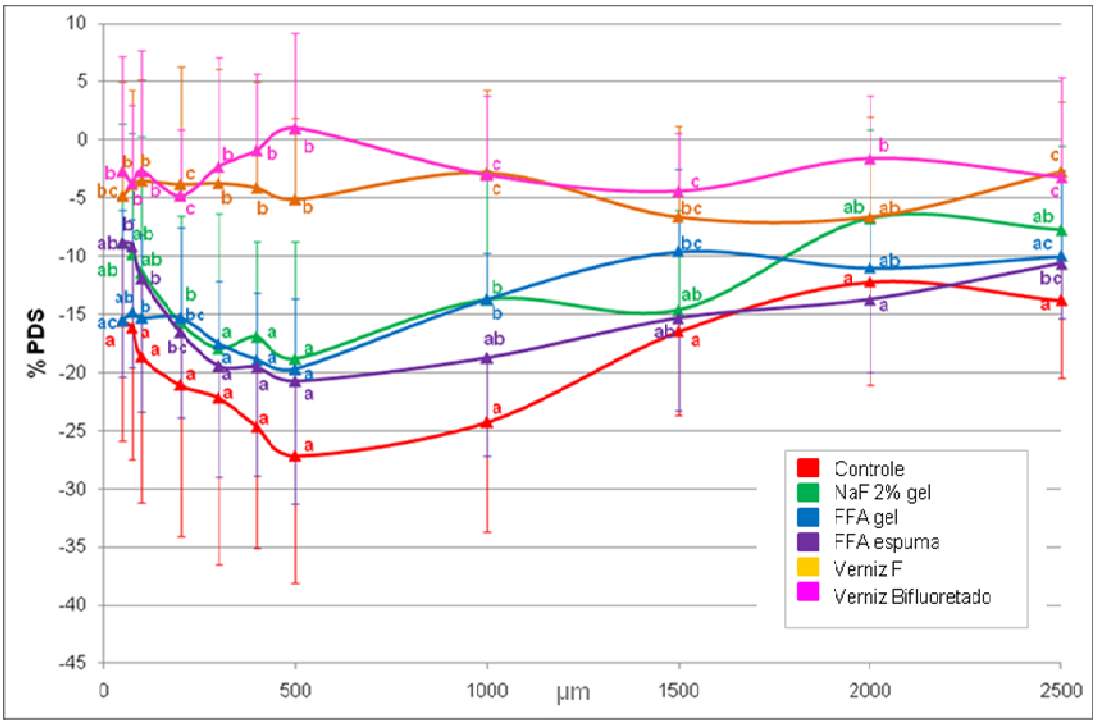

Figura 23: % PDS nos blocos utilizados após sete dias de exposição à saliva artificial, de acordo com os grupos de tratamento e distância da borda do bloco (50 a 2500 µm), simulando espessura de placa teste (média ± DP, n=12). Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, em cada distância ($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

É reconhecido que o F apresenta um importante papel na redução significativa da cárie dental nas populações nas últimas décadas (Clarkson, 2000; Cury *et al*., 2004), através de sua utilização por diversos meios, como água F e dentifrícios. Adicionalmente, a aplicação tópica profissional de F (ATPF) se destaca como meio de uso de F para os pacientes que ainda apresentam alta atividade da doença cárie. Esses produtos para ATPF têm se mostrado eficazes para o controle da cárie (Marinho *et al*., 2011e) devido à capacidade de reagirem com o esmalte dental formando reservatórios de F (Saxegaard & Rölla, 1988).

O mineral tipo fluoreto de cálcio ("CaF_2") formado no esmalte pelos produtos para ATPF tem mostrado ser de fundamental importância para o seu efeito anticárie (Ögaard *et al*., 1990). Utilizando um modelo de estudo similar ao utilizado no estudo 2 deste trabalho, Tenuta *et al*., 2008, demonstraram haver relação de dose resposta entre a concentração de "CaF_2" formado no esmalte, a liberação de fluoreto para o fluido do biofilme e o efeito de inibição da desmineralização.

Entretanto, os produtos para ATPF existentes no mercado apresentam diversas concentrações, pHs e veículos, os quais estudos tem demonstrado formarem distintas concentrações de "CaF_2" no esmalte (Dijkman *et al*., 1982; Saxegaard & Rölla, 1988; Hayacibara *et al*., 2004). Considerando que o mecanismo de ação da ATPF está embasado na reatividade do F do produto com o substrato dental, a avaliação das peculiaridades dessa reatividade com diferentes substratos dentais se faz necessária, uma vez que o substrato bovino vem sendo largamente utilizado nas pesquisas odontológicas como substituto do humano (Valk *et al*., 1985; Attin *et al*., 1995; Maia *et al*., 2003; Paes Leme *et al*., 2003; Hayacibara *et al*., 2004; Paes Leme *et al*., 2004; Tenuta *et al*., 2008).

Os resultados do estudo 1 confirmaram uma maior reatividade para o esmalte bovino quando da ATPF com os produtos FFA gel e espuma e NaF 2% gel em comparação com o esmalte humano, que poderia ser explicado por sua maior porosidade (Arends & Jongebloed, 1978). Em ambos os substratos uma

maior concentração de "CaF_2" pôde ser observada para os grupos FFA gel e espuma em relação ao NaF 2% gel, o que pode ser explicado pelo menor pH desses produtos, disponibilizando cálcio (Ca) do dente para reagir com o fluoreto (Gray *et al*., 1958). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por alguns estudos (Larsen *et al*., 1981; Larsen & Jensen, 1986; Christoffersen *et al*., 1988; Saxegaard & Rölla, 1988; Hayacibara *et al*., 2004) que quando da aplicação de produtos acidulados, observaram maior concentração de "CaF_2" no esmalte em relação a um produto neutro. Considerando que em ambos os substratos o comportamento dos produtos em termos de formação de "CaF_2" foi o mesmo, sugere-se que o substrato bovino possa ser utilizado na comparação entre produtos para ATPF.

Entretanto, no esmalte humano, a ATPF não foi capaz de formar FA de modo a aumentar sua concentração em relação já existente nesse substrato (controle). Isso poderia ser explicado pela maior formação de FA no grupo controle humano, mas também pela menor reatividade dos produtos para ATPF testados com o esmalte humano. O substrato bovino, por outro lado, foi capaz de diferenciar os grupos em termos de formação de FA. Considerando que a FA é considerada como uma conseqüência do processo de cárie na presença de F, com pouca relação com a inibição da desmineralização dental frente a um desafio cariogênico (Tenuta *et al*., 2008), as diferenças entre os substratos humano e bovino na formação de FA podem ser consideradas aceitáveis quando se considera a aplicação de ambos os substratos em pesquisas.

O estudo 2 corroborou os dados de reatividade obtidos no estudo 1, com a inclusão de dois outros grupos, compreendendo os vernizes fluoretados. Uma alta concentração de "CaF_2" foi encontrada após aplicação dos produtos FFA acidulados e verniz fluoretados (Dijkman *et al*., 1982; Hayacibara *et al*., 2004) sobre o esmalte, com formação de "CaF_2" em concentração semelhantes entre o FFA gel e o verniz F (Dijkman & Arends, 1988). O verniz bifluoretado também demonstrou grande capacidade de formar "CaF_2" sobre o esmalte, o que está de

acordo com estudo realizado por Attin *et al*., 1995, após o uso de um verniz com composição semelhante (NaF 6% e CaF_2 6%).

É importante ressaltar que o sistema de fluxo salivar no qual os blocos foram imersos por 24 h se mostrou eficaz para simular a formação do "CaF_2" e FA no esmalte para os grupos vernizes F, já que estudos demonstram a importância da permanência desses produtos sobre o esmalte por longos períodos (Retief *et al*., 1980; Ripa, 1990).

O processo de envelhecimento em saliva artificial por sete dias foi capaz de reduzir as concentrações de "CaF_2" formadas sobre o esmalte (Dijkman *et al*., 1983; Serra *et al*., 1989; Tenuta *et al*., 2008). As maiores concentrações de "CaF_2" retido após exposição a saliva nos grupos tratados com os vernizes F indicam que os reservatórios de fluoreto formados durante o período de aplicação de 24 h permanecem por longo período de tempo, e contrastam com os resultados de Dijkman *et al*., 1983, que demonstraram que após ATPF com o verniz F e exposição na saliva grandes quantidades de "CaF_2" foram perdidas após algum tempo.

Ainda no estudo 2, os resultados demonstraram que após ATPF houve a formação de FA para os grupos F (com exceção do grupo NaF 2% gel, que não diferiu do controle), o que está de acordo com a literatura (Retief *et al*., 1980; Dijkman *et al*., 1982; Benediktsson *et al*., 1982; Retief *et al*., 1983; Ögaard *et al*., 1984; Whitford *et al*., 1995). Por outro lado, após exposição à saliva artificial, não eram esperadas alterações na concentração de FA em relação aos grupos recém-tratados, já que estudos demonstraram que após ATPF e exposição à saliva artificial, a FA não foi afetada (Serra *et al*., 1989; Tenuta *et al*., 2008). O aumento na concentração de FA para os grupos NaF 2% gel e verniz bifluoretado pode ser explicado pela precipitação de FA no esmalte como conseqüência da liberação dos reservatórios de "CaF_2" para a saliva artificial na qual os blocos ficaram imersos. No caso do grupo controle, o mesmo poderia ocorrer como resultado do contato dos blocos, cuja camada superficial de esmalte foi removida por

polimento, com a saliva artificial que contém concentração residual de F (0,02 ppm).

Os produtos para ATPF foram eficazes em reduzir significativamente a desmineralização do esmalte, especialmente logo após a aplicação tópica. Nesse momento, o maior efeito foi demonstrado para os produtos FFA gel e espuma e vernizes fluoretados, o que pode ser atribuído à alta concentração de "CaF_2" formado sobre o esmalte e a liberação do F do "CaF_2" para a 'placa teste' aos 30 min do experimento (Tenuta *et al*., 2008). Entretanto, os resultados demonstraram que após a imersão em saliva artificial por sete dias os produtos FFA gel e espuma perderam parte do seu efeito anticárie, sendo que nesse momento os vernizes fluoretados foram os produtos mais eficazes contra a desmineralização do esmalte. Esse resultado também pode ser explicado pela maior concentração de "CaF_2" retido após sete dias em saliva artificial nesses grupos, e sua liberação a partir desse reservatório para o fluido da placa teste. Esses resultados sugerem a realização de estudos adicionais para avaliar o mecanismo de ação dos vernizes fluoretados em condições mais próximas àquelas encontradas na clínica, como a avaliação de sua efetividade quando permanecem em contato com a superfície dental por tempos menores do que o testado neste estudo (24 horas).

Embora o efeito anticárie dos produtos para ATPF esteja comprovado por revisões sistemáticas da literatura (Marinho *et al*., 2011e), estudos adicionais utilizando vernizes fluoretados foram sugeridos (Marinho *et al*., 2011a). Em acréscimo, boa parte dos trabalhos utilizados nessas revisões foram realizados há décadas, quando os índices mundiais de cárie progrediam de forma mais acelerada do que atualmente. Também, pouco se conhece sobre a efetividade dos produtos neutros em relação aos acidulados. Assim, os resultados do estudo 2 trouxeram um melhor entendimento da efetividade anticárie dos produtos para ATPF para o clínico. Os produtos para ATPF se mostraram eficazes no efeito anticárie, especialmente os vernizes F, os quais mantiveram seu efeito contra a cárie uma semana após sua aplicação. Esses resultados sugerem que estudos

adicionais sejam realizados para explicar a diferença de efeito entre produtos F de reatividade mais rápida (géis, espumas) e mais lenta (vernizes).

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere que o substrato bovino pode ser utilizado como substituto do humano em estudos para estimar o potencial anticárie de produtos para ATPF, porém a maior reatividade de produtos fluoretados com o primeiro deve ser considerada. O efeito anticárie de produtos para ATPF parece estar relacionado com sua capacidade de formar no esmalte reservatórios de F e destes serem mantidos em concentrações residuais por prolongados períodos de tempo.

REFERÊNCIAS*

1. Arends J, Jongebloed, WL. Crystallites dimensions of enamel. J Biol Buccale. 1978; 6(3): 161–71.
2. Attin T, Hartmann O, Hilgers RD, Hellwig E. Fluoride retention of incipient enamel lesions after treatment with a calcium fluoride varnish in vivo. Arch Oral Biol. 1995; 40(3): 169-74.
3. Benediktsson S, Retief DH, Bradley EL, Switzer P. The effect of contact time of acidulated phosphate fluoride on fluoride concentration in human enamel. Arch Oral Biol. 1982; 27: 567-72.
4. Bijella MFTB, Bijella VT, Lopes ES, Bastos JR de M. Comparison of dental prophylaxis and toothbrushing prior to topical APF applications. Community Dent Oral Epidemiol. 1985; 13: 208-11.
5. Brudevold F, McCann HG, Nilsson R, Richardson B, Coklica V. The chemistry of caries inhibition problems and challenges in topical treatments. J Dent Res. 1967; 46(1): 37-45.
6. Bruun C, Givskov H. Formation of CaF_2 on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications *in vitro*. Caries Res. 1991; 25: 96-100.
7. Bruyn de H, Arends J. Fluoride varnishes – A review. J Biol Buccale. 1987; 15: 71-82.
8. Calvo AFB, Tabchoury CPM, Cury AADB, Tenuta LMA, Silva WJda, Cury JA. Effect of APF-gel application time on enamel demineralization of deciduous and permanent teeth. Caries Res. 2012. No prelo.
9. Caslavska V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions. Arch Oral Biol 1975; 20: 333-39.

---

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Cheyne VD. Human dental caries and topically applied fluorine: A preliminary report. J Am Dent Assoc. 1942; 29: 804-7.
11. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibalczyc W, Perdok WG. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. Acta Odontol Scand. 1988; 46(6): 325-36.
12. Clarkson JJ. International collaborative research on fluoride. J Dent Res 2000; 79: 893-904.
13. Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res. 2000; 34(6): 491-97.
14. Cury JA, Francisco SB, Simões GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization *in situ*. Caries Res 2003; 37: 194-99.
15. Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. Braz Dent J. 2004; 15(3): 167-74.
16. Dijkman AG, Tak J, Arends J. Fluoride deposited by topical applications in enamel KOH-soluble and acquired fluoride. Caries Res. 1982; 16: 147-155.
17. Dijkamn AG, Boer de P, Arends J. In vivo investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical applications. Caries Res. 1983: 17: 392-402.
18. Dijkman TG, Arends J. The role of 'CaF2-like' material in topical fluoridation of enamel in situ. Acta Odontol Scand. 1988; 46(6): 391-7.
19. Duke S, Forward GC. Calcium fluoride and fluoridated hydroxyapatite formation in relation to the acid dissolution rate of enamel mineral. Caries Res. 1978; 12(1): 12-20.
20. Edgar WM, Dawes C, O`Mullane D. Saliva and Oral Health. 3th ed. London: British Dental Association. 2004.

21. Englander HR, Keyes PH, Gestwicki M, Sultz HA. Clinical anticaries effect of repeated topical sodium fluoride applications by mouthpieces. J Am Dent Assoc. 1967; 75: 638-44.
22. Englander HR, Carlos JP, Senning RS, Mellberg JR. Residual anticaries effect of repeated topical sodium fluoride applications by mouthpieces. J Am Dent Assoc. 1969; 78: 783-7.
23. Evans D. APF foam does reduce caries in primary teeth. Evid Based Dent. 2007; 8(1): 7.
24. Gerould CH. Electron microscope study of the mechanism of fluorine deposition in teeth. J Dent Res. 1945; 24: 223-33.
25. Gray JA, Schweizer HC, Rosevear FB, Broge RW. Electron microscopic observations of the differences in the effects of stannous fluoride and sodium fluoride on dental enamel. J Dent Res. 1958; 37(4): 638-48.
26. Grön P. Chemistry of topical fluorides. Caries Res. 1977; 11(Suppl. 1): 172-204.
27. Hayacibara MF, Paes Leme AF, Lima YBO, Gonçalves NCLAV, Queiroz CS, Gomes MJ, *et al*. Alkali-soluble fluoride deposition on enamel after professional application of topical fluoride *in vitro*. J. Appl. Oral Sci. 2004; 12(1): 18-21.
28. Holm AK. Effect of a fluoride varnish (Duraphat®) in preschool children. Community Dent Oral Epidemiol. 1979; 7: 241-5.
29. Jiang H, Bian Z, Tai BJ, Du MQ, Peng B. The effect of a bi-annual Professional application of APF foam on dental caries increment in primary teeth: 24-month clinical Trial. J Dent Res. 2005; 84(3): 265-8.
30. Khattak MF, Conry JP, Ko C-C. Comparison of three topical fluorides using computer imaging. J Clin Pediatr Dent. 2005; 30(2): 139-44.
31. Klimek J, Prinz H, Hellwig E, Ahrens G. Effect of a preventive program based on Professional toothcleaning and fluoride application on caries and gengivitis. Community Dent Oral Epidemiol. 1985; 13: 295-8.

32. Koch G, Petersson L, Gleerup A, Löwstedt E. Kinetics of fluorine in deciduous enamel after application of fluoride-containing varnish (Duraphat®). Swed Dent J. 1982; 6: 39-44.
33. Koo RH, Cury JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. Am J Dent. 1998; 11: 173-76.
34. Larsen MJ, Lambrou D, Fejerskov O, Tachos B. A study on accumulation and release of loosely bound fluoride on enamel. Caries Res. 1981; 15: 273-77.
35. Larsen MJ, Jenses SJ. On the properties of fluoride solutions used for topical treatment and mouth rinse. Caries Res. 1986; 20: 56-64.
36. Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. Caries Res. 2001; 35(1): 57-60.
37. Maia LC, de Souza IPR, Cury JA. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake *in vitro*. Eur J Oral Sci. 2003; 111: 68-72.
38. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 08, Art. No. CD002279. DOI: 10.1002/14651858. CD002279. Pub3a.
39. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 08, Art. No. CD002280. DOI: 10.1002/14651858. CD002280. Pub2b.
40. Marinho VCC, Higgins JPT, Sheiham A, Stuart L. One topical fluoride (toothpastes, or mouthrinses, or gels, or varnishes) versus another for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 08, Art. No. CD002780. DOI: 10.1002/14651858. CD002780. Pub1c.
41. Marinho VCC, Higgins JPT, Sheiham A, Stuart L. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane

Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 08, Art. No. CD002781. DOI: 10.1002/14651858. CD002781. Pub1d.

42. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 08, Art. No. CD002782. DOI: 10.1002/14651858. CD002782. Pub4e.
43. Mc Cann HG, Bullock FA. Reactions of fluoride ion with powdered enamel and dentin. J Dent Res. 1955; 34: 59-67.
44. McCann HG. The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. Arch Oral Biol. 1968; 13(8): 987-1001.
45. Mellberg JR, Laakso PV, Nicholson CR. The acquisition and loss of fluoride by topically fluoridated human tooth enamel. Arch Oral Biol. 1966; 11: 1213-20.
46. Myers HM. Summary of open discussion. Caries Res. 1977; 11(suppl 1): 204.
47. Ögaard B, Rölla G, Helgeland K. Alkali soluble and alkali insoluble fluoride retention in demineralized enamel in vivo. Scand J Dent Res. 1983; 91(3): 200-4.
48. Ögaard B, Rölla G, Helgeland K. Fluoride retention in sound and demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat). Scand J Dent Res. 1984; 92: 190-7.
49. Ögaard B, Rölla G, Ruben J, Arends J. Relative cariostatic effects of KOH-soluble and KOH-insoluble fluoride *in situ*. J Dent Res. 1990; 69(8): 1505-7.
50. Ögaard B, Seppa L, Rölla G. Professional topical fluoride applications-clinical efficacy and mechanism of action. Adv Dent Res. 1994; 8(2): 190-201.
51. Ögaard B. CaF_2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. Caries Res. 2001; 35(suppl 1): 40-44.
52. Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoride dentifrice and acidulate phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. Am J Dent. 2003; 16: 91-5.

53. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. J Dent Res. 2004; 83(1): 71-5.
54. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J Dent Res. 2006; 85(10): 878-87.
55. Paes Leme AF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Efeito da associação da aplicação de fluoreto profissional e uso de dentifrício no esmalte dental. RGO. 2007; 55(1): 35-40.
56. Pameijer JHN, Brudevold F, Hunt EE. A study of acidulated fluoride solutions-III. The cariostatic effect of repeated topical sodium fluoride applications with and without phosphate: a pilot study. Arch Oral Biol. 1963; 8: 183-5.
57. Retief DH, Sorvas PG, Bradley EL, Taylor RE, Walker AR. In vitro fluoride uptake, distribution and retention by human enamel after 1- and 24-hour application of various topical fluoride agents. J Dent Res. 1980; 59: 573-82.
58. Retief DH, Bradley EL, Holbrook M, Switzer P. Enamel fluoride uptake, distribution and retention from topical fluoride agents. Caries Res. 1983; 17: 44-51.
59. Ripa LW. An evaluation of the use of professional (Operator-applied) topical fluorides. J Dent Res. 1990; 69(Spec Iss): 786-96.
60. Rölla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. Acta Odontol Scand. 1988; 46: 341-5.
61. Saxegaard E, Lagerlöf F, Rölla G. Dissolution of calcium fluoride in human saliva. Acta Odontol Scand. 1988; 46: 355-9.
62. Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. Scand J Dent Res. 1988; 96(6): 523-35.
63. Seppä L, Luoma H, Hausen H. Fluoride content in enamel after repeated applications of fluoride varnishes in a community with fluoridated water. Caries Res. 1982a; 16: 7-11.

64. Seppä L, Tuutti H, Luoma H. Three-year report on caries prevention using fluoride varnishes for caries risk children in a community with fluoridated water. Scand J Dent Res. 1982b; 90: 89-94.
65. Seppä L, Leppänen T, Hausen H. Fluoride varnishes versus acidulated phosphate fluoride gel: a 3-year clinical trial. Caries Res. 1995; 29: 327-30.
66. Serra MC, Sartini Filho R, Cury JA. Incorporação e retenção de flúor em esmalte e dentina após aplicação tópica de flúor fosfato acidulado. Rev Bras de Odontol. 1989; XLVI: 18-23.
67. ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. Caries Res. 1982; 16: 201-10.
68. ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. Eur J Oral Sci. 1997; 105: 461-65.
69. ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O, Kidd E, editores. Dental Caries: The disease and its clinical management. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p.49-69.
70. Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, P_i, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. J Dent Res 2006; 85: 834-38.
71. Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF_2 and enamel demineralization. J Dent Res. 2008; 87(11): 1032-6.
72. Valk JWP, Duijsters PPE, ten Cate JM, Davidson CL. Long-term retention and effectiveness of APF and neutral KF fluoridation agents on sound and etched bovine enamel. Caries Res. 1985; 19: 46-52.
73. Villena RS, Tenuta LMA, Cury JA. Effect of APF gel application time on enamel demineralization and fluoride uptake in situ. Braz Dent J. 2009; 20(1): 37-41.
74. Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. J Dent Res 1997; 76: 761-67.

75. Weintraub JA. Fluoride varnish for caries prevention: comparison with other preventive agents and recommendations for a community-based protocol. Spec Care Dentist. 2003; 23(5): 180-6.
76. Wellock WD, Brudevold F. A study of acidulated fluoride solutions-II. The caries inhibiting effect of single annual topical applications of an acidic fluoride and phosphate solution. A two year experience. Arch Oral Biol. 1963; 8: 179-82.
77. Whitford GM, Adair SM, Hanes CMM, Perdue EC, Russel CM. Enamel uptake and patient exposure to fluoride: comparison of APF gel and foam. Pediatric Dentistry. 1995; 17: 199-203.
78. Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, Mccormack SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. J Dent Res. 1992; 71(Spec Iss): 871-8.
79. Zero DT. *In situ* caries models. Adv Dent Res 1995; 9: 214-30.
80. Zimmer S, Robke FJ, Roulet JF. Caries prevention with fluoride varnish in a socially deprived community. Community Dent Oral Epidemiol. 1999; 27: 103-8.
81. Zimmer S, Bizhang M, Seemann R, Witzke S, Roulet JF. The effect of a preventive program, including the application of low-concentration fluoride varnish, on caries control in high-risk children. Clin Oral Invest. 2001; 5: 40-44.

ANEXO 1

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação in situ de meios de uso profissional de fluoreto usando modelo de curta duração**", protocolo nº **084/2006**, dos pesquisadores **RENATA VALVANO CEREZETTI, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, CÍNTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, JAIME APARECIDO CURY e LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 05/07/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**In situ evaluation of professional methods for fluoride application using a short-term model**", register number **084/2006**, of **RENATA VALVANO CEREZETTI, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, JAIME APARECIDO CURY and LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 05/07/2006.

Profa. Cecília Gatti Guirado
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

PESQUISA: AVALIAÇÃO *IN SITU* DE MEIOS DE USO PROFISSIONAL DE FLUORETO USANDO MODELO DE CURTA DURAÇÃO

Leia este termo cuidadosamente, pois as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e a sua função nela como participante. As informações dispostas neste termo são fornecidas e apresentadas pelos pesquisadores responsáveis por este estudo, Renata Valvano Cerezetti e Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta (orientadora), objetivando firmar acordo formal por escrito, mediante o qual o voluntário, autoriza sua participação no estudo, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos que lhe são inerentes, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação. Assim, caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores.

JUSTIFICATIVA: Embora as campanhas de saúde alertem para a prevenção da cárie dentária através da higienização e visitas regulares ao dentista para aplicação tópica de fluoretos, ainda existe em nosso país um grande número de indivíduos que apresentam cárie. Entretanto, embora o efeito dos diferentes agentes de aplicação tópica profissional de fluoretos na diminuição da desmineralização dental seja estabelecido, não há estudos científicos da avaliação da quantidade de F liberada para o fluido do biofilme, o que ajudaria a entender o efeito anticariogênico.

OBJETIVO: O objetivo desse estudo será relacionar a concentração de CaF_2 no esmalte dental tratado com agentes fluoretados de uso profissional e sua liberação de F para o fluido do biofilme submetido a um desafio cariogênico com a

conseqüente desmineralização do esmalte, utilizando um modelo *in situ* de curta duração.

PROCEDIMENTOS: O estudo será duplo-cego, cruzado (onde todos os voluntários passarão por todos os tratamentos), realizado em 6 fases durante as quais blocos de esmalte dental bovino de microdureza de superfície conhecida e pré-tratados ou não com F profissional serão cobertos por uma 'placa teste' de *S mutans* e submetidos a um desafio cariogênico. Os seguintes grupos e subgrupos de tratamentos serão avaliados: (1) Grupo Controle, sem tratamento; (2) Grupo FFA gel: flúor fosfato acidulado (1,23% de íon fluoreto) na forma de gel; (3) Grupo FFA espuma (1,23% F) na forma de espuma; (4) Grupo FN: fluoreto de sódio a 2% neutro (0,9% F) na forma de gel; (5) Grupo VNaF: verniz fluoretado (NaF a 5%) e (6) Grupo VBF: verniz bifluoretado (NaF a 6% + CaF_2 a 6%, totalizando 5,6% F). Todos os grupos terão 2 subgrupos, um chamado de fresco e o outro de envelhecido, o qual será colocado em fluxo contínuo de saliva artificial para promover o envelhecimento precoce dos reservatórios de F formados no esmalte pela aplicação de F. Quatro blocos com aplicação fresca e 4 envelhecidos de cada tratamento serão fixados em dispositivos palatinos, por um suporte acrílico, e cobertos com uma camada de bactérias obtidas de cultura de *S. mutans* Ingbritt 1600 ('placa teste'). Após 30 min de uso intra-oral do dispositivo a 'placa teste' de dois blocos do tratamento "fresco" e envelhecido será coletada para análise de íons minerais no fluido. O dispositivo será reinserido na boca e será realizado um desafio cariogênico por bochecho por 1 min com solução de sacarose a 20%. Após 45 min a 'placa teste' será coletada para análise de íons minerais no fluido e na sua porção sólida. A microdureza de superfície será novamente determinada para avaliação da porcentagem de perda mineral. E a concentração de F no esmalte (fracamente e firmemente ligado) será determinada.

DESCONFORTOS, RISCOS PREVISÍVEIS E BENEFÍCIOS ESPERADOS: Os voluntários poderão sentir certo desconforto durante o período de utilização dos

dispositivos, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico removível. No entanto, este desconforto é minimizado pelo curto período de utilização. O uso das soluções de sacarose será restrito a uma única exposição por fase do experimento, não implicando em qualquer risco de aumento de cárie dental nos voluntários em função da baixa freqüência. O modelo de estudo de curta duração proposto foi inicialmente proposto em 1984, e desde então a segurança do modelo têm sido repetidamente evidenciada na literatura (Brudevold *et al*. 1984, Zero *et al.* 1992), não havendo riscos previsíveis.

O benefício que os voluntários terão será indireto, contribuindo para a realização deste projeto e permitindo o conhecimento sobre o efeito preventivo e os mecanismos envolvidos na inibição de cárie pelos diferentes meios de aplicação tópica profissional de fluoretos.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES: As informações desejadas poderiam ser obtidas por meio de estudo *in vivo* de avaliação prospectiva, ou estudo *in situ* de longa duração. No entanto, ambos os delineamentos trariam maiores desconfortos para os voluntários, além da necessidade de um acompanhamento por período de tempo maior.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para ajuste no aparelho intrabucal a fim de minimizar qualquer desconforto e caso o voluntário não se sinta bem utilizando o disposito palatino, poderá informar os responsáveis pela pesquisa que estarão por perto para que possam ser tomadas as medidas necessárias. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições de saúde bucal do indivíduo. Os voluntários utilizarão durante o período da pesquisa dentifrício fluoretado, serão orientados a realizarem uma eficiente higiene bucal e continuarão ingerindo água de abastecimento de Piracicaba, que é fluoretada.

Os pesquisadores estarão disponíveis para perguntas ou questionamentos sobre a pesquisa.

FORMA DE ESCLARECIMENTOS: O voluntário tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos, antes, durante ou após a pesquisa, ainda que isso possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

POSSIBILIDADE DE INCLUSÃO NO GRUPO CONTROLE: Como é uma pesquisa do tipo cruzado os voluntários participarão das seis fases propostas, assim haverá uma fase em que o voluntário participará do grupo Controle, que significa ausência de aplicação tópica de fluoreto nos blocos dentários colocados no dispositivo, mas não acarretando prejuízo algum ao voluntário.

RETIRADA DO CONSENTIMENTO: A decisão de fazer parte desta pesquisa é voluntária. O voluntário pode escolher se quer ou não participar, assim como poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer conseqüência ou prejuízo para o voluntário.

GARANTIA DE SIGILO: Os resultados do estudo têm finalidade exclusivamente científica e poderão ser apresentados em congressos e publicados em revistas científicas, porém nem a identidade e nem as fotografias que permitam o reconhecimento dos participantes serão divulgadas nessas apresentações, o mesmo ocorrendo em eventuais publicações. As amostras coletadas dos voluntários para análises serão codificadas garantindo dessa forma o sigilo absoluto.

RESSARCIMENTO DE GASTOS: Os voluntários serão ressarcidos de eventuais despesas com transporte-alimentação para a coleta das amostras contidas nos dispositivos.

FORMAS DE INDENIZAÇÃO PARA OS RISCOS PREVISÍVEIS: Não há previsão de indenização, pois não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa.

Aspecto Legal: O projeto foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos atendendo a resolução no. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília-DF.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em pesquisa da FOP/UNICAMP.

Endereço – Av. Limeira, 901 – CEP/FOP 13.414-903 – Piracicaba – SP Telefone: (0xx19) 2106-5349 e-mail: cep@fop.unicamp.br Website: www.fop.unicamp.br/cep

Será entregue uma cópia do TCLE ao voluntário.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMATIVO

Eu,_____, certifico que tendo lido as informações acima e sendo suficientemente esclarecido de todos os itens pelos pesquisadores através deste TCLE, estou plenamente de acordo com a realização do estudo.

Piracicaba,____de_____de_____.

_____.

Assinatura do (a) voluntário (a)

***** Renata Valvano Cerezetti (Cirurgiã-Dentista Mestre em Odontopediatria) – Av. Limeira, 901. CEP: 13.414-903. Telefone: (0xx19) 2106-5303 (Laboratório Bioquímica).

* Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta – Departamento de Ciências Fisiológicas – FOP – UNICAMP – Av. Limeira, 901. CEP: 13.414-903. Telefone: (0xx19) 2106-5393.