



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **DANIELE LABBATE**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 038



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE
METILPARABENO E A REATIVIDADE DO FLUORETO COM O ESMALTE
DENTAL**

Daniela Labbate

Trabalho de conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia, apresentado
à Faculdade de Odontologia de Piracicaba
FOP - UNICAMP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Piracicaba

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Sumário

Resumo.....	03
Introdução.....	04
Material e Métodos.....	05
Resultados.....	09
Discussão.....	14
Referências Bibliográficas.....	18

Resumo

Pierobon et al. (2000) sugeriram que substâncias presentes em enxaguatórios fluoretados usados para a prevenção da cárie dental, como por exemplo o conservante metilparabeno, podem interferir na reatividade do fluoreto com o esmalte dental. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito dose-resposta entre a concentração do conservante metilparabeno e a reatividade do fluoreto com o esmalte dental com lesão cariiosa artificial. Assim, blocos dentais bovinos cariados foram divididos em cinco grupos e submetidos a soluções fluoretadas contendo NaF 0,05% preparadas em laboratório, na ausência ou presença do metilparabeno em diferentes concentrações (1,63; 3,25; 6,5; e 13,0 mM). Após a dosagem de fluoreto nessas soluções, foi feita a reação entre as soluções e os blocos dentais com lesão cariiosa artificial (2 mL/mm² de esmalte dental). Através de biópsia ácida dos blocos dentais, foram removidas duas camadas sucessivas de esmalte e, então, foram realizadas as dosagens de fluoreto incorporado por grama de esmalte. A concentração de fluoreto em cada camada de esmalte removida foi determinada utilizando-se um analisador de íons e um eletrodo íon específico previamente calibrados. Através dos resultados obtidos, observamos que o aumento da concentração de metilparabeno implica em maior incorporação de fluoreto por camadas superficiais removidas, não sendo necessária a utilização do metilparabeno em sua maior concentração, ou seja, 13 mM, pois a concentração de 6,5 mM já é suficiente para permitir a máxima incorporação de fluoreto pelo esmalte. Observamos também que parece existir uma mudança no pH da solução quando esta contém o conservante metilparabeno, o que poderia interferir com a reatividade do fluoreto, porém mais estudos ainda são necessários na tentativa de afirmar se há uma relação direta entre reatividade do fluoreto e pH das soluções fluoretadas contendo metilparabeno.

Introdução

Tem-se discutido que o fluoreto presente em enxaguatórios bucais sofra alteração na incorporação ao esmalte dental por interferência de demais componentes da formulação. Desta forma, Barkvoll et al. (1988) e Barkvoll (1991) verificaram uma diminuição da reatividade do fluoreto tanto na forma de fluoreto de sódio (NaF) como na de monofluorofosfato de sódio (MFP) com o esmalte dental hígido ou cariado devido à presença de outros componentes dos bochechos fluoretados, como o detergente aniônico lauril sulfato de sódio. A exemplo disto, Franco & Cury (1993,1994) também constataram que este detergente, presente no enxaguatório bucal Plax[®], compete com o fluoreto pela ligação no esmalte dental. Além disso, Modesto e Vieira (1995) verificaram que bochechos fluoretados comerciais, que contêm substâncias antibacterianas, apresentaram a reatividade do fluoreto com o esmalte humano reduzida quando comparados com uma solução contendo apenas NaF 0,05%.

Por outro lado, Pierobon et al (2000) constataram que enxaguatórios bucais fluoretados preparados por algumas farmácias de manipulação levaram a uma maior incorporação de fluoreto pelo esmalte dental bovino com lesão cariosa artificial quando comparados a uma solução de NaF 0,05% preparada em laboratório. Neste estudo, esta maior reatividade observada não parecia estar relacionada com pH ou concentração de fluoreto no produto. Desta forma, foi levantada a hipótese de que um dos componentes presentes nos bochechos fluoretados seria o responsável por aumentar a reatividade, já que a solução de NaF 0,05% preparada em laboratório não apresentava outras substâncias em sua composição. Analisando-se os rótulos dos produtos, verificou-se que Nipagin (metilparabeno), um conservante antifúngico, estava presente na composição daqueles enxaguatórios com maior reatividade. Desta forma, estudou-se o efeito da solução contendo NaF 0,05% e Nipagin 0,2%, verificando-se

maior incorporação de fluoreto pelo esmalte dental, se comparado à solução de NaF 0,05% e incorporação estatisticamente semelhante à dos bochechos, cujos rótulos apresentavam o Nipagin (Pierobon, 2000).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a relação dose-resposta entre a concentração de metilparabeno e a reatividade do fluoreto com o esmalte dental bovino com lesão cáriosa artificial.

Material e Métodos

Delineamento experimental

Sessenta blocos dentais (4 x 4 mm) foram obtidos de incisivos bovinos hígidos, estocados a temperatura ambiente em solução de formol 2% pH 7,0 por um período mínimo de trinta dias (White, 1987; Cury et al., 2000) para desinfecção. A superfície de esmalte dos blocos dentais foi polida e lesão de cárie artificial foi induzida. Posteriormente, os blocos dentais foram distribuídos ao acaso em cinco grupos e reagiram com as soluções de tratamento descritas abaixo:

Grupo 1: NaF 0,05%

Grupo 2: NaF 0,05% e metilparabeno 1,63 mM

Grupo 3: NaF 0,05% e metilparabeno 3,25 mM

Grupo 4: NaF 0,05% e metilparabeno 6,50 mM

Grupo 5: NaF 0,05% e metilparabeno 13,0 mM

As concentrações de metilparabeno nas soluções foram determinadas a partir daquela utilizada nos bochechos preparados por farmácias de manipulação que é de 0,2% ou 13,0 mM, de acordo com Pinto et al. (2000).

Antes da reação dos blocos dentais com as soluções de tratamento, a concentração de fluoreto e o pH das soluções foram determinados. Os blocos dentais foram expostos às soluções por 10 minutos sob agitação e o volume utilizado foi de 2

mL de solução por mm² de área exposta do esmalte dental. Posteriormente os blocos dentais foram lavados por 1 minuto em água destilada e deionizada. Após a reação, o pH de cada solução foi novamente determinado.

Determinação de flúor nas soluções testes

As amostras das soluções foram diluídas 20 vezes e, em seguida, misturadas com TISAB II (Tampão acetato 1 M pH 5,0 contendo NaCl M e CDTA a 0,4%) na proporção de 1:1. A determinação de fluoreto foi feita em duplicata e utilizando eletrodo específico ORION 96-06 e analisador de íons EA 940, previamente calibrado, com padrões contendo 2,0 a 20,0 µg F/mL.

Determinação de pH

O pH de cada solução foi determinado antes e após as reações com os blocos dentais, sendo para isso necessária a utilização de um peagômetro previamente calibrado com padrões de pH 4 e 7.

Preparo dos blocos dentais de esmalte bovino e indução de lesão cariosa artificial

Os incisivos bovinos hígidos, após a extração, foram lavados com água destilada e deionizada e armazenados a temperatura ambiente em formol a 2% pH 7,0 por um período mínimo de 30 dias (White, 1987; Cury et al., 2000) para desinfecção. Sessenta blocos (4x4x2 mm) de esmalte dental foram obtidos, com o auxílio de cortadeira, 2 discos diamantados de dupla face e um espaçador de 4 mm. Para a planificação da superfície de esmalte dos blocos dentais, foi utilizada polítriz com lixas de granulação de 320, 600 e 1200. As dimensões de cada bloco dental foram determinadas com o auxílio de um paquímetro digital.

Posteriormente, as superfícies dos blocos dentais foram recobertas com verniz de unha ácido-resistente, exceto na porção onde há a presença de esmalte, a qual foi exposta à solução desmineralizadora tampão acetato 0,05M, 1,2 mM de cálcio, 0,7 mM de fósforo, pH 5,0 contendo 0,02 ppm de fluoreto. Os blocos dentais ficaram submersos em 2 mL de solução por mm² de área exposta, por 16 horas na estufa a 37°C. Após este tempo, os blocos dentais foram lavados com água destilada e deionizada e armazenados em ambiente úmido a 4°C.

Tratamento dos blocos de esmalte dental bovino com as soluções fluoretadas

Os sessenta blocos de esmalte dental bovino foram distribuídos ao acaso em cinco grupos, correspondentes às respectivas soluções fluoretadas previamente descritas. O volume de solução por área do bloco foi de 2 mL/mm² e o tempo de reação foi de 10 minutos na mesa agitadora com a velocidade de 100 rpm. Após a reação, os blocos foram lavados por 1 minuto em água destilada e deionizada.

Dosagem de fluoreto no esmalte dental

Após a reação dos blocos com as soluções de tratamento, foi realizada a biópsia (Koo e Cury, 1998), removendo-se duas camadas consecutivas de esmalte a partir da imersão do bloco dental em diferentes tubos de ensaio contendo 0,25 mL de ácido clorídrico 0,5 M sob agitação constante por tempos de 15 e 15 segundos. Foi então adicionado a cada tubo um volume igual de TISAB II pH 5,0 (20 g NaOH/L), a fim de neutralizar o ácido e tamponar a solução para determinação de fluoreto. A concentração de fluoreto em cada camada de esmalte removida foi determinada utilizando-se um analisador Orion EA 940 e um eletrodo íon específico Orion 96-09, previamente calibrados com padrões de 0,02 a 1,28 µg F/mL. A quantidade (g) de esmalte dental removido durante cada ataque ácido foi determinada a partir da

dosagem colorimétrica de fósforo inorgânico (Pi) pelo método de Fiske & Subbarow (1925), utilizando-se o espectrofotômetro BECKMAN DU-70 no comprimento de onda 660 nm. Para calcularmos a quantidade de esmalte removido, consideramos um teor de Pi no esmalte de 17,4% e para o cálculo da espessura de cada camada de esmalte consideramos um valor de densidade do esmalte de 2,92 (Lazzari, 1976). Desta forma, determinamos a concentração de fluoreto no esmalte dental em função dos tratamentos na primeira e na segunda camada de esmalte removida através de $\mu\text{g F/g}$ de esmalte, determinamos também a concentração de fluoreto nas duas camadas removidas através da soma dos resultados obtidos na primeira e na segunda camada e o total de fluoreto nas duas camadas através de $\mu\text{g F/mm}^2$, ou seja, concentração de fluoreto nas duas camadas removidas por área dos blocos.

Análise Estatística

As análises foram realizadas considerando a interdependência dos tratamentos deste estudo. Para a avaliação da concentração de fluoreto no esmalte dental, a análise estatística através do teste de Shapiro-Wilks avaliou a normalidade dos dados e os resultados de concentração de fluoreto na segunda camada e de fluoreto total em $\mu\text{g/mm}^2$, foram transformados por $\log(x)$. A análise de variância foi então realizada. Os graus de liberdade dos resultados da concentração de F ($\mu\text{g/g}$ de esmalte) na primeira camada, na segunda camada e de fluoreto total foram desdobrados em regressão polinomial quadrática, e os resultados de fluoreto por área de esmalte foram desdobrados em regressão linear. Para estas análises foi utilizado o SAS. Analisamos também a distância de superfície, tanto para a primeira, quanto para a segunda camada de esmalte dental removida através do teste de Kruskal-Wallis.

Resultados

Na Tabela 1, os resultados de concentração de fluoreto, pH inicial de cada solução, pH da solução após a reação com os blocos de esmalte, e respectiva variação de pH (Δ pH) estão apresentados. Com relação ao pH inicial das soluções, foi observada uma diminuição à medida que a concentração de metilparabeno aumentou, exceto no grupo que continha NaF e metilparabeno 3,25 mM. Verificou-se que o pH final de todas as soluções foi maior do que o pH inicial. A solução de NaF e metilparabeno 1,63 mM apresentou a maior Δ pH (+ 0,56), a qual diminuiu à medida que a concentração de metilparabeno aumentava nas soluções.

Tabela 1. Concentração de fluoreto e pH das soluções.

Soluções	F (μg /mL)	pH inicial	pH final	ΔpH
NaF	235,74	6,06	6,35	+ 0,29
NaF e metilparabeno 1,63 mM	240,06	5,51	6,07	+ 0,56
NaF e metilparabeno 3,25 mM	240,11	5,99	6,09	+ 0,10
NaF e metilparabeno 6,50 mM	227,03	5,75	5,85	+ 0,10
NaF e metilparabeno 13,0 mM	235,77	5,58	5,64	+ 0,06

Na tabela 2, a distância da superfície da primeira e da segunda camadas de esmalte dental removido está apresentada. A análise da distância de superfície, tanto para a primeira camada, quanto para a segunda camada, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, sendo respectivamente, $p=0,229$ e $p=0,5418$ (Tabela 2).

Tabela 2. Distância da superfície (média \pm dp, μm) em relação à primeira e segunda camadas de esmalte.

Tratamentos	1ª camada	2ª camada
NaF	8,20 \pm 1,64 a	9,41 \pm 1,97 a
NaF e metilparabeno 1,63 mM	8,47 \pm 2,35 a	9,26 \pm 2,13 a
NaF e metilparabeno 3,25 mM	6,54 \pm 2,16 a	8,46 \pm 1,63 a
NaF e metilparabeno 6,50 mM	7,76 \pm 2,41 a	8,97 \pm 1,07 a
NaF e metilparabeno 13,0 mM	8,08 \pm 2,13 a	10,10 \pm 3,39 a

Tratamentos com médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados de concentração de fluoreto no esmalte dental em função dos tratamentos, para a primeira e segunda camada dos blocos dentais. Através dos resultados obtidos, podemos observar que à medida que a concentração de metilparabeno aumentava nas soluções, houve também maior incorporação de fluoreto pelo esmalte dental na primeira camada, exceto no grupo que continha NaF e metilparabeno 6,5 mM. A incorporação de fluoreto na primeira camada foi maior nos blocos dentais do grupo contendo metilparabeno na concentração de 13,0 mM. Já na segunda camada de esmalte dental removida, não fica claro que o aumento da concentração de metilparabeno implique diretamente em uma maior incorporação de fluoreto. Apesar de tal fato, houve maior incorporação de fluoreto nos blocos dentais tratados com NaF e metilparabeno 13,0 mM e menor incorporação foi observada naqueles tratados com NaF.

Tabela 3. Concentração (média \pm dp) de fluoreto no esmalte dental em função dos tratamentos e camada de esmalte removida.

Tratamentos	1ª camada ($\mu\text{g F/g}$)	2ª camada ($\mu\text{g F/g}$)	fluortotal ($\mu\text{g F/g}$)	total μg ($\mu\text{g F/mm}^2$)
NaF	642,4 \pm 136,2	539,0 \pm 118,1	1181,2 \pm 216,5	3,3 \pm 1,1
NaF e metilparabeno 1,63 mM	843,7 \pm 162,6	804,6 \pm 252,4	1648,3 \pm 196,6	4,1 \pm 0,9
NaF e metilparabeno 3,25 mM	978,5 \pm 154,5	783,9 \pm 107,2	1762,4 \pm 225,3	3,8 \pm 1,0
NaF e metilparabeno 6,50 mM	896,4 \pm 153,9	777,0 \pm 201,7	1673,4 \pm 337,1	4,0 \pm 1,0
NaF e metilparabeno 13,0 mM	934,8 \pm 217,0	889,0 \pm 140,7	1835,7 \pm 455,9	4,5 \pm 1,3

A figura 1 mostra que existe uma relação direta entre a concentração de F na primeira camada removida do esmalte e a concentração de metilparabeno nas soluções de tratamento. Esta regressão polinomial quadrática apresenta um $R^2 = 0,6874$, sendo estatisticamente significativa ($p=0,00290$).

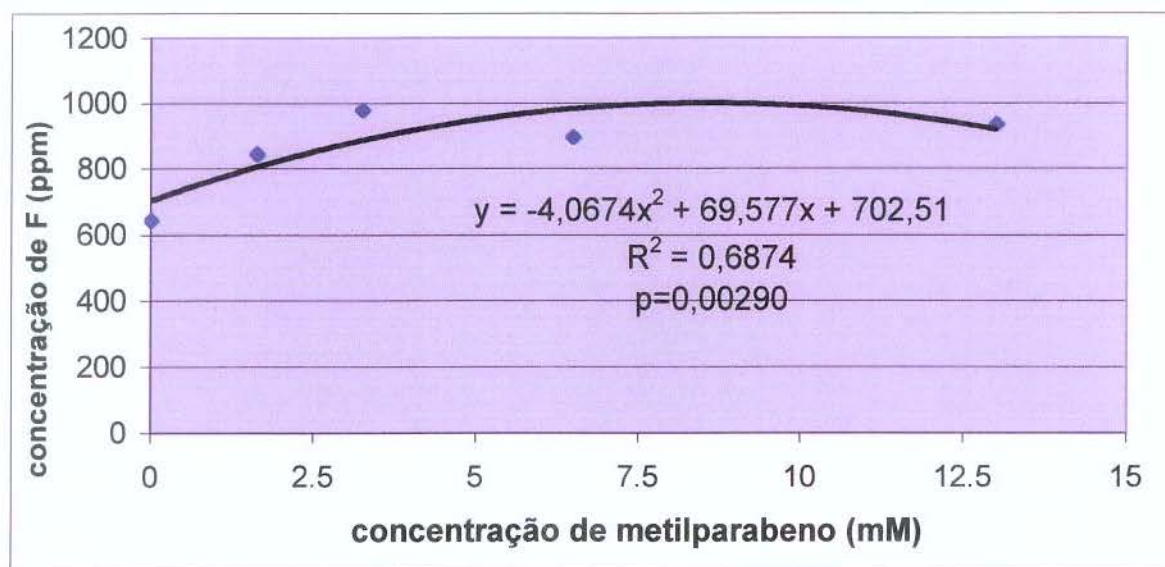


Figura 1. Gráfico de dispersão e equação de regressão ajustada aos dados da concentração de F na primeira camada removida do esmalte dental em função da concentração de metilparabeno das soluções de tratamento.

A figura 2 mostra a relação dose-efeito entre o logaritmo da concentração de F na segunda camada de esmalte removida e a concentração de metilparabeno nas soluções de tratamento. Esta regressão polinomial quadrática apresenta $R^2 = x$, sendo estatisticamente significativa ($p=0,04261$).

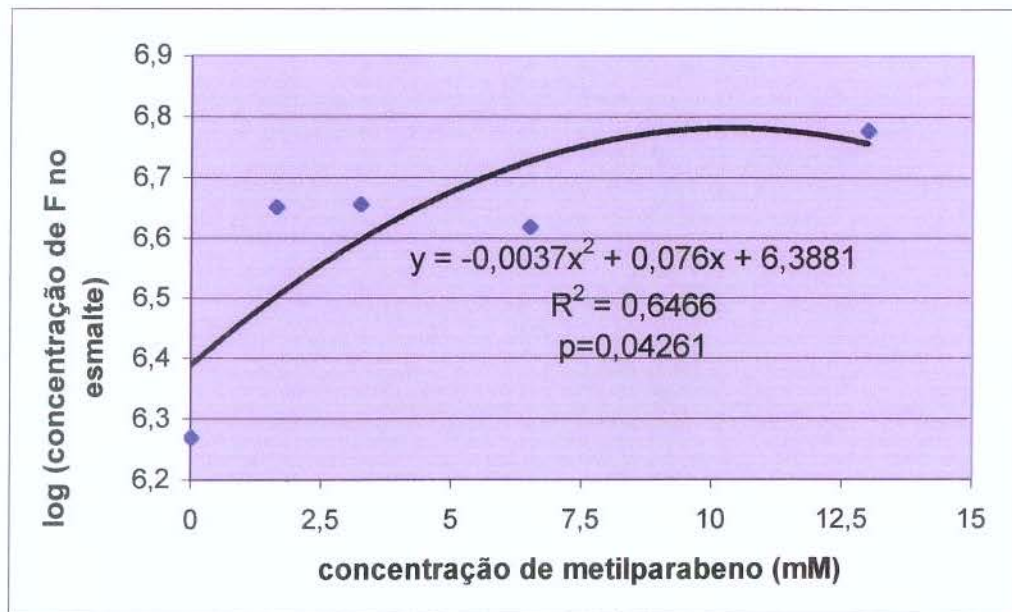


Figura 2. Gráfico de dispersão e equação de regressão ajustada aos dados da concentração de F na segunda camada removida do esmalte dental em função da concentração de metilparabeno das soluções de tratamento.

A figura 3 mostra que existe uma relação direta entre a concentração de flúor total (ppm) e a concentração de metilparabeno nas soluções de tratamento. Esta regressão polinomial quadrática apresenta um $R^2 = 0,6890$, sendo estatisticamente significativa ($p=0,00951$).

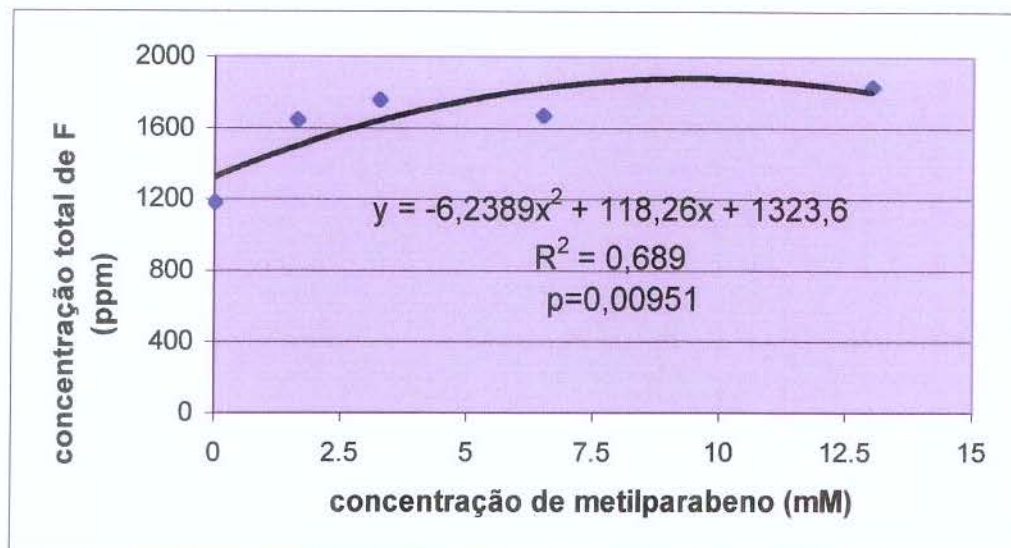


Figura 3. Gráfico de dispersão e equação de regressão ajustada aos dados da concentração total de fluoreto (ppm) em função da concentração de metilparabeno das soluções de tratamento.

A figura 4 mostra a relação dose-efeito entre o logaritmo da concentração de flúor total (μg) e a concentração de metilparabeno nas soluções de tratamento. Esta regressão linear apresenta $R^2 = x$, sendo estatisticamente significativa ($p = 0,02097$).

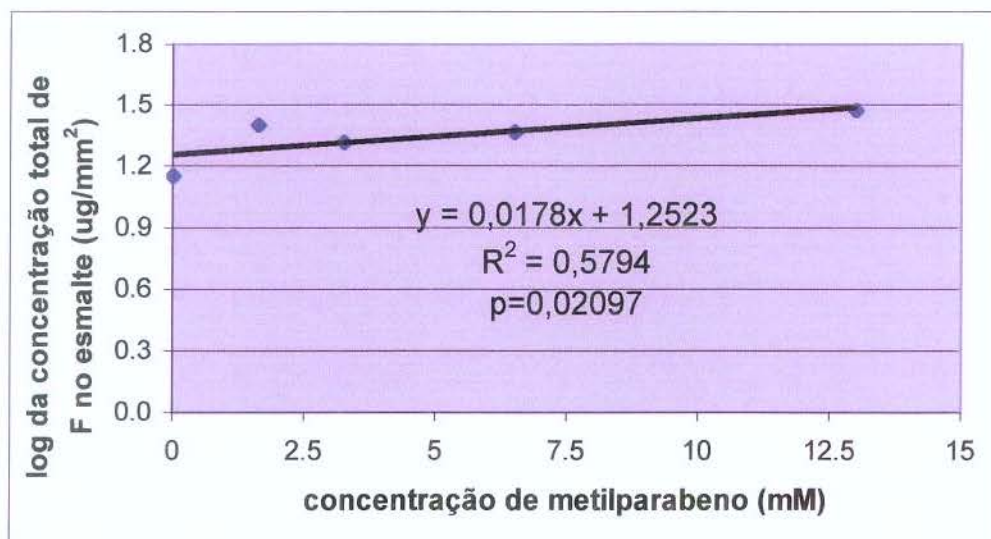


Figura 4. Gráfico de dispersão e equação de regressão ajustada aos dados da concentração total de fluoreto ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) em função da concentração de metilparabeno das soluções de tratamento.

Discussão

Já tem sido discutido que a presença de determinados compostos pode alterar a reatividade do fluoreto presente em enxaguatórios. Caslavská & Gron (1983) e Gron & Caslavská (1983) relataram que agentes de ação de superfície, quando presentes em soluções fluoretadas, aumentam a deposição de fluoreto no esmalte dental por alterarem esta interação.

Pierobon et al. (2000) e Arthur et al. (2002) mostraram que determinadas formulações de enxaguatórios bucais apresentaram maior reatividade do fluoreto com o esmalte dental, sugerindo que conservantes, como o metilparabeno, fossem os responsáveis por tal efeito. Dessa forma, para melhor avaliar a relação do metilparabeno com o aumento da incorporação de fluoreto pelo esmalte dental, tornou-se necessário um estudo utilizando-se o conservante em diferentes e crescentes concentrações, estudando a relação dose-resposta.

No presente estudo, em relação ao fluoreto presente no esmalte dental com lesão cariiosa artificial, constatou-se que houve diferença na quantidade de fluoreto presente na primeira camada removida, comparando-se os vários tratamentos. Observou-se que, à medida que a concentração de metilparabeno nas soluções aumentou, houve maior incorporação de fluoreto pelo esmalte dental, verificando a relação dose-efeito do metilparabeno da solução com o fluoreto do esmalte. Os resultados também sugerem que tal efeito do metilparabeno não ocorreu apenas em sua maior concentração, ou seja, 13,0 mM, sendo que a concentração de 6,5 mM já parece ser suficiente para permitir uma maior incorporação de fluoreto pelo esmalte (Figura 1), pois a partir de 6,5 mM de metilparabeno tal efeito parece ter atingido um platô.

É importante ressaltar que o pH exerce papel fundamental na reatividade do fluoreto com o esmalte dental (Friberger, 1975; Saxegaard & Rølla, 1988; Larsen, 2001;

Delbem & Cury, 2001). Assim, foi importante a determinação do pH das soluções antes e após a reação com os blocos dentais com lesão cariiosa artificial. Os resultados do pH inicial, isto é, o pH das soluções antes das reações com os blocos de esmalte dental, estão na faixa de 5,58 a 6,06, o que significa um intervalo de 0,48. De acordo com estes resultados parece existir uma ligeira mudança no pH da solução quando esta contém o conservante metilparabeno, o que poderia interferir com a reatividade do fluoreto. À medida que aumentou a concentração de metilparabeno houve uma queda no pH da solução (Tabela 1) sendo que a solução de NaF e metilparabeno 13,0 mM apresentou o menor pH inicial, o que poderia ser uma hipótese para explicar a sua maior reatividade. Entretanto, tal diferença em relação às outras soluções poderia não ser o único fator envolvido no efeito do metilparabeno e outras pesquisas considerando o pH devem ser realizadas.

Comparando soluções de NaF com pH de 7,1 a 4,5, Friberger (1975) observou que a incorporação de fluoreto na forma de fluorapatita foi mais de cinco vezes maior na presença do menor pH em relação ao maior pH. No entanto, como não há uma grande diferença de pH entre as soluções do presente estudo, não se pode estabelecer com certeza uma relação direta entre a maior reatividade do fluoreto e o pH da solução. Além disso, não foi constante a diferença de pH inicial e final entre os grupos, houve maior variação entre uns grupos (NaF e metilparabeno 1,63 mM), do que em outros (NaF e metilparabeno 13,0 mM, pH baixo em toda reação). Uma hipótese para uma futura pesquisa seria a utilização de um tampão que pudesse manter o pH constante, de tal forma a evitar tais variações.

Como a relação dose-resposta apresenta um p mais baixo para a primeira camada, pode-se sugerir que o metilparabeno parece facilitar principalmente a incorporação de fluoreto fracamente ligado "(CaF₂)", presente nas camadas mais superficiais, não acontecendo da mesma forma com as demais camadas, que

apresentam o fluoreto mais firmemente ligado. A extração do fluoreto com KOH poderia remover essa camada de fluoreto fracamente ligado (Gron & Caslavská, 1983). Entretanto, no presente trabalho, na realização da biópsia, optou-se pela extração com ácido mostrando-se a diferença na incorporação de fluoreto entre a primeira e a segunda camada sucessivamente.

Em resumo, os resultados sugerem que o aumento da concentração de metilparabeno implica em maior incorporação de fluoreto por camadas superficiais removidas e que mais estudos ainda são necessários na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação envolvido neste processo.

Agradecimentos

À professora Cíntia, pela dedicação e paciência com que me orientou;

À Sra. Mariza J. C. Soares, técnica do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, pelo auxílio indispensável nas análises laboratoriais;

Aos meus pais, pelo exemplo de luta e superação e pelo amor incondicional;

Ao meu irmão, pelo apoio, pela amizade constante e ajuda inestimáveis;

Ao Thiago, companheiro constante na luta pelas realizações;

Às minhas amigas Paula, Anna Rita, Denise, Aline, Juliana, Camila e Lóci pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas, em especial à amiga Paula por sua força, competência e dedicação de sempre.

Bibliografia

BARKVOLL, P. Effect of sodium lauryl sulfate on the uptake of fluoride from NaF and MFP by etched enamel in vitro. **J Biol Buccale**, v.19, p.235-239, 1991.

BARKVOLL, P., RÖLLA, G., LAGERLÖF, F. Effect of sodium lauryl sulfate on the deposition of alkali-soluble fluoride on enamel in vitro. **Caries Res**, v.22, p.139-144, 1988.

CASLAVSKA, V., GRON, P. Effect of surface-active agents on fluoride-enamel interactions I. **Caries Res**, v.17, p.221-228, 1983.

CRUZ, R., RÖLLA, G., ÖGAARD, B. Formation of fluoride on enamel in vitro after exposure to fluoridated mouthrinses. **Acta odontol Scand**, v.49, p.329-334, 1991.

CURY, J.A., REBELLO, M.A.B., DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, v.37, p.356-360, 1997.

CURY, J.A., REBELLO, M.A.B., DEL BEL CURY, A.A., DERBYSHIRE, M.T.V.C., TABCHOURY, C.P.M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v.34, p.491-497, 2000.

DELBEM, A.C.B., CURY, J.A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. **Am J Dent**, v.15, p.169-172, 2002.

FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem**, v. 66, p.375-400, 1925.

FRANCO, E.M., CURY, J.A. Bochecho com Plax e reatividade do flúor. **RGO**, v.41, p.283-286, 1993.

FRANCO, E.M., CURY,

J.A. Effect of Plax prebrushing rinse on enamel fluoride deposition. **Am J Dent**, v.7,p.119-121, 1994.

FRIBERGER, P. The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel. **Scand J Dent Res**, v.83,p.339-344, 1975.

GRON, P., CASLAVSKA, V. Effect of surface active agents on fluoride enamel interactions II. **Caries Res**, v.17, p.304-309, 1983.

HELLWING, E., LUSSI, A. What is the optimum Fluoride concentration needed for the remineralization process? **Caries Res**, v.35 (suppl 1), p.57-59, 2001.

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

LAZZARI, E.P. **Dental Biochemistry**. 2 ed. London:Henry Kimpton Publishers, 1976, 390p.

MODESTO, A., VIEIRA, A.R. Avaliação do fluoreto de enxaguatórios bucais antibacterianos. **Anais da SBPqO**, v.11, p.114, 1995.

PIEROBON, C.N., TABCHOURY, C.P.M., CURY, J.A. Avaliação de produtos odontológicos para prevenção preparados por farmácias de manipulação. **Anais da SBPqO**, v.31, p. 2000.

PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. Eficácia de conservantes. *In Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. Atheneu, 2000. p. 203-210.

RODRIGUES, L.K.A., DALCICO, R., GOMES, V.E., ZANIN, I.C.J., NASCIMENTO, M.M., DUARTE, S, Análise de flúor em enxaguatórios bucais encontrados no comércio brasileiro e o uso de eletrodo íon específico. **RPG**, 2002.

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

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

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