



ALHETHEA RATTI

**“VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE CICLAGENS DE pH PARA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIO DE
ALTA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR EM DENTINA RADICULAR”**

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ALHETHEA RATTI

**““VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE CICLAGENS DE pH PARA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIO DE
ALTA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR EM DENTINA RADICULAR””**

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA,
DA UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRA EM ODONTOLOGIA, NA ÁREA DE
CARIOLOGIA.

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação defendida pela aluna Alhethea
Ratti, e orientada pela Profa. Dra. Cíntia P.
Machado Tabchoury

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R189v Ratti, Alhethea, 1981-
Validação de um modelo de ciclagens de pH para avaliação do potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de flúor em dentina radicular / Alhethea Ratti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cíntia Pereira Machado Tabchoury.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. In Vitro. 2. Fluoretos. 3. Cremes dentais. I. Tabchoury, Cíntia Pereira Machado, 1969- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Validation of a pH-cycling model to evaluate the anticaries potential of high-fluoride toothpaste in root dentine

Palavras-chave em Inglês:

In Vitro

Fluorides

Toothpastes

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Cíntia Pereira Machado Tabchoury [Orientador]

Cecília Pedroso Turssi

Adriana Franco Paes Leme

Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata ALHETHEA RATTI aprovada.

Cynthia Machado Tabchouy

Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Cecilia Pedroso Turssi

Profa. Dra. CECÍLIA PEDROSO TURSSI

Adriana Franco Paes Leme

Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME

Aos meus pais, Selma Silva Ratti e Décio Donizetti Ratti, pelo cuidado, dedicação e apoio incondicional.

Ao meu companheiro Luis pelo incentivo constante.

A Maria Vitória, minha filha amada, pela inocente compreensão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, *Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury*, pela confiança, compreensão e apoio. Agradeço também pela participação sempre presente e pelo exemplo de trabalho dedicado, sério e competente.

Ao *Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury* pelas contribuições sempre decisivas no planejamento e desenvolvimento do trabalho. Agradeço também pelo constante aprendizado, proporcionado durante todos os momentos de convivência e principalmente, pela contribuição no desenvolvimento do nosso senso crítico.

AGRADECIMENTOS

A *Universidade Estadual de Campinas*, pela oportunidade de formação.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, *Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa*.

À *Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas*, na pessoa do Diretor *Prof. Dr. Jacks Jorge Junior*.

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

À *Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury*, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP.

Aos *Profs. Dr Jaime Aparecido Cury e Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta* pelas considerações na fase de pré-qualificação.

Aos *Profs. Dr Jaime Aparecido Cury, Dra. Livia Maria Andaló Tenuta e Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima* pelas observações e correções sugeridas na fase de exame de qualificação (2ª fase).

Ao *CNPq*, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 130672/2010-6).

À *Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta*, pela contribuição na minha formação ao longo desses dois anos.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, *Waldomiro Vieira Filho e José Alfredo da Silva*, pela solicitude e ajuda constante.

À *Karla Cook*, pela ajuda e colaboração ativa durante todo o desenvolvimento deste trabalho. E, sobretudo, pela amizade, convivência e parceria absoluta construída nesses dois anos.

À Amanda Falcão, Lívia Helena e Nádia Masson pela amizade e incentivo.

RESUMO

Considerando que dentifrícios de alta concentração de flúor (F) têm sido recomendados para reversão de lesões cariosas radiculares e que inexistem modelos *in vitro* de ciclagens de pH que mostrem efeito dose-resposta desses dentifrícios em dentina radicular, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um modelo de ciclagens de pH para avaliação do potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F na inibição à desmineralização de dentina radicular. Foi realizado um estudo *in vitro* de ciclagens de pH por meio de dois experimentos. As unidades experimentais foram blocos de dentina bovina hígida, selecionados a partir dos valores de dureza de superfície. O regime de ciclagens de pH teve duração de 10 dias, e os blocos dentais foram mantidos diariamente por 6 h na solução desmineralizante e aproximadamente 18 h na solução remineralizante a 37°C. No primeiro experimento, para validação do modelo quanto ao efeito dose resposta ao F, soluções fluoretadas nas concentrações de 0, 50, 150, 450 e 1350 µg F/mL foram utilizadas, simulando a diluição de dentifrícios fluoretados de baixa, alta e concentração convencional de F na saliva durante a escovação. Duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, os blocos dentais foram mantidos sob agitação por 5 min em temperatura ambiente nas soluções de tratamento descritas acima. O potencial anticárie do dentifrício de alta concentração de F foi avaliado em um segundo experimento, usando o modelo testado nas mesmas condições anteriormente descritas. Blocos dentais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de tratamento: dentifrício não fluoretado (DNF; controle negativo) e dentifrícios fluoretados comerciais contendo 500, 1100 e 5000 µg de F/g. Todos os dentifrícios apresentavam a mesma formulação (NaF e sílica) e foram utilizados 2 vezes por dia na forma de suspensão na proporção 1:3 (dentifrício/água purificada). No primeiro experimento, as médias e desvios-padrão dos valores de área de lesão (ΔS ; $\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$; $n=15$) para os grupos tratados com água purificada e soluções contendo 50, 150, 450 e 1350 µg F/mL foram respectivamente $1320,6 \pm 298,6^a$; $1022,8 \pm 317,7^b$; $748,9 \pm 240,9^b$; $466,8 \pm 246,3^c$ e $163,1 \pm 117,1^d$ $\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$. Quanto à concentração de F total na dentina (F total; $\mu\text{g F}/\text{cm}^2$; $n=8$), foram observados valores crescentes quanto maior a concentração de F nas soluções de tratamento ($17,7 \pm 3,6^a$; $27,3 \pm 3,4^{ab}$; $33,1 \pm 5,7^{bc}$; $41,3 \pm 8,0^{cd}$ e $52,6 \pm 15,2^d$ $\mu\text{g F}/\text{cm}^2$). No segundo experimento, as médias dos valores

de ΔS (n=12) para os grupos tratados com DNF, 500, 1100 e 5000 $\mu\text{g F/g}$ foram respectivamente $1328,1 \pm 450,9^a$; $761,6 \pm 308,8^b$; $705,6 \pm 243,9^b$ e $234,2 \pm 198,0^c$ $\text{kg/mm}^2 \times \mu\text{m}$. Quanto à análise de F total na dentina no 2º experimento (n=8), as médias foram $10,2 \pm 2,0^a$; $29,4 \pm 6,4^b$; $34,3 \pm 7,5^b$ e $49,1 \pm 7,3^c$ $\mu\text{g F/cm}^2$. Conclui-se que o modelo in vitro de ciclagens de pH desenvolvido utilizando dentina radicular bovina apresentou efeito dose-resposta ao F e também foi capaz de avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F.

Palavras-chave: in vitro, fluoretos, cremes dentais.

ABSTRACT

Considering high-F toothpaste have been recommended for reversal of root caries lesions and the lack of an in vitro model of pH-cycling showing dose-response effect for high-fluoride (F) toothpastes in root dentin, the objective of this study was to develop a pH cycling model for assessing the potential of high-F toothpaste on the inhibition of root dentin demineralization. An in vitro study using a pH-cycling regimen was conducted in two experiments. The experimental units were blocks of bovine dentin, which were selected from the surface hardness values. The pH-cycling regimen lasted for 10 days, and the dentin blocks were kept for 6 h in a demineralizing solution and approximately 18 h in a remineralizing solution at 37°C each day. In the first experiment, F solutions at the concentrations of 0, 50, 150, 450 and 1350 µg F/mL were used to validate the model with regard to the dose-response effect to fluoride. Twice daily, before and after the immersion in the demineralizing solution, the dental blocks were kept under agitation for 5 min at room temperature in treatment solutions described above. The anti-caries potential of a high-F dentifrice was evaluated in a second experiment, using the model tested under the same conditions previously described. Dentin blocks were randomly divided into 4 treatment groups: non-fluoride toothpaste (negative control) and fluoride toothpastes containing 500, 1100 and 5000 µg F/g. All toothpastes had the same formulation (NaF and silica) and were used twice daily as a suspension in the ratio 1:3 (dentifrice/purified water). In the first experiment, the mean values of lesion area (ΔS ; $\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$; $n=15$) for the groups treated with purified water and solutions containing 50, 150, 450 and 1350 mg F / mL were respectively 1320.6 ± 298.6^a ; 1022.8 ± 317.7^b , 748.9 ± 240.9^b , 466.8 ± 246.3^c and 163.1 ± 117.1^d $\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$. For total F concentration in dentin ($\mu\text{g F}/\text{cm}^2$; $n=8$), higher values were observed as the concentration of F in treatment solutions increased (17.4 ± 3.6^a ; 27.3 ± 3.4^{ab} ; 33.1 ± 5.7^{bc} ; 41.3 ± 8.0^{cd} and 52.6 ± 15.2^d $\mu\text{g F}/\text{cm}^2$). In the second experiment, the mean values of ΔS ($n=12$) for the groups treated with non-fluoride toothpaste, 500, 1100 and 5000 µg F/g were respectively 1328.1 ± 450.9^a ; 761.6 ± 308.8^b ; 705.6 ± 243.9^b and 234.2 ± 198.0^c . In the analysis of total F present in dentin ($n=8$) in the second experiment, the mean values were 10.2 ± 2.0^a ; 29.4 ± 6.4^b ; 34.3 ± 7.5^b and 49.1 ± 7.3^c . We conclude that the in vitro model developed using pH-cycling in

bovine root dentine showed a dose-response effect for fluoride and was also able to assess the anticaries potential of high-fluoride toothpastes.

Key words: in vitro, fluorides, toothpastes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
3	PROPOSIÇÃO	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem ocorrido um declínio na prevalência e incidência de cárie coronária, o qual tem sido atribuído ao uso de dentifrício fluoretado (Cury *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2010). Mas há maior risco de desenvolvimento de lesões cariosas radiculares na população idosa (Curzon & Preston, 2004), sendo que este fato está relacionado à maior expectativa de vida, maior número de dentes naturais retidos, acúmulo de placa dental e ao fenômeno da recessão gengival, que expõe superfícies de dentina radicular (Jones, 1995; Curzon & Preston, 2004; Johanson *et al.*, 2009). Para dentina, o pH do biofilme dental necessário para provocar desmineralização é menos ácido do que aquele requerido para o esmalte, o que significa que diante de um mesmo desafio cariogênico, a desmineralização se inicia antes na dentina e se prolonga por mais tempo (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986; Wefel, 1994).

A utilização de produtos fluoretados tem sido o recurso mais importante no controle de cárie dental, pois o fluoreto é capaz de inibir a desmineralização e ativar a remineralização. Dentre os vários métodos de oferta de flúor disponíveis, a escovação com dentifrício fluoretado é considerado o mais racional, porque além de remover ou desorganizar a placa dental, expõe o meio bucal constantemente ao flúor (ten Cate & Featherstone, 1991). Assim, o uso de dentifrício fluoretado parece ser a primeira medida de prevenção e controle da cárie radicular, especialmente os de alta concentração, desde que tem sido sugerido que maior concentração de flúor (F) é necessária para remineralização de dentina (Baysan *et al.*, 2001; Ekstrand *et al.*, 2013).

Entretanto, o número de estudos clínicos avaliando dentifrícios de alta concentração de F é limitado, existe grande disparidade quanto à metodologia empregada e a maioria das pesquisas realizadas é para cárie em esmalte e em crianças (Innes & Evans, 2009). Ainda, nos poucos ensaios clínicos realizados na população idosa, os voluntários selecionados possuem lesões cariosas radiculares e, portanto, o principal efeito do flúor analisado nesses estudos seria o estímulo à remineralização e não a inibição à desmineralização. Considerando o elevado custo e dificuldades operacionais envolvidos na realização de estudos clínicos, uma melhor avaliação do mecanismo de ação e eficácia dos dentifrícios de alta concentração para cárie radicular poderia ser feita por meio de estudos *in situ* e *in vitro*.

Dentre os protocolos de estudos in vitro, há consenso que os modelos de ciclagens de pH são interessantes de serem utilizados porque mimetizam o desenvolvimento da cárie in vivo (ten Cate, 1990). Para o substrato esmalte dental, existe apenas um estudo in vitro publicado utilizando dentifrício de alta concentração de F (ten Cate *et al.*, 2006). Entretanto, para dentina não existe um modelo in vitro de ciclagens de pH que mostre efeito dose-resposta para dentifrício de alta concentração de F. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é desenvolver um modelo de ciclagens de pH para avaliação do potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F na inibição à desmineralização de dentina radicular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie radicular

Nas últimas décadas tem sido observado um declínio na prevalência e incidência de cárie coronária, tanto nos países industrializados, como também em alguns em desenvolvimento (Narvai *et al.*, 1999; Narvai *et al.*, 2006). Por outro lado, há maior risco de formação de lesões cariosas radiculares na população idosa (Curzon & Preston, 2004). Este fato está relacionado primeiramente à maior expectativa de vida na atualidade. No Brasil, a proporção de idosos em relação à população total passará de 7% em 2000 para quase 13% em 2020 e estima-se que em 2050 o número de idosos brasileiros seja 13 milhões (IBGE, 2009). Outro fator a ser considerado é que os idosos estão conseguindo manter seus dentes por mais tempo e este maior número de dentes naturais retidos aliado ao fenômeno da recessão gengival aumenta o risco de desenvolvimento de lesões de cárie radicular (Jones, 1995; Curzon & Preston, 2004).

Todos os fatores de risco normalmente associados ao desenvolvimento de cárie em esmalte são também aplicáveis às lesões cariosas radiculares, incluindo higiene bucal inadequada (microbiota específica), dieta cariogênica e exposição das superfícies radiculares (substrato). Experiência anterior de cárie e quantidade de restaurações também têm forte correlação e geralmente indicam a presença de condições e comportamentos que determinam a atividade de cárie. A lesão cariosa radicular apresenta aspecto amolecido e formato irregular e encontra-se totalmente restrita à superfície radicular ou em alguns casos, também pode envolver o limite amelocementário, mas desde que se observe clinicamente que a lesão teve início na superfície radicular (Jones, 1995; Berry *et al.*, 2004). Uma outra característica é o pH do biofilme dental necessário para desmineralização da dentina, que é menos ácido do que aquele requerido para o esmalte, o que significa que diante de um mesmo desafio cariogênico, a desmineralização da dentina se inicia antes e se prolonga por mais tempo (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986; Wefel, 1994).

Para caracterizar a ocorrência de cárie radicular entre adultos, Griffin *et al.* (2004) revisaram sistematicamente 11 estudos publicados em inglês, conduzidos após 1980, em populações de 45 anos ou mais e que continham informações suficientes para que pudesse ser realizada análise estatística. Os autores verificaram incidência de cárie

radicular correspondente a 23,7% (IC=17,1-30,2%) e um incremento anual de 0,47 (IC=0,34-0,61) superfícies radiculares cariadas, concluindo que a experiência de cárie entre adultos idosos apresentou níveis similares ou ainda mais altos que nas crianças.

Em 2009 foi publicado estudo conduzido por Johanson *et al.* (2009) para divulgar os resultados de duas coortes, denominadas III e IV, nas quais o objetivo foi avaliar a prevalência e os fatores de risco da doença cárie por um período de 20 anos e, posteriormente, os voluntários foram reavaliados após 6 anos. A coorte III acompanhou 135 voluntários nascidos nos anos de 1911-2 e na coorte IV 139 voluntários nascidos no ano de 1930. Verificou-se que o número médio de dentes naturais retidos nas coortes III e IV foi respectivamente 14 e 21. Na coorte III foram observadas 2,1 superfícies dentais cariadas e na IV, 1,3 ($p < 0,05$). 49% dos voluntários na coorte III não desenvolveram nenhuma superfície dental cariada, enquanto 19% apresentaram 3 ou mais superfícies cariadas após o período de reavaliação de 6 anos. Concluiu-se que o número de dentes naturais retidos aumentou e a prevalência de cárie diminuiu durante o período do estudo. A incidência, obtida através da reavaliação dos voluntários após 6 anos apresentou-se moderada. Os resultados indicaram que a quantidade de placa, presença de sangramento gengival e profundidade de bolsa periodontal maior ou igual a 4 mm são fatores preditivos tanto para prevalência, quanto incidência da doença cárie.

No Brasil, estudo realizado através de dados secundários provenientes do Levantamento das Condições de Saúde Bucal do Estado de São Paulo – 1998 avaliou a prevalência de lesões de cárie radicular entre adultos e idosos. No levantamento de 1998, foram examinadas 1.475 pessoas dentadas, dos grupos etários de 35 a 44 e de 65 a 74 anos e os exames epidemiológicos foram realizados seguindo recomendações da OMS. A partir dos dados desse levantamento, Rihs e colaboradores (2005) obtiveram prevalência de cárie radicular de 15,6% e 31,8%, respectivamente, para 35 a 44 e 65 a 74 anos. Comparativamente a estudos internacionais, a prevalência de cárie radicular no sudeste de São Paulo pode ser considerada baixa. Entretanto, os autores alertaram que essa baixa prevalência poderia ser consequência do baixo número médio de dentes por pessoa na população em estudo (9,6 dentes presentes no grupo de 65-74 anos) (Rihs *et al.*, 2005).

Em 2004, foram publicados resultados do “Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira”, amplo levantamento epidemiológico

realizado em diferentes grupos etários de 250 municípios brasileiros de pequeno, médio e grande porte. De acordo com o levantamento, no que se refere a adultos, o índice CPO-D médio foi de 20,1 na faixa etária de 35 a 44 anos e 27,8 na de 65-74 anos. Destacou-se o fato que o componente perdido foi responsável por cerca de 66% do índice no grupo pertencente a faixa etária de 35-44 anos e quase 93% no de 65-74 anos. Para cárie radicular, a média de raízes expostas foi de 5,92 para os indivíduos com idade entre 35-44 anos, 5,23% dessas estavam cariadas. Na faixa de 65-74 anos, a média foi de 3,06 raízes expostas sendo que 12,19% apresentaram cárie. O relatório justificou a baixa prevalência de cárie de raiz pelas grandes perdas dentárias nestes dois grupos etários (Brasil, 2004).

Sete anos após, o Ministério da Saúde, concluiu em 2011 o 4^o levantamento epidemiológico de âmbito nacional de saúde bucal, intitulado “SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal”, o qual foi realizado em 26 capitais e em 150 municípios do interior. Com relação aos adultos, o CPO-D médio foi de 16,75 na faixa etária de 35-44 anos e 27,53 na de 65-74. O componente perdido foi responsável por cerca de 44,7% do índice no grupo de 35-44 anos e 92% no grupo de 65-74 anos. Aos 35-44 anos, os brasileiros apresentaram em média 0,32 dentes com raízes cariadas e aos 65-74 anos, a média desta condição foi 0,23. Assim como no levantamento anteriormente realizado, supôs-se que essa baixa prevalência de cárie radicular é consequência do baixo número de dentes retidos nessas faixas etárias (Brasil, 2011).

Existe evidência bem estabelecida de que o flúor atua nos processos de des - remineralização tanto do esmalte quanto da dentina, sendo seu uso benéfico também para os adultos. Em estudo de metanálise, foram revisados 50 estudos e excluídos aqueles nos quais a média da idade da população era inferior a 20 anos, que não tinham grupo controle correspondente e que possuíam informações insuficientes para extrapolar os benefícios do flúor e para o cálculo estatístico, assim restaram 20 estudos. Os resultados indicam que qualquer forma de utilização de flúor (água fluoretada, auto-uso ou aplicação profissional) evita anualmente 0,22 (IC 95%: 0,08-0,37) superfícies cáries radiculares e sugerem que a utilização de flúor previne cárie entre adultos de todas as idades (Griffin *et al.*, 2007).

Dentre os vários métodos de utilização do flúor, é claramente demonstrado na literatura que o uso de dentifrício fluoretado foi o fator responsável pela queda na

incidência e prevalência de cárie em esmalte (Cury *et al.*, 2004). Assim, a escovação com dentifrício fluoretado parece ser o primeiro recurso na prevenção de cárie de raiz, porque além de remover ou desorganizar a placa dental, é uma forma de exposição constante ao flúor no meio bucal e também, por ser um método custo-efetivo, exequível e conveniente. Desde que estudos têm sugerido que maior concentração de flúor é necessária para remineralização da dentina, dentifrícios de alta concentração têm sido alvo de interesse de pesquisadores para o tratamento da cárie radicular (Baysan *et al.*, 2001; Ekstrand *et al.*, 2008).

2.2 Dentifrícios fluoretados de alta concentração

A prevalência da cárie dental tem diminuído em muitos países industrializados nas últimas décadas, inclusive no Brasil (Cury *et al.*, 2004; Narvai *et al.*, 2006). Esse resultado tem sido atribuído principalmente ao uso de dentifrícios fluoretados (Cury *et al.*, 2004). A relação dose-resposta entre concentração de F disponível nos dentifrícios e redução de cárie dental foi avaliada primeiramente em 1973, quando Reed testou dentifrícios contendo NaF de diferentes concentrações (0; 250; 500 e 1000 ppm F) na inibição da formação de lesões cariosas. Desde então, muitos estudos têm mostrado uma relação positiva entre concentração de F nos dentifrícios e redução na experiência de cárie (Innes & Evans, 2009).

Através da revisão e combinação dos resultados de 17 ensaios clínicos, Tavss *et al.* (2003) encontraram correlação linear (coeficiente 0,884) entre dentifrícios fluoretados (com concentrações variando de 0 a 5000 ppm F) e sua eficácia clínica, independentemente do controle utilizado ser negativo (dentifrício não fluoretado) ou positivo (dentifrícios de concentração em torno de 1000 ppm F), permitindo sugerir que formulações com altas concentrações de F promovem maior benefício anticárie que os dentifrícios convencionais.

Uma pesquisa realizada *in vivo* comparou a capacidade de dois dentifrícios, um contendo 5000 ppm F e outro 1450 ppm F, na reversão de lesões cariosas de fissura não cavitadas. Trinta voluntários adultos com lesões de cárie oclusal foram instruídos a escovar os dentes com os dentifrícios anteriormente descritos 3 vezes ao dia, por 3 minutos, após as refeições, durante duas semanas. Através do uso do aparelho DIAGNOdent foi observada maior redução nos valores de fluorescência a laser (21%) de lesões cariosas de fissura não cavitadas para indivíduos que fizeram uso de dentifrício 5000 ppm F que o grupo controle no período do teste (4%; $p < 0,001$; ANOVA). Sob as condições deste estudo, observou-se que o dentifrício de 5000 ppm F foi significativamente melhor que o de 1450 ppm F na reversão desse tipo de lesão (Schirrmeyer *et al.*, 2007).

Posteriormente, um estudo randomizado conduzido com 26 voluntários (entre 19 e 35 anos) testou dois dentifrícios NaF (5000 e 1450 ppm F) com e sem

enxágue com água após a escovação, na retenção de F no biofilme proximal e saliva quando utilizados duas vezes por dia, durante duas semanas. O presente estudo mostrou que o uso de dentifrício de 5000 ppm F sem enxágue posterior com água resultou em concentrações mais altas de F tanto no biofilme proximal quanto na saliva e que o uso de dentifrício de 1450 ppm F com enxágue posterior, apresentou as menores concentrações. A diferença da área sob a curva da concentração de F na saliva versus tempo entre os dois métodos foi 4,2 vezes ($p < 0,001$). A diferença na concentração de F por peso placa/unidade foi de 2,75 vezes ($p < 0,05$), esse valor poderia ser comparado à concentração de F nos dois dentifícios (5000 versus 1450 ppm = 3,5 vezes) (Nordström & Birkhed, 2009).

Al-Mulla *et al.* (2010) também compararam o efeito de dois diferentes regimes de escovação dental/enxágue na desmineralização do esmalte e retenção de F. Para tanto, foi desenvolvido um modelo *in situ* em 20 voluntários com bandas ortodônticas usadas pelo período de 8-9 semanas. Os voluntários foram aleatorizados em dois grupos de tratamento: (1) grupo teste – dentifrício de 5000 ppm F sem enxágue após a escovação e (2) grupo controle – dentifrício de 1450 ppm F com 3 enxágues após a escovação. Após 8-9 semanas, os pré-molares nos quais estavam fixadas as bandas ortodônticas foram extraídos e avaliados através do método QLF (quantitativo de luz fluorescência induzida). Também foi mensurada a retenção de F. O grupo teste resultou em menor média de perda de fluorescência QLF ($p < 0,05$) e em maior concentração de F abaixo da banda ortodôntica comparado ao grupo controle. Assim, concluiu-se que a utilização de dentifrício de alta concentração, seguido da ausência de enxágue após a escovação, tem maior potencial anticárie e resulta em níveis mais altos de retenção de F quando comparados ao grupo controle.

O desempenho dos dentifícios contendo NaF nas concentrações de 1450 e 5000 ppm F foi acompanhado em um ensaio clínico com duração de dois anos com 279 adolescentes com atividade de cárie. Incidência e progressão de cárie proximal e oclusal foram as variáveis avaliadas. Os adolescentes que fizeram uso do dentifrício de 5000 ppm F tiveram menor progressão das lesões cáries comparado ao grupo de 1450 ppm F. Também foi verificado estatisticamente menor incidência de cárie para os voluntários que fizeram uso do dentifrício de alta concentração e que não tiveram boa adesão ao tratamento (indivíduos que não realizam escovação 2 vezes ao dia ou que não utilizam

dentifrício regularmente) quando comparados aos que utilizaram dentifrício de 1450 ppm F. Isso poderia indicar que o dentifrício de alta concentração (5000 ppm F) teria maior impacto em indivíduos que negligenciam a frequência da escovação ou uso do dentifrício. O estudo concluiu que o dentifrício de 5000 ppm F parece ser um importante veículo para prevenção e tratamento de adolescentes que são pertencentes ao grupo com alto risco à cárie (Nordström e Birkhed, 2010).

Os autores Nordström & Birkhed (2012) também investigaram a possibilidade de utilização do dentifrício de alta concentração de flúor (5000 ppm F) na forma de suspensão. Os autores propuseram o uso da suspensão através de uma terceira aplicação (além das duas escovações diárias), por meio de “massagem” direta com o dedo indicador sobre a superfície vestibular dos dentes. Para tanto, realizou-se estudo randomizado com 16 voluntários (média de idade de 26 anos), os quais foram designados para os tratamentos: 1) 5000 ppm F, 2X/dia; 2) 5000 ppm F, 3X/dia; 3) 5000 ppm F, 2X/dia e “massagem” 1X/dia; 4) 1450 ppm F, 2X/dia; 5) 1450 ppm F, 3X/dia; 6) 1450 ppm F, 2X/dia e “massagem” 1X/dia. Foi determinada a concentração de F no biofilme proximal e saliva e o pH da placa foi mensurado no 14^o dia de tratamento, através de microeletrodo. Os resultados mostraram que uma terceira aplicação de dentifrício aumenta a retenção de F na saliva e biofilme e, os autores sugerem que, o dentifrício de alta concentração (5000 ppm F) utilizado da forma proposta de “massagem” com suspensão, seria especialmente interessante para idosos, pois alguns apresentam dependência funcional e cognitiva e o método é simples e custo efetivo (Nordström & Birkhed, 2012).

Para cárie radicular, Baysan *et al.* (2001) conduziram ensaio clínico duplo cego com duração de 6 meses, para comparar a capacidade de dois dentifrícios fluoretados, um contendo 5000 ppm F e outro 1100 ppm F, na forma de NaF, na reversão de lesões cariosas radiculares primárias. Duzentos e um voluntários com ao menos uma lesão cariosa radicular foram selecionados e 186 foram incluídos na análise estatística. No início do estudo e após 3 e 6 meses, as lesões cariosas radiculares foram mensuradas quanto à resistência elétrica e foram também avaliadas clinicamente, por meio dos parâmetros dureza, cavitação, dimensão, cor e quantidade de placa dental recobrimo as lesões. Após 3 meses, 38,2% dos voluntários do grupo 5000 ppm F e 10,7% do grupo 1100 ppm F tiveram uma ou mais lesões inativadas. Entre o período

que compreende o início do estudo e 3 meses, o \log_{10} média da resistência elétrica diminuiu $0,06 \pm 0,55$ para o grupo do dentifrício de 1100 ppm F, enquanto que no grupo de 5000 ppm F aumentou $0,40 \pm 0,64$ ($p < 0,001$). Ao final do estudo (6^o mês), 56,9% dos voluntários do grupo do dentifrício de alta concentração e 28,6% do grupo controle tiveram lesões paralisadas. Entre o início do estudo e ao final do período de 6 meses, o \log_{10} média da resistência elétrica diminuiu $0,004 \pm 0,70$ para o grupo do dentifrício de 1100 ppm F, enquanto que no grupo de 5000 ppm F aumentou $0,056 \pm 0,76$ ($p < 0,001$). A quantidade de placa recobrimo as lesões cáries também foi significativamente menor no grupo de alta concentração, comparado ao grupo do dentifrício convencional. O estudo concluiu que é possível remineralizar ou paralisar lesões cáries radiculares e que o dentifrício de concentração de 5000 ppm F foi significativamente mais efetivo que o dentifrício de concentração convencional.

A paralisação de lesões cáries radiculares também foi observada em estudo realizado por Ekstrand *et al.* (2008), que comparou a efetividade de dois programas preventivos no controle de cárie radicular em voluntários de 75 anos ou mais após 8 meses de acompanhamento. Duzentos e quinze voluntários foram aleatoriamente divididos entre os grupos de tratamento: (G1) – acompanhamento mensal de um profissional técnico em higiene bucal para escovação dental e aplicação de verniz fluoretado; (G2) – Escovação 2X/dia com dentifrício 5000 ppm F ou 1450 ppm F. Os resultados mostraram que os dois programas testados controlaram o desenvolvimento de lesões de cárie radicular; sete de cada 10 voluntários que fizeram uso de dentifrício 5000 ppm F, 8 de 10 para os que receberam a visita do técnico de higiene bucal e 5 de 10 para os que utilizaram dentifrício convencional.

Posteriormente, Ekstrand *et al.* (2013) conduziram ensaio clínico randomizado com duração de 8 meses que comparou a eficácia dos dentifrícios de 1450 e 5000 ppm F em lesões de cárie radicular de idosos residentes em casas de apoio. Os voluntários foram incluídos segundo os critérios: residentes não capazes de realizarem escovação dental sozinhos e que permitiam que a equipe de enfermagem o fizesse; que possuíam 5 ou mais dentes naturais retidos; com 1 ou mais lesões de cárie radicular e que não estavam em fase terminal de doenças. A equipe de enfermagem realizou a escovação dental 2X/dia em 125 residentes que completaram o estudo. Um examinador calibrado avaliou a textura, contorno, localização e coloração das lesões de cárie

radicular, antes do início dos tratamentos e ao final do estudo. O número médio de lesões de cárie radicular ativas foram 1,05 ($\pm 2,76$) e 2,55 ($\pm 1,91$) e o número de lesões paralisadas 2,13 ($\pm 1,68$) e 0,61 ($\pm 1,76$) nos grupos tratados respectivamente com os dentifrícios de 5000 e 1450 ppm F ($p < 0,001$). O estudo concluiu que o dentifrício de 5000 ppm F foi significativamente mais eficaz no controle da progressão, assim como na remineralização das lesões quando comparado ao dentifrício de 1450 ppm F.

Entretanto, o número de estudos clínicos que avaliam os benefícios dos dentifrícios de alta concentração de flúor entre adultos e idosos ainda é limitado. Outra dificuldade é a disparidade dos trabalhos existentes, quanto ao tempo de duração, idade da população, tipo de lesão, frequência de uso do dentifrício e metodologia empregada (Tavss *et al.*, 2003; Innes & Evans, 2009).

Assim, considerando as incertezas relacionadas ao emprego dos dentifrícios de alta concentração de F e também pelo elevado custo e dificuldades operacionais envolvidas na realização de estudos clínicos, uma avaliação mais detalhada e controlada desses produtos, para melhor conhecimento de mecanismo de ação e eficácia, poderia ser feita por meio de estudos *in situ* e *in vitro*.

2.3 Modelos *in vitro* de ciclagens de pH para avaliação do efeito do flúor

Apesar do progresso de estudos *in vivo* e *in situ* nas pesquisas relacionadas à cárie dental, testes *in vitro* ainda são largamente empregados. Muitos modelos foram desenvolvidos e o atual conhecimento sobre o mecanismo de desenvolvimento da cárie dental, efeito do fluoreto e medidas preventivas relativas à cárie dental também são decorrentes de estudos *in vitro*. Dentre os estudos *in vitro*, os modelos de ciclagens de pH têm sido amplamente utilizados para diversos fins, e a aplicação mais importante tem sido a avaliação do efeito do F na inibição da desmineralização e ativação da remineralização.

A partir de resultados de experimentos *in vivo*, Featherstone (1986) desenvolveu um modelo *in vitro* de ciclagens de pH com duração de 14 dias. Coroas de dentes molares e pré-molares foram isoladas com verniz ácido resistente, deixando 2 áreas dos dentes expostas aos tratamentos (superfícies vestibulares ou linguais/palatinas). O regime consistiu na manutenção dos espécimes individualmente

por 6 horas em 40 mL de solução desmineralizante (Ca 2 mmol/L; PO₄ 2 mmol/L; acetato 0,075 mol/L; pH 4,3) e a seguir, os mesmos eram enxaguados e imersos por 5 minutos nos dentifrícios testados, na forma de suspensão 1/3 (dentifrício/ água). Após a exposição aos tratamentos, os espécimes eram novamente enxaguados e mantidos por aproximadamente 17 horas na saliva artificial.

Em 1987, White desenvolveu um modelo *in vitro* de ciclagens de pH com duração de 12 dias para avaliar o efeito de dentifrícios fluoretados no reparo mediado por saliva de lesões cariosas iniciais. No modelo desenvolvido, o tratamento consistia na imersão dos espécimes de esmalte 4X/dia, durante 1 minuto em 10 mL de suspensão 33% (dentifrício/água), para simular a exposição diária a escovação. Entre os intervalos do tratamento, os espécimes foram mantidos em 25 mL de saliva humana (troca 2X/dia), a temperatura ambiente, sob agitação e por 2 horas em solução ácida desmineralizante (ácido láctico 0,1 M/L; ácido poliacrílico 0,2%; 50% saturada com relação à hidroxiapatita; pH 5).

Os modelos de ciclagens de pH podem se diferenciar em diversos aspectos, um deles é o tipo do substrato empregado, como dentes humanos ou bovinos. A vantagem em utilizar dentes bovinos, ao invés de humanos, é que eles são mais fáceis de serem obtidos, manipulados e também, por apresentarem composição química mais homogênea, o que permitiria menor variação na resposta aos tratamentos (Mellberg, 1992). Mais recentemente foi mostrado que a dentina bovina pode substituir a humana em modelos *in situ* que avaliam desafios cariogênicos e agentes anticariogênicos (Hara *et al.*, 2003).

Os modelos *in vitro* de ciclagens de pH simulam o processo natural de cárie dental (ten Cate, 1990), permitindo avaliar a perda ou ganho mineral do esmalte – dentina e também, o potencial anticárie de dentifrícios fluoretados. Entretanto, antes desses modelos *in vitro* serem usados para estimar o potencial anticárie de produtos fluoretados, esses modelos deveriam ser previamente validados em termos de efeito dose-resposta (White, 1995).

Estudos *in vitro*, utilizando modelo de ciclagens de pH para dentifrícios de concentração de até 1450 µg F/g, têm mostrado potencial para prever os benefícios clínicos desses compostos. Queiroz *et al.* (2008) desenvolveram um modelo *in vitro* de ciclagens de pH para avaliar o efeito de dentifrícios de baixa concentração de F nos

processos de des e remineralização do esmalte. Para tanto, foram conduzidos 4 estudos independentes. Em dois dos estudos, soluções fluoretadas (0; 70; 140 e 280 µg F/mL) foram usadas para validar os modelos quanto ao efeito do flúor na desmineralização do esmalte (modelo chamado de desmineralizante) e na remineralização do esmalte (modelo chamado de remineralizante). Nos outros dois estudos, os modelos previamente validados testaram a capacidade de 4 dentifrícios (dentifrício não fluoretado, Colgate Baby 500 µg F/g, Tandy 1100 µg F/g e Crest 1100 µg F/g) interferirem nos processos de des e remineralização do esmalte. O regime de ciclagens de pH tinha duração de 8 dias e os blocos de esmalte bovino foram mantidos diariamente por 4 horas na solução desmineralizante e por 20 horas na solução remineralizante a 37°C. Duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, os blocos dentais eram lavados com água purificada e submetidos a um dos grupos de tratamento por 5 minutos sob agitação. No quarto dia de ciclagens as soluções des e remineralizante foram substituídas por soluções frescas. Após o término da ciclagens (8º dia), os blocos dentais permaneciam por mais 24 horas na solução remineralizante. As variáveis analisadas foram: porcentagem de perda ou ganho de dureza de superfície, de perda ou ganho de mineral integrado e profundidade de lesão. O modelo desenvolvido mostrou efeito dose-resposta tanto na avaliação da desmineralização, quanto da remineralização. O dentifrício de baixa concentração apresentou potencial anticárie, porém menor que aqueles de 1100 µg F/g.

Entretanto, melhores estudos deveriam ser desenhados para avaliação de dentifrícios fluoretados, especialmente para aqueles de altas concentrações de flúor.

2.4 Estudos in vitro para avaliação de dentifrício de alta concentração

Estudo in vitro foi conduzido para avaliação de dentifrícios de alta concentração de flúor em esmalte humano e/ou bovino (ten Cate *et al.*, 2006). Com o objetivo de avaliar dose-resposta entre dentifrícios de diferentes concentrações nos processos de des e remineralização em um estudo in vitro, ten Cate *et al.* (2006) desenvolveram 3 diferentes esquemas de ciclagens, que variaram quanto à profundidade das lesões artificialmente produzidas em esmalte (50 a 200 µm), quanto aos dentifrícios avaliados (concentrações de 0 a 3000 ppm F) e quanto ao regime de ciclagens de pH

(período na solução des e remineralizante). A perda de cálcio mostrou efeito dose-resposta, resultando em redução de 72% de cálcio para o dentifrício de 3000 ppm F comparado ao dentifrício não fluoretado.

Assim, constata-se que modelos de ciclagens de pH têm sido desenvolvidos para testar o potencial anticárie de dentifrícios de alta concentração no esmalte. Entretanto, para dentina radicular, não existe um modelo in vitro de ciclagens de pH que mostre efeito dose-resposta para dentifrício de alta concentração.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um modelo de ciclagens de pH para avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de flúor na inibição à desmineralização de dentina radicular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* de ciclagens de pH por meio de dois experimentos, adequado a partir de modelo previamente desenvolvido (Queiroz, 2004). As unidades experimentais foram blocos de dentina bovina hígida, os quais foram selecionados a partir dos valores de dureza de superfície utilizando-se microdurômetro e penetrador tipo Knoop. O regime de ciclagens de pH teve duração de 10 dias, e os blocos dentais foram mantidos individualmente por 6 horas diárias em solução desmineralizante e aproximadamente 18 h em solução remineralizante a 37°C. No primeiro experimento, para validação do modelo de ciclagem quanto ao efeito dose-resposta ao flúor, 140 blocos dentais foram aleatoriamente submetidos a um dos seguintes grupos de tratamento: água purificada (controle negativo) e soluções fluoretadas nas concentrações de 50, 150, 450 e 1350 µg F/ mL. Após a validação do modelo, foi realizado um segundo experimento para avaliação do efeito do dentifrício fluoretado de alta concentração na inibição à desmineralização. Para tanto, blocos dentais (n=20) foram aleatorizados em 4 grupos de tratamento: DNF (dentifrício não fluoretado; controle negativo) e dentifrícios fluoretados comercialmente disponíveis nas concentrações de 500, 1100 e 5000 µg F/g. Duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, os blocos dentais foram mantidos sob agitação por 5 min à temperatura ambiente nos respectivos grupos de tratamento do primeiro ou segundo experimento. As soluções desmineralizante e remineralizante foram trocadas no sexto dia do regime de ciclagens de pH e após o último dia de tratamento os blocos dentais permaneceram adicionalmente por 24 h na solução remineralizante. Ao final de cada fase experimental, foram analisadas as seguintes variáveis de respostas: dureza da dentina seccionada longitudinalmente (por meio da qual calculou-se a área de lesão; Delta S; kg/mm² X µm), dosagem da concentração de F nas soluções desmineralizante e remineralizante (µg F/mL) e de flúor total na dentina (µg F/cm²) (Figura 1). O tamanho da amostra foi calculado a partir de resultados obtidos em estudo piloto previamente realizado com o mesmo protocolo experimental (dados não apresentados), com um poder estatístico de 80%.

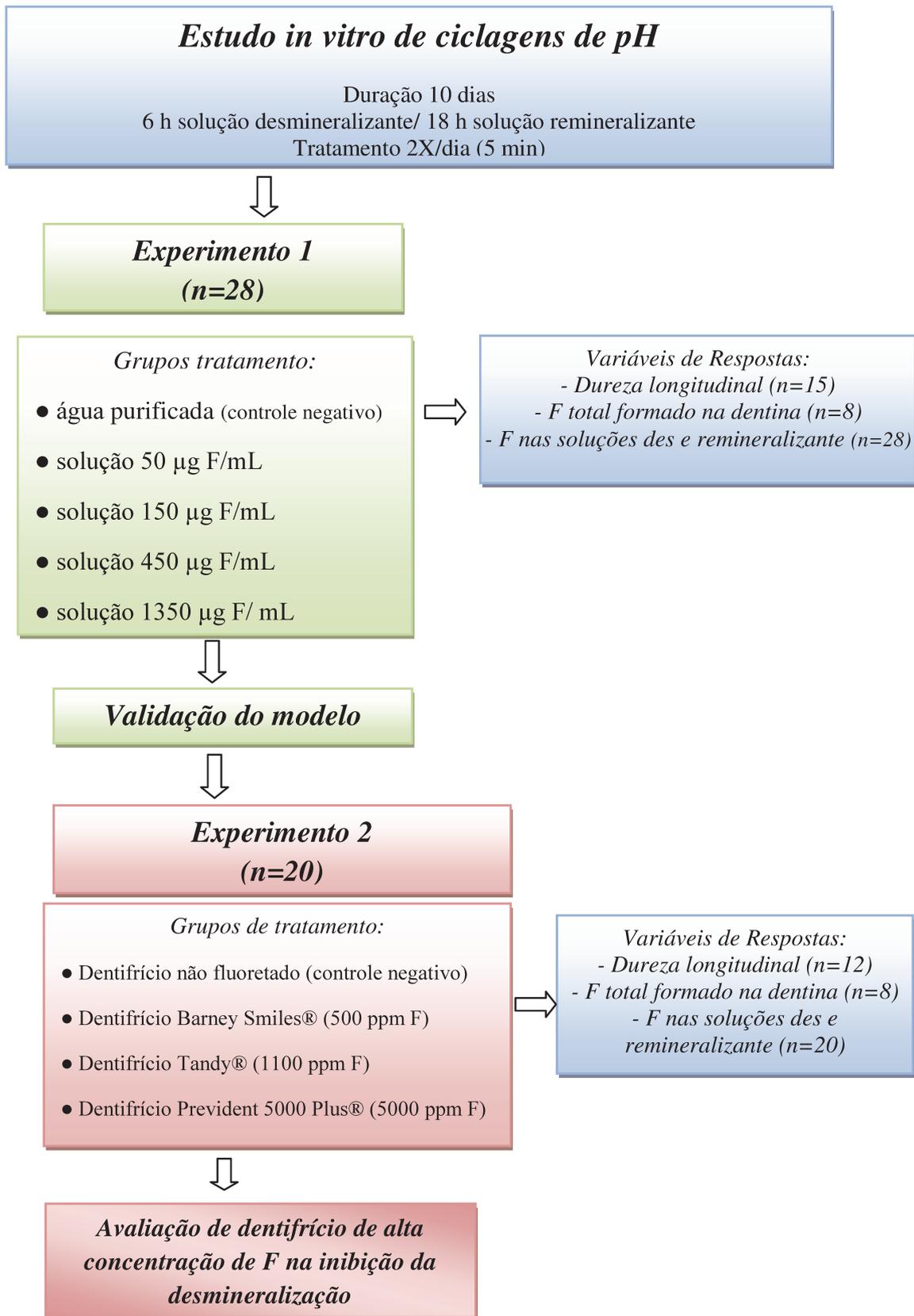


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental do estudo

4.2 Obtenção dos blocos de dentina bovina

Para a realização desse estudo foram utilizados dentes incisivos bovinos. Os elementos dentários foram mantidos em formol 2% pH 7,0 por um período mínimo de 30 dias para desinfecção antes de qualquer procedimento experimental (White, 1987). Para a obtenção dos blocos de dentina foram utilizadas cortadeira elétrica (Buehler – Isomet) e discos diamantados de dupla face (Buehler Diamond Wafering Blade nº 11-4243 da série 15 HC). Os dentes foram fixados em placas de acrílico com auxílio de cera pegajosa e levados à cortadeira elétrica, para que fosse realizada a separação entre coroa e raiz. Então, usando 2 discos diamantados posicionados paralelamente e separados por um espaçador de acrílico com 4 mm de espessura, foram obtidos blocos dentais a partir do corte nas raízes dentais. Os fragmentos dentais corresponderam ao primeiro terço da raiz. Estas fatias foram novamente fixadas à peça acrílica e de suporte e seccionadas no sentido mesiodistal para obtenção de blocos dentais medindo 4 x 4 x 2 mm. Os cortes foram feitos sempre sob refrigeração (água destilada e deionizada) para evitar trincas.

A altura de 2 mm dos blocos de dentina foi determinada após planificação da porção dentinária, utilizando-se lixa de granulação 320 (Carbimet® Paper Discs – nº 30-5108-320 Buehler®) e politriz APL-4 Arotec®, verificando-se a espessura do bloco com uma régua milimetrada. Para tal, a maior área plana da dentina foi fixada com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado para que a dentina voltada para a câmara pulpar pudesse ser ajustada/planificada. Os blocos foram então lavados no ultrassom (T7, Thornton®) em água destilada e deionizada (dd), com o objetivo de remover os debris. Posteriormente, os blocos dentais foram fixados com a superfície da dentina vestibular ou lingual voltada para cima para que esta superfície também pudesse ser planificada, lixada e polida. Inicialmente, foi utilizada lixa de granulação 400 por 5 s. Na sequência foi utilizada lixa de granulação 600 por 5 s para possibilitar maior planificação da superfície de dentina. Finalmente, foi utilizada lixa de granulação 1200 por 2 min, para o polimento das superfícies. A cada mudança de granulação da lixa, os blocos dentais eram colocados em ultra-som para remoção dos resíduos da lixa anterior. Ao final do lixamento, os blocos dentais foram imersos em uma solução detergente, visando remoção completa dos resíduos da lixa. O polimento

foi realizado com panos auto-adesivos de 1 μ , previamente banhados com suspensão de diamante por 2 min. Em seguida, os blocos dentais permaneciam submersos em solução detergente (Ultramet®) diluída na proporção de 20:1 em água dd, por 2 min (Hara *et al.*, 2003). Os blocos dentais obtidos foram armazenados em geladeira em potes devidamente vedados, cobertos com guardanapo de papel, umedecido com água purificada, para evitar o ressecamento da superfície da dentina e a ocorrência de trincas.

4.3 Seleção dos blocos dentais

A dureza de superfície da dentina dos blocos dentais foi determinada utilizando-se o microdurômetro Future Tech modelo FM – 7 acoplado a um software FM – ARS e penetrador tipo Knoop, com carga de 5 g por 5 s (Fushida & Cury, 1999; Aires *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2008). Antes que os blocos dentais fossem submetidos à análise, eles eram retirados do recipiente úmido no qual estavam armazenados e mantidos em temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Foram realizadas 3 indentações na região central dos blocos dentais e os critérios de seleção foram baseados na média e desvio padrão de dureza de cada bloco. Para o primeiro e segundo experimentos, foram incluídos blocos dentais com média de dureza de superfície correspondente a, respectivamente, $40,86 \pm 3,42$ e $40,69 \pm 2,24$ kg/mm².

4.4 Preparo dos blocos dentais para as ciclagens de pH

Após os blocos terem sido selecionados quanto à dureza de superfície, uma fita adesiva de tamanho de 2 x 4 mm foi colocada sobre a superfície central de cada bloco e as demais superfícies dos blocos foram recobertas com verniz ácido-resistente. A fita, ao ser retirada, deixava então uma área de 8 mm² para exposição aos tratamentos.

4.5 Modelo de ciclagens de pH

O modelo de ciclagens de pH desenvolvido neste estudo baseou-se em pesquisa previamente realizada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Queiroz, 2004), na qual o objetivo foi desenvolver um modelo de ciclagem de pH para dentina radicular que avaliasse o potencial anticárie de dentifrício fluoretado de concentração convencional (1100 µg F/g). O esquema de ciclagem apresentava duração de 8 dias e blocos de dentina radicular bovina eram mantidos por 4 h na solução desmineralizante e por 20 h na solução remineralizante. Para validação do modelo quanto ao efeito dose-resposta ao F foi realizado um primeiro experimento, no qual, blocos dentais foram submetidos antes e após a imersão na solução desmineralizante, aos tratamentos: água purificada, soluções fluoretadas de concentrações 70, 140 e 280 µg F/ mL. Posteriormente, o segundo experimento testou os dentifrícios: dentifrício não fluoretado (controle negativo), dentifrício fluoretado 1100 µg F/g (Tandy) e dentifrício fluoretado 1100 µg F/g (Crest, controle positivo); para avaliação do efeito do dentifrício fluoretado na inibição à desmineralização.

No presente estudo o objetivo foi desenvolver e validar um modelo de ciclagens de pH para avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de flúor na inibição à desmineralização de dentina radicular. Assim, foram necessárias modificações no modelo descrito anteriormente. Considerando a profundidade ($5,4 \pm 5,8$ µm) das lesões cáries produzidas artificialmente pela imersão dos blocos de dentina bovina hígida por 32 h na solução desmineralizante (Queiroz, 2004), observou-se que o tempo de permanência dos blocos na solução desmineralizante deveria ser maior para soluções fluoretadas e dentifrícios com maiores concentrações de flúor. Assim, pensou-se em aumentar o número de dias de ciclagem e/ou o tempo de permanência diária dos blocos na solução desmineralizante. Foi desenvolvido então um estudo piloto (dados não mostrados), no qual blocos de dentina radicular bovina (n=5) foram submetidos a um esquema de ciclagem com duração de 10 dias e diariamente mantidos por 6 h na solução desmineralizante e aproximadamente por 18 h na solução remineralizante. Ou seja, ao final do período de ciclagem, os blocos dentais teriam permanecido na solução desmineralizante por um período total de 60 h. Os grupos de

tratamento foram: água purificada e soluções fluoretadas de concentrações: 315, 625 e 1250 µg F/mL.

Assim, após a obtenção e avaliação dos resultados encontrados no trabalho piloto, foi realizado um estudo in vitro de ciclagens de pH com duração de 10 dias através de dois experimentos. Nas duas fases experimentais, blocos dentais (4 x 4 x 2 mm) foram mantidos individualmente na estufa a 37°C por 6 horas na solução desmineralizante (1,4 mM de Ca, 0,91 mM de P, 0,06 µg F/mL, tampão acetato 0,05 M pH 5,0) e aproximadamente 18 h na solução remineralizante (1,5 mM de Ca, 0,9 mM de P, KCl 150 mM, 0,05 µg F/mL, tampão Tris 0,1 M, pH 7,0) a cada dia (Figura 2). O volume de solução des e remineralizante proporcionalmente utilizada por área do bloco foi de respectivamente 6,25 mL/mm² e 3,12 mL/mm². Assim como na pesquisa anteriormente realizada (Queiroz, 2004), ambas as soluções foram trocadas na metade do período de ciclagem, ou seja, no sexto dia de ciclagens de cada experimento. Ainda, duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, os blocos dentais foram mantidos sob agitação (60 rpm) individualmente por 5 min nos grupos de tratamento pertencentes a primeira ou segunda fase experimental. Após o término do período de 10 dias de ciclagens, os blocos de dentina radicular bovina permaneceram por mais 24 horas na solução remineralizante (Queiroz, 2004).

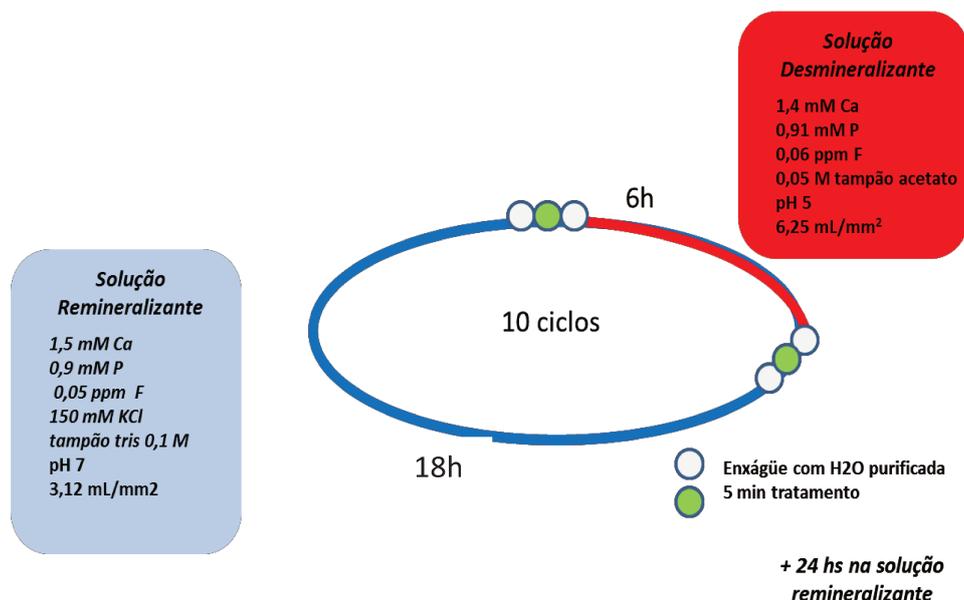


Figura 2. Esquema de ciclagem de pH.

4.6 Determinação da concentração de flúor nas soluções des e remineralizante

A concentração de cada reagente das soluções des e remineralizante foi obtida do estudo de Queiroz (2004). Para a determinação da composição da solução desmineralizante, foram adicionadas partículas de dentina radicular bovina (tamanho de 74-105 μm) ao tampão acetato pH 5 na proporção 0,5g/L, que foram mantidos sob agitação por 96 h a 37°C para obtenção de uma solução 100% saturada com relação à dentina bovina. Essa solução foi então novamente diluída com igual volume do mesmo tampão, obtendo-se uma solução 50% com relação à dentina bovina. Nessa solução foram determinadas as concentrações de flúor, fósforo e cálcio, que permitiram calcular a quantidade dos reagentes que deveria ser empregada no preparo da solução. Antes de serem submetidas às ciclagens de pH, as soluções des e remineralizante preparadas para o presente estudo tiveram a concentração de flúor mensurada. Para esta dosagem utilizou-se um eletrodo específico para íon flúor (Orion model 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-740) e 2 mL das soluções des e remineralizante foram adicionadas a 0,2 mL de TISAB III. A curva de calibração foi realizada em triplicata a partir de padrões de concentração de F conhecidas de 0,031 a 1 $\mu\text{g F/mL}$, os quais foram preparados da mesma forma que as amostras. A concentração de F foi calculada por regressão linear da curva de calibração e expressa em $\mu\text{g F/mL}$.

4.7 Determinação da concentração de fósforo nas soluções des e remineralizante

Previamente às ciclagens de pH, também foi determinada a concentração de fósforo nas soluções des e remineralizante. A curva de calibração foi feita em duplicata e obtida a partir de alíquotas de água purificada, padrão de fósforo 3 mg%, ácido molíbdico e reativo redutor, de forma que fossem obtidos padrões com 0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 μg de fósforo. As amostras foram preparadas de forma semelhante, com 2,2 mL água purificada; 0,1 mL amostra; 0,5 mL ácido molíbdico e 0,2 mL de reativo redutor.

Para esta dosagem utilizou-se um espectrofotômetro e as leituras foram realizadas a 660 nm. A concentração de fósforo foi expressa em mM.

4.8 Primeiro Experimento – Validação do Modelo de Ciclagens de pH

O primeiro experimento foi realizado para validação do modelo de ciclagens de pH utilizado quanto ao efeito dose-resposta ao flúor para concentrações acima de 1100 ppm F. Para tanto, duas vezes por dia, antes e após a imersão na solução desmineralizante, blocos dentais (n=28) foram aleatoriamente distribuídos e mantidos sob agitação por 5 min nos seguintes grupos de tratamento: água purificada (controle negativo) e soluções contendo 50, 150, 450, 1350 µg F/mL. Essas concentrações foram escolhidas porque simulam a diluição na saliva de dentifrícios fluoretados de baixa e alta concentração de flúor (Duke & Forward, 1982). Todas as soluções foram preparadas com NaF e água purificada e tiveram concentração de fluoreto dosada previamente ao uso.

4.9 Segundo Experimento – Efeito do dentifrício fluoretado na inibição da desmineralização

O efeito de dentifrício fluoretado de alta concentração na inibição da desmineralização da dentina foi testado, usando as mesmas condições anteriormente descritas, em um segundo experimento. Nesse segundo experimento, oitenta blocos de dentina bovina hígida foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de tratamento: dentifrício não fluoretado (controle negativo) e dentifrícios fluoretados Barney Smiles® (500 ppm F; Colgate-Palmolive; SP, Brasil); Tandy® (1100 ppm F; Colgate- Palmolive; SP, Brasil) e PreviDent 5000 Plus® (5000 ppm F; Colgate- Palmolive; SP; Brasil). Todos os dentifrícios apresentavam a mesma formulação (NaF e sílica-SiO₂) e foram utilizados 2 vezes por dia na forma de suspensão na proporção 1:3 (dentifrício/água purificada), simulando a diluição do dentifrício na cavidade oral (Duke & Forward, 1982). Essas suspensões contendo os dentifrícios eram preparadas diariamente e utilizadas para os dois momentos de tratamento (antes e após a imersão na solução desmineralizante). Todos os dentifrícios utilizados nesse experimento foram

previamente dosados através de protocolo (Cury *et al.*, 1981; Cury *et al.*, 2010) para certificação da concentração de F presente em cada um deles e verificou-se que os estavam de acordo com a indicação do fabricante.

4.10 Determinação da dureza longitudinal dos blocos dentais

Ao final de cada experimento, os blocos de dentina radicular bovina foram cortados transversalmente por corte longitudinal com uso de disco diamantado acoplado à cortadeira elétrica. O hemibloco foi embutido (embutidora Arotec Pre 30) em resina acrílica incolor, ficando a parte seccionada exposta. Para possibilitar as análises da lesão de cárie, a superfície seccionada da dentina foi lixada e polida com lixas de granulação 320, 600 e 1200 e refrigerada com água purificada. Discos de feltro com suspensão de 1 micrão também foram utilizados para dar polimento final e em seguida a dureza foi determinada. Para tanto as impressões foram realizadas no centro do bloco, às distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μm da superfície da dentina. Mais duas linhas de impressão foram repetidas 100 μm acima e 100 μm abaixo, todas com carga de 5 g e tempo de 5 s (Aires *et al.*, 2008). Então, as médias das durezas nas três posições de cada hemibloco a cada distância da superfície foram calculadas. A área de lesão (Delta S; ΔS) foi calculada por integração numérica usando regra do trapézio pela diferença entre a área abaixo da curva da superfície da dentina ($\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) e a área de desmineralização. Os dados foram expressos como número de dureza Knoop (kg/mm^2) versus distância da superfície (Ana *et al.*, 2012).

4.11 Determinação da concentração de flúor nas soluções des e remineralizante

Após o término do período de ciclagens, foram determinadas as concentrações de flúor nas soluções des e remineralizante que estavam em contato com cada bloco dental individualmente para cada uma das fases do experimento. Para esta dosagem utilizou-se um eletrodo específico para íon flúor (Orion model 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-740) e 1 mL das soluções des e remineralizante foram adicionadas a 0,1 mL de TISAB III, na

proporção de 10 partes de amostra para 1 parte de TISAB III. A curva de calibração foi realizada em triplicata e obtida a partir de padrões de concentração de F conhecidas de 0,031 a 1,0 µg F/mL, os quais foram preparados da mesma forma que as amostras. A concentração de F foi calculada por regressão linear da curva de calibração e expressa em µg F/mL.

4.12 Determinação de flúor total na dentina

Para determinação da concentração de flúor total em cada bloco de dentina, duas camadas consecutivas de dentina foram removidas pela imersão dos blocos em 0,4 mL de HCl 0,5 M por 15 segundos e posteriormente, por mais 15 segundos. Esses extratos ácidos foram neutralizados com 0,4 mL de TISAB II (contendo NaOH 0,5 M). A seguir, as amostras foram dosadas em eletrodo específico para íon flúor (Orion model 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-740), previamente calibrados em triplicata com padrões de concentração que variaram de 0,125 a 16,0 µg F/ mL. A área de dentina exposta de cada bloco dental foi mensurada com paquímetro digital. No primeiro experimento, a média da espessura das camadas de dentina removida foi $16,1 \pm 3,1$ µm e no segundo, $13,8 \pm 2,5$ µm. Os dados obtidos para 1^a e 2^a extração ácida foram somados e os resultados expressos em µg F/cm².

4.13 Análise Estatística

As variáveis de resposta ΔS , flúor total na dentina e concentração de flúor nas soluções des e remineralizante foram submetidas a uma análise estatística exploratória e avaliadas de forma independente para o 1^o e 2^o experimento. Para verificação da normalidade, todos os dados foram testados através do teste Shapiro Wilks. Todas as variáveis de resposta também foram submetidas à análise de variância, seguida do teste de Tukey. Foram feitas análises de regressão para as variáveis ΔS e flúor total na dentina do 1^o experimento. O teste t pareado para uma média também foi aplicado para os dados da variável concentração de flúor na solução des e remineralizante, permitindo a comparação das concentrações de F nas soluções

submetidas à ciclagens com as concentrações das soluções inicialmente preparadas (“solução fresca”). Todas as análises foram feitas utilizando o software IBM SPSS Statistics 20 (2011). Foi estabelecido um limite de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Primeiro Experimento

A tabela 1 apresenta as médias (\pm desvio padrão) de ΔS e flúor total na dentina do 1º experimento.

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) de ΔS (n=15) e flúor total na dentina (n=8) de acordo com os grupos de tratamento.

Grupos de tratamento	ΔS (kg/mm ² x μ m)	Flúor total na dentina (μ g F/cm ²)*
Água purificada	1320,6 \pm 298,6 a	17,4 \pm 3,6 a
50 μ g F/mL	1022,8 \pm 317,7 b	27,3 \pm 3,4 a,b
150 μ g F/mL	784,9 \pm 240,9 b	33,1 \pm 5,7 b,c
450 μ g F/mL	466,8 \pm 246,3 c	41,3 \pm 8,0 c,d
1350 μ g F/mL	163,1 \pm 117,1 d	52,6 \pm 15,2 d

Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$).

*blocos dentais que não participaram das ciclagens de pH apresentaram 1,4 μ g F/cm².

A Figura 3 resume os resultados da variável ΔS em termos de média e desvio padrão. Os resultados de desmineralização dos blocos de dentina radicular bovina avaliados pela área de lesão (ΔS) apresentam valores sucessivamente menores quanto maior a concentração de F das soluções fluoretadas de tratamento. A menor área de lesão foi apresentada pelo grupo de 1350 μ g F/mL ($p < 0,05$) e a maior pelo grupo controle negativo ($p < 0,05$).

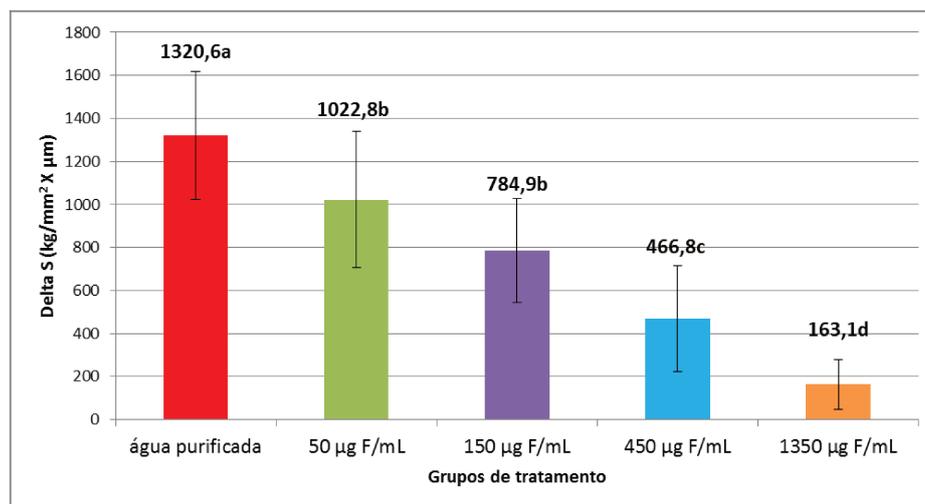


Figura 3. Médias (n=15) de área de lesão (ΔS) de acordo com grupos de tratamento. Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$). As barras denotam o desvio padrão.

Para ΔS foram realizadas análises de regressão em função do logaritmo (base 10) da concentração de flúor nas soluções de tratamento e a melhor reta de ajuste para as duas variáveis apresentou relação linear ($r^2= 0,72$; $p<0,0001$). A figura abaixo representa graficamente essa análise de acordo com os grupos de tratamento e a função (expressão da reta).

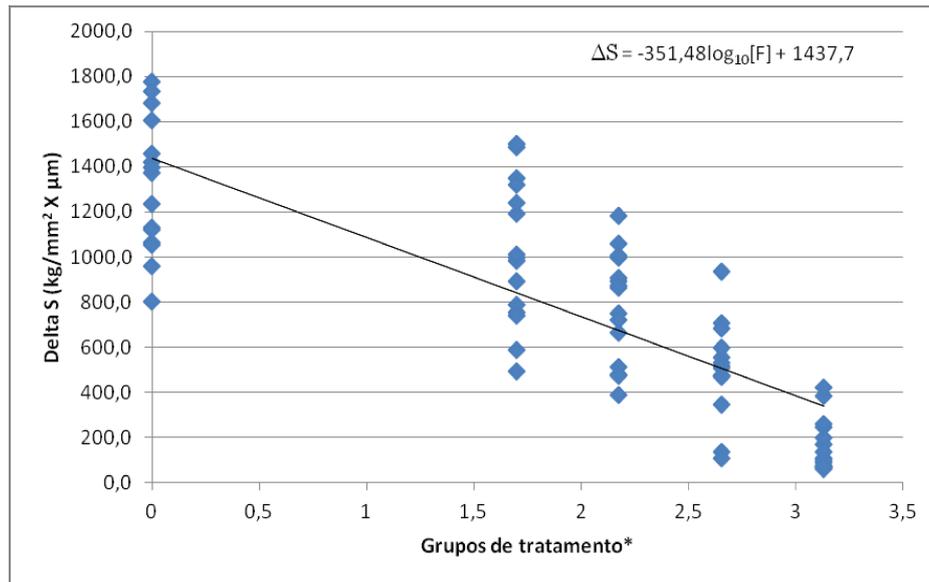


Figura 4. Regressão linear da área de lesão (ΔS) em função dos grupos de tratamento. Na equação, [F] corresponde a concentração de flúor nas soluções de tratamento.*As concentrações de flúor das soluções de tratamento foram expressas na forma \log_{10} .

As médias dos dados de dureza a cada profundidade da superfície dos blocos dentais estão ilustradas para cada grupo de tratamento na Figura 5.

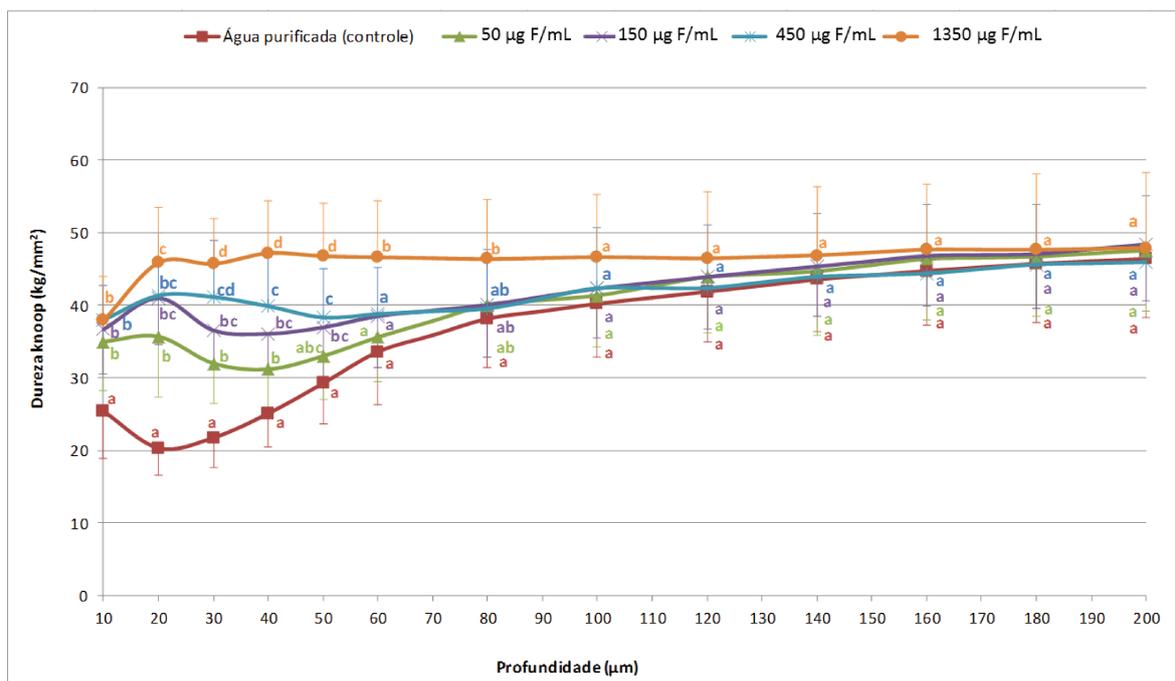


Figura 5. Média de dureza Knoop (kg/mm^2) dos blocos de dentina radicular bovina de acordo com grupos de tratamento e em função da distância (μm) da superfície ($n=15$). Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p<0,05$). As barras denotam o desvio padrão.

Na Figura 5, é possível visualizar curvas com perfil semelhante para os blocos dentais tratados com soluções contendo 50, 150 e 450 $\mu\text{g F/mL}$ e que essas apresentam padrões distintos dos grupos tratados com água e solução contendo 1350 $\mu\text{g F/mL}$, corroborando os dados anteriormente descritos na Figura 3. Nas distâncias de 10 a 80 μm das superfícies dos blocos dentais, existe diferença estatística entre os diferentes grupos de tratamento, entretanto, a partir da profundidade 100 μm não existe diferença entre os grupos de tratamento ($p>0,05$).

A Figura 6 apresenta as médias e desvios padrão da concentração de flúor total na dentina extraído dos blocos de dentina bovina, após o término do período de ciclagens de pH. É possível observar valores crescentes de concentração de flúor total na dentina, quanto maior a concentração de flúor nas soluções de tratamento. O grupo 1350 $\mu\text{g F/mL}$ apresentou a maior concentração de F total na dentina e diferiu dos demais ($p<0,05$), com exceção do grupo 450 $\mu\text{g F/mL}$ ($p=0,076$).

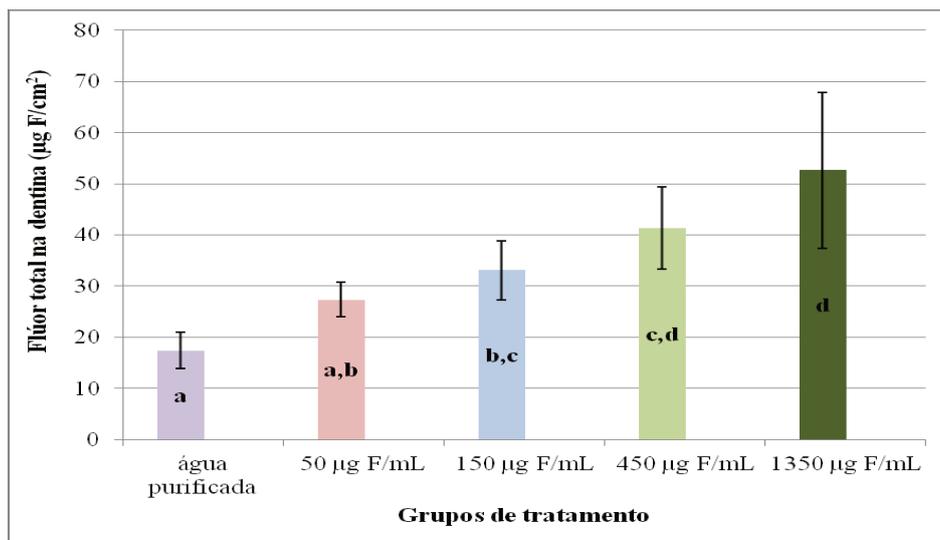


Figura 6. Médias (n=8) de flúor total na dentina de acordo com os grupos de tratamento. Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$). As barras denotam o desvio padrão.

Para flúor total na dentina, as análises de regressão em função do logaritmo (base 10) da concentração de flúor nas soluções de tratamento mostraram padrão exponencial ($r^2 = 0,76$; $p < 0,0001$) e a figura 7 representa graficamente essa análise e a função (expressão da reta) de acordo com os grupos de tratamento.

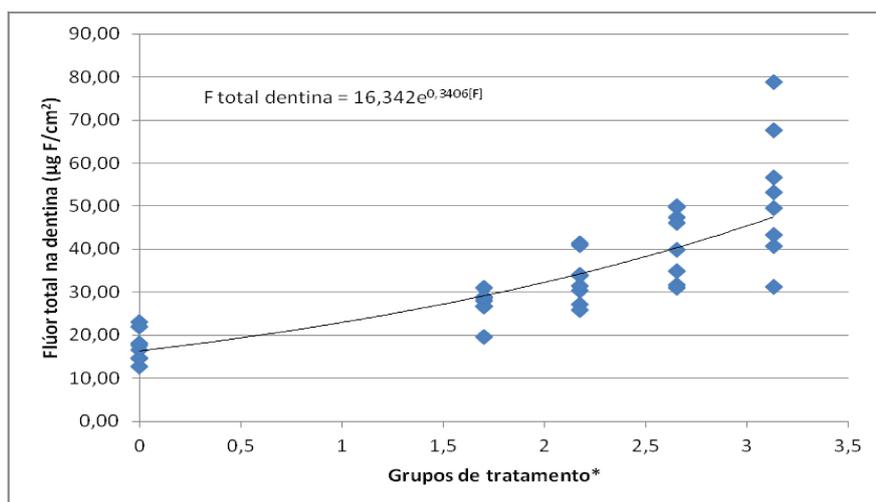


Figura 7. Regressão exponencial da concentração de flúor total na dentina em função dos grupos de tratamento. Na equação, [F] representa a concentração de flúor nas soluções de tratamento e “e” um valor constante. *As concentrações de flúor das soluções de tratamento foram expressas na forma \log_{10} .

Na tabela 2 estão as médias da concentração de F encontradas nas soluções des e remineralizante (n=28) que estavam em contato individualmente com os blocos dentais, divididas em “1º período” (corresponde ao período de ciclagens dos dias 1 a 5) e “2º período” (corresponde ao período de ciclagens dos dias 6 a 10).

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão; n=28) da concentração de flúor nas soluções des e remineralizante de acordo com os tratamentos.

Grupos de Tratamento	Flúor na solução Desmineralizante ($\mu\text{g F/mL}$)		Flúor na solução Remineralizante ($\mu\text{g F/mL}$)	
	1º período	2º período	1º período	2º período
água purificada	0,057 \pm 0,004 a*	0,055 \pm 0,007 a*	0,035 \pm 0,002 a	0,035 \pm 0,002 a
50 $\mu\text{g F/mL}$	0,062 \pm 0,003 a	0,060 \pm 0,009 a,b	0,050 \pm 0,005 b	0,052 \pm 0,004 a,b
150 $\mu\text{g F/mL}$	0,070 \pm 0,003 b	0,062 \pm 0,002 b,c	0,061 \pm 0,003 b	0,061 \pm 0,004 b
450 $\mu\text{g F/mL}$	0,078 \pm 0,008 c	0,067 \pm 0,006 c	0,091 \pm 0,015 c	0,088 \pm 0,019 c
1350 $\mu\text{g F/mL}$	0,110 \pm 0,018 d	0,090 \pm 0,013 d	0,176 \pm 0,034 d	0,238 \pm 0,073 d

Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos de tratamento em cada período e em cada solução pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Asteriscos representam soluções que não diferiram estatisticamente das “soluções frescas” pelo teste t para uma média ($p > 0,05$).

Concentração de F nas soluções des e remineralizante “frescas”, respectivamente, 0,056 e 0,045 $\mu\text{g F/mL}$.

Para as dosagens realizadas nas soluções des e remineralizante, observou-se que a concentração de F apresenta valores crescentes quanto maior a concentração de F da solução de tratamento e que esses grupos de modo geral diferem estatisticamente um do outro, especialmente nas concentrações de 0, 150, 450 e 1350 $\mu\text{g F/mL}$. A concentração de F na solução desmineralizante no 1º período de ciclagens não apresentou diferença estatística entre os grupos de tratamento água purificada e solução 50 $\mu\text{g F/mL}$. Considerando o 2º período de ciclagens, o grupo tratado com solução 1350 $\mu\text{g F/mL}$ apresentou maior concentração de F ($p < 0,05$). Nos dois períodos de ciclagens, apenas a solução desmineralizante que estava em contato com os blocos dentais tratados com água purificada não diferiram da “solução fresca” ($p > 0,05$). Observando a concentração de F na solução remineralizante no 1º período de ciclagens, constata-se que os grupos diferiram estatisticamente entre si, exceto entre aqueles de 50 e 150 $\mu\text{g F/mL}$. No 2º período, o grupo de 1350 $\mu\text{g F/mL}$ apresentou a maior concentração de F na solução remineralizante ($p < 0,05$).

5.2 Segundo Experimento

A tabela 3 resume os resultados da variável ΔS e flúor total na dentina em termos de média e desvio padrão do 2º experimento.

Tabela 3. Média (\pm desvio padrão) de ΔS (n=12) e flúor total na dentina (n=8) de acordo com os grupos de tratamento.

Grupos de Tratamento	ΔS (kg/mm ² x μ m)	Flúor total na dentina (μ g F/cm ²)
DNF	1328,1 \pm 450,9 a	10,2 \pm 2,0 a
500 μ g F/g	761,6 \pm 308,8 b	29,4 \pm 6,4 b
1100 μ g F/g	705,6 \pm 243,9 b	34,3 \pm 7,5 b
5000 μ g F/g	234,2 \pm 198,0 c	49,1 \pm 7,3 c

Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$).
DNF – dentifrício não fluoretado

A figura 8 representa os resultados da variável ΔS do 2º experimento. Os resultados da área de lesão (ΔS) apresentam valores menores quanto maior a concentração de F nos dentifrícios testados e apontam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento, exceto para aqueles tratados com os dentifrícios 500 e 1100 μ g F/g. O grupo controle negativo DNF mostrou maior área de lesão cariosa ($p < 0,05$) e o grupo tratado com dentifrício de 5000 μ g F/g menor área de lesão cariosa ($p < 0,05$).

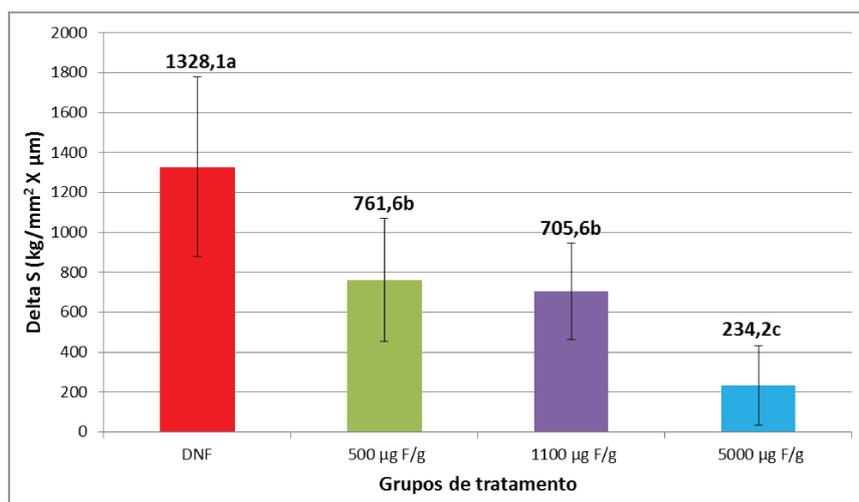


Figura 8. Médias (n=12) de área de lesão (ΔS) de acordo com grupos de tratamento. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$). Barras denotam desvio padrão. DNF – dentifrício não fluoretado.

As médias dos dados de dureza a cada profundidade da superfície dos blocos dentais para cada grupo de tratamento estão na Figura 9.

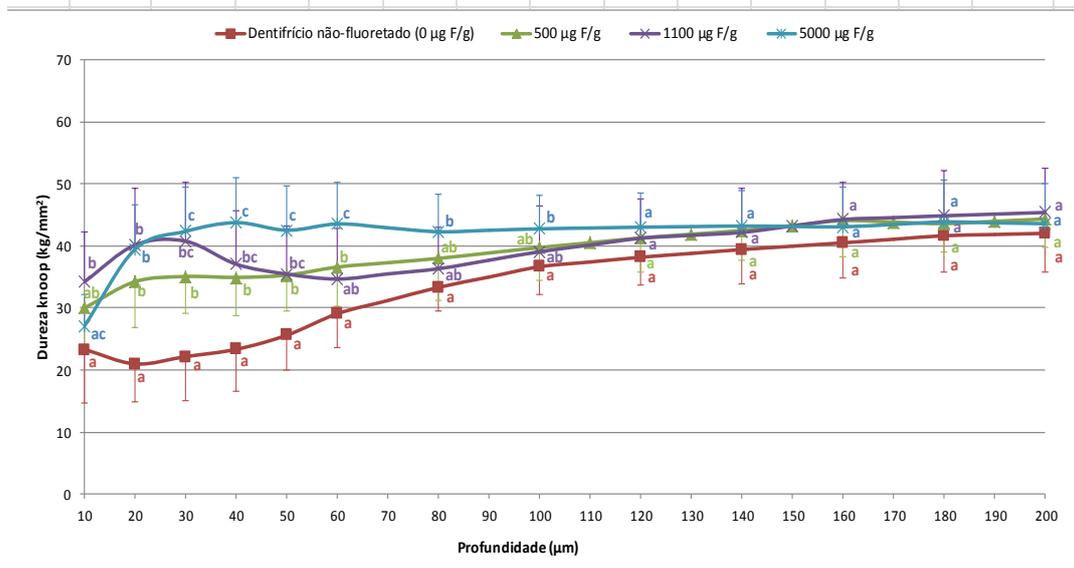


Figura 9. Média de dureza Knoop (kg/mm^2) dos blocos de dentina radicular bovina de acordo com grupos de tratamento e distância (μm) da superfície ($n=12$). Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos de tratamento. As barras denotam desvio padrão.

A figura acima permite observar curvas com perfis distintos de acordo com os tratamentos. Os blocos dentais tratados com os dentifrícios 500 e 1100 $\mu\text{g F/g}$ apresentam perfis semelhantes e diferem dos grupos tratados com DNF e 5000 $\mu\text{g F/g}$. A distância de 120 μm da superfície marca o início do platô da área hígida para os blocos submetidos aos diferentes grupos de tratamento.

As médias e desvios padrão da concentração de flúor total na dentina extraído dos blocos dentais estão representados na figura 10.

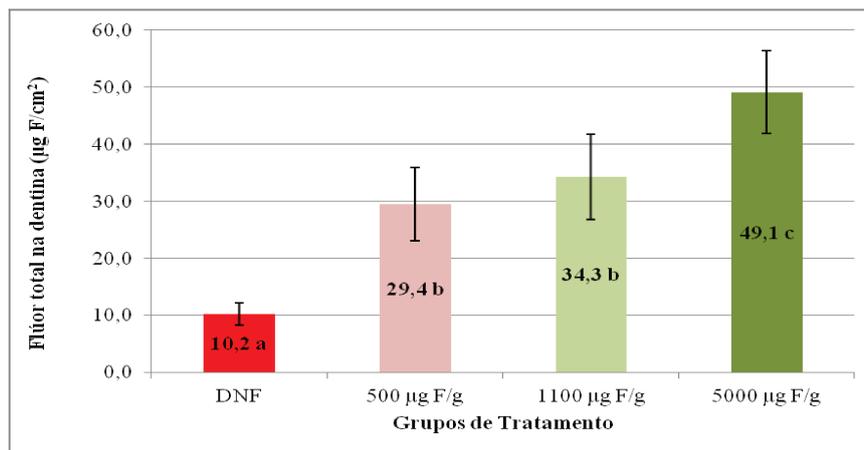


Figura 10. Médias (n=8) de flúor total na dentina de acordo com os grupos de tratamento. Letras distintas representam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$). As barras denotam o desvio padrão.

Os resultados apontam valores crescentes das dosagens de F total na dentina para as concentrações de dentifrícios (0, 500, 1100 e 5000 µg F/g). Existe diferença ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos de tratamento, exceto para aqueles blocos dentais tratados com os dentifrícios de concentração 500 e 1100 µg F/g. O grupo DNF apresentou a menor concentração de flúor total na dentina e o grupo tratado com dentifrício de alta concentração apresentou a maior quantidade de flúor total na dentina ($p < 0,05$).

A tabela 4 apresenta a média da concentração de F dosadas nas soluções des e remineralizante (n=20) que estavam em contato individualmente com os blocos dentais do 2º experimento, divididas em “1º período” (corresponde ao período de ciclagens dos dias 1 a 5) e “2º período” (corresponde ao período de ciclagens dos dias 6 a 10).

Tabela 4. Média (\pm desvio padrão; n=20) concentração de F ($\mu\text{g/mL}$) nas soluções des e remineralizante de acordo com os tratamentos e período.

Grupos de Tratamento	F sol. Desmineralizante ($\mu\text{g F/mL}$)		F sol. Remineralizante ($\mu\text{g F/mL}$)	
	1 ^o período	2 ^o período	1 ^o período	2 ^o período
DNF	0,053 \pm 0,003 a	0,056 \pm 0,001 a	0,037 \pm 0,002 a	0,045 \pm 0,005 a*
500 $\mu\text{g F/g}$	0,061 \pm 0,003 b	0,072 \pm 0,004 b	0,053 \pm 0,002 b	0,072 \pm 0,005 b
1100 $\mu\text{g F/g}$	0,067 \pm 0,004 c	0,074 \pm 0,004 b	0,063 \pm 0,005 b	0,081 \pm 0,005 b
5000 $\mu\text{g F/g}$	0,093 \pm 0,008 d	0,121 \pm 0,012 c	0,182 \pm 0,030 c	0,241 \pm 0,040 c

Letras distintas denotam diferença estatística entre os grupos de tratamento em cada período e cada solução pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Asteriscos representam soluções, cujas concentrações de F não diferem estatisticamente da encontrada nas soluções “frescas” pelo teste t para uma média ($p > 0,05$).

Concentração de F nas soluções des e remineralizante “frescas” respectivamente 0,055 e 0,044 ($\mu\text{g F/mL}$).

Na análise da variável concentração de F na solução des e remineralizante, observa-se maior concentração nas soluções quanto maior a concentração de F nos dentifrícios utilizados no tratamento dos blocos dentais. Houve diferença estatisticamente significativa na concentração de F na solução desmineralizante do 1^o período entre todos os grupos de tratamento. No 2^o período das ciclagens de pH, não houve diferença ($p < 0,05$) na concentração de F na solução desmineralizante entre os grupos tratados com os dentifrícios de 500 e 1100 $\mu\text{g F/g}$. A maior concentração de F na solução desmineralizante foi observada no grupo tratado com dentifrício de 5000 $\mu\text{g F/g}$. Considerando a concentração de F na solução desmineralizante “fresca”, todos os grupos diferiram ($p < 0,05$) da mesma tanto no 1^o quanto no 2^o período.

Quanto à concentração de F na solução remineralizante do 1^o período, o maior valor ($p < 0,05$) foi apresentado pelo grupo tratado com o dentifrício de 5000 $\mu\text{g F/g}$. Não houve diferença significativa na concentração de F dos grupos tratados com os dentifrícios de 500 e 1100 $\mu\text{g F/g}$. No 2^o período, para a solução remineralizante maior concentração de F foi observada no grupo tratado com o dentifrício de 5000 $\mu\text{g F/g}$. Apenas o grupo tratado com DNF não diferiu ($p = 0,52$) da concentração da solução remineralizante “fresca”.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi desenvolvido e testado um modelo *in vitro* de ciclagens de pH para avaliar o potencial anticárie de dentifrício com alta concentração de flúor (5000 ppm F) na inibição à desmineralização da dentina radicular. O modelo de ciclagens de pH baseou-se em pesquisa previamente realizada (Queiroz, 2004) e alguns aspectos da metodologia foram mantidos, como por exemplo, concentração dos reagentes das soluções des e remineralizante, volume de solução des e remineralizante proporcionalmente utilizada por área do bloco, período de troca das soluções des e remineralizante, forma de realização dos tratamentos e manutenção dos blocos dentais por mais 24 h na solução remineralizante após o término do período de ciclagens. Para a solução desmineralizante, as concentrações de cálcio, fósforo e flúor refletem concentrações encontradas em uma solução 50% saturada em relação à dentina bovina, a qual foi preparada com pó de dentina bovina, conforme descrito por Queiroz (2004).

No esquema de ciclagem anteriormente conduzido (Queiroz, 2004), o objetivo do trabalho foi desenvolver um modelo para dentina radicular que avaliasse o potencial anticárie de dentifrício fluoretado de concentração convencional (1100 µg F/g) e os blocos dentais foram mantidos por 4 h na solução desmineralizante e 20 h na solução remineralizante, durante 8 dias. Entretanto, neste trabalho o objetivo foi desenvolver um modelo de ciclagens de pH para avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de flúor (5000 µg F/g). Para tanto, por meio da análise dos resultados obtidos por Queiroz (2004) e a partir de estudo piloto (dados não apresentados), determinou-se que o tempo de permanência diário dos blocos dentais na solução desmineralizante deveria ser aumentado para 6 h e o período de ciclagem para 10 dias, representando um desafio ácido superior.

O 1º experimento utilizou água purificada (controle negativo) e soluções contendo 50, 150, 450, 1350 µg F/mL para verificar se o modelo demonstraria efeito dose-resposta à alta concentração de flúor na inibição à desmineralização em dentina radicular. Para área de lesão (ΔS), principal variável de resposta, o grupo tratado com solução de 1350 µg F/mL apresentou menor desmineralização ($p < 0,05$). Para as dosagens realizadas nas soluções des e remineralizante, que foram mantidas em contato individualmente com os blocos dentais, observou-se que a concentração de F mostrou valores crescentes quanto maior a concentração de F na solução de tratamento. É

possível que produtos fluoretados formados na superfície da dentina durante os tratamentos tenham sido liberados para estas soluções durante os períodos que os blocos dentais ficavam imersos nas mesmas. Maiores concentrações de F foram encontradas nas soluções des e remineralizantes dos tratamentos contendo 450 e 1350 µg F/mL, cujos blocos dentais também tiveram as maiores quantidades de F total na dentina, sugerindo que parte do F presente nos tratamentos foi incorporado à dentina durante as ciclagens de pH. Na solução desmineralizante (1^o e 2^o período), apenas a concentração do grupo tratado com água não diferiu ($p>0,05$) da solução “fresca”. O baixo pH da solução desmineralizante (pH=5) tornou o meio ácido, estabelecendo uma condição de subsaturação que promoveu a dissolução de minerais dos blocos dentais. Entretanto, considerando que havia F no meio em concentrações acima de 0,02 ppm (Tenuta e Cury, 2005), parte dele precipitou sobre os blocos dentais, daí as menores concentrações de F livre na solução desmineralizante dos blocos tratados com água. Na solução remineralizante, o pH elevado (pH=7) estimulou a reposição de minerais perdidos e apenas o grupo tratado com água mostrou concentração de F inferior à solução fresca, já que a única forma de F presente estava na solução.

Os achados do primeiro experimento demonstraram que o modelo de ciclagens de pH desenvolvido apresentou efeito dose-resposta ao F para todas as variáveis analisadas e foi adequado para avaliar *in vitro* o efeito de alta concentração de flúor na inibição da desmineralização da dentina. Portanto, pode-se afirmar que o modelo foi validado, o que permite que este seja utilizado posteriormente em outros estudos que tenham o objetivo de testar o potencial anticárie de produtos fluoretados de alta concentração em dentina.

Ao analisar os gráficos das médias de dureza dos blocos dentais de acordo com os grupos de tratamento e em função da distância da superfície verificou-se que os mesmos tiveram padrões semelhantes tanto para o primeiro quanto para o segundo experimento. Para os blocos dentais tratados com água e DNF, as curvas demonstraram grande área de desmineralização e perfil gradativamente ascendente. Nos grupos tratados com alta concentração de flúor (solução de 1350 µg F/mL e dentifrício de 5000 µg F/g), as curvas abruptamente atingem valores correspondentes ao platô, às distâncias de 20-30 µm da superfície. Nas concentrações intermediárias (soluções fluoretadas de 50, 150 e 450 µg F/mL e dentifrícios de 500 e 1100 µg F/g) o perfil mostrou-se

ascendente até a distância aproximada de 20 µm da superfície, a seguir descendente e posteriormente gradativamente ascendente até atingir o platô. Essas características foram provavelmente consequência da presença de produtos fluoretados formados sobre a superfície dos blocos dentais e da concentração de F nas soluções des e remineralizante. Outro fator a ser considerado é que a concentração de F precipitado é alta na superfície dos blocos dentais e diminui gradativamente para o seu interior.

A seguir, após o modelo ter sido validado, foi realizado um segundo experimento para testar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F comercialmente disponível (5000 µg F/g), pois tem sido sugerido que mais flúor é necessário para remineralização da dentina radicular (Baysan *et al.*, 2001). Para tanto, além do dentifrício de 5000 µg F/g, foram utilizados como tratamento dentifrício não fluoretado (controle negativo) e dentifícios fluoretados comercialmente disponíveis nas concentrações de 1100 µg F/g e outro de baixa concentração de F (500 µg F/g).

No 2º experimento, o grupo tratado com dentifrício de 5000 µg F/g apresentou a menor área de lesão cariosa e a maior concentração de flúor total na dentina ($p < 0,05$). Apenas as soluções desmineralizante e remineralizante (ambas do 1º período) dos grupos tratados com DNF tiveram concentração de F inferior a da solução fresca. A solução remineralizante (2º período) dos blocos dentais tratados com DNF foi a única que não diferiu da solução fresca. Foram encontradas maiores concentrações de F nas soluções des e remineralizante que estavam em contato com os blocos dentais tratados com o dentifrício de 5000 µg F/g e que tinham maior concentração de F total na dentina. Ou seja, o dentifrício de alta concentração demonstrou ter ação superior no processo de inibição à desmineralização no modelo de ciclagens de pH desenvolvido quando comparado ao dentifrício de concentração convencional. Tais resultados corroboram achados de estudos *in vivo*, nos quais tem sido demonstrado potencial anticárie superior dos dentifícios de alta concentração na reversão de lesões cariosas (Baysan *et al.*, 2001; Schirrmeyer *et al.*, 2007; Nordström & Birkhed, 2009; Ekstrand *et al.*, 2008; Al-Mulla *et al.*, 2010).

Entretanto, alguns desses estudos testaram a ação dos dentifícios de alta concentração em cárie de esmalte em adolescentes ou em voluntários adultos jovens (Schirrmeyer *et al.*, 2007; Nordström & Birkhed, 2009; Al-Mulla *et al.*, 2010). Ainda, nos trabalhos que tiveram como substrato dental dentina radicular (Baysan *et al.*, 2001;

Ekstrand *et al.*, 2008), os dentifrícios de alta concentração foram avaliados em voluntários que possuíam lesões cáries radiculares e assim, o principal efeito do flúor analisado foi na ativação da remineralização. Estudo que comparou a ação de dentifrícios de alta concentração de flúor utilizando modelos de ciclagens de pH também encontrou efeito anticárie superior dos dentifrícios de concentrações acima de 1450 µg F/g (ten Cate *et al.*, 2006). Entretanto, o substrato dental testado foi esmalte (ten Cate *et al.*, 2006). Daí a relevância do presente estudo, pois o dentifrício de alta concentração de flúor foi testado em dentina radicular e os blocos dentais foram submetidos a um regime de ciclagens de pH que os expôs a intenso desafio ácido (imersão na solução desmineralizante por um período total de 60 horas), assim avaliou-se preponderantemente a ação do dentifrício fluoretado de alta concentração na inibição à desmineralização.

Em resumo, os achados do presente estudo sugerem que o modelo *in vitro* de ciclagens de pH desenvolvido, utilizando dentina radicular bovina como substrato, apresentou efeito dose-resposta ao flúor e também foi capaz de avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o modelo in vitro de ciclagens de pH desenvolvido para avaliar a inibição da desmineralização de dentina radicular bovina apresentou efeito dose-resposta ao flúor, sendo possível sua utilização para avaliação de novos produtos fluoretados de alta concentração. Também, foi capaz de avaliar o potencial anticárie de dentifrício de alta concentração de F.

REFERÊNCIAS*

Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42: 380-6.

Aires, C.P.; Tabchoury, C.P.M. ; Del Bel Cury, A.A. ; Cury, J.A. . Effect of a Lactose-Containing Sweetener on Root Dentine Demineralization in situ. *Caries Research* v. 36, n.3, p. 167-169, 2002.

Al-Mulla A, Karlsson L, Kharsa S, Kjellberg H, Birkhed D. Combination of high-fluoride toothpaste and no post-brushing water rinsing on enamel demineralization using an in-situ caries model with orthodontic bands. *Acta Odontol Scand.* 2010 Nov;68(6):323-8.

Ana PA, Tabchoury CPM, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention. *Caries Res.* 2012; 46: 441-51.

Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Peterson L, Borsboom P. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5.000 and 1.100 ppm fluoride. *Caries Res.* 2001; 35: 41-6.

Berry TG, Summitt JB, Sift EJ Jr. Root Caries. *Oper Dent.* 2004; 29(6):601-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 68p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados Principais. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 92p.

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

Cury JA, Guimaraes LOC, Arbex ST, Moreira BH. Análise de dentifícios fluoretados: concentração e formas químicas de fluoretos encontrados em produtos brasileiros. *Rev Ass Paul Cirurg Dent.* 1981; 35(2): 142-47.

Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Paes Leme AF. The Importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15(3): 167-74.

Cury JA, Oliveira MJL, Martins CC, Tenuta LMA, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by Brazilian children. *Braz Dent J.* 2010; 21(5): 396-400.

Curzon MEJ, Preston AJ. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res.* 2004; 38: 24-33.

Duke SA, Forward GC: The conditions occurring in vivo when brushing with toothpastes. *Br Dent J.* 1982; 152:52-4.

Ekstrand KR, Martignon S, Holm-Pedersen P. Development and evaluation of two root caries controlling programmes for home-based frail people older than 75 years. *Gerodontology.* 2008; 25: 67-75.

Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5000 compared to 1450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res.* 2013; 47: 391-8.

Featherstone JD, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S: Enhancement of remineralisation in vitro and in vivo. In: Leach SA (ed); *Factors Affecting De- and Remineralization of the Teeth.* Oxford: IRL Press; 1986; 23-34.

Fushida CE, Cury JA. Estudo in situ do efeito da frequência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1999; 13: 127-34.

Griffin SO, Regnier E, Griffin PM, Huntley V. Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. *J Dent Res.* 2007; 86(5): 410-5.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37:339-44.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM: The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res* 1986;65:955-958.

Innes N, Evans D. Caries prevention for older people in residential care homes. *Evid Bas Den.* 2009; 10(3):83-7.

Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Projeção da população do Brasil. IBGE. [acesso 2009 set 23]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1272.

Johanson CN, Osterberg T, Steen B, Birkhed D. Prevalence and incidence of dental caries and related risk factors in 70- to 76-year-olds. *Acta Odontol Scand.* 2009; 67: 304-312.

Jones JA. Root caries: prevention and chemotherapy. *Am J Dent.* 1995; 8(6): 352-7

Mellberg JR: Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992; 71(Spec Iss): 913-9.

Narvai PC, Frazão P, Castellanos RA. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. *Odontologia e Sociedade.* 1999; 1:25-29.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JL. Dental caries in Brazil: decline, polarization, inequality and social exclusion. *Panam Salud Publica.* 2006; 19: 385-93.

Nordström A, Birkhed D. Fluoride Retention in Proximal Plaque and Saliva. Using Two NaF Dentifrices Containing 5,000 and 1,450 ppm F with and without Water Rinsing. *Caries Res.* 2009; 43: 64–9.

Nordström A, Birkhed D. Preventive effect of high-fluoride dentifrice (5,000 ppm) in caries-active adolescents: a 2-year clinical trial. *Caries Res.* 2010;44(3):323-31.

Nordström A, Birkhed D. Effect of a third application of toothpastes (1450 and 5000 ppm F), including a 'massage' method on fluoride retention and pH drop in plaque. *Acta Odontol Scand.* 2012; 1-7.

Queiroz CS. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH – cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 21-27.

Rihs LB, Sousa Mda L, Wada RS. Dental root surface caries prevalence among adults and senior citizens in southeast São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005; 21(1): 311-6.

Schirrmeister JF, Gebrande JP, Altenburger MJ, Hellwig E. Effect of dentifrice containing 5000 ppm fluoride on non – cavitated fissure carious lesions in vivo after 2 weeks. *Am J Dent.* 2007; 20(4): 212-6.

Tavss EA, Mellberg JR, Joziak M, Gambogi RJ, Fisher SW. Relationship between dentifrice fluoride concentration and clinical caries reduction. *Am J Dent.* 2003; 16 (6): 369–74.

ten Cate JM. In vitro studies effects of fluoride on de and remineralization. *J Dent Res.* 1990; 69 (Spec Iss): 614-9.

ten Cate JM, Featherstone JD: Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 283-296.

ten Cate JM, Exterkate RAM, Buijs MJ. The Relative Efficacy of Fluoride Toothpastes Assessed with pH Cycling. *Caries Res.* 2006; 40: 136-41.

Tenuta LMA; Cury, JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Sada Assed. (Org.). *Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica.* 1ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005, p. 113-52.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD007868.

Wefel JS: Root caries histopathology and chemistry. *Am J Dent* 1994; 7:261-265.

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res.* 1987; 21: 126-40.

White DJ: The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res.* 1995; 9:175-93.