



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PAULO EDELVAR CORRÊA PERES
CIRURGIÃO - DENTISTA

**EFEITO DO PMSF NA INCORPORAÇÃO DE FLÚOR E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL**

*Este exemplar foi devidamente
corrigido, conforme resolução
CCPQ 1036/83
Suaçaba, 06 de agosto de 1997
Jaime*

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS: ÁREA DE
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-
DENTAL*

P415e

31526/BC

Piracicaba
1997

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PAULO EDELVAR CORRÊA PERES

CIRURGIÃO - DENTISTA

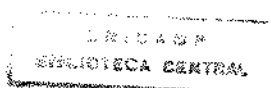
**EFEITO DO PMSF NA INCORPORAÇÃO DE FLÚOR E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL**

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS: ÁREA DE
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-
DENTAL*

Orientador: Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY

Piracicaba

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	TIUNICAMP
	P415e
V.	Ex.
TEMP. BC	31526
PROD.	281197
	D ☒
	R.B. 11.00
	30/08/97
N.º CPU	

CM-00100029-0

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

P415e	Peres, Paulo Edelvar Corrêa. Efeito do PMSF na incorporação de flúor e remineralização do esmalte dental / Paulo Edelvar Corrêa Peres. - Piracicaba : [s.n.], 1997. 92f. : il. Orientador : Jaime Aparecido Cury. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Saliva. 2. Inibidores de Enzima Proteolítica. 3. Flúor - Incorporação. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. 19.CDD - 612.313 - 612.015 16 - 661.42
-------	--

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Saliva	612.313
2. Inibidores de Enzima Proteolítica	612.015 16
3. Flúor - Incorporação	661.42



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 07/07/97, considerou o candidato aprovado.

1. Jaime Aparecido Cury

2. Celso Paulino da Costa

3. Maria Tereza C. Derbyshire

A **Deus**, por ter me acompanhado em todos os momentos.

A meu **pai** "*in memoriam*" pelos exemplos de bondade, honestidade e resignação.

À minha **mãe** pelos exemplos de amor, fé e persistência.

À **Rosanara**, por tudo o que fez, por amor e com amor.

Aos meus filhos, **Raphael e Bernardo** com a certeza de que este exemplo representa um caminho a ser seguido e um incentivo à constante luta por novos conhecimentos e ideais verdadeiros, dedico este trabalho.

Ao Prof. Doutor **Jaime A. Cury**, pelo exemplo de competência, objetividade e seriedade e pela paterna dedicação à minha formação científica, meu reconhecimento e sincero agradecimento.

À José Luiz Freire de Andrade, “*in memoriam*”,
pelo exemplo e estímulo no começo da minha vida profissional e
pela semente da prevenção plantada com seu apoio dentro da
Odontologia da UFSM.

À Universidade Federal de Santa Maria, UFSM e ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde, por terem possibilitado o meu afastamento para realização deste Mestrado.

À Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP pela acolhida e pelos exemplos a serem seguidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES - pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Profs. Drs. Sérgio Roberto Peres Line e Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra ex-coordenador e coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP pela consideração e atenção dispensadas.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pelos ensinamentos recebidos.

Aos professores da FOP-UNICAMP, especialmente à Profª Drª Altair A. Del Bel Cury, Prof. Dr. Celso Paulino da Costa e ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida pela consideração e amizade.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pelo companheirismo e amizade, especialmente a Ana Maria Sell, Carlos Fornasari, Edvaldo Rosa e Ricardo Della Coletta.

À Prof.^a **Rosana Cristina Pereira Parente**, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Amazonas pela realização da análise estatística.

Aos **técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral**, FOP-UNICAMP, Sra. **Mariza de Jesus Carlos Soares**, Srs. **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pelo imprescindível apoio no decorrer das análises laboratoriais e pela demonstração de amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP **Alberto, Augusta, Cinthia, Eliane, Helena, Kátia, Léa, Michel, Rita, Rosa, Silvana** e aos alunos de Graduação **Adriana, Adriana Leme, Alessandra, Cláudia, Eduardo e Rodrigo** pelo companheirismo e pela amizade.

À Sr.^a **Luzia de Fátima da Silva** Bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo auxílio nas pesquisas e pela correção das referências bibliográficas.

À Sr.^a **Vânia Funaro** Bibliotecária da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP, pela constante colaboração na obtenção de artigos e publicações.

Ao Sr. **Wanderlei Fornel Grange**, pelo auxílio prestado na confecção de peças de acrílico, indispensáveis na realização deste trabalho.

Ao Sr. **José Pires**, funcionário do Frigorífico Angelelli, pela grande colaboração na obtenção dos dentes bovinos.

Aos amigos **Cláudio Figueiró e Mariella**, pelo suporte afetivo, auxílio permanente, companheirismo e convívio.

Ao colega e amigo **Mauro Forgearini Nunes**, pelo apoio, consideração e amizade.

E a todos que direta ou indiretamente auxiliaram na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

I . LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	01
II. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	04
1. RESUMO.....	05
2. INTRODUÇÃO.....	07
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
4. PROPOSIÇÃO.....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
6. RESULTADOS.....	48
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÃO.....	68
9. SUMMARY.....	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
11. APÊNDICE.....	79

I. LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figuras:

- Figura 1: Representação esquemática da inibição irreversível pelo PMSF....p. 18
- Figura 2: Cortadeira elétrica BUEHLER-ISOMET.....p. 34
- Figura 3: Sequência de cortes realizada no dente bovino para obtenção dos blocos de esmalte (4x4mm)..... p. 35
- Figura 4: Sequência do ajuste da dentina e polimento do esmalte.....p.36
- Figura 5: Politriz APL-4 AROTEC.....p.37
- Figura 6: Microdurômetro SHIMADZU HMV-2000.....p.39
- Figura 7: Diagrama das indentações realizadas nos blocos de esmalte.....p.40
- Figura 8: Bloco de esmalte bovino protegido com esmalte para unhas e fixado em disco de resina acrílica.....p.41
- Figura 9: Dispositivo utilizado para fixar os blocos de esmalte durante as ciclagens de pH.....p.43
- Figura 10: Blocos de esmalte fixados ao dispositivo de acrílico e metal.....p. 44
- Figura 11: Eletrodo específico para flúor modelo ORION 96-09 acoplado ao analisador de íons ORION EA-940 e agitador magnético MARTE.....p.44
- Figura 12: Representação gráfica da liberação do íon flúor do PMSF pela ação da saliva em função do tempo (min).....p. 50
- Figura 13: Ilustração gráfica das médias (%) da recuperação de dureza superficial do esmalte dental em função dos tratamentos.....p.51
- Figura 14: Aspecto microscópico (50x) do esmalte dental e as indentações feitasp. 52
- Figura 15: :Aspecto microscópico (500x) das indentações no esmalte dental antes e após o tratamento do grupo IV.....p. 52

- Figura 16: Representação gráfica da distância 1-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 55
- Figura 17: Representação gráfica da distância 2-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 56
- Figura 18: Representação gráfica da distância 3-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 56
- Figura 19: Representação gráfica da distância 4-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 57
- Figura 20: Representação gráfica da distância 5-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 57
- Figura 21: Representação gráfica da área integrada-(Média de flúor incorporado no esmalte dental pelos diferentes tratamentos).....p. 58
- Figura 22: Representação gráfica das redução porcentual média da concentração de flúor na saliva diurna após os tratamentos.....p. 59
- Figura 23: Representação gráfica das redução porcentual média da concentração de flúor na saliva noturna após os tratamentos.....p. 59
- Figura 24: Representação gráfica da variação da concentração de flúor na solução desmineralizante (SD), após o 6^o e 12^o dia das ciclagens. p. 60

Tabelas :

- Tabela 1: Médias e desvios padrões da concentração de íon flúor liberado do PMSF pela ação da saliva em função do tempo.....p.49
- Tabela 2: Médias e seus respectivos desvios padrão, para a porcentagem de recuperação de dureza superficial do esmalte -% Rec. DSE.....p.50
- Tabela 3: Médias e desvios padrão de flúor incorporado ao Esmalte (ppm F) em função das distâncias da superfície dental (μm).....p.54
- Tabela 4: Médias e desvios padrão da área sob a curva de concentração de flúor no esmalte dental (ppm F x μm).....p.55

II. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DIFP = diisopropilfluorofosfato

EDTA = ácido etilenodiamino tetracético

F⁻ = íon flúor ou fluoreto ou flúor iônico

FEAC = flúor no esmalte após ciclagem

FSDAT = flúor na saliva diurna antes da ciclagem

FSDAC = flúor na saliva diurna após a ciclagem

FSNAT = flúor na saliva noturna antes da ciclagem

G = grupo

GTF = glicosiltransferase

HA = hidroxiapatita

MG1 = mucina de alto peso molecular

NEM = N - Etilmaleimida

PMSF = fenilmetilsulfonilflúor

PMS = fenilmetilsulfonil

RDSE = recuperação de dureza superficial do esmalte

S = enxôfre

Ser = serina

SBTI = inibidor de tripsina de soja

TISAB = Total Ionic Strenght Adjustor Buffer- (Tampão de ajuste de pH, força iônica e descomplexante). Composição: Tampão acetato 1M pH 5,0, contendo NaCl 1,0 M e ciclohexilenodiaminotetracético 0,4%.

1 - RESUMO

Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) é um inibidor de proteases amplamente utilizado em pesquisas. Entretanto, durante sua ação, ele libera íon flúor o qual pode ter efeitos indiretos em enzimas, na formação de película e no esmalte dental. Quarenta e nove blocos (4x4mm) polidos de esmalte bovino foram utilizados. Inicialmente, dureza superficial do esmalte (DSE) foi determinada, após o que os blocos foram submetidos a uma solução desmineralizante (ácido láctico 0,05 M, pH 5,0, 50 % saturado em relação à hidroxiapatita e contendo carbopol 907 a 0,2 %) para provocar uma lesão superficial de cárie. A DSE foi novamente determinada e os blocos foram divididos casualmente em 5 grupos para serem submetidos aos seguintes tratamentos: I = Saliva humana estimulada (SHE) ; II = SHE contendo PMSF a 10,0 µM ; III = SHE contendo PMSF a 50,0 µM ; IV = SHE contendo PMSF a 100,0 µM e V = SHE contendo 1,0 ppm F. Durante 12 dias estes blocos permaneceram, diariamente, 22h nas salivas de acordo com os tratamentos, e por 2h na solução desmineralizante (ciclagens de pH). As salivas foram trocadas 2x/dia e a solução desmineralizante após o 6º dia. A DSE (Knoop) foi novamente medida, sendo feitas sempre 05 indentações a cada 100 µm de distância, com uma carga de 50 g por 5 seg, utilizando-se um microdurômetro Shimadzu HMV 2000. Flúor incorporado no esmalte (FIE) foi também determinado, removendo-se 05 camadas de esmalte com HCL 0,5 M e as análises de íon flúor foram realizadas com eletrodo específico Orion 96-09 e analisador de íons EA 940. Determinou-se também, a liberação de íon flúor do PMSF (100 µM) pela ação da saliva. Os resultados mostraram que o PMSF liberou íon flúor e em 10 min/37°C a concentração na saliva aumentou de 0,078 para 1,732 ppm F. Calculou-se a % de recuperação da DSE (remineralização) sendo os resultados (média ± erro padrão) para os grupos de I a V, respectivamente de : $10,7 \pm 1,97$ A; $30,8 \pm 2,90$ B; $43,5 \pm 5,07$ B,C ; $54,5 \pm 6,59$ C; e $43,2 \pm 5,82$ B,C. Os resultados de FIE na 1ª camada foram : $2544,8 \pm 203,7$ A; $6281,0 \pm 429,9$ B; $13732,7 \pm 1372,8$ C ; $13719,0 \pm 1552,1$ C e $11650,3 \pm 1394,2$ C, sendo que médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Concluiu-se que o PMSF libera íon flúor quando em contato com a saliva, o qual não só remineraliza e incorpora flúor no esmalte como poderá ter efeitos indiretos em outras pesquisas nas quais ele é utilizado com a finalidade de inibir enzimas proteolíticas.

2. INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

O senso de observação aliado ao criticismo e experiência são fatores importantes para diferenciar os fatos dos artefatos em qualquer pesquisa. Embora o conhecimento científico do todo seja fundamental não só na condução da pesquisa mas também para evitar conclusões indevidas, fatores não diretamente relacionados ao estudo em si podem comprometê-lo se passarem despercebidos. Se temos o conhecimento destes fatores devemos divulgá-lo no sentido de que outros não sejam surpreendidos com o comprometimento do seu trabalho. Este pode ser o caso do uso do PMSF (fenilmetilsulfonilflúor) em pesquisas odontológicas.

PMSF é um inibidor de enzimas proteolíticas amplamente usado em pesquisas para evitar a proteólise durante os procedimentos bioquímicos de extração, purificação e análises finais. Durante a reação de inibição haveria o ataque nucleofílico da Ser do sitio ativo das enzimas proteolíticas no S do grupo sulfonil do PMSF (FAHRNEY & GOLD, 1963) e com o subsequente rearranjo eletrônico, o PMS ficaria ligado covalentemente à enzima. Isto leva a uma inibição irreversível da enzima, porém com a liberação de íon flúor. O íon flúor liberado para o meio poderia atingir certa concentração e indiretamente interferir na pesquisa em execução, principalmente a odontológica.

Assim, ROLLA & MELSEN (1975) demonstraram que soluções de NaF contendo apenas 1,0 ppm de F^- eram capazes de deslocar proteínas adsorvidas à hidroxiapatita (HA). Em 1977 RÖLLA mostrou que, devido sua alta afinidade pela HA, o F^- competitivamente pode inibir a adsorção de proteínas salivares à HA. Deste modo, estas duas pesquisas mostram que o PMSF usado (FISHER et al., 1987) nos estudos de formação de película adquirida (proteínas salivares adsorvidas ao dente), o íon flúor liberado do mesmo pode indiretamente influenciar nos resultados finais da mesma.

Efeito indireto do PMSF pode também ocorrer no estudo de enzimas bacterianas bucais. Deste modo, a enolase do *S. salivarius* é inibida por NaF a 2,4 mM (HAMILTON, 1990). Também a enzima $F_1 F_0$ ATPase próton translocase, fundamental para garantir a tolerância a ácidos de *S. mutans*, é diretamente inibida em 50% por fluoreto a 20 ppm (MARQUIS, 1990).

Outro aspecto importante em Odontologia é a capacidade do íon flúor ativar a capacidade de Ca e P remineralizarem o esmalte ou dentina. Assim, enquanto soluções aquosas de Ca-P remineralizam *in vitro* o esmalte em 22%, a adição de 1,0 ppm F^- às mesmas aumenta a remineralização para 72% (SILVERSTONE, 1988). Em acréscimo, além do F^- ativar a remineralização sua concentração no esmalte com lesão de cárie aumenta (CURY, 1992). Assim, o ideal seria usar saliva como solução remineralizante pois além de simular o meio bucal haveria não só a presença de Ca e P como proteínas que tem papel na adsorção ao dente e remineralização do esmalte (ZAHARADNIK, 1979; ZAHARADNIK et al., 1977).

Por outro lado, para evitar a hidrólise destas proteínas inibidores de proteases devem ser utilizados.

Assim, CURY (1995) estudando *in vitro* a remineralização do esmalte utilizando vários meios de uso de flúor (dentifrícios, flúor fosfato acidulado e associações) adicionou à saliva PMSF na concentração final de 100,0 μM . Surpreendentemente a remineralização, em comprimento das indentações, dos blocos de esmalte do grupo controle foi igual ao tratado com dentifrício fluoretado (80%). Suspeitando-se de um artefato foi determinada a concentração de íon flúor na saliva contendo 100,0 μM de PMSF. Após 20-40 min. de incubação a concentração aumentou de 0,05 para 2,00 ppm F. Deste modo, a remineralização poderia ser atribuída ao F^- liberado do PMSF. Entretanto, como o experimento não foi planejado para tal, não havia nem um grupo controle de saliva sem PMSF como um de saliva contendo íon flúor livre proveniente de um sal (p.e. NaF). Considerando que o efeito indireto do flúor liberado do PMSF pode estar sendo ignorado, o objetivo desta pesquisa foi estudar este efeito na remineralização e incorporação de flúor no esmalte, alertando para que o mesmo pode estar ocorrendo em outros trabalhos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão feita procurou dar ênfase aos estudos realizados considerando:

1- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) : Generalidades

2- Flúor em Odontologia e uso do PMSF.

1- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) : Generalidades

Em 1938 , SCHRADER *apud* FAHRNEY & GOLD (1963) descreveu o PMSF como um potente inseticida, por inibir irreversivelmente a acetilcolinesterase.

Considerada uma substância letal para ratos e comparável ao diisopropilfluorofosfato (DIFP) por MYERS & KEMP *apud* FAHRNEY & GOLD (1963), estes estudos demonstraram *in vitro* que o PMSF é um inibidor de colinesterase de ratos e sugeriram que a inibição ocorre pela sulfonilação de um grupo no sítio ativo da enzima. Os autores afirmaram que se o PMSF está em grande excesso sobre a enzima, a taxa de inativação da enzima é proporcional a concentração do inibidor.

Segundo FAHRNEY & GOLD (1963) existem dois mecanismos fundamentalmente diferentes para a inibição pelo PMSF, ambos envolvendo ataque nucleofílico ao átomo de enxofre (S) pela serina (Ser) do sítio ativo da enzima. Quando a reação procede pelo mecanismo I, o enxofre está agindo como um agente sulfonilante comum e sua reatividade deve ser previsível pelos princípios da química orgânica. Se a inibição procede pelo mecanismo II dois fatores importantes determinam a capacidade de inibição do sulfonil fluoreto. Primeiro existe a afinidade do composto pelo sítio ativo; segundo , existe a prontidão com a qual o composto, uma vez ligado ao sítio pode o sulfonilar.

A cinética de inibição da tripsina e quimiotripsina com o PMSF e análogos foi descrita por FAHRNEY & GOLD (1963). Foi demonstrado que o resíduo de serina no sítio ativo reage com o PMSF, o flúor é liberado e o restante da molécula permanece ligado irreversivelmente a enzima, tornando-a inativa.

O estudo da inibição de proteases tornou-se importante não somente para estudos bioquímicos bem definidos de proteases puras, mas também para a prevenção da degradação proteolítica de outras proteínas em preparações biológicas.

Estes estudos permitiram que o inibidor de protease PMSF tenha se constituído em um grande aliado dos pesquisadores e passasse a ser amplamente utilizado em pesquisas, para estes propósitos.

JAMES, em 1978, pesquisou a inativação do inibidor de proteases fenilmetilsulfonilflúor em tampões e verificou que preparações aquosas de PMSF tornam-se inativas em relação às proteases a menos que sejam colocadas em contato direto com a protease. A inativação do PMSF aumentou com o aumento do pH e temperatura. Meias-vidas do inibidor a 25°C foram determinadas como 110, 55 e 35 min. em pH 7,0 , 7,5 e 8,0 respectivamente. Em pH 8,0 100 µm de PMSF foram quase completamente inativados dentro de 1 hora a 25°C ou dentro de 24 horas a 4°C. Soluções estoques de PMSF em Isopropanol 100% são estáveis a 25°C por meses, senão mais. Reativação da Quimiotripsina inibida por PMSF não aconteceu dentro de 1 semana a 25°C em pH 7,0. Este trabalho forneceu dados sobre a estabilidade do PMSF sob várias condições. Soluções estoques de PMSF em 2-propanol foram totalmente estáveis à temperatura ambiente por pelo menos 9 meses após sua preparação. Em um ambiente aquoso livre de proteases inibíveis, o PMSF torna-se inativado, presumivelmente hidrolisado pelo íon hidroxila e a inativação aumenta com o pH e é mais rápida a 25°C do que a 4°C.

Um grande número de pesquisadores têm utilizado PMSF para prevenir modificação proteolítica de várias proteínas durante purificação ou com outras finalidades que não esta.

Foi demonstrado por GANESAN et al. (1987), que o PMSF 100 mM inibiu a ligação do 17 β estradiol no receptor de estrogênio da próstata humana.

Ao analisarem a possível ativação do sistema complemento, que consiste em uma série de componentes químicos que atuam em cascata desencadeando a reação inflamatória no sistema imune, especificamente o C₁, 1º componente do sistema complemento em humanos, através da utilização do PMSF 0.1 M em Isopropanol 1%, HOSOI et al. (1987), relataram que o PMSF nesta concentração foi incapaz de impedir a ativação espontânea do C₁.

Estudando o possível papel de uma proteinase na endoesporulação do *Coccidioides immitis*, agente causador de doenças fúngicas respiratórias em humanos, YUAN et al. (1988), utilizaram o inibidor de proteinases PMSF na concentração de 1,0 mM e demonstraram que o mesmo se liga irreversivelmente à enzima proteolítica presente na parede celular do *Coccidioides immitis*.

Ao pesquisarem os efeitos de dois inibidores Serina-Proteases na ligação de 17 β estradiol no receptor de estrogênio de ratos KOFFMAN et al. (1991), demonstraram que PMSF 5 mM inibiu a ligação do esteróide ao receptor de estrogênio no útero de ratas.

Verificando os efeitos das proteases e oxidantes na descamação e danos na célula epitelial humana, MENDIS et al. (1990), relataram que colagenase, elastase e tripsina são as principais proteases liberadas pelos leucócitos polimorfonucleares (responsáveis pelos danos às células epiteliais do trato respiratório, durante a bronquite; bronco-espasmos e alguns tipos de asma). Os autores demonstraram que a elastase e a tripsina foram sensivelmente inibidas pelo PMSF 1 mmol/L.

Em 1991, BAUM et al. pesquisando a 3C protease do poliovirus tipo 1, verificaram que o PMSF a 20 µg/ml inibiu a protease. Considerando que o mecanismo de inibição é altamente específico para sítios ativos de serina proteases, os autores sugeriram que a 3C protease possui um sítio ativo semelhante à serina protease.

Analisando a caracterização e purificação parcial de enzimas proteolíticas de vermes adultos de *Fasciola gigantica*, FAGBEMI & HILLYER (1991), examinaram a inibição de enzimas proteolíticas através da aplicação de diversos inibidores de proteases, dentre eles o PMSF. Foi utilizado neste estudo PMSF a 10 mM que foram adicionados previamente às análises da atividade proteolítica das enzimas sobre a IgG. Os autores demonstraram que o PMSF inibiu a digestão enzimática da IgG e que as frações das enzimas proteolíticas da *Fasciola gigantica* não foram detectadas em gel SDS-PAGE quando o PMSF foi adicionado à solução enzimática.

Ao demonstrarem que a vesícula acrossomal do espermatozóide do peixe estrela apresentou uma protease do tipo tripsina, SOUZA et al. (1992) relataram que a atividade enzimática desta protease foi inibida por inibidor de tripsina de soja (SBTI) N- α -p-tosyl-L-lisina, clorometil cetona-HCl (TLCK) e PMSF. A inibição da atividade enzimática por PMSF (1 e 2 mM) e SBTI , sugeriram que a enzima é uma serina-protease .Com os dados obtidos da eletroforese (SDS-PAGE) os autores confirmaram que a enzima era uma protease tipo tripsina.

O PMSF na concentração 2,5 mM foi incapaz de inibir proteinases obtidas a partir de 2 espécies de *Leishmania* (*L.braziliensis* e *L.major*). O gênero *Leishmania* pertence ao grupo de protozoários parasitas responsáveis

pela doença denominada Leishmaniose. Este trabalho foi descrito por ALVES et al. (1993).

Segundo LEHNINGER et al. (1995), virtualmente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas. Com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. As enzimas são catalisadores extraordinariamente efetivos e, em geral, produzem aumentos na velocidade das reações da ordem de 10^7 a 10^{14} . As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo ES). A ligação ocorre em uma fenda da enzima chamada de sítio ativo. A função das enzimas e outros catalisadores é diminuir a energia de ativação da reação e, desta forma, aumentar a velocidade da mesma. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos que ocorrem nas células e não deve ser surpreendente que os inibidores das enzimas estejam entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos. Por exemplo, a aspirina (acetilsalicilato) inibe a enzima que catalisa o primeiro passo na síntese das prostaglandinas; substâncias envolvidas em muitos processos biológicos, incluindo alguns que produzem a sensação de dor. O estudo dos inibidores das enzimas também fornece valiosas informações a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas. Existem duas grandes classes de inibidores enzimáticos; reversíveis e irreversíveis. Inibidores irreversíveis são aqueles que combinam-se com um grupo funcional da molécula da enzima e que é essencial para sua atividade, estes inibidores podem, também, promover a destruição de tal grupo. É comum a formação de uma união covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima. Inibidores irreversíveis são muito úteis no estudo do mecanismo das reações. Os aminoácidos com funções catalíticas essenciais no sítio ativo podem, algumas vezes, ser identificados pela determinação de qual aminoácido está ligado covalentemente a um inibidor depois que a enzima é inativada.

A reação da quimiotripsina, uma protease específica para ligações peptídicas adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos, com o diisopropilfluorofosfato (DIFP), levou à descoberta de que o resíduo essencial do sítio ativo é a Ser¹⁹⁵. O DIFP também age como um “gás dos nervos” venenoso, porque ele inativa irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, através de um mecanismo similar ao descrito aqui. A acetilcolina é um neurotransmissor que é hidrolisado pela ação da acetilcolinesterase, um passo essencial no funcionamento normal do sistema nervoso. O mecanismo de ação do PMSF assemelha-se à reação do DIFP com a quimiotripsina (fig.1).

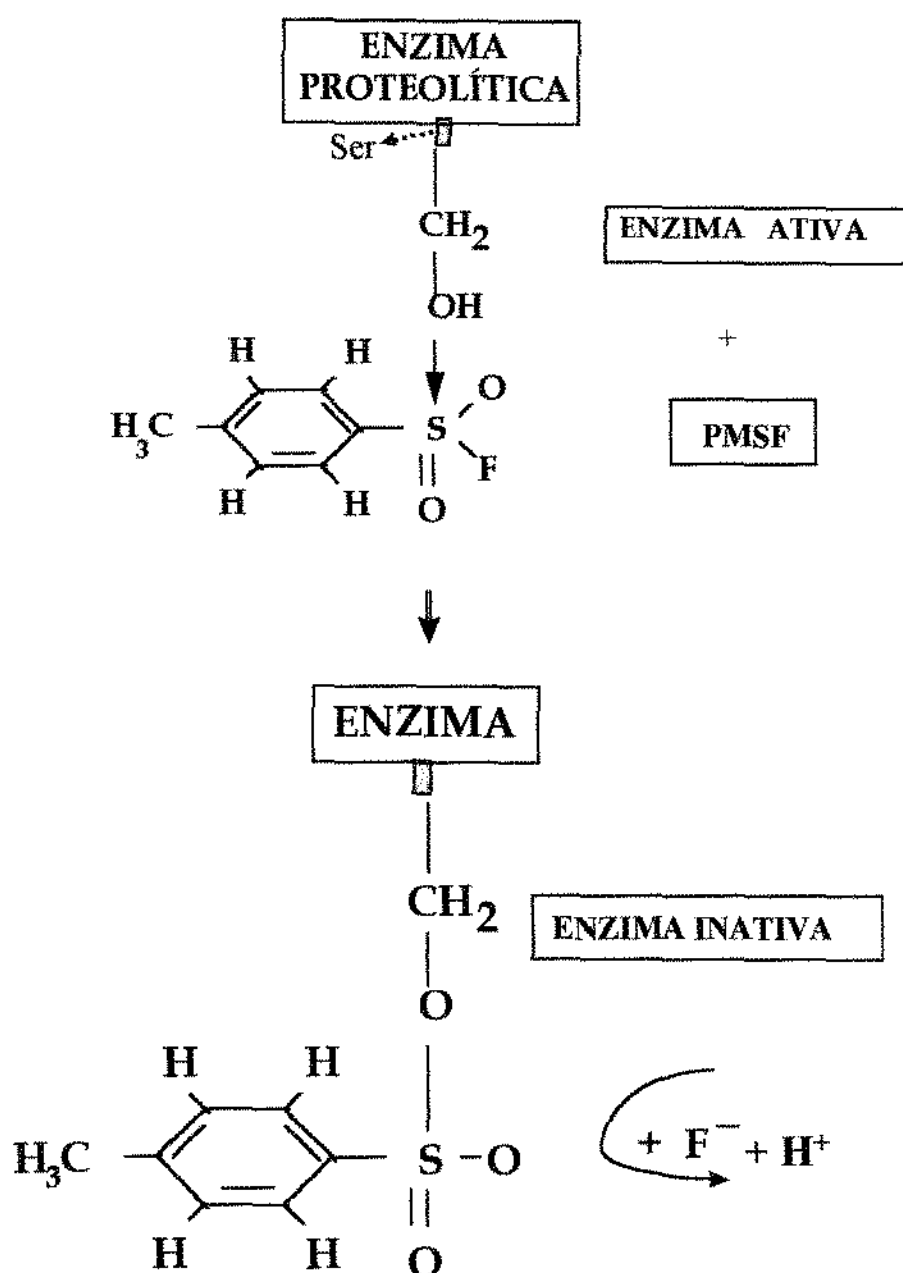


Fig.1- Representação esquemática da inibição irreversível pelo PMSF

O PMSF se liga ao sítio ativo da enzima, libera o flúor e o restante da molécula permanece ligado à enzima de forma irreversível, tornando a enzima inativa. O PMSF ao inibir enzimas proteolíticas, libera o flúor e pode produzir vários efeitos biológicos indiretos, tais como interferir com a atividade enzimática, interferir com a formação de película, modificar o metabolismo energético de bactérias dificultando seu crescimento, interferir nos processos de desmineralização e de remineralização dental mediados pela saliva.

2- Flúor em Odontologia e uso do PMSF.

Em 1975 RÖLLA & MELSEN demonstraram *in vitro* que o flúor em baixas concentrações pode remover albumina e glicoproteínas adsorvidas na hidroxiapatita (HA).

Estudando os efeitos do flúor no início da formação da placa dental RÖLLA (1977) afirmou que o flúor nas concentrações de 1 a 5 ppm, devido sua alta afinidade pelo cálcio, inibe a adsorção de proteínas salivares à HA (modelo da superfície dental) através de um mecanismo de inibição competitiva.

Analizando a collagenase e outras proteinases presentes em extratos de gengiva humana inflamada UITTO et al. (1981), utilizaram inibidores enzimáticos e demonstraram que as enzimas proteolíticas foram inibidas com agentes quelantes de metal como o EDTA 10 mM, porém não foram inibidas com PMSF 1 mM. Os autores concluíram assim que as enzimas pertenciam ao grupo das metaloproteinases.

TEN CATE & DUIJSTERS em 1983 usaram *in vitro* um modelo de ciclagens de pH e verificaram que o flúor, em um primeiro momento diminuiu a taxa de desmineralização e posteriormente induziu aumento nas taxas de remineralização. Os efeitos do flúor aplicado tópicamente, tais como bochechos ou dentifrícios são devidos a diferentes mecanismos, que incluem um aumento da taxa de reparo das lesões cariosas de esmalte através de remineralização e um aumento da resistência das áreas remineralizadas ao ataque ácido subsequente.

Em 1980, KOULOURIDES demonstrou que a remineralização de lesões cariosas iniciais é potencializada pelo uso do flúor, podendo tornar áreas remineralizadas “imunes” a dano ácido adicional.

Ao descreverem proteínas salivares relacionando-as com saúde bucal, BOACKLE & SUDDICK (1984) relataram que a inibição, pelo hospedeiro, de enzimas que possuem atividade de digestão (proteases, glicosidases) pode proteger tanto as superfícies das mucosas como a função de outras proteínas salivares. Tais inibidores de enzimas incluem anticorpos salivares específicos para enzimas digestivas bacterianas e muitos outros tipos de moléculas salivares que atuam não-especificamente como substratos competitivos. Conquanto diversos potentes inibidores de proteases, de amplo espectro, tenham sido estudados na saliva submandibular do cão, pouco tem sido divulgado sobre tais fatores na secreção salivar humana. Da mesma maneira, inibidores específicos de importantes glicosidases bacterianas, como as neuraminidases, têm recebido pouca atenção. Talvez nos próximos anos os pesquisadores venham a pesquisar as secreções das glândulas salivares maiores e menores como possível fonte desses inibidores. Afirmam os autores que a regulação das enzimas digestivas bacterianas pode ser um importante determinante na minimização da cárie dentária e da gengivite.. Considere-se o delicado equilíbrio entre o papel protetor das proteínas salivares, glicoproteínas e mucoproteínas que recobrem os dentes e a mucosa bucal e as enzimas digestivas bacterianas que destroem estas substâncias. Se estas enzimas destrutivas forem inibidas, o tecido da mucosa receberá menores danos. Além disso, a ligação bacteriana aos dentes poderá ser minimizada, pois as proteínas salivares que os recobrem terão uma meia-vida mais longa. Ao concluírem seu trabalho, os autores admitem que o conhecimento advindo de recentes pesquisas sobre os constituintes proteicos da saliva cresceu dramaticamente. Conquanto de há muito se tenha reconhecido que a dessalivação resultante de excisão, atrofia, defeito ou efeito colateral à terapia por radiação das regiões da cabeça e do pescoço, leve às doenças da cavidade bucal, os mecanismos exatos que alicerçam estes efeitos ainda estão longe de ser resolvidos. No entanto, o papel das proteínas salivares na formação da película, nas reações enzimáticas, na

atividade antimicrobiana “não-imune” e de outros mecanismos de defesa baseados em imunoglobulinas aponta para muitas possíveis formas de ação dessas potentes macromoléculas. Espera-se que através do conhecimento dos aspectos bioquímicos das proteínas salivares possa ser atingida uma base biológica para a compreensão de seu significado para a saúde bucal.

Em 1987 WHITE utilizou um modelo de ciclagens de pH para examinar os efeitos dos dentifrícios fluoretados no reparo mediado por saliva de lesões cariosas incipientes, e afirmou que os dentifrícios fluoretados, em particular, as preparações de fluoreto de sódio e fluoreto de amina, foram extremamente efetivos em aumentar a remineralização das lesões cariosas iniciais. O autor afirmou que o efeito mais proeminente dos fluoretos tópicos, entretanto, foi o enriquecimento de flúor do esmalte remineralizado e que a remineralização de lesões cariosas iniciais estava linearmente associada com a dureza aumentada das superfícies das amostras. Foi demonstrado que houve uma correlação (0,94) entre a recuperação de dureza superficial do esmalte e a remineralização interna do esmalte com lesão de cárie.

Realizando um estudo com o objetivo de determinar as propriedades físicas e cinéticas da glicosiltransferase (GTF) adsorvida à superfície de HA coberta por saliva, SCHILLING & BOWEN (1988) demonstraram que a GTF adsorvida apresentava maior atividade do que a GTF não adsorvida. Os autores relataram que GTF adsorvida à HA também apresentou maior flexibilidade em relação ao pH, além de apresentar maior resistência em temperaturas mais elevadas. A maioria dos glucanos produzidos por essa enzima permaneceram ligados à superfície da HA coberta com saliva. Os resultados obtidos sugerem que as enzimas bacterianas solúveis, encontradas na saliva, podem ser incorporadas na película e apresentar atividade enzimática capaz de influenciar as propriedades biológicas da película. Neste estudo os

autores utilizaram PMSF como inibidor de protease na concentração de 1 mmol/L e azida sódica 0,02% para evitar a degradação da GTF.

Ao estudar a formação da película adquirida do esmalte, decorrente da adsorção seletiva de proteínas salivares à superfície dental, FISHER et al. (1987) utilizaram PMSF 2 mM para a produção de película *in vitro*; para tanto utilizaram blocos de esmalte e cimento incubados em mistura de saliva das glândulas parótida e submandibular/sublingual na proporção 1:1 (v/v), a 4°C por 10, 30 e 60 minutos. A ligação dos componentes salivares no tempo 0, foi obtida pela colocação dos blocos de esmalte e cimento na mistura de saliva e imediatamente após removidos. Para cada tempo, dois blocos de cimento e dois de esmalte foram utilizados e imediatamente após removidos. Saliva da parótida e submandibular/sublingual foram sempre coletadas separadamente, mantidas a 0°C, antes de serem misturadas. Além do PMSF, outros inibidores de proteases como EDTA 10 mM e pepstatin 10 µM foram adicionados às salivas para a produção de película *in vitro*, sempre num período menor do que 1 hora.

MINAGUCHI, K. et al (1988) estudaram a presença e a origem de fosfopeptídeos na saliva humana. Os fosfopeptídeos são formados na cavidade bucal resultantes da ação de enzimas proteolíticas sobre as PRPs (proteínas ricas em prolina) originárias das glândulas salivares. Para verificar a natureza destas proteinases os autores utilizaram diversos inibidores enzimáticos e demonstraram que 8 mM de PMSF inibiu a ação enzimática o que sugere que as enzimas responsáveis pela degradação das PRPs para a formação de fosfopeptídeos pertencem ao grupo das serina proteases.

Em 1989, discutindo a dinâmica do desenvolvimento da lesão de cárie e os mecanismos de ação do flúor, CURY afirmou que a cárie dental é uma consequência do desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e

remineralização (ciclagens de pH) e que a presença de flúor nos fluidos da placa e esmalte pode controlar o desenvolvimento do processo de cárie, por inibir o processo de desmineralização e ativar a remineralização. Como consequência o dente ganha flúor (CURY, 1992).

Descrevendo os efeitos do flúor na regulação enzimática bacteriana no metabolismo de carboidratos HAMILTON (1990) relatou que a adição de NaF (2,4 mM/L) inibe a enzima enolase do *S.salivarius* e consequentemente a conversão de 2-fosfoglicerato (2-PGA) para fosfoenolpiruvato (PEP) na via glicolítica. O flúor também inibe a enzima fosfoglucomutase, responsável pela conversão de G-6P em G-1P na síntese de glicogênio. A enzima F_1F_0 ATPase próton translocase, fundamental para garantir a tolerância a ácidos do *S.mutans*, é diretamente inibida em 50 % por fluoreto a 20 ppm.

KOLLER et al.(1992) realizaram análises bioquímicas das funções das glândulas salivares parótida e submandibular após estimulações simultâneas com pilocarpina e isoproterenol em ratas (NIA FISCHER 344) de 3, 12 e 24 meses de idade. Análises fisiológicas, bioquímicas e alterações moleculares relacionadas com a idade foram feitas. A relação peso glandular/peso corporal e proteínas estruturais da membrana não sofreu alterações com a idade para ambas as glândulas. Foi observado um declínio na síntese de DNA para ambas as glândulas em relação à idade. Um aumento marcante na concentração de proteínas solúveis foi observado na glândula parótida dos animais com 3 meses de idade, e para os dois grupos mais velhos (12 e 24 meses), sendo o mesmo observado na glândula submandibular. A velocidade do fluxo salivar foi diferente quando expressa em volume/tempo, como volume/tempo e peso úmido glandular (g), e/ou kg/peso corporal. A concentração de proteínas secretadas não foi afetada pela idade em ambas as glândulas. A quantidade total de proteínas secretadas após 30 minutos não sofreu mudanças relacionadas com a idade para a glândula parótida, mas demonstrou um aumento significativo

relacionado com a idade na saliva submandibular. Análises em gel de poliacrilamida (SDS) revelaram mudanças nas bandas de proteínas entre 39 e 50 kDa, dos animais de 12 meses. A amilase demonstrou um aumento inicial, seguido por um declínio característico em suas atividades na saliva da parótida. O sobrenadante glandular apresentou baixa atividade da amilase celular residual após estimulação. Consequentemente, diminuição secretoria com a idade após estimulação com isoproterenol-pilocarpina foi excluída. Análises do RNA total demonstraram uma redução severa da amilase RNAm na glândula parótida entre 12 e 24 meses de idade. Amilase mRNA não expressou-se em nenhuma das amostras submandibulares. Para o fator de crescimento epidermal, a saliva total demonstrou uma redução com a idade. Verificou-se que a glândula submandibular seguiu o mesmo quadro com a idade como a glândula parótida, com um declínio específico de proteínas secretórias isoladas. Os autores utilizaram PMSF 100 μ M (concentração final) para evitar a degradação de proteínas, quando realizaram a síntese de DNA, preparação da membrana e atividade da α -amilase celular.

Estudando o efeito do delmopinol, recentemente descrito como um potencial agente antiplaca, na atividade de GTF em solução e adsorvida na superfície da HA coberta com saliva STEINBERG et al (1992) relataram que a síntese total de glucanos foi reduzida na presença do delmopinol e que a sacarose foi incapaz de reverter a inibição da GTF. Os autores afirmaram que a inibição da atividade da GTF pelo delmopinol é aparentemente o resultado da interação droga-enzima na superfície das partículas da HA coberta por saliva. Este trabalho proporcionou um suporte maior para a importante diferença nas propriedades da GTF adsorvida e da GTF em solução, esclarecendo que a interação GTF-droga é diferente para a enzima adsorvida numa superfície e a enzima em solução. PMSF 1 mM e 0,02% de NaN_3 foram utilizados pelos autores para evitar a degradação da GTF.

Em 1993 SLOMIANY et al. identificaram uma protease da secreção da glândula submandibular humana, com capacidade de degradar glicoproteínas salivares de alto e baixo peso molecular. A protease apresentou uma atividade ótima entre o pH 7.0 e 7.4 e através da eletroforese (SDS-PAGE) demonstraram 2 bandas proteicas principais de 48 e 53 Kda. A enzima apresentou suscetibilidade ao PMSF entre outros inibidores, demonstrando ser uma serina protease. A atividade desta protease com relação a glicoproteína de alto peso molecular foi maior nas secreções das glândulas submandibulares de indivíduos cárie-resistentes do que nos indivíduos cárie-suscetíveis. Considerando que glicoproteínas de baixo peso molecular são mais eficientes na eliminação mecânica de bactérias do que as glicoproteínas de alto peso molecular uma maior atividade desta protease salivar pode ser um dos fatores responsáveis pela redução de microrganismos cariogênicos na cavidade bucal.

Analisando a inibição da adesão de *P. gingivalis* a *S. gordonii* pela saliva submandibular e sub-lingual humana, STINSON et al. (1992) verificaram que *P. gingivalis* adere *in vitro* a biofilmes produzidos por *S. gordonii* e que este fenômeno favorece a colonização inicial da cavidade oral pela *P. gingivalis* contribuindo para a maturação da placa dental. Os autores demonstraram que proteínas da saliva submandibular e sub-lingual humana inibiram a adesão de *P. gingivalis* a *S. gordonii* em 50 % quando a concentração de proteína foi de 57 µg/ml de saliva. Tratando a *P. gingivalis* a 60°C por 30 min ou utilizando PMSF 0,5 mM a aderência ao biofilme estreptococal foi reduzida. Esses resultados indicaram que as proteases associadas à superfície da *P. gingivalis* facilitaram a adesão interbacteriana (estreptococos orais) e as propriedades de adesão-bloqueio da saliva submandibular-sub-lingual humana, podem representar um importante mecanismo de defesa da cavidade oral do hospedeiro.

Descrevendo os efeitos biológicos do flúor sobre as bactérias orais HAMILTON & BOWDEN (1996) afirmaram que: o flúor na concentração de 1 µg F/mL (1 ppm F), interfere no metabolismo energético, dificultando o crescimento bacteriano; dificulta a aderência ao dente, prejudicando a colonização bacteriana; inibe a formação de glicogênio; inibe a enolase, fosfotransferase e o sistema de transporte de açúcares da via glicolítica. O flúor também altera a ATPase e diminui a concentração de cálcio e fosfato na célula, provocando alterações na membrana celular. Inibe as enzimas fosfatase ácida, pirofosfatase, pirofosforilase, peroxidase e catalase.

CURY em 1995 demonstrou que PMSF 100 µM (concentração final) é hidrolisado pela saliva humana e dentro de 20 a 40 minutos, a concentração de flúor livre aumenta de 0,05 ppm para 2,00 ppm. Neste estudo o autor demonstrou também que a concentração de flúor em esmalte bovino parcialmente desmineralizado aumentou de 1,22 µg/cm² para 20,70 µg/cm². A recuperação da microdureza superficial do esmalte foi de 80,4 %. Entretanto, este efeito indireto do flúor não havia sido previsto no plano de pesquisa, não havendo neste estudo um controle apropriado. O autor considerou que este efeito indireto do flúor, não considerado neste trabalho, poderia interferir também nos resultados de outras pesquisas.

Avaliando dentifrícios fluoretados comercializados no Brasil, propondo testes que apresentam correlação com a situação clínica CARVALHO et al. em 1996 utilizaram *in vitro* a reatividade com o esmalte dental humano e ciclagens de des-remineralização, e concluíram que todos os dentifrícios analisados laboratorialmente apresentavam flúor ativo. Que os dentifrícios com flúor iônico (NaF) mostraram tendência de maior atividade que aqueles que continham flúor ionizável (MFP) e que a significância laboratorial de diferença de atividade entre os dentifrícios deveria ser confirmada por estudos clínicos,

tendo em vista que, não foi observada uma relação entre a concentração de flúor no produto e a atividade dos mesmos. Dentifrícios que continham uma concentração de flúor entre 1001 e 1500 ppm F apresentaram a mesma atividade que os dentifrícios com <600 -800 ppm F. Os autores atribuíram este resultado adverso ao fato de que, na análise, não foram diferenciados os tipos de flúor presentes nas diferentes formulações e a uma possível relação com os demais componentes da formulação dos dentifrícios. Também pelo fato de que a relação entre a concentração de flúor no produto e atividade é logarítmica; o que está de acordo com FEATHERSTONE et al. (1990).

Estudando a inativação proteolítica de receptores C_5A de leucócitos através das proteinases derivadas de *P.gingivalis*, considerado o agente etiológico da periodontite em adultos JAGELS et al. em 1996 afirmaram que diversas proteinases produzidas por esta bactéria contribuem com a virulência e na destruição do tecido gengival pela infecção por *P.gingivalis*. Tem sido demonstrado recentemente que estas proteinases inativam o receptor C_5A denominado C_5aR . Os autores verificaram que o ataque proteolítico ao C_5aR pelas enzimas de *P. gingivalis* foi inibido por TPCK, PMSF e dicloroisocumarin, sugerindo que estas serina proteases são as responsáveis pela atividade lítica desse receptor. A proteólise desses receptores pode levar à impossibilidade das células de defesa do sangue e de tecidos para reagir ou limitar a destruição tecidual provocada pela *P. gingivalis*.

COLETTA (1996) pesquisou metaloproteinases associadas ao germe dental do primeiro molar de ratos, durante os diversos períodos de formação do germe dental e determinou o sítio principal de atuação desse grupo de enzimas. As metaloproteinases foram extraídas com tampão contendo 50 mM TRIS HCL pH 7,4; 100 mM $CaCl_2$, 2 mM PMSF e 2 mM NEM por 30 minutos a 40°C. O autor observou que 0,5 mM de EDTA e 0,5 mM de 1,10- Fenantroína

foram capazes de inibir as atividades enzimáticas, mas 0,5 mM de PMSF não inibia a atividade das metaloproteinases.

Em 1997, IONTCHEVA et al. utilizaram inibidores de protease para isolar e estudar a significância funcional dos complexos heterotípicos formados entre MG1, amilase, PRPs, estaterinas e histatinas. Afirmaram que estudos imunológicos demonstraram que MG1, amilase, PRPs e estaterina são os principais precursores da película adquirida do esmalte recém-formada (2 h) *in vivo*. A identificação de diferentes tipos de complexos heterotípicos que envolve todas as proteínas acima mencionadas sugerem que a película adquirida do esmalte pode possivelmente ser formada por pela ligação de complexos heterotípicos preferivelmente do que por simples proteínas. Por exemplo, o complexo heterotípico formado por MG1-amilase descrito, ocorre na secreção glandular e este complexo pode ser um precursor da película adquirida do esmalte. Em adição, é bem reconhecido que amilase salivar degrada carboidratos e liga-se a um seletivo grupo de estreptococos orais com alta afinidade pelas superfícies dentais. Assim sendo, a amilase no complexo MG1-amilase ligado a superfície dental pode potencialmente liberar carboidratos da MG1 e a curto prazo produzir uma fonte de nutrientes para os microrganismos aderidos. Deste modo, um complexo pode desempenhar um importante papel na formação da placa bacteriana dental e na doença cárie por prover ambas de uma estrutura para a ligação das bactérias orais e a curto prazo nutrientes como os carboidratos e também constituintes dietéticos extrínsecos ou de componentes intrínsecos da película, incluindo MG1. Os autores afirmam que a significância funcional dos complexos heterotípicos entre MG1 e amilase, PRPs, estaterinas e histatinas não é conhecida, mas a descoberta destes complexos abrem novas perspectivas para investigar-se seu papel fisiológico na cavidade oral. Para isolar e analisar MG1 sob condições de não-desnaturação, amostras de saliva foram coletadas de doadores saudáveis, sob estimulação gustatória. Para cada doador, 4 amostras de 10 mL de saliva foram coletadas e processadas à

temperatura ambiente. A cada 10 mL de amostra foram utilizados inibidores de proteases nas seguintes concentrações finais: 0,001 M EDTA; 0,005 M de cloreto de benzamidina; 0,1 M ácido aminocapróico e 0.2 M de PMSF.

Assim, apesar das evidências de que o flúor liberado do PMSF pode ter efeitos indiretos em vários tipos de pesquisas, este inibidor de enzimas proteolíticas tem sido usado indiscriminadamente em concentrações suficientes para interferir com o resultado das mesmas.

4. PROPOSIÇÃO

Estudar o efeito do PMSF sobre a incorporação de flúor e remineralização *in vitro* do esmalte bovino com lesão de cárie quando submetido a um modelo de ciclagens de pH, verificando:

1. A liberação de íon flúor do PMSF pela ação da saliva em função do tempo;
2. Se o flúor liberado do PMSF remineraliza o esmalte dental;
3. Se o flúor liberado do PMSF se incorpora no esmalte com lesão de cárie.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais

5.1.1- Dentes incisivos bovinos, por apresentarem segundo ZERO (1995) menor heterogeneidade de composição em relação aos dentes humanos, o esmalte tem menor curvatura, facilitando a obtenção de superfícies planas, existe uma maior disponibilidade de amostras como também uma maior área de esmalte facilitando a obtenção de blocos de esmalte com microdureza superficial padronizada. Os dentes foram obtidos do Frigorífico Angelelli, Piracicaba, SP, de bovinos com idade aproximada de 3 anos. Estes dentes ficaram armazenados em formol 2%, pH 7,0, por 30 dias antes de qualquer procedimento experimental. Blocos de esmalte (120), foram preparados a partir destes dentes. Destes, 49 foram utilizados na pesquisa.

5.1.2- Saliva humana estimulada contendo ou não PMSF ou Flúor.

5.1.2-1- Coleta da Saliva: A saliva fresca foi coletada de 7 voluntários adultos, 2 vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, a partir da estimulação com goma base, em frascos tipo Erlenmayer de 100 mL, mantidos em gelo moído. Após a coleta, a saliva foi colocada em proveta graduada de 250 mL e foram adicionados 0,048 g de azida sódica à 240 mL de saliva. Foram preparados a partir da saliva fresca contendo azida sódica a 0,02%, 5 Grupos (tratamentos) contendo as seguintes soluções:

Grupo I = Saliva Humana Estimulada (SHE);

Grupo II = SHE contendo PMSF a 10,0 μ M;

Grupo III = SHE contendo PMSF a 50,0 μ M;

Grupo IV = SHE contendo PMSF a 100,0 μ M

Grupo V = SHE contendo 1,0 ppm F.

A saliva contendo PMSF foi preparada a partir de uma solução de PMSF (SIGMA^R) 10 mM preparada em isopropanol. Saliva contendo 1,0 ppm F foi preparada a partir da adição de uma solução de NaF contendo 100 ppm F (ORION).

5.2. Métodos

5.2.1-Confecção dos blocos de esmalte dental bovino

Para a confecção dos blocos dentais foi utilizada a cortadeira elétrica BUEHLER-ISOMET(fig.2), aparelhada respectivamente com 1 e 2 discos diamantados dupla face previamente ajustados para cortar os blocos de esmalte medindo (4 x 4 mm).



Fig.2 - Cortadeira elétrica BUEHLER-ISOMET.

Após a secção da porção radicular, as coroas dentais (fig.3) foram fixadas com cera pegajosa HORUS, em placas acrílicas medindo (4x4 cm) com 4 mm de espessura, para secção da porção palatina da coroa (fig.3B). Utilizou-se para tanto um disco nº 11-4244 série 15 HC - Diamond BUEHLER, acoplado à cortadeira elétrica.

Para a obtenção dos blocos de esmalte (4 x 4mm) fixou-se à placa de acrílico, a porção vestibular da coroa (fig.3C). Para a remoção da fatia central, utilizou-se 02 discos nº 11-4243 série 15 HC - Diamond BUEHLER, separados por um espaçador (disco de acrílico com 4 mm de espessura) para conferir ao bloco as dimensões desejadas (fig.3D). O critério adotado para escolha da porção mais plana do esmalte foi o toque simultâneo dos dois discos diamantados na superfície. Realizado o corte no sentido longitudinal, reposicionou-se a placa de acrílico no suporte da cortadeira, para a realização do corte no sentido transversal. Os cortes foram feitos sob refrigeração (água deionizada) para evitar trincas no esmalte.

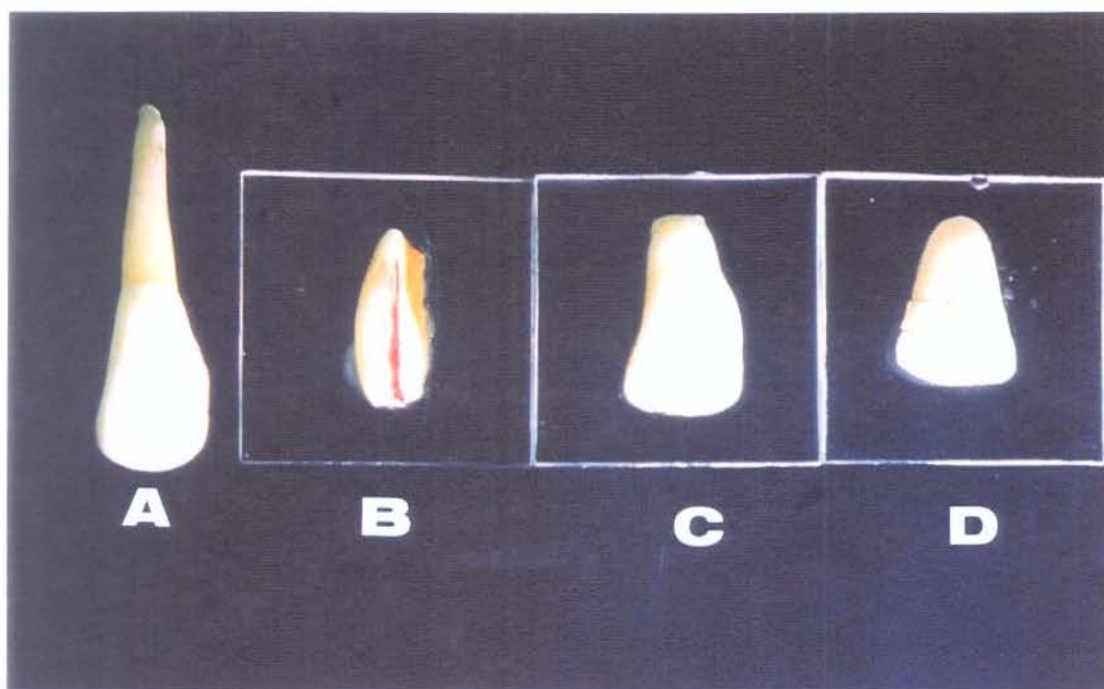


Fig. 3 - Sequência de cortes realizados no dente bovino para obtenção do bloco de esmalte (4x4mm).

- A: Dente incisivo bovino
- B: Coroa fixada para remoção da face palatina
- C: Face vestibular fixada
- D: Face vestibular com cortes nos sentidos longitudinal e transversal

5.3.Confecção e polimento dos corpos de prova

5.3.1-Ajuste da dentina: Após a obtenção do bloco de esmalte, fez-se necessário o ajuste da dentina visando a obtenção de superfícies paralelas para facilitar os procedimentos de polimento do esmalte; para tanto os blocos foram afixados na porção central de um disco de resina acrílica pré-fabricado, com as seguintes dimensões: 3 cm de diâmetro e 8 mm de espessura .Os blocos foram fixados com a superfície do esmalte voltada para baixo (fig.4A).

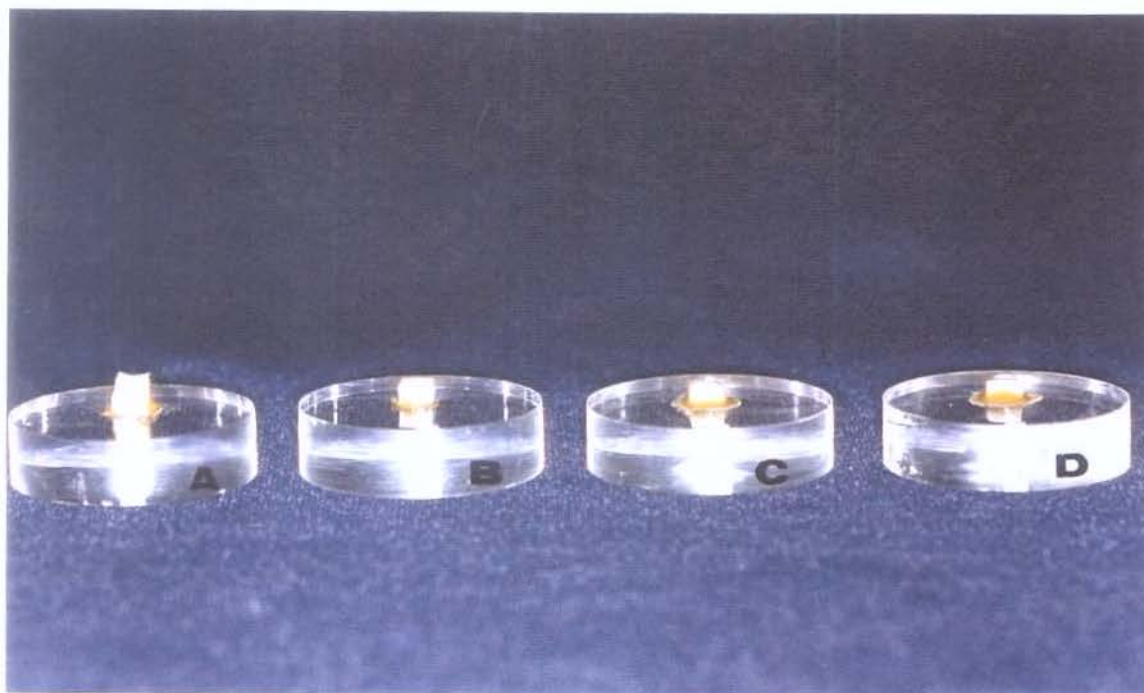


Fig.4- Ajuste da dentina e polimento e acabamento do esmalte

Foi utilizada a politriz APL-4 AROTEC (fig.5), contendo sistema de polimento automático para 06 corpos de prova. No prato giratório da politriz foi colocada uma lixa de granulação 320 (CARBIMET^R Paper Discs - n. 30-

5108-320 - BUEHLER), utilizou-se baixa rotação sob refrigeração, 1 peso padrão (86g) e o tempo de 10 seg. A seguir verificou-se a espessura do bloco de esmalte, utilizando-se para tanto um paquímetro digital MAUSER JR (0,01mm-150mm), devendo a espessura estar em torno de ± 2 mm (fig.4B). Após a planificação e ajuste da dentina, o bloco foi removido do disco de resina acrílica e a cera pegajosa removida totalmente, para evitar problemas no polimento do esmalte.



Fig.5 : Politriz APL - 4 AROTEC.

5.3.2 - Polimento e acabamento do esmalte:

Os blocos foram fixados novamente no centro do disco de resina acrílica, com a superfície do esmalte voltada para cima (fig.4C). Utilizou-se na politriz, baixa rotação, lixa de granulação 600, 2 pesos, o tempo de 10 segundos e refrigeração a água. Após o polimento com a lixa 600, os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som (T7 , THORNTON), em água deionizada (200 mL) para cada 12 blocos, durante 2 minutos. A seguir, colocou-se na politriz, baixa rotação, lixa de granulação 1.200, 2 pesos, durante 15 segundos. Novamente os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som, imersos em água deionizada ,durante 2 minutos. Para o acabamento final, foi utilizado na politriz disco de papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER^R Nº 40-7618) e suspensão de diamante (METADI^R Diamond Suspension 1 micron-Blue Color Polish Spray * - Water Base Nº 40-6530), baixa velocidade, 2 pesos e o tempo de 1 minuto. Nesta fase não foi utilizada água para refrigeração, apenas uma quantidade de suspensão de diamante suficiente para umedecer totalmente o papel feltro, quantidade esta que permite o polimento de 12 corpos de prova. Após o polimento com a suspensão diamantada, os corpos de prova foram lavados em água deionizada corrente, durante 3 minutos. A seguir os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som , durante 2 minutos, imersos na solução (ULTRAMET^R SONIC CLEANING SOLUTION) diluída na proporção 20:1 em água destilada. Finalmente os corpos de prova foram lavados em água deionizada corrente, durante 3 minutos e a seguir identificados por uma letra maiúscula (E) seguida de números 01 à 120. Conservados em ambiente úmido para evitar trincas no esmalte, os corpos de prova ficaram prontos para serem submetidos à análise da microdureza superficial do esmalte (fig. 4D).

5.4. Análise da microdureza do esmalte dental

5.4.1- Microdureza superficial:

Para análise da microdureza superficial foi utilizado o microdurômetro (SHIMADZU HMV- 2000), (fig.6) e penetrador tipo KNOOP com carga estática de 50 gramas e tempo de 5 segundos.



Fig. 6: Microdurômetro (SHIMADZU HMV- 2000).

No centro do bloco (2.000 μm abaixo do limite superior) e a 1.000 μm à direita do limite esquerdo, foi feita uma marca de referência utilizando-se carga de 100 gramas e o tempo de 5 segundos. À direita da marca de referência, utilizando-se carga estática de 50 gramas durante 5 segundos, foram realizadas 5 indentações no esmalte no centro da área exposta e separadas entre si por uma distância de 100 μm . Foram selecionados os blocos que apresentaram comprimento de indentação de 43 ± 3 , sendo descartados os demais. O diagrama das indentações realizadas nos blocos de esmalte, relacionados com as análises

de microdureza inicial (INICIAL), após a produção de lesões incipientes de cárie (CÁRIE) e após as ciclagens de pH (REMIN) são apresentados na figura a seguir, (fig.7).

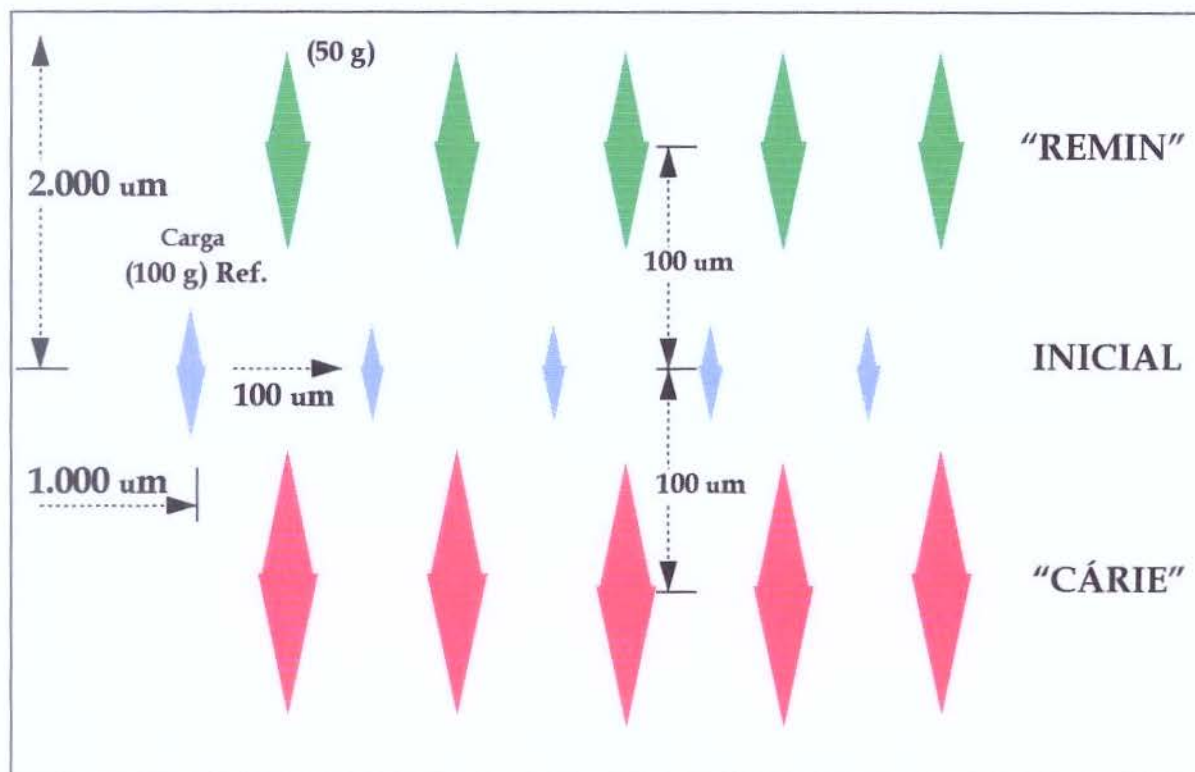


Fig.7- Diagrama das indentações realizadas nos blocos de esmalte.

Após a determinação da microdureza superficial inicial, os blocos de esmalte dental bovino, devidamente protegidos com esmalte para unhas, foram fixados em disco de resina acrílica (fig.8), e colocados em frascos plásticos que continham a solução desmineralizante na proporção de 2,0 ml para cada 1,0 mm² de área de superfície de esmalte exposto.

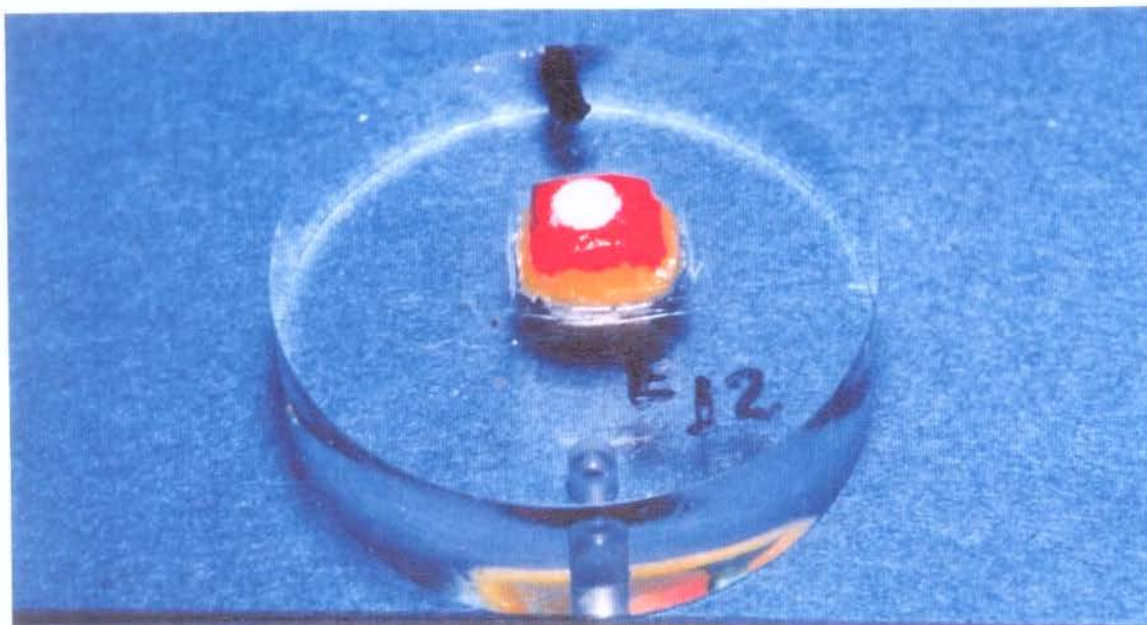


Fig. 8: Bloco de esmalte bovino (4 x 4mm) protegido com esmalte para unhas e fixado em disco de resina acrílica, para ser submetido à solução desmineralizante (SD).

5.5. Indução de lesão artificial de cárie

Lesões artificiais de cárie foram produzidas nos blocos de esmalte que atendiam os limites de comprimento de indentação pré-estabelecidos. Assim, 99 blocos foram colocados em uma solução desmineralizante (solução de ácido láctico 0,05M, pH 5,0, saturada 50% em relação a hidroxiapatita e contendo carbopol C907 a 0,2%) por um período de 16 horas, a uma temperatura de 37°C, para a produção de uma lesão superficial de cárie (WHITE 1987). A seguir os blocos foram lavados em água deionizada corrente durante 3 minutos e conservados em ambiente úmido, para serem submetidos novamente a análise da microdureza superficial.

5.6. Análise da microdureza superficial após desmineralização inicial

Os blocos de esmalte dental bovino, com lesões superficiais de cárie, foram submetidos à análise de microdureza superficial, sendo as indentações realizadas na área central do bloco de esmalte, 100 μm abaixo da marca de referência (Fig.7). Foram selecionados 59 blocos que apresentaram comprimento de indentação de 130 ± 20 .

5.7. Ciclagens de DES X REMINERALIZAÇÃO

49 blocos de esmalte com lesões superficiais de cárie foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 elementos e 1 grupo de 9 elementos:

GRUPO I: 10 blocos dentais submetidos ao tratamento com saliva humana estimulada (SHE), durante as ciclagens de pH.

GRUPO II: 10 blocos dentais submetidos ao tratamento com SHE contendo PMSF 10,0 μM , durante as ciclagens de pH.

GRUPO III: 10 blocos dentais submetidos ao tratamento com SHE contendo PMSF 50,0 μM , durante as ciclagens de pH.

GRUPO IV: 10 blocos dentais submetidos ao tratamento com SHE contendo PMSF 100,0 μM , durante as ciclagens de pH.

GRUPO V: 09 blocos dentais submetidos ao tratamento com SHE contendo flúor a 1,0 ppm, durante as ciclagens de pH.

Os ciclos de pH foram de 12 dias consecutivos segundo modelo de estudo preconizado por WHITE (1987). Os blocos foram fixados com cera pegajosa a um dispositivo de acrílico e metal, contendo 10 hastes de fio

inoxidável, que penetram no interior de tubos de ensaio com tampa plástica (fig.9A). Fixados à uma régua de acrílico e colocados em estante metálica (fig.10). As réguas de acrílico contendo o número do grupo (tratamento) e o número dos blocos nas devidas posições em que estão fixados, permitiram a remoção simultânea dos blocos de cada grupo, bem como facilitaram o manuseio dos mesmos durante os procedimentos das ciclagens de Des x Re .

Mantidos em estufa à 37°C os blocos permaneceram 02 horas em 12 mL de uma solução desmineralizante (fig.9B) (a mesma utilizada para provocar cárie artificial) e o tempo restante de $\pm$ 22 horas em 4 mL de saliva humana estimulada (fig.9C) contendo ou não PMSF ou F, a qual foi trocada 2x/dia (pela manhã = saliva diurna e a tarde = saliva noturna); sendo a solução desmineralizante (SD), trocada após o 6º dia de ciclagem.

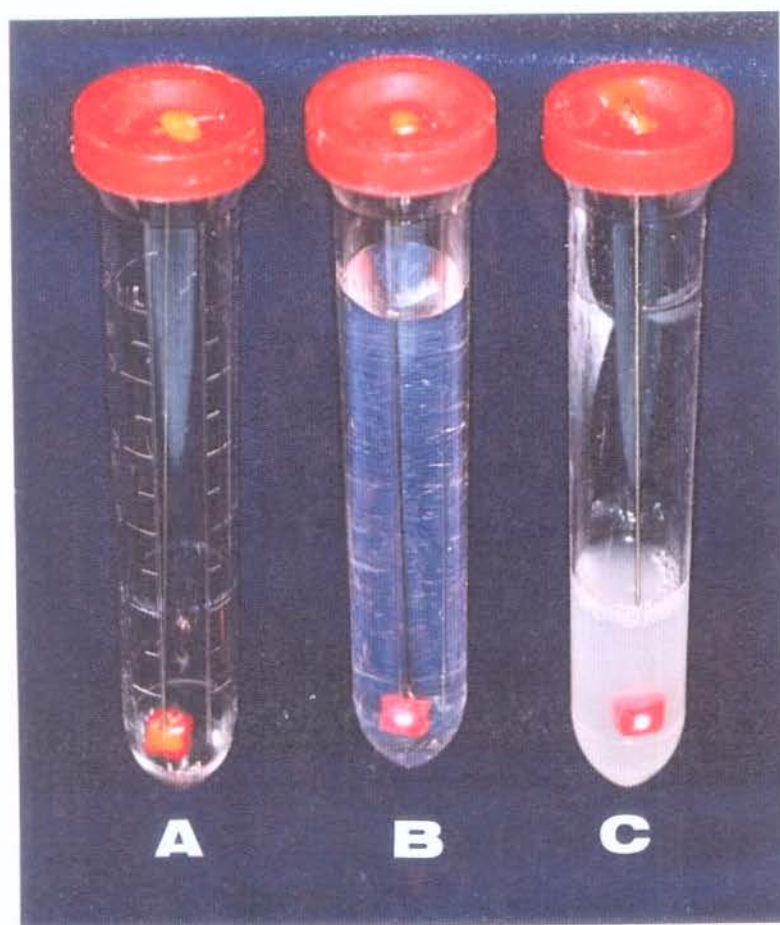


Fig 9: A- Bloco de esmalte bovino fixado na haste metálica.

B- Bloco de esmalte bovino fixado e imerso na SD.

C- Bloco de esmalte bovino fixado e imerso em SHH.

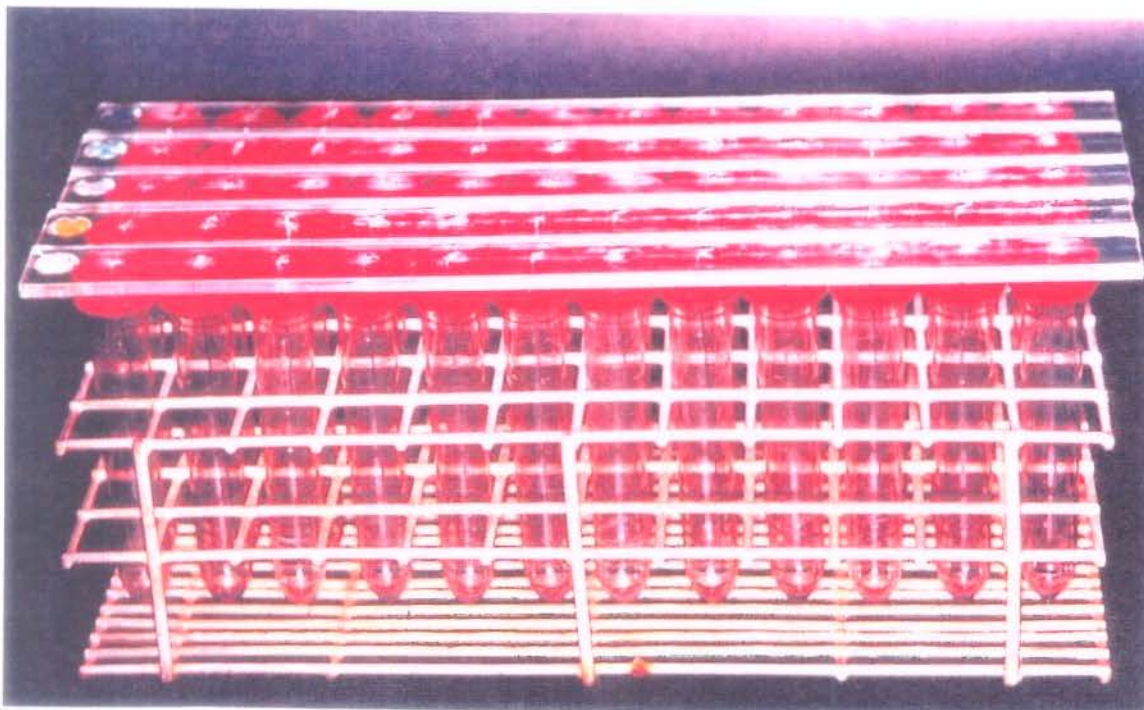


Fig 10: Blocos de esmalte fixados ao dispositivo de acrílico e metal e colocados em estante metálica.

5.8. Análise de flúor na saliva e solução desmineralizante (SD).

Os teores de íon flúor nas soluções foram determinados em potenciômetro digital modelo ORION EA-940, utilizando-se eletrodo específico para flúor ORION 96-09 (Fig.11). As amostras individuais de cada tratamento foram reunidas, sendo feita uma análise representativa da mistura.



Fig.11- Eletrodo específico para flúor modelo ORION 96-09 acoplado ao analisador de íons mod. ORION EA-940 e agitador magnético MARTE.

Previamente às leituras uma curva de calibração foi elaborada a partir de soluções padrões de íon flúor preparadas em TISAB II, contendo de 0,125 a 10,0 µg F/ml. As leituras de todas as amostras e padrões foram feitas sob agitação magnética constante, utilizando-se um agitador magnético MARTE e barras magnéticas. As calibrações foram testadas em termos de precisão por regressão linear utilizando o software Quattro-Pro, versão 1.01, de número QPR1110PGFS350. A exatidão foi verificada com padrões Orion de concentração conhecida.

5.9. Análise de íon flúor incorporado ao esmalte dental após ciclagens

Após a conclusão das ciclagens e análise da microdureza superficial do esmalte, foram feitas as análises de flúor incorporado ao esmalte dental. Para tanto, com o auxílio de um vazador de 2 mm e fita adesiva branca (Scotch 3M) aderiu-se ao bloco de esmalte, um disco de fita adesiva (2 mm de diâmetro), para isolar a porção a ser analisada. As extremidades do bloco foram protegidas com a aplicação de esmalte para unhas de cor vermelha e após a secagem do esmalte, a fita adesiva foi removida. A área exposta, foi submetida à limpeza com cotonetes umedecidos em água deionizada, para remoção de resíduos do adesivo proveniente da fita 3M e observados em lupa estereoscópica para verificar a total remoção de resíduos. A seguir, os blocos devidamente isolados e limpos foram colocados em tubos plásticos, aos quais adicionou-se 0,25 mL de HCl 0,5 M. A seguir os frascos contendo os blocos, foram agitados por 30 segundos em agitador KLINE, adicionou-se então 0,25 mL de TISAB II (contendo 20,0 g de NaOH/L), com a finalidade de neutralização imediata da reação, de acordo com o descrito por MELLBERG (1980) *apud* CURY (1984). Foram realizados 5 tratamentos nos tempos de 30, 30, 30, 60 e 60 segundos, a seguir procedeu-se as leituras nas soluções, da quantidade de flúor removida das 5 camadas de esmalte pelos tratamentos,

utilizando-se para a análise do íon flúor nas soluções, eletrodo específico para flúor, acoplado ao analisador de íons. Foram preparadas curvas de calibração de 0,125 a 5,0 ppm F .

A seguir as concentrações de fósforo (P) foram determinadas em 0,25 ml da solução, pelo método de FISKE & SUBARROW (1925) sendo as absorvâncias lidas em um espectrofotômetro BECKMAN DU-70. A partir das dosagens de P estimou-se a quantidade de esmalte removido após cada ataque ácido e dividindo-se a quantidade de flúor (μg) pelo grama de esmalte foi obtida a concentração de flúor (ppm) em cada camada. A espessura de esmalte removida (μm) foi calculada considerando-se a densidade do esmalte igual a 3,0. A área sob a curva de concentração de flúor em função da distância da superfície (ppm F x μm) foi determinada por regra trapezoidal simples.

5.10- Liberação do íon F^- do PMSF pela ação da saliva

Para verificarmos a liberação do íon flúor do PMSF pela ação da saliva, 25,0 ml de saliva estimulada, coletada diariamente de 03 voluntários, pela manhã, foram submetidos ao seguinte tratamento: colocou-se a saliva (25ml) em banho-maria (BM) à 37°C durante 5 minutos. A seguir adicionou-se 0,51 ml de PMSF 5 mM (5mMF= 95 mg/L), o que proporcionou uma concentração final do PMSF de 100 μM em Saliva.

A saliva (1 ml), acrescida de PMSF foi distribuída em 18 tubos BRUNEAU-S, com capacidade para 15ml e colocada em BM à 37°C.

Após os tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos, os frascos (02 de cada tempo) foram retirados do BM e adicionou-se 1,0 ml de TISAB II pH 5,0; sendo a seguir realizadas as dosagens de íon flúor nas soluções. Foram realizadas 6 repetições, sendo que anteriormente às dosagens, foram preparadas curvas de calibração de 0,125 a 1,00 ppm F em TISAB II (1:1).

5.11 -Análise estatística

A análise de resíduos não apresentou nenhuma violação dos pressupostos do modelo, assim como foi possível admitir a normalidade dos dados, através do teste de Shapiro-Wilk ($p>0,05$).

Para verificar se havia diferença entre os tratamentos (grupos) com relação a porcentagem de recuperação de dureza superficial do esmalte (%RDSE), utilizou-se o delineamento com um critério de classificação, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Para a análise estatística da liberação do íon flúor do PMSF pela ação da saliva em função do tempo utilizou-se o delineamento com um fator de classificação (tempo), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e para a verificação de diferença significativa entre os grupos com relação ao flúor incorporado ao esmalte após ciclagem, considerando cada distância e a área sob a curva, foi feita análise de variância em cada distância e na área sob a curva de concentração. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1. Liberação do íon flúor do PMSF pela ação da saliva

Os resultados da liberação do íon flúor do PMSF (100 μ M) pela ação da saliva estão expressos a seguir. Para a análise estatística, utilizou-se o delineamento com um fator de classificação (tempo). A análise de variância apresentou significância estatística para efeito de tempo e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As comparações entre as médias estão apresentadas na Tabela 1, e os dados individuais no Anexo 1.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão da concentração de íon flúor (ppm) na saliva em função do tempo de incubação com PMSF

Tempo (min)	Média	Desvio Padrão
0	0,0783 a	0,0031
5	1,4017 b	0,0257
10	1,7283 c	0,0350
20	1,8717 c	0,0447
40	1,9083 c	0,0621
60	1,9067 c	0,0529
120	1,8500 c	0,0485

Médias (n=6) seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Os resultados foram analisados estatisticamente sendo que só foi encontrada diferença significativa nos tempos 0 , 5 e 10, os demais não diferiram entre si. Estes resultados estão ilustrados na figura 12.

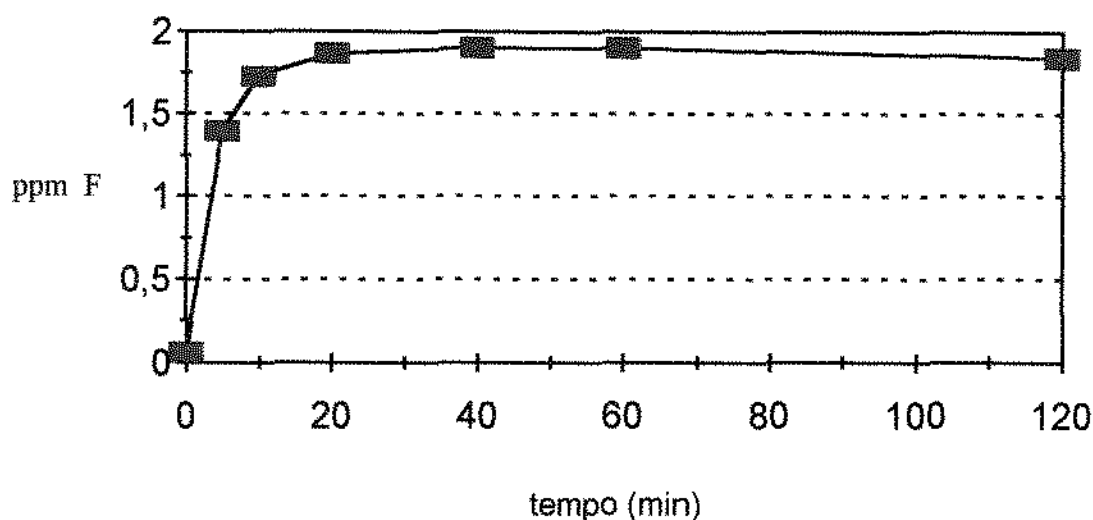


Fig. 12- Representação gráfica da liberação do íon flúor do PMSF pela ação da saliva em função do tempo (min). Média final de 6 repetições.

6.2. Porcentagem de recuperação da dureza superficial do esmalte - % rec. (DSE).

A seguir são apresentados na tabela 2 os resultados da % média de recuperação da dureza superficial do esmalte.

Tabela 2 - Médias e seus respectivos desvios padrão, para porcentagem de recuperação da dureza superficial do esmalte - % Rec. DSE

Grupos	Médias	Desvio Padrão
I(SHE)	10,66 a	1,9718
II(SHE com 10 μ M de PMSF)	30,77 b	2,9006
III(SHE com 50 μ M de PMSF)	43,48 b, c	5,0670
IV(SHE com 100 μ M PMSF)	54,54 c	6,5870
V(SHE com 1,0 ppm F)	43,24 b, c	5,9170

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Para verificar se houve diferença entre os tratamentos (grupos) com relação a porcentagem de recuperação de dureza superficial do esmalte (DSE), utilizou-se o delineamento com um critério de classificação, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A maior média foi observada no grupo IV que não diferiu significativamente dos grupos III e V e o grupo I apresentou a menor média que diferiu significativamente dos demais. O gráfico a seguir (fig.13) ilustra esses resultados.

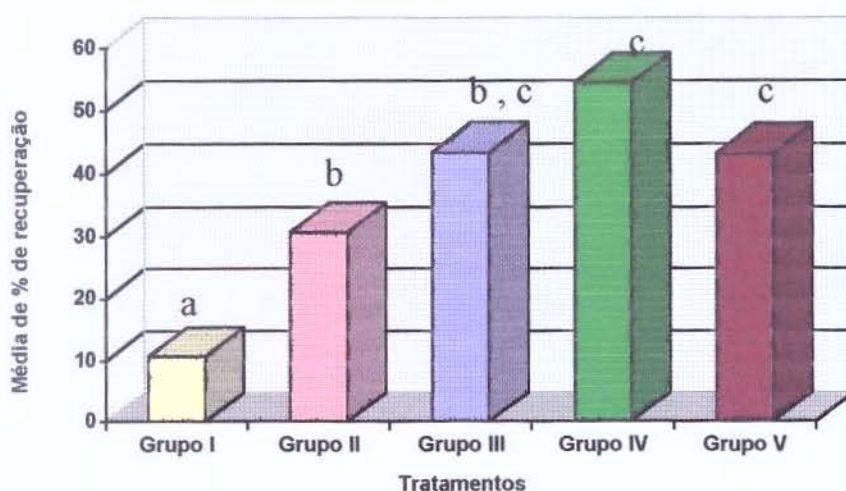


Fig.13 - Ilustração gráfica das médias de % de recuperação de dureza superficial do esmalte em função dos tratamentos.

As figuras 14 e 15 ilustram as indentações no esmalte íntegro, após a indução de cárie e após a remineralização.

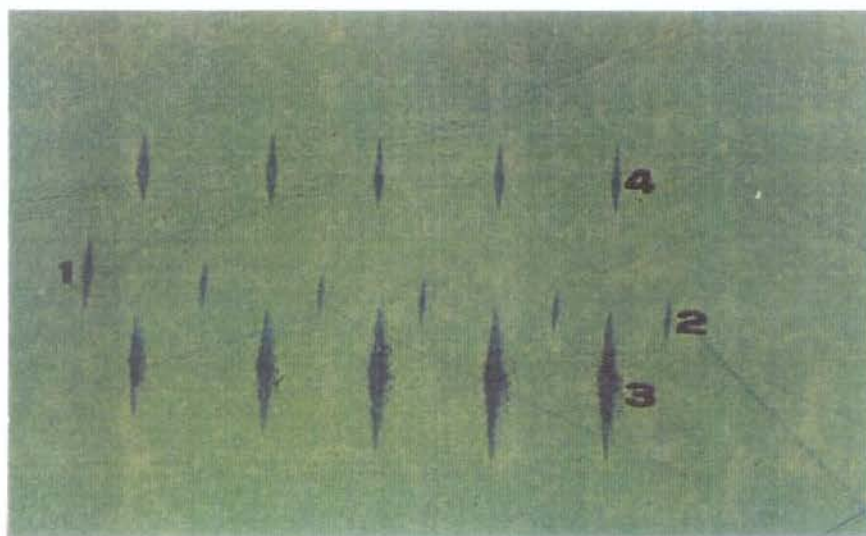


Fig. 14. Aspecto microscópico (50x) do esmalte dental e as indentações feitas.

- 1- Marca de referência
- 2- Inicial
- 3- Após DES (Cárie)
- 4- Após RE (Remineralização)

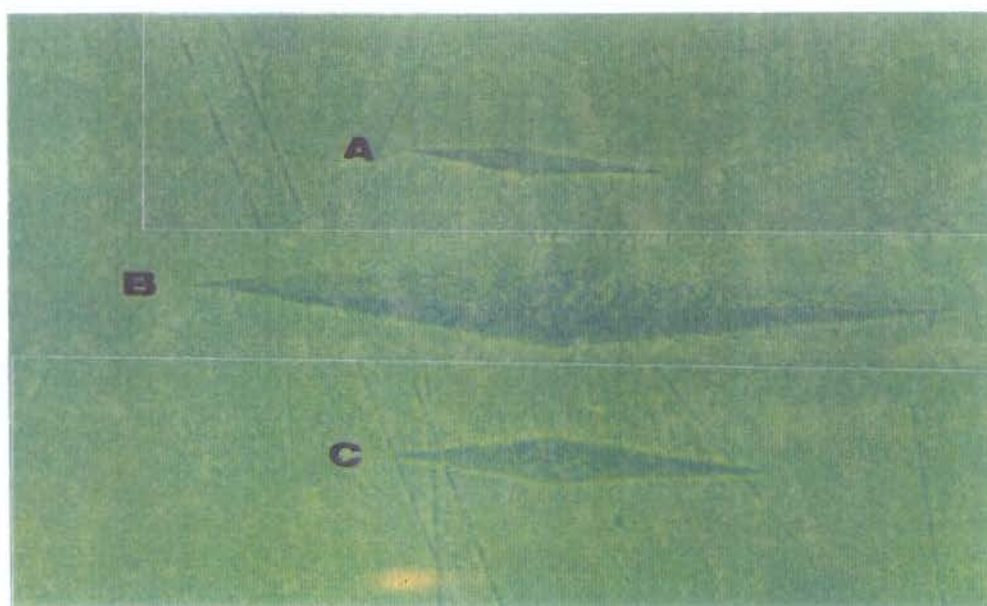


Fig.15- Aspecto microscópico (500 x) das indentações no esmalte dental antes e após o tratamento do grupo IV.

A- Dureza Knoop inicial = 396,2

B- Dureza Knoop após DES = 50,4

C- Dureza Knoop após RE = 170,0

* * Porcentagem de recuperação de dureza Knoop = 37,5 %

6.3- Análise de flúor incorporado ao esmalte dental após ciclagens - (FIE)

Os resultados (ppm F) de FIE após as ciclagens, estão apresentados na Tabela 3. Para a verificação de diferença significativa entre grupos com relação ao flúor incorporado ao esmalte após ciclagem, considerando cada distância, foi feita análise de variância, sendo encontrada diferença significativa entre esses grupos avaliados, e as comparações de médias estão a seguir apresentadas.

A Tabela 4 mostra as médias e desvios padrão da área sob a curva de concentração de flúor no esmalte dental (ppm x μm). Foi feita análise de variância, sendo encontrada diferença significativa entre os grupos. Médias seguidas de letras distintas, diferem estatisticamente ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 3- Médias e desvios padrão de flúor incorporado ao esmalte (ppm F) em função das distâncias da superfície dental (μm)

Distâncias (μm)	Grupos	Médias	Desvios Padrão
1 = (10,56 $\pm$ 1,97)	I	2544,76 a	203,6950
	II	6281,97 b	429,8699
	III	13732,68 c	1372,8300
	IV	13718,99 c	1552,1400
	V	11650,28 c	1394,1900
2 = (20,74 $\pm$ 3,76)	I	1951,17 a	175,5382
	II	3983,93 b	407,6058
	III	7598,35 c	704,5157
	IV	7785,75 c	842,2734
	V	7400,06 c	887,7703
3 = (31,52 $\pm$ 6,80)	I	1540,33 a	131,0209
	II	2697,42 b	308,6343
	III	4113,17 c	478,6573
	IV	4952,37 c	540,4778
	V	5647,93 c	705,0105
4 = (53,72 $\pm$ 9,40)	I	1033,15 a	129,5412
	II	1587,36 a	182,2791
	III	2342,41 b	426,8966
	IV	2773,12 b	342,5486
	V	3418,74 b	545,0834
5 =(76,91 $\pm$ 15,09)	I	873,45 a	107,3174
	II	1212,43 a	165,5480
	III	1531,51 a b	293,1923
	IV	1847,22 b	219,8530
	V	2536,84 b	360,4292

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 4: Médias e desvios padrão da área sob a curva de concentração de flúor no esmalte dental (ppm F x μm).

Grupos	Médias	Desvios Padrão
I	78646,32 a	10304,60
II	139550,15 b	14011,72
III	325486,10 c	34543,67
IV	378444,49 c	40133,64
V	235697,11 c b	29642,14

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

Os resultados das tabelas 3 e 4 estão ilustrados graficamente nas figuras de números 16 a 21.

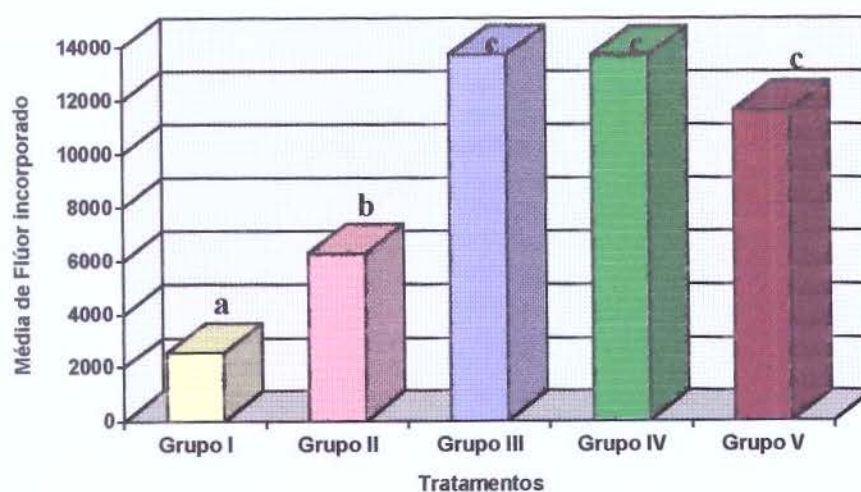


Fig. 16 -Representação gráfica da distância 1 (média de flúor incorporado no esmalte pelos diferentes tratamentos).

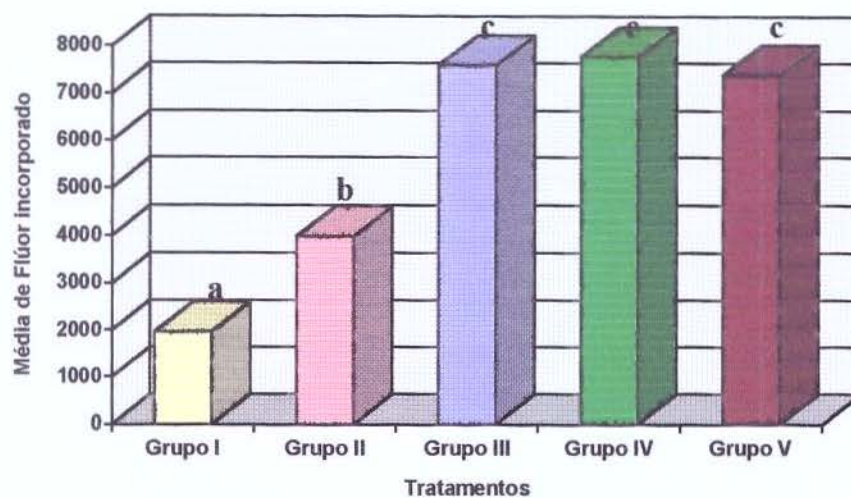


Fig. 17-Representação gráfica da distância 2 (média de flúor incorporado no esmalte pelos diferentes tratamentos).

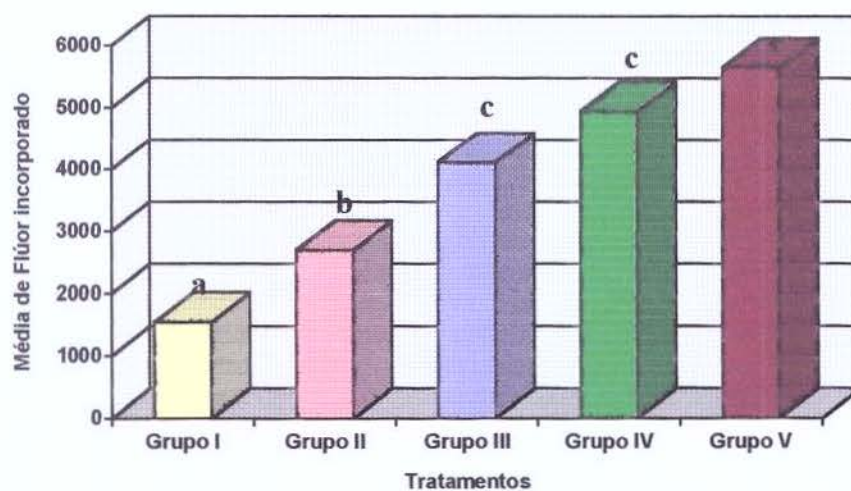


Fig. 18 -Representação gráfica da distância 3 (média de flúor incorporado no esmalte pelos diferentes tratamentos).

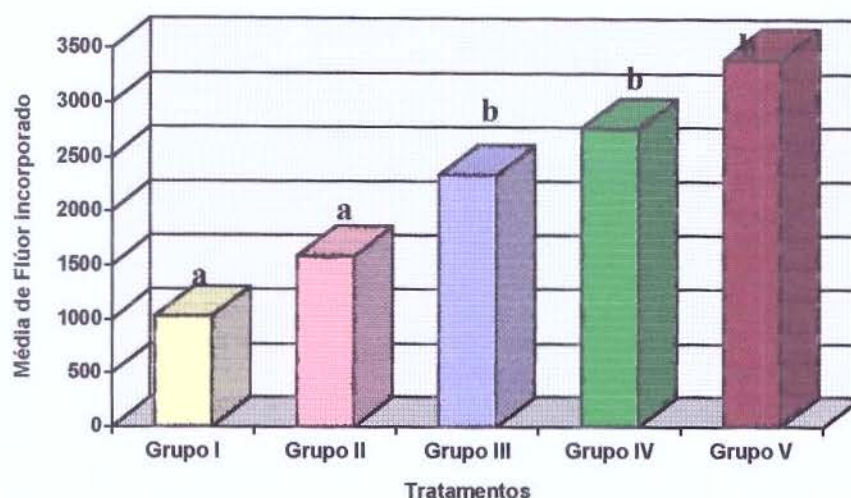


Fig. 19 -Representação gráfica da distância 4 (média de flúor incorporado no esmalte pelos diferentes tratamentos).

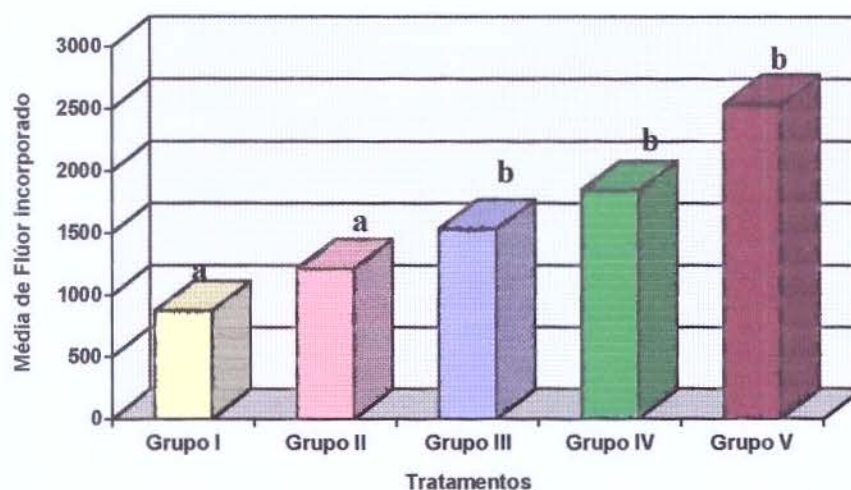


Fig. 20 -Representação gráfica da distância 5 (média de flúor incorporado no esmalte pelos diferentes tratamentos).

Nas distâncias 1, 2 e 3 os comportamentos foram semelhantes, isto é a menor média foi obtida com o grupo I que diferiu significativamente dos demais, seguida do grupo II que também diferiu significativamente dos demais e os outros três grupos não diferiram entre si. Nas distâncias 4 e 5, os grupos I e II não diferiram significativamente entre si, e a maior média foi observada no grupo V que não diferiu significativamente dos grupos IV e III.

A figura 21 ilustra a área integrada (ppm F x μm) de flúor incorporado no esmalte em função da distância da superfície dental, com relação aos tratamentos.

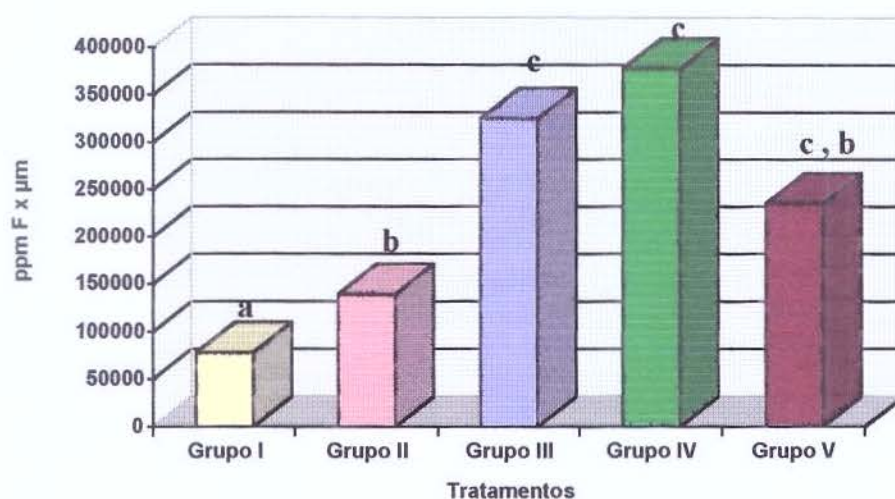


Fig. 21 -Representação gráfica da área integrada (ppm F x μm) em função dos tratamentos.

Na área integrada a menor média foi observada no grupo I que diferiu significativamente dos demais, sendo que a maior média foi observada no grupo IV que não diferiu dos grupos III e V.

6.4- Variação (%) da concentração de flúor na saliva

6.4.1- Saliva diurna

A figura 22 ilustra a redução porcentual média da concentração de flúor na saliva diurna após as ciclagens (ver no anexo 2, tabelas A e B, resultados absolutos).

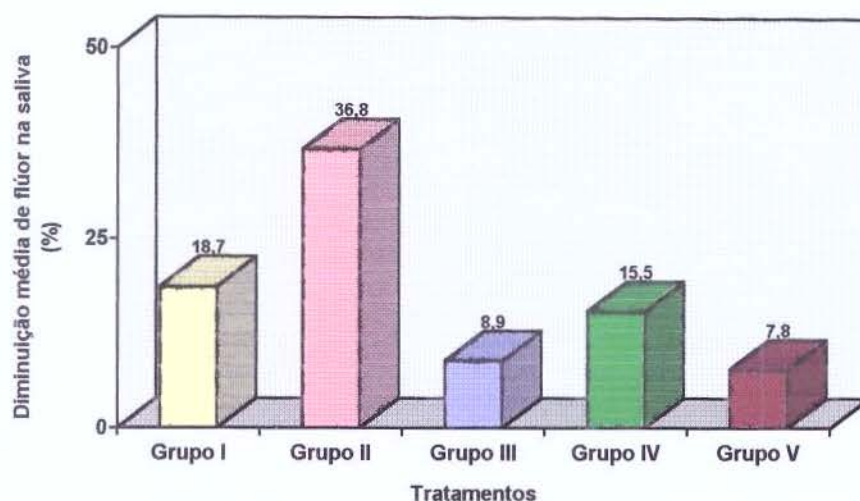


Fig. 22 - Representação gráfica da redução porcentual média da concentração de flúor na saliva diurna após as ciclagens.

6.4.2-Saliva noturna

A figura a seguir ilustra a redução porcentual média da concentração de flúor na saliva noturna após as ciclagens (ver no anexo 2, tabelas C e D, resultados absolutos).

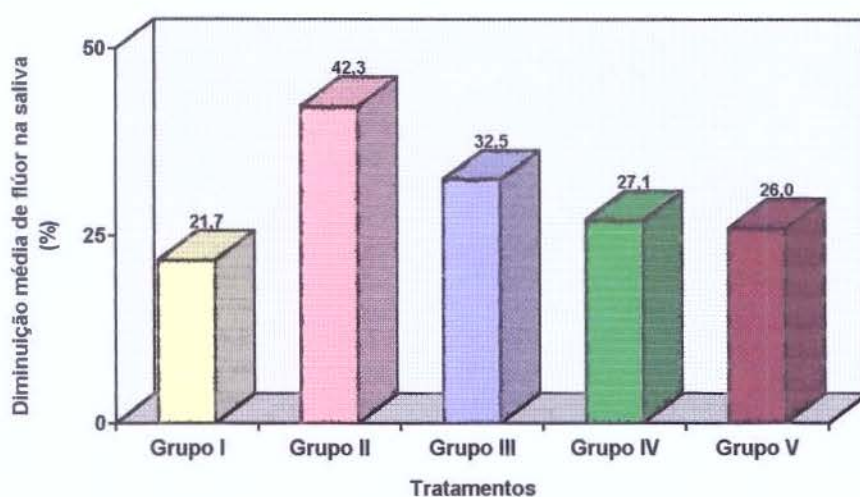


Fig. 23 - Representação gráfica da redução porcentual média da concentração de flúor na saliva noturna após as ciclagens.

6.5-Variação da concentração de flúor na solução desmineralizante.

A figura 24 ilustra a variação da concentração de flúor na solução desmineralizante (SD) após o 6º e o 12º dia de ciclagens (ver no anexo 3, tabela E, resultados absolutos).

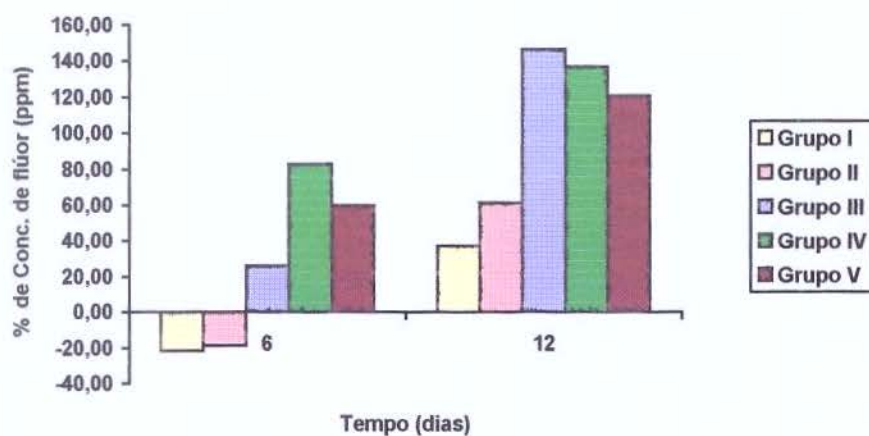


Fig. 24 - Variação da concentração de flúor na solução desmineralizante (SD), após o 6º e 12º dia das ciclagens.

7. DISCUSSÃO

A utilização do fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), um inibidor de enzimas proteolíticas amplamente utilizado em pesquisas para evitar a proteólise durante os procedimentos bioquímicos de extração, purificação e análises finais, foi inicialmente descrita por SCHRADER em 1938. Posteriormente, FAHRNEY & GOLD (1963), descrevendo a reação de inibição pelo PMSF de proteases serina-dependentes, relataram que ocorre um ataque nucleofílico da Ser, do sítio ativo da enzima, no S do grupo sulfonil do PMSF. Em seguida, com o subsequente rearranjo eletrônico, o PMS ficaria ligado covalentemente à enzima, inibindo-a irreversivelmente, porém com a liberação de íon flúor.

Os resultados do presente trabalho mostram que o PMSF libera íon flúor pela ação da saliva (tab. 1). A liberação a partir de uma solução 100,0 μM é rápida (fig.12), sendo que após 10 min. a concentração de F na saliva já é de 1,72 ppm, não havendo diferença significativa nos tempos posteriores de incubação. Deste modo, conclui-se que pela ação da saliva (provavelmente proteinases salivares e bacterianas) PMSF a 100,0 μM libera íon flúor na saliva atingindo uma concentração máxima de 1,9 ppm, o que corresponde estequiometricamente a proporção de F na molécula do PMSF. Isto implica dizer que todo o flúor do PMSF foi liberado pela saliva. Este resultado está de acordo com CURY (1995), o qual observou que numa solução de saliva contendo PMSF a 100,0 μM foi encontrada aproximadamente 2,0 ppm de íon flúor.

Deste modo, considerando que o PMSF tem sido utilizado em pesquisas odontológicas desde concentrações a 100,0 μM (KOLLER et al., 1992) até 0,2 M (IONTCHEVA et al., 1997), a concentração de íon flúor na saliva poderia teoricamente atingir valores desde 1,9 a 3.800,0 ppm. Estas concentrações são suficientes para induzir a efeitos indiretos nas pesquisas em andamento.

Assim, considerando que concentrações de íon flúor tão baixas quanto 1,0 ppm são suficientes para interferir com a adsorção e desorção de

proteínas a hidroxiapatita (RÖLLA & MELSEM, 1975; RÖLLA, 1977), os estudos de formação de película adquirida ou de adsorção de enzimas bacterianas a HA, que utilizam o PMSF na pesquisa podem estar tendo interferência do íon flúor liberado do mesmo. Neste particular, FISHER et al. (1987) utilizaram PMSF a 2,0 mM para estudar a adsorção de proteínas salivares ao dente. Esta concentração de PMSF seria suficiente para gerar uma solução com 38,0 ppm de F, alta o suficiente para competir com as proteínas pela adsorção à superfície da hidroxiapatita. Este mesmo fenômeno pode estar ocorrendo quando do estudo da adsorção de GTF à HA, pois concentrações de PMSF a 1,0 mM têm sido utilizadas (SCHILLING & BOWEN, 1988; STEINBERG et al., 1992), o que representaria 19,0 ppm F se todo flúor do PMSF fosse liberado.

Do mesmo modo, considerando que baixas concentrações de íon flúor podem inibir enzimas bacterianas (HAMILTON & BOWDEN, 1996) o PMSF pode liberar flúor em concentração suficiente para interferir no estudo de uma série de propriedades das bactérias bucais. Assim, STINSON et al. (1992) utilizaram PMSF a 0,5 mM para estudar a inibição da aderência de *P. gingivalis* a *S. gordonii* pelas proteínas das glândulas salivares sub-mandibular e sublingual. Os autores concluíram que proteases associadas à superfície do *P. gingivalis* facilitariam a adesão interbacteriana, pois o PMSF agiu como um inibidor. Entretanto, a concentração de PMSF utilizada poderia gerar 10,0 ppm de F na solução, o qual poderia interferir com a adesão.

Por outro lado, o aspecto mais relevante do flúor é sua capacidade de aumentar a capacidade da saliva repor mineral perdido pelo dente. A saliva tem cálcio e fosfato, os minerais perdidos pelo esmalte durante o desenvolvimento da cárie e proteínas que se adsorvem ao esmalte mudando suas propriedades. Assim, a princípio saliva deveria ser utilizada quando do estudo de

substâncias para remineralizar o esmalte. Entretanto, para preservar as proteínas salivares inibidores de proteases deveriam ser utilizados. Devido ao fato que PMSF é um eficiente inibidor de proteases salivares (MINAGUCHI, 1988) este deveria ser uma das substâncias de eleição. Porém, PMSF libera flúor o qual pode mascarar o efeito na avaliação de métodos de usar flúor, como sugerido por CURY em 1995, principalmente considerando que apenas 1,0 ppm F no meio aumenta a remineralização do esmalte de 3,3 vezes (SILVERSTONE, 1988). Como esta concentração pode ser atingida pela liberação de flúor de PMSF a 50,0 μM , e a menor concentração de PMSF em pesquisa odontológica tem sido 100,0 μM , este risco existe.

Os resultados do presente trabalho (tab. 2) mostram que enquanto a saliva conseguiu remineralizar o esmalte em 10,7%, a saliva contendo apenas 10,0 μM de PMSF remineralizou em 30,8%, diferença esta 3 vezes maior e estatisticamente significativa. Quando as concentrações de PMSF na saliva eram de 50,0 e 100,0 μM houve aumento de remineralização, as quais foram significativas em relação a saliva sem PMSF, porém não se diferenciaram. Entretanto, a saliva com 100,0 μM de PMSF remineralizou o esmalte em 54,5%, a qual foi apenas 1,8 vezes maior que a saliva com 10,0 μM de PMSF, porém significativa. Por outro lado, não houve diferença significativa na remineralização entre as salivas com 10,0 μM de PMSF e a com 50,0 e entre esta e a com 100,0 μM (ver fig. 13 para uma visão geral). Isto pode ser explicado pelo fato de que o efeito do flúor não depende linearmente da sua concentração, mas sim é função logarítmica (FEATHERSTONE et al., 1990). Assim, considerando as concentrações médias de flúor nas soluções de tratamentos com salivas diurnas e noturnas antes das ciclagens (anexos), ter sido: 0,074 ppm F na saliva; 0,216 na saliva com 10,0 μM de PMSF; 0,852 na saliva com 50,0 μM de PMSF; 1,888 na saliva com 100,0 μM de PMSF e 1,080 na saliva com 1,0 ppm de F, estas concentrações explicariam porque as

diferenças de remineralização entre os tratamentos foram ou não estatisticamente significativas.

A ratificação de que as remineralizações observadas são devidas ao flúor liberado do PMSF pela ação da saliva (Fig.12), pode ser feita quando são comparados (tab. 2) os tratamentos III (saliva com 50,0 μ M de PMSF) e V (saliva contendo 1,0 ppm de flúor iônico). Remineralizações de respectivamente 43,5 e 43,2% foram conseguidas, não havendo diferenças significativas entre elas, o que pode ser explicado pelas concentrações de flúor nas soluções de saliva em que os dentes ficavam armazenados durante as ciclagens (anexos 2 e 3).

A remineralização observada no presente trabalho não só confirma a possibilidade do flúor liberado do PMSF interferir com resultados de pesquisas tendo este objetivo (CURY, 1995), como enfatiza a importância dos conceitos atuais de mecanismo de ação do flúor da importância de concentrações baixas de flúor, porém constantemente presentes no meio ambiente bucal para interferir com o desenvolvimento da cárie (CURY, 1989).

Em termos da porcentagem de remineralização obtida, os 54,5 % de recuperação de dureza superficial do esmalte quando do tratamento com saliva contendo 100,0 μ M de PMSF confirma os resultados obtidos por CURY (1995) quando este valores são expressos em termos de comprimento de indentações (anexo 4). Porém, o valor de 43,2% obtido com a saliva contendo 1,0 ppm F é inferior ao obtido por SILVERSTONE (1988). Entretanto, este autor não utilizou um modelo de ciclagens de pH para simular o desenvolvimento de cárie, mas sim só submeteu os dentes a uma solução remineralizante artificial. Assim, além da ausência da saliva os dentes não eram simultaneamente submetidos a uma desmineralização, o que seria ideal num modelo laboratorial para mimetizar ao máximo o que ocorre na cavidade bucal (TEN CATE, 1990).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os de WHITE (1987), que avaliou a remineralização do esmalte tratado 4x/dia com dentifrícios fluoretados durante as ciclagens de pH (saliva como sol. Re), o referido autor observou que o dentifrício com NaF foi 2,5x mais eficiente que o placebo para recuperar a dureza superficial do esmalte. Os resultados do presente trabalho (tab. 2) mostram que PMSF na saliva na concentração apenas de 10,0 μ M é 2,9 x mais eficiente que a saliva. Este dado tem duplo significado. Primeiro mostra a capacidade do flúor liberado do PMSF pela ação da saliva em mascarar resultados de pesquisa de avaliação de produtos fluoretados. Em segundo lugar mostra que em termos de mecanismos de ação do flúor, a manutenção constante na solução remineralizante de apenas 0,2 ppm F (anexo 2) é tão efetivo quanto tratar o dente 4x/dia com um dentifrício contendo 1.100,0 ppm F.

Outro aspecto do efeito do flúor é sua capacidade de reagir quimicamente incorporando-se no esmalte, o que pode acontecer quando PMSF é utilizado na saliva. Os resultados do presente trabalho (tab. 3) mostram que o flúor liberado do PMSF em qualquer das concentrações utilizadas foi capaz de incorporar significativamente mais flúor no esmalte que o controle (saliva sem PMSF). Este mesmo efeito ocorreu com a saliva contendo 1,0 ppm F. O flúor encontrado no esmalte é proveniente do presente nas salivas durante as ciclagens, o que pode ser constatado (Figs. 22 e 23) pela porcentagem de redução do encontrado nas soluções antes das ciclagens e após a permanência dos blocos dentais nas mesmas. Uma maior incorporação de flúor ocorreu durante a permanência dos dentes na saliva noturna que na diurna (Fig. 23 x 22), o que pode ser explicado não só pelo maior tempo de contato, mas também pelo fato que os dentes foram submetidos a solução Des- antes da colocação na saliva noturna. Nesta sol. Des- o esmalte se desmineraliza perdendo flúor, como pode ser constatado pelo aumento na solução (fig. 24). Esta liberação de flúor para a

solução Des- é consequência da sua subsaturação em relação aos produtos formados no esmalte, o qual quando nas sols. Re- (saliva) ganharia flúor novamente devido agora a uma supersaturação desta em relação a produtos do esmalte. Observou-se também uma porcentagem maior de redução de flúor nas salivas (fig. 22) que tinham menores concentrações de flúor (anexo 2), o que pode ser explicado pelo fato de, nas maiores concentrações, haver uma maior formação de produtos na superfície do esmalte atingindo mais rapidamente um equilíbrio de solubilidade. Isto também explicaria o porquê de não terem sido obtidas diferenças significativas de flúor incorporado entre os grupos III, IV e V.

Com relação ao flúor no esmalte, o resultado mais relevante do presente trabalho foi mostrar que o flúor proveniente do PMSF na concentração de apenas 10,0 μM foi capaz de incorporar quantidades significativas em relação ao controle (só saliva). Considerando que a concentração mínima de PMSF utilizado em Odontologia tem sido 10x maior, interferências nas pesquisas fatalmente poderão ocorrer.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que o PMSF libera íon flúor pela ação da saliva, o qual seria suficiente para interferir indiretamente com o resultado final de uma série de pesquisas.

8. CONCLUSÃO

- 1- O PMSF libera íon flúor quando em contato com a saliva humana.
- 2- O flúor liberado não só remineraliza como se incorpora no esmalte dental.
- 3- O uso do PMSF , como inibidor de enzimas proteolíticas, poderá ter efeitos indiretos em outras pesquisas, principalmente em Odontologia.

9. SUMMARY

Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) is a widely used protease inhibitor that by releasing fluoride may have indirect effect on enzymes, pellicle formation and dental enamel. The objective of this research was to study the effect of PMSF on enamel remineralization through saliva action. Forty nine flat bovine enamel blocks (4x4mm) were used. Surface microhardness (SMH) was initially determined in the sound enamel. These enamel blocks were partially demineralized in 0.05 M lactic acid, 50% saturated hydroxiapatite sol. at pH 5.0 containing Carbopol 0.2%, during 16h at 37°C. SMH was determined again; the enamel blocks were randomly allocated in 5 groups and submitted to the following treatments: I= Human Stimulated Saliva (HSS); II= HSS containing 10.0 µM PMSF; III= HSS containing 50.0 µM PMSF; IV= HSS containing 100.0 µM PMSF and V= HSS containing 1.0 ppm F. The enamel blocks were submitted to a pH-cycling model for 12 days, kept 2h in demineralizing solution and 22h in HSS. The saliva was changed twice/day and the demineralizing sol. after the 6th day. The Knoop SMH was again determined. Enamel fluoride uptake was determined by removing 5 layers of enamel with 0.5 M HCL. Fluoride released from PMSF (100.0 µM) through saliva action was determined. For the Knoop SMH analysis a microhardness tester SHIMADZU HMV-2000 was utilized and for the fluoride analysis, specific electrode ORION 96-09 was utilized. The results showed that PMSF releases fluoride and after 10 minutes at 37°C, the fluoride concentration in saliva increased significantly from 0.078 to 1.732 ppm F. The % of Knoop SMH recovery (mean $\pm$ SE) was calculated; the results for the groups I to V were respectively: 10.7 $\pm$ 1.97A; 30.8 $\pm$ 2.90B; 43.5 $\pm$ 5.07B,C; 54.5 $\pm$ 6.59C; and 43.2 $\pm$ 5.82B,C. The results (mean $\pm$ SE) of enamel fluoride uptake (ppm) at the 1st layer were: 2544.8 $\pm$ 203.7A; 6281.0 $\pm$ 429.9B; 13732.7 $\pm$ 1372.8C; 13719.0 $\pm$ 1552.1C; and 11650.3 $\pm$ 1394.2C. Means followed by different letters are statistically significant ($p < 0.05$). In conclusion, PMSF releases fluoride when in contact with saliva, which not only enhances remineralization and enamel fluoride uptake but may also have indirect effects on other researches where PMSF is used as protease inhibitor.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALVES,C.R,MARZOCHI,M.C.A.,GIOVANNI-DE-SIMONE,S,
Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis*
and *Leishmania major*. **Brazilian J Med Biol Res.**, v.26, n.2, 1993.
2. BAUM, E.Z. *et al.* Purification, properties, and mutagenesis of poliovirus
3C protease. **Virology.**, New York, v.185, n.1, p.140-150, Nov. 1991.
3. BOACKLE, R.J., SUDDICK,R.P. Proteínas Salivares e Saúde Bucal. *In*:
MENAKER,L., MORHART,R.E., NAVIA,J.M. **Cáries Dentárias:
Bases Biológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. cap.3,
p.102-117.
4. CARVALHO, A.S.D. *et al.* Avaliação de dentifrícios fluoretados: pela
reatividade com o esmalte dental humano e tratamento de dentes
submetidos a ciclagens des-remineralização *in vitro*. **RGO.**, Porto
Alegre, v.44, n.1, p.17-21, 1996.
5. COLETTA, R.D. **Caracterização das metaloproteinases associadas ao
desenvolvimento do germe dental do primeiro molar de ratos**. Tese
(Mestrado- Biologia e Patologia Buco-Dental) Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 66p.

* De acordo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com "World List of Scientific Periodicals".

6. CURY, J.A. **Aprimoramento de metodologias analíticas em cariologia.** Rochester, Eastman Dental Center, 1995. [Relatório Técnico de Estágio] -CNPq; proc. 450685/95.
7. _____. **Estudo do metabolismo do flúor em função da sua administração a ratas por períodos pré-natais sucessivos.** Tese (Livre-docência em Bioquímica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1984. 136p.
8. _____. Flúor dos 8 aos 80. *In:* BOTTINO, M.A., FELLER, C. **Atualização na clínica odontológica.** São Paulo: Artes Médicas, 1992. cap.26, p.375-382.
9. _____. Uso do flúor. *In:* BARATIERI, L.N. *et al.* **Dentística procedimentos preventivos e restauradores.** Rio de Janeiro: Quintessence, 1989. cap. 2, p.43-67.
10. FAGBEMI, B.O., HILLYER, G.V. Partial purification and characterisation of the proteolytic enzymes of *Fasciola gigantica* adult worms. **Veterinary Parasitology.**, Amsterdam, v.40, p.217-226, 1991.
11. FAHRNEY, D.E., GOLD, A.M. Sulfonyl Fluorides as Inhibitor of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.85, p.997-1000, 1963.

12. FEATHERSTONE, J.D.B., *et al.* Dependence of *in vitro* Demineralization of Apatite and Remineralization of Dental Enamel on Fluoride Concentration. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.660-665, February. 1990. [Special issue]

13. FISHER, S.J. *et al.* External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.32, n.7, p.509-517, 1987.

14. FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. **J. biol. Chem.**, Baltimore, v.66, n.2, p. 375-400, 1925.

15. GANESAN, S. *et al.* Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) inhibits 17β - estradiol binding to estrogen to receptor from human prostate. **Life Sci.**, Elmsford, v.41, n.25, p.2767-2775, Dec. 1987.

16. GOLD, A.M., & FAHRNEY, D. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin **Biochemistry.**, v.3, n.6, p.783-791, June 1964.

17. GOLD, A.M. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. III. Identification of Serine as the Site of Sulfonylation in Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin **Biochemistry.**, v.4, n.5, p.897-901, May 1965.

18. HAMILTON, I.R. Biochemical Effects of Fluoride on Oral Bacteria. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.660-665, February. 1990. [Special issue]

19. _____, BOWDEN, G.H.W. **Fluoride effects on oral bacteria in Fluoride in Dentistry**. Copenhagen, Munksgaard, 1996. Cap. 13. p.230-251.
20. HOSOI, S., CIRCOLO, A., BORSOS, T., Activation of Human C1: Analysis With Western Blotting Reveals Slow Self-Activation. **J. Immunol.** v.139, n.5, p. 1602-1608, September, 1987.
21. IONTCHEVA, I., OPPENHEIM, F.G., TROXLER, R.F., Human Salivary Mucin MG1 Selectively Forms Heterotypic Complexes with Amylase, Proline-rich Proteins, Statherin, and Histatins. **J. dent. Res.**, Washington, v.76, n.3, p.734-743, March, 1997.
22. JAGELS, M.A. *et al.* Proteolytic inactivation of the leukocyte C5_a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. **Infec. Immun.**, Washington, v.64, n.6, p. 1984-1991, June 1996.
23. JAMES, G.T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers **Analyt. Biochem.**, Orlando, v.86, n.2, p.574-579, June 1978.
24. KOFFMAN, B. The effects of various serine protease inhibitors on estrogen receptor steroid binding. **J. steroid biochem. molec. biol.**, Oxford, v.38, n.5, p. 569-574, May 1991.
25. KOLLER, M.M. *et al.* A biochemical analysis of parotid and submandibular salivary gland function with age after simultaneous stimulation with pilocarpine and isoproterenol in female Nia Fischer 344 rats. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.37, n.3, p.219-230, Mar. 1992.

26. KOULOURIDES, T., Enhancement of Fluoride Effectiveness by Experimental Cariogenic Priming of Human Enamel **Caries Res.**, Basel, v.14, p.32-39, 1980.
27. LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 8, p.147-178.
28. MARQUIS, R.E., Diminished Acid Tolerance of Plaque Bacteria Caused by Fluoride. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.672-675, February. 1990. [Special issue]
29. MENDIS, A.H.W. Study of human epithelial cell detachment and damage: Effects of proteases and oxidants. **Immunol. cell Biol.**, Adelaide, v.68, pt.2, p.95-105, 1990.
30. MINAGUCHI, K. The presence and origin of phosphopeptides in human saliva. **Biochem. J.**, London, v.250, n.1, p.171-177, Feb 1988.
31. RÖLLA, G., MELSEN, B. Desorption of protein and bacteria from hidroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate. **Caries Res.**, Basel, v.9, n.1, p. 66-73, 1975.
32. RÖLLA, G. Effects of fluoride on initiation of plaque formation. **Caries Res.**, Basel, v.11, p.243-261, 1977. [Supplement, 1]
33. RÖLLA, G., & BOWEN, W.H. Surface adsorption of fluoride and ionic exchange reactions on hidroxyapatite. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.36, n.4, p.219-224, 1978.

34. SCHILING, K.M., & BOWEN, W.H. The activity of glucosyltransferase absorbed on to saliva-coated hydroxyapatite. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, n.1, p.2-8, 1988.

35. SILVERSTONE, L.M., Structural features of dental caries and the effects of fluoride on artificial caries. *In*: EKSTRAND, J. et al. **Fluoride in Dentistry**. Copenhagen, Munksgaard, 1988. Cap. 5. p.105-124.

36. SLOMIANY, B.L. *et al.* Control of mucin molecular forms expression by salivary protease: differences with caries. **Int. j. biochem.**, Elmsford, v.25, n.5, p.681-687, May 1993.

37. SOUZA, M. MORADAS-FERREIRA, P. AZEVEDO, C. Presence of a Trypsin-Like Protease in Starfish Sperm Acrosome. **J. Exp. Zool.**, v.261, p. 349-354, 1992.

38. STEINBERG, D., BEEMAN, D., BOWEN, W.H. The effect of delmopinol on glucosyltransferase absorbed on to saliva-coated hydroxyapatite. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.37, n.1, p.33-38, Jan. 1992.

39. STINSON, M.W. *et al.* Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* adhesion to *Streptococcus gordonii* by human submandibular-sublingual saliva. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, n.7, p.2598-2604, July 1992.

40. TEN CATE, J.M. *In vitro* studies on the effect of fluoride on De and Remineralization. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.614-619, Feb. 1990.

41. _____, DUIJSTERS, P.P.E. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical Data. **Caries Res.**, Basel, v.17, n.3, p.193-199, 1983.

42. UITTO, V.J., APPELGREN, R., ROBINSON, P.J. Collagenase and neutral metallo -proteinase activity in extracts of inflamed human gingiva. **J. periodont.**, Copenhagen, v.16, n.4, p.417-424, July 1981.

43. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, Basel, v.21, n.2, p.126-140, 1987.

44. YUAN, L., COLE, G.T., SUN, S.H., Possible Role of a Proteinase in Endosporeulation of *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, n.6, p.1551-1559, June 1988.

45. ZAHARADNIK, R.T., PROPAS, D., MORENO, E.C., *In vitro* Enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the Presence of Salivary Pellicles. **J. dent. Res.**, Washington, v.56, n.9, p.1107-1110, September 1977.

46. ZAHARADNIK, R.T., Modification by Salivary Pellicles of *in vitro* Enamel Remineralization. **J. dent. Res.**, Washington, v.58, n.11, p.2066-2073, November 1979.

47. ZERO, D.T. *In situ* Caries Models. **Adv.dent.Res**, Washington, v.9,n.3, p.214-230, 1995.

11. APÊNDICE

Anexo 1 - Liberação do íon flúor do PMSF pela ação da Saliva

Curvas de Calibração e análises realizadas no período de 14 à 21/02/1997

Wald.Alf
FEV.14.97

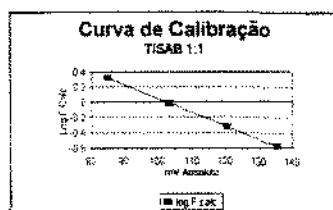
Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva

TISAB II (%)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,60206	135,4	-0,58442	0,26
0,25	2	0,5	-0,30103	120,5	-0,31836	0,48
0,5	2	1	0	103,5	-0,01481	0,97
1	2	2	0,30103	85	0,315527	2,07

Resultado de Regressão:

Constante	1,833289
Erro padrão de valores estimado	0,022816
R ao Quadrado	0,997702
Nº de Observações	4
Graus de Liberdade	2
Coefficiente(s) X	-0,01786
Erro padrão de coefic	0,000606



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BlankM	185,7	-1,48257	0,03	0,00	
Padrão1M	103,2	-0,00945	0,98	1,00	0,98
Padrão2M	102,8	-0,00231	0,99	1,00	0,99
Média			0,99		
dp			0,01		

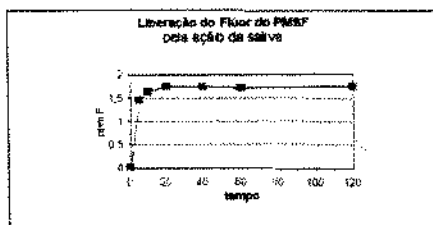
Em 23,0 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento

Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0

Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo adicionou-se 0,47 ml de PMSF (5mMF = 95mg/l) dil. 49,94 esperado 1,9 ppm

Dividiu-se a saliva em tubos com 1,0 ml da saliva contendo PMSF e colocou-se no Banho-Maria e após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	190,8	-1,57364	0,03	0,03
5 min.	93,4	0,165537	1,46	1,46
10 min.	90,85	0,211069	1,63	1,63
20 min.	89,05	0,24321	1,75	1,75
40 min.	89,15	0,241425	1,74	1,74
60 min.	89,55	0,234282	1,72	1,72
120 min.	89,35	0,237853	1,73	1,73



0
5
10
20
40
60
120

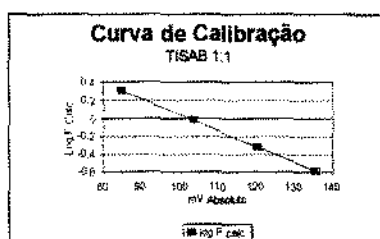
Wald Alf
FEV.17.97

Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva
TISAB II (1:1)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,60206	136,1	-0,59735	0,25
0,25	2	0,5	-0,30103	119,5	-0,30417	0,50
0,5	2	1	0	102,7	-0,00746	0,98
1	2	2	0,30103	84,9	0,306913	2,03

Resultado de Regressão:

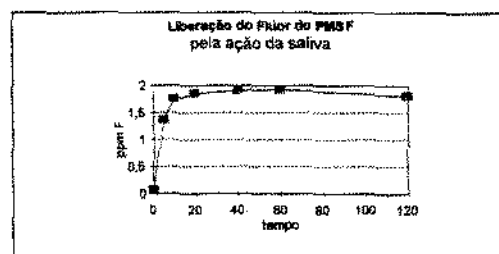
Constante	1,806358
Erro padrão de valores estimado	0,00782
R ao Quadrado	0,99973
Nº de Observações	4
Graus de Liberdade	2
Coefficiente(s) X	-0,01766
Erro padrão de coefici	0,000205



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BlankM	193,3	-1,60757	0,02	0,00	
Padrão1M	102,4	-0,00216	1,00	1,00	1,00
Padrão2M	102,6	-0,00569	0,99	1,00	0,99
Média			0,99		
dp			0,01		

Em 25,0 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento:
Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0
Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo, adicionou-se 0,51 ml de PMSF 5 (5mMF = 95mg/l)
Dividiu-se a saliva em tubos com 1,0 ml da saliva com PMSF em colocou-se em Banho-Maria e após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	169,2	-1,18194	0,07	0,07
5 min.	94,75	0,132949	1,36	1,36
10 min.	88,45	0,244215	1,75	1,75
20 min.	87,15	0,267175	1,85	1,85
40 min.	86,4	0,280421	1,91	1,91
60 min.	86,15	0,284836	1,93	1,93
120 min.	87,65	0,258344	1,81	1,81



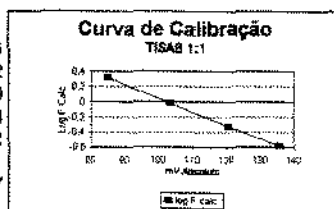
0
5
10
20
40
60
120

Wald.Alf
FEV.18.97

Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva
TISAB II (1:1)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,60208	134,36	-0,58704	0,26
0,25	2	0,5	-0,30103	119,3	-0,32137	0,48
0,5	2	1	0	101,2	-0,00207	1,00
1	2	2	0,30103	83,6	0,308414	2,03

Resultado de Regressão:
Constante 1,783196
Erro padrão de valores estimado 0,018682
R ao Quadrado 0,998459
Nº de Observações 4
Graus de Liberdade 2
Coeficiente(s) X -0,01764 56,7
Erro padrão de coefic 0,00049



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BlankM	193,6	-1,63209	0,02	0,00	
Padrão1M	101,5	-0,00736	0,98	1,00	0,98
Padrão2M	101,4	-0,00559	0,99	1,00	0,99
Média			0,99		
dp			0,00		

Em 22,0 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento:

Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0

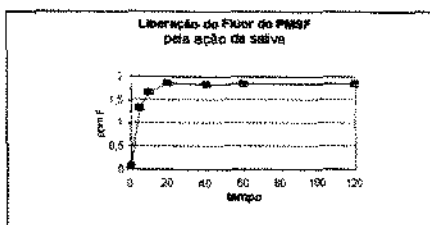
Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo adicionou-se 0,45 ml de PMSF (5mMF = 95mg/l)

Dividiu-se a saliva em tubos contendo 1,0 ml de saliva com PMSF em colocou-se no Banho-Maria e

após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado

o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	170,35	-1,22194	0,06	0,06
5 min.	94,1	0,123184	1,33	1,33
10 min.	88,6	0,220209	1,66	1,66
20 min.	85,85	0,268722	1,86	1,86
40 min.	86,15	0,26343	1,83	1,83
60 min.	86	0,268076	1,85	1,85
120 min.	86,05	0,265194	1,84	1,84



0
5
10
20
40
60
120

Wald.Alf
FEV.19.97

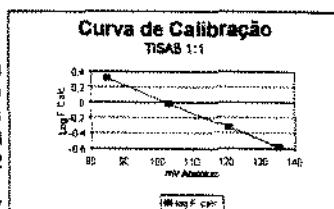
Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva
TISAB II (1:1)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,60206	135,13	-0,5948	0,25
0,25	2	0,5	-0,30103	119,13	-0,30776	0,49
0,5	2	1	0	102,4	-0,00762	0,98
1	2	2	0,30103	84,8	0,308126	2,03

Resultado de Regressão:

Constante 1,829454
Erro padrão de valores estimado 0,010159
R ao Quadrado 0,999544
Nº de Observações 4
Graus de Liberdade 2

Coefficiente(s) X -0,01794 55,7
Erro padrão de coefic 0,000271



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BiancoM	193,6	-1,64377	0,02	0,00	
Padrão1M	102,6	-0,01121	0,97	1,00	0,97
Padrão2M	102,3	-0,00583	0,99	1,00	0,99
Média			0,98		
dp			0,01		

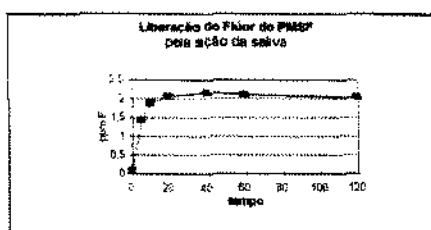
Em 19,0 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento:

Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0

Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo, adicionou-se 0,388 ml de PMSF (5mMF = 95mg/l)

Dividiu-se a saliva em tubos com 1,0 ml de saliva com PMSF em colocou-se em Banho-Maria e após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	163,8	(1,109)	0,08	0,08
5 min.	93,4	0,154	1,43	1,43
10 min.	86,8	0,272	1,87	1,87
20 min.	84,5	0,314	2,06	2,06
40 min.	83,25	0,336	2,17	2,17
60 min.	83,9	0,324	2,11	2,11
120 min.	84,8	0,308	2,03	2,03



0
5
10
20
40
60
120

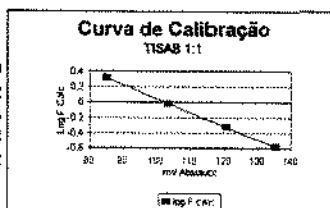
Wald.Alf
FEV.20.97

Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva
TISAB II (1:1)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,60206	136	-0,5906	0,26
0,25	2	0,5	-0,30103	120,2	-0,31385	0,49
0,5	2	1	0	102,7	-0,00732	0,98
1	2	2	0,30103	84,6	0,309715	2,04

Resultado de Regressão:

Resultado de Regressão:	
Constante	1,791559
Erro padrão de valores estimado	0,014572
R ao Quadrado	0,999063
Nº de Observações	4
Graus de Liberdade	2
Coefficiente(s) X	-0.01752
Erro padrão de coefic	0.000379



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BlancM	190,6	-1,54697	0,03	0,00	
Padrão1M	102,9	-0,01083	0,98	1,00	0,98
Padrão2M	102,5	-0,00382	0,99	1,00	0,99
Média			0,98		
dp			0,01		

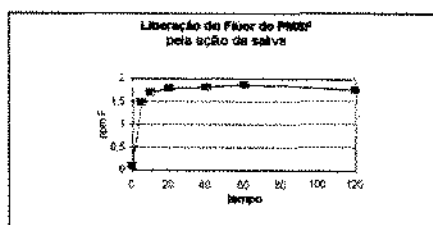
Em 11,6 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento:

Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0

Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo adicionou-se 0,255 ml de PMSF (5mMF = 95mg/l)

Dividiu-se a saliva em tubos contendo 1,0 ml da saliva com PMSF em colocou-se em Banho-Maria e após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	161,4	(1,036)	0,09	0,09
5 min.	92,5	0,171	1,48	1,48
10 min.	89,1	0,231	1,70	1,70
20 min.	87,85	0,253	1,79	1,79
40 min.	87,45	0,260	1,82	1,82
60 min.	86,7	0,273	1,87	1,87
120 min.	88,6	0,240	1,74	1,74



0
5
10
20
40
60
120

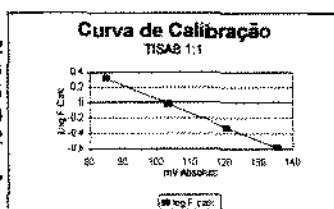
Wald, A.M.
FEV.21.97

Curva de Calibração para Análise de Flúor liberado do PMSF pela Ação da Saliva
TISAB II (1:1)

ppm F	vol. ml	F ug	log F	mV	log F calc.	ug F Calc.
0,125	2	0,25	-0,80206	135,96	-0,58935	0,28
0,25	2	0,5	-0,30103	120,13	-0,31518	0,48
0,5	2	1	0	102,4	-0,0081	0,98
1	2	2	0,30103	84	0,316576	2,04

Resultado de Regressão:

Constante 1,765422
Erro padrão de valores estimado 0,016103
R ao Quadrado 0,998855
Nº de Observações 4
Graus de Liberdade 2
Coeficiente(s) X -0,01732 57,7
Erro padrão de coefic 0,000415



Testes	mV	log F Calc	ug F Calc	ug F Esp.	ppm F
BlankM	193,6	-1,58765	0,03	0,00	
Padrão1M	102,4	-0,0081	0,98	1,00	0,98
Padrão2M	101,9	0,000555	1,00	1,00	1,00
Média			0,99		
dp			0,01		

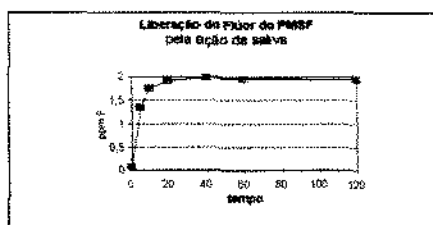
Em 13,0 ml de saliva estimulada foi feito o seguinte tratamento:

Retirou-se 1,0 ml de saliva estimulada + 1,0 ml de Tisab II pH 5,0

Colocou-se a saliva em B.M. 37°C por 5 minutos e após o tempo adicionou-se 0,265 ml de PMSF (5mMF = 95mg/l)

Dividiu-se a saliva em tubos contendo 1,0 ml da saliva com PMSF em colocou-se em Banho-Maria e após os seguintes tempos de 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos foi retirado do BM e adicionado o volume de 1,0 ml de TISAB II pH 5,0 e feita a dosagem de FLUOR.

ANÁLISE	mV	log F Calc	ug F Calc	ppm F
Saliva	168,55	(1,154)	0,07	0,07
5 min.	94,35	0,131	1,35	1,35
10 min.	87,75	0,246	1,76	1,76
20 min.	85,6	0,283	1,92	1,92
40 min.	84,75	0,298	1,98	1,98
60 min.	85,1	0,292	1,96	1,96
120 min.	85,25	0,289	1,95	1,95



0
5
10
20
40
60
120

Anexo 2 - Análise de Flúor nas amostras de Saliva Diurna e Noturna antes e após as ciclagens.

Tab A- Concentração de flúor (ppm) na saliva diurna antes das ciclagens.(FSDAT)

Grupos	Tempo (dias)												média	dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
I	0,101	0,085	0,047	0,056	0,116	0,056	0,101	0,064	0,086	0,088	0,083	0,089	0,081	0,021
II	0,180	0,234	0,178	0,243	0,248	0,243	0,224	0,226	0,299	0,222	0,188	0,257	0,229	0,035
III	0,895	0,905	0,843	0,936	0,897	0,936	0,899	0,882	0,892	0,717	0,716	0,888	0,867	0,074
IV	1,843	2,056	1,927	1,947	1,913	1,947	1,922	1,992	1,979	1,673	1,548	1,749	1,875	0,147
V	0,979	1,127	1,075	1,136	1,104	1,136	1,038	1,063	1,198	1,127	1,019	1,044	1,087	0,062

Tab B- Concentração de flúor (ppm) na saliva diurna após a ciclagem (FSDAC) em função do tempo em relação aos grupos.

Grupos	Tempo (dias)												média	dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
I	0,052	0,074	0,057	0,051	0,097	0,051	0,080	0,049	0,078	0,079	0,067	0,053	0,066	0,016
II	0,085	0,061	0,119	0,096	0,182	0,096	0,186	0,129	0,208	0,206	0,171	0,193	0,144	0,052
III	0,691	0,664	0,821	0,793	0,840	0,793	0,871	0,775	0,899	0,727	0,759	0,845	0,790	0,071
IV	1,550	1,488	1,499	1,433	1,787	1,433	1,819	1,533	1,680	1,632	1,390	1,756	1,583	0,148
V	0,841	1,016	1,004	1,021	1,001	1,021	1,034	0,993	1,075	1,048	0,978	1,001	1,003	0,057

Tab C- Concentração de flúor (ppm) na saliva noturna antes ciclagem (FSNAT) em função do tempo em relação aos grupos.

Grupos	Tempo (dias)												média	dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
I	0,052	0,057	0,049	0,053	0,135	0,053	0,074	0,069	0,070	0,100	0,081	0,073	0,072	0,025
II	0,177	0,179	0,169	0,187	0,231	0,187	0,189	0,253	0,222	0,237	0,206	0,202	0,203	0,027
III	0,959	0,929	0,857	0,784	0,890	0,784	0,735	0,787	0,874	0,745	0,818	0,884	0,837	0,072
IV	1,963	2,172	1,735	2,088	1,886	2,088	1,541	1,836	1,820	1,964	1,877	1,832	1,900	0,172
V	1,104	1,155	1,064	1,053	1,031	1,053	1,069	1,005	1,128	1,151	1,040	1,038	1,074	0,049

Tab D- Concentração de flúor (ppm) na saliva noturna após a ciclagem (FSNAC) em função do tempo em relação aos grupos.

Grupos	Tempo (dias)												média	dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
I	0,045	0,055	0,047	0,042	0,080	0,042	0,069	0,046	0,062	0,075	0,063	0,051	0,056	0,013
II	0,070	0,067	0,087	0,097	0,098	0,097	0,147	0,128	0,112	0,200	0,137	0,166	0,117	0,040
III	0,635	0,245	0,379	0,657	0,295	0,657	0,574	0,632	0,628	0,769	0,548	0,765	0,565	0,171
IV	1,193	0,867	0,988	1,648	1,246	1,648	1,393	1,209	1,344	1,763	1,655	1,662	1,385	0,293
V	0,773	0,407	0,806	0,850	0,599	0,850	0,873	0,817	0,824	1,029	0,842	0,875	0,795	0,156

Anexo 3 - Concentração de Flúor na solução desmineralizante (SD) nos grupos/tratamentos em função do tempo.

Tab.E - Concentração de Flúor na solução desmineralizante antes e após o 6^a e 12^a dias de ciclagens de pH.

Grupos / Tratamentos	Tempo (dias)		
	0	6 ^a	12 ^a
I	0,064	0,051	0,085
II	0,064	0,053	0,100
III	0,064	0,082	0,153
IV	0,064	0,119	0,147
V	0,064	0,104	0,137

Anexo 4 - Porcentagem de recuperação da Dureza Superficial do Esmalte - % Rec. (DSE). Média e desvios padrão das durezas superficial inicial, após desmineralização (cárie) e após as ciclagens (remineralização) para os grupos I a V. Resultados apresentados em Dureza Superficial (comp. Indentação) e Dureza Superficial Knoop, obtidos após todos os tratamentos.

GRUPO I (saliva)					GRUPO I - SALIVA				
Blocos	Inicial # Knoop	DES # Knoop	RE # Knoop	% Rec. # Knoop	Blocos	Inicial Comp.Ind.	DES Comp.Ind.	RE Comp.Ind.	% Rec. DUREZA Comp.Ind.
181	415,1	53,6	68,1	4,0	181	41,40	115,20	102,20	17,62
16	392,1	26,6	104,8	21,4	16	42,60	163,70	82,40	67,13
46	390,2	30,7	50,1	5,4	46	42,70	152,20	119,20	30,14
182	377,7	51,4	78,8	8,4	182	43,40	117,70	95,00	30,55
13	376,0	30,3	40,4	2,9	13	43,50	153,20	132,70	18,89
38	365,8	49,0	95,3	14,6	38	44,10	120,50	86,40	44,63
39	365,8	49,5	73,2	7,5	39	44,10	119,90	98,60	28,10
77	354,5	33,2	68,1	10,9	77	44,80	146,40	102,20	43,50
67	352,9	51,2	108,2	18,9	67	44,90	117,90	81,10	50,41
164	336,2	35,3	73,3	12,6	164	46,00	141,90	98,50	45,26
@AVG	372,7	41,1	76,0	10,7	@AVG	43,75	134,86	99,83	37,60
@STDS	22,8	10,7	21,9	6,2	@STDS	1,33	18,41	16,08	15,39

GRUPO II - 10 µM PMSF					GRUPO II - 10 µM PMSF				
Blocos	Inicial # Knoop	DES # Knoop	RE # Knoop	% Rec. # Knoop	Blocos	Inicial Comp.Ind.	DES Comp.Ind.	RE Comp.Ind.	% Rec. DUREZA Comp.Ind.
E 34	411,1	32,8	141,1	28,6	E 34	41,60	147,20	71,00	72,16
E 68	393,9	46,5	132,4	24,7	E 68	42,50	123,70	73,30	62,07
E 185	390,2	48,6	87,3	11,3	E 185	42,70	121,00	90,30	39,21
E 87	377,7	39,2	172,1	39,3	E 87	43,40	134,70	64,30	77,11
E 32	376,0	50,3	161,4	34,1	E 32	43,50	118,90	66,40	69,63
E 173	367,5	34,7	127,5	27,9	E 173	44,00	143,20	74,70	69,05
E 69	364,2	58,3	164,3	34,7	E 69	44,20	110,50	65,80	67,42
E 37	354,5	38,1	167,9	41,0	E 37	44,80	136,60	65,10	77,89
E 70	351,4	29,3	159,9	40,6	E 70	45,00	155,90	66,70	80,43
E 134	336,2	29,6	107,9	25,5	E 134	46,00	155,00	81,20	67,71
@AVG	372,3	40,7	142,2	30,8	@AVG	43,77	134,67	71,88	68,27
@STDS	22,3	9,8	28,3	9,2	@STDS	1,31	15,77	8,39	11,64

' GRUPO III - 50 µM PMSF

	Inicial	DES	RE	% Rec.
Blocos	# Knoop	# Knoop	# Knoop	# Knoop
E 165	409,2	44,3	182,7	37,9
E 48	393,9	32,5	44,9	3,4
E 45	388,4	33,5	181,0	41,6
E 15	377,7	60,2	245,8	58,5
E 35	376,0	38,6	176,5	40,8
E 76	369,2	55,1	213,7	50,5
E 30	362,5	42,8	188,1	45,5
E 41	356,1	41,1	196,3	49,3
E 156	351,4	35,4	178,1	45,2
E 3	343,7	57,2	235,2	62,1
@AVG	372,8	44,1	184,2	43,5
@STDS	20,4	10,1	54,7	16,0

GRUPO IV - 100 µM PMSF

	Inicial	DES	RE	% Rec.
Blocos	# Knoop	# Knoop	# Knoop	# Knoop
E 63	405,3	27,2	217,5	50,3
E 158	395,8	37,5	186,3	41,5
E 71	388,4	29,4	185,7	43,5
E 179	381,2	55,1	182,1	38,9
E 143	376,0	33,0	191,2	46,1
E 72	369,2	50,4	170,0	37,5
E 78	362,5	27,2	217,5	56,7
E 128	357,7	70,0	239,5	58,9
E 64	349,8	45,2	239,5	63,8
E 170	345,2	54,4	369,2	108,2
@AVG	373,1	43,0	219,9	54,6
@STDS	19,8	14,5	57,8	20,8

' GRUPO III - 50 µM PMS

	Inicial	DES	RE	% Rec. DUR
Blocos	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.
E 165	41,70	126,80	62,40	75,68
E 48	42,50	147,90	125,90	20,87
E 45	42,80	145,80	62,70	80,68
E 15	43,40	108,70	53,80	84,07
E 35	43,50	135,70	63,50	78,31
E 76	43,90	113,60	57,70	80,20
E 30	44,30	129,00	61,50	79,69
E 41	44,70	131,60	60,20	82,16
E 156	45,00	141,80	63,20	81,20
E 3	45,50	111,50	55,00	85,61
@AVG	43,73	129,24	66,59	74,85
@STDS	1,19	14,20	21,12	19,17

GRUPO IV - 100 µM PMSF

	Inicial	DES	RE	% Rec. DUR
Blocos	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.
E 63	41,90	161,70	57,20	87,23
E 158	42,40	137,70	61,80	79,64
E 71	42,80	155,60	61,90	83,07
E 179	43,20	113,60	62,50	72,59
E 143	43,50	146,90	61,00	83,08
E 72	43,90	118,80	64,70	72,23
E 78	44,30	161,60	57,20	89,00
E 128	44,60	100,80	54,50	82,38
E 64	45,10	125,40	54,50	88,29
E 170	45,40	114,40	43,90	102,17
@AVG	43,71	133,65	57,92	83,97
@STDS	1,16	22,07	6,04	8,67

GRUPO V - 1,0 ppm F

	Initial	DES	RE	% Rec.
Blocos	# Knoop	# Knoop	# Knoop	# Knoop
E 172	401,4	31,5	129,2	26,4
E 132	397,6	33,8	145,2	30,6
E 20	386,6	28,3	175,9	41,2
E 160	381,2	44,8	75,5	9,1
E 17	374,3	32,5	220,5	55,0
E 44	370,9	53,2	236,1	57,6
E 2	357,7	43,7	233,5	60,4
E 136	349,8	48,3	203,7	51,5
E 162	345,2	40,0	215,2	57,4
@AVG	373,9	39,6	181,6	43,3
@STDS	20,0	8,5	55,0	17,8

GRUPO V - 1,0 ppm F

	Initial	DES	RE	% Rec. DUREZA
Blocos	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.	Comp.Ind.
E 172	42,10	150,20	74,20	70,31
E 132	42,30	145,10	70,00	73,05
E 20	42,90	158,70	63,60	82,12
E 160	43,20	126,00	97,10	34,90
E 17	43,60	147,90	56,80	87,34
E 44	43,80	115,70	54,90	84,56
E 2	44,60	127,60	55,20	87,23
E 136	45,10	121,40	59,10	81,65
E 162	45,40	133,40	57,50	86,25
@AVG	43,67	136,22	65,38	76,38
@STDS	1,18	14,76	13,68	16,70

Anexo 5 - Resultados absolutos das análises de Flúor incorporado ao esmalte dental após as Ciclagens (FIE).

Tab. F - Concentração de Flúor no Esmalte Após a Ciclagem (FEAC)

Grupo/Tempo	GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV		GRUPO V	
	ppm F	des(gm)	ppm F	des(gm)	ppm F	des(gm)	ppm F	des(gm)	ppm F	des(gm)
1 30	3.523,0	1,90	5.458,7	2,33	17.379,8	12,86	15.665,0	12,94	13.265,8	7,18
1 30	2.793,7	3,90	5.760,5	4,98	7.727,2	26,19	8.440,1	24,58	7.695,2	13,87
1 30	1.768,1	7,10	4.816,3	7,30	4.329,0	40,43	5.315,6	40,82	5.248,7	20,91
1 80	1.462,9	13,03	2.802,0	13,67	2.238,6	68,01	2.491,7	68,66	3.370,0	33,29
1 80	1.097,9	18,13	2.342,5	21,05	1.442,6	97,77	1.677,6	95,28	2.459,5	48,42
2 30	3.012,3	12,36	7.115,2	8,11	4.841,7	13,34	13.504,3	13,45	11.489,2	8,88
2 30	1.966,4	23,89	4.068,1	17,60	3.703,1	24,22	6.580,9	29,13	6.733,1	17,76
2 30	1.680,3	41,95	3.139,3	25,96	1.801,2	39,90	4.347,4	45,01	8.561,7	22,86
2 80	816,2	68,12	2.095,0	42,01	964,6	64,28	2.318,8	78,95	5.885,9	30,82
2 80	717,3	94,29	1.531,4	60,86	542,6	95,10	1.631,3	111,70	4.712,2	39,95
3 30	2.155,8	12,25	4.295,5	14,98	15.901,8	11,20	17.051,2	14,47	13.440,1	11,27
3 30	1.476,3	24,87	2.523,9	29,24	9.601,4	22,96	6.472,9	23,28	7.020,3	22,56
3 30	1.063,4	39,37	2.069,4	47,86	5.676,4	37,31	4.845,3	34,57	6.129,7	36,87
3 80	762,3	64,73	1.091,0	76,12	2.730,1	61,72	2.713,6	57,11	2.742,2	65,35
3 80	645,7	91,13	988,2	105,68	2.058,0	83,36	2.087,5	81,74	1.746,9	89,14
4 30	2.674,6	12,59	7.102,6	15,53	16.207,4	12,31	3.689,9	8,49	12.764,0	8,88
4 30	2.470,6	23,77	4.355,3	31,38	7.462,3	25,37	4.325,5	16,28	8.205,9	17,98
4 30	2.175,9	34,88	2.091,5	47,49	4.104,5	40,34	2.829,2	24,66	5.167,0	27,18
4 80	1.630,2	53,62	1.162,4	75,14	1.806,9	66,84	1.982,4	40,87	1.163,4	76,40
4 80	1.434,9	71,21	816,4	103,32	1.168,9	96,22	1.612,2	57,75	1.169,0	122,06
5 30	2.535,8	8,61	3.818,3	9,88	11.834,2	14,31	12.329,7	14,79	8.176,8	10,05
5 30	2.227,9	16,10	1.989,5	19,05	7.828,8	30,51	5.735,3	29,01	6.058,2	19,23
5 30	1.790,6	23,99	1.809,8	26,03	2.783,0	51,28	3.493,0	44,68	3.671,9	29,59
5 80	1.021,8	41,17	1.176,2	45,86	1.161,8	86,97	1.975,6	77,45	2.234,4	51,20
5 80	869,4	60,06	1.043,3	81,89	734,3	127,79	1.440,0	111,78	1.626,8	76,29
6 30	1.910,7	4,84	8.617,8	8,30	15.893,6	9,94	9.061,7	12,06	2.022,3	10,97
6 30	1.495,4	9,04	3.535,4	18,02	6.826,9	20,52	4.462,8	26,01	1.406,1	22,11
6 30	1.260,4	13,30	2.042,0	26,68	3.947,7	33,44	3.180,2	41,68	1.579,5	32,88
6 80	685,6	23,08	1.170,3	43,41	2.076,4	60,97	2.267,0	71,85	1.676,1	52,37
6 80	572,8	34,30	766,7	70,32	1.308,4	88,82	1.472,3	105,16	2.061,0	75,53
7 30	1.816,3	13,95	8.967,1	7,35	20.283,9	12,73	20.733,7	12,92		
7 30	1.229,9	25,69	4.427,7	13,51	10.506,7	24,25	11.366,7	27,40		
7 30	1.068,5	36,20	3.084,6	20,85	6.238,9	38,22	7.690,6	40,48		
7 80	634,6	58,77	1.861,5	34,78	5.188,4	59,53	4.160,3	65,32		
7 80	515,9	79,55	1.834,6	48,70	2.918,5	81,63	2.428,8	93,57		
8 30	1.779,6	13,28	6.344,7	11,78	10.267,0	9,69	11.364,2	20,88	14.960,9	6,01
8 30	1.430,0	27,09	3.045,6	23,94	10.237,1	19,55	9.625,7	38,03	9.750,5	11,84
8 30	1.178,2	43,15	1.874,9	38,20	3.763,2	30,27	4.323,5	55,26	7.235,8	17,56
8 80	856,9	74,89	1.088,9	58,60	1.713,0	51,06	1.270,6	93,72	5.472,8	31,01
8 80	731,3	114,64	815,3	81,18	977,7	80,10	637,9	132,28	3.215,0	46,27
9 30	2.560,9	14,12	8.169,7	8,36	13.084,5	16,01	17.960,6	12,17	15.467,8	4,12
9 30	1.796,3	28,29	6.054,7	18,28	4.536,2	30,27	11.636,4	23,10	9.935,5	8,41
9 30	1.408,7	42,48	3.641,3	25,47	2.719,8	45,22	7.493,6	34,53	6.676,1	14,43
9 80	763,6	69,47	1.970,1	44,33	1.408,9	70,89	4.106,4	57,82	3.872,5	24,42
9 80	703,8	94,63	1.058,3	68,66	894,6	99,01	2.467,2	81,52	2.526,1	34,91
10 30	3.478,6	7,49	6.930,1	6,65	11.842,9	6,07	15.848,6	10,17	13.275,6	7,46
10 30	2.636,2	13,17	4.088,6	13,59	7.663,8	11,22	9.221,2	19,51	9.795,7	12,75
10 30	2.129,2	19,02	2.885,1	21,27	5.968,0	16,76	6.205,4	30,35	7.571,0	26,47
10 80	1.717,4	28,56	1.456,2	37,44	4.137,4	27,81	4.444,8	48,47	4.351,3	36,00
10 80	1.445,5	38,25	938,6	56,23	3.269,5	41,31	3.117,4	65,35	3.315,1	49,22