ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE FLÚOR NO ESMALTE DENTÁRIO *IN VIVO* APÓS O USO DE DENTIFRÍCIOS COM CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE FLÚOR E SUA RELAÇÃO COM A BIODISPONIBILIDADE DE FLÚOR NESTES DENTIFRÍCIOS EM COMPARAÇÃO COM OUTROS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS

Kelly Polido Kaneshiro Olympio

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru,
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia,
Área de Odontologia em Saúde
Coletiva

(Edição Revisada)

Bauru
2005

ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE FLÚOR NO ESMALTE DENTÁRIO *IN VIVO* APÓS O USO DE DENTIFRÍCIOS COM CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE FLÚOR E SUA RELAÇÃO COM A BIODISPONIBILIDADE DE FLÚOR NESTES DENTIFRÍCIOS EM COMPARAÇÃO COM OUTROS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS

Kelly Polido Kaneshiro Olympio

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru,
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia,
Área de Odontologia em Saúde
Coletiva

(Edição Revisada)

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Bauru
2005

Olympio, Kelly Polido Kaneshiro

OI9a   Análise da incorporação de flúor no esmalte dentário *in vivo* após o uso de dentifrícios com concentrações reduzidas de flúor e sua relação com a biodisponibilidade de flúor nestes dentifrícios em comparação com outros comercialmente disponíveis / Kelly Polido Kaneshiro Olympio – Bauru, 2004.

140 p.: il.; 30,0 cm

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução total ou parcial desta dissertação por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura da autora:

Data:

Dissertação: Análise da incorporação de flúor no esmalte dentário *in vivo* após o uso de dentifrícios com concentrações reduzidas de flúor e sua relação com a biodisponibilidade de flúor nestes dentifrícios em comparação com outros comercialmente disponíveis

Datas de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa:

18/09/2002: Processo nº086/2002

26/06/2003: Processo nº70/2003

18/11/2004: Autorização de alteração do título, referente aos processos acima citados (Of.nºCEP/28 2004/FOB)

DADOS CURRICULARES

Kelly Polido Kaneshiro Olympio

Filiação	José Kaneshiro Lourdes Polido Kaneshiro
Nascimento	07 de junho de 1976 Santos – SP
1995 – 2000	Curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
2001 - 2002	Curso de Especialização em Odontologia em Saúde Coletiva – APCD
2001 – 2002	Estágio na Disciplina de Odontologia Preventiva da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2003 – 2004	Curso de Pós-Graduação em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva, opção Odontologia em Saúde Coletiva, Programa de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
Associações	Conselho Regional de Odontologia do Estado de São Paulo – CRO – SP Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD Associação dos Pós-Graduandos – APG – FOB / USP Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO

DEDICATÓRIA

“Temos excesso de homens de ciência, mas escassez de homens de Deus.

Captamos o mistério do átomo e rejeitamos o Sermão da Montanha. O nosso é o mundo de gigantes nucleares e pigmeus morais. Sabemos mais a respeito da guerra do que a respeito da paz, mais a propósito de matar do que a propósito de viver”.

Omar N. Bradley

“Se o Senhor não edificar a casa”,

Em vão trabalham os que a constroem.

Se o Senhor não guardar a cidade,

Debalde vigiam as sentinelas.

Inútil levantar-vos antes da aurora,

E retrasar até alta noite vosso descanso,

Para comer o pão de um duro trabalho,

Pois Deus dá aos seus amados até durante o sono.”

Salmo 126

Dedico este trabalho ao meu Senhor e Salvador **Jesus Cristo**. A Ele toda honra e toda glória, agora e para sempre. Amém!

Ao meu marido, **Tony**

“(...) Meu riso é tão feliz contigo, meu melhor amigo é o meu amor...”

“Dois homens juntos são mais felizes do que um isolado, porque obterão um bom salário do seu trabalho. Se um vem a cair, o outro o levanta. Mas, aí do homem solitário: se ele cair, não há ninguém para o levantar”.

Eclesiastes 4, 9-10

Obrigada por ter sido a pessoa mais importante para mim durante todo este tempo em que estamos juntos e, especialmente, pelo auxílio direto, amor e companheirismo dedicados, durante o desenvolvimento deste trabalho. Sem você nada disto teria sido possível.

A você, todo o meu amor e respeito.

Aos meus pais José e Lourdes,

Dedico todo amor e agradecimento pelos conceitos básicos de caráter que alicerçaram minha vida pessoal e profissional, além do incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos,

Minha eterna amizade, carinho e respeito. Que nossa Dulcíssima Mãe Maria continue intercedendo por nós ao seu Filho, como sempre faz, envolvendo-nos em seu manto sagrado.

"Lembrai-vos dos dias de outrora, logo que fostes iluminados. Quão longas e dolorosas lutas sustentastes. Seja tornando-vos alvo de toda espécie de opróbrios e humilhações, seja tomando moralmente parte nos sofrimentos daqueles que os tiveram que suportar. Não só vos compadecestes dos encarcerados, mas aceitastes com alegria a confiscação dos vossos bens na certeza de possuídes riquezas muito melhores e imperecíveis. Não percais esta convicção a que está vinculada a uma grande recompensa, pois vos é necessária a perseverança para fazerdes a vontade de Deus e alcançardes os bens prometidos. Ainda um pouco de tempo – sem dúvida, bem pouco – e o que há de vir virá e não tardará. Meu justo viverá da fé; porém, se ele desfalecer, meu coração já não se agradará dele (Hab 2,3s). Não somos, absolutamente, de perder o ânimo, para nossa ruína; somos de manter a fé, para nossa salvação!"

Hebreus, 10, 32-39

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Por ser o exemplo de profissional que pretendo ser, tanto no que diz respeito à relação aluno-professor, quanto à competência em tudo que faz. O carinho e empenho com que se dedica a nós, alunos, jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos

Pela amizade e incentivo profissional a mim dedicado.

À Priscila Ariede Petinuci Bardal

Pelo apoio e trabalho constante em tantos momentos deste e de outros trabalhos desenvolvidos. A amizade é um dos mais nobres tesouros.

À Vanessa Eid da Silva Cardoso

Pela sua inestimável amizade em todos estes anos e pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Sempre terei você em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários desta pesquisa: Juliana, Laurita, Juan, Joicy, Fábio, Juliane, Juliano, William Fernando, Liliane, Nara, Willian, Augusto, Aline, Adriano, Thiago, Fabíola, Lucilene, Juliano, Karina, Vanessa, Priscila, Marília, Antonio Carlos e Rodrigo. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris

Ao Prof. Dr. Arsenio Sales Peres

À Profa. Ms. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres

À Thelma, Pâmela e Ovídio

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica

Ao Senhor Friedrich e ao Clóvis (FGM)

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, da Universidade de São Paulo, através de sua Diretora, Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro.

À **Prefeitura do Campus Administrativo de Bauru**, da Universidade de São Paulo, através de seu Prefeito, Prof. Dr. José Fernando Castanha Henriques.

À **Comissão de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, através de seu Presidente, Prof. Dr. José Carlos Pereira.

Aos **professores e funcionários** da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em especial aos **professores do curso de Pós-Graduação** e aos docentes da Disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva

Às funcionárias e amigas da Disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva, Sílvia, Marta, Helena e Rosa.

Aos queridos amigos Joicy, Lucilene e Fabíola.

À Maria Fernanda Borro Bijella por ceder várias fotografias que ilustram esta obra.

Ao Padre Jesus Bringas Trueba e a toda Comunidade da Paróquia São Sebastião de Bauru pela amizade e apoio constantes.

Aos funcionários da Biblioteca da FOB-USP e aos funcionários do serviço de xerox.

À **FGM**, pelo auxílio financeiro concedido ao longo do curso para a realização desta e de outras pesquisas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 A importância dos dentifrícios fluoretados na prevalência da fluorose dentária.....	6
2.2 Dentifrícios de baixa concentração de flúor.....	12
2.3 Fatores de interação do flúor com o esmalte.....	20
2.4 Biodisponibilidade de flúor.....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 MATERIAL.....	38
4.1.1 Dentifrícios.....	38
4.1.2 Material utilizado para a realização das biópsias de esmalte dentário e respectivas análises de F.....	39
4.1.3 Material utilizado para a análise de fósforo das biópsias.....	41
4.1.4 Material utilizado para a coleta de saliva total.....	41
4.1.5 Material utilizado para a análise de saliva total (método direto).....	42
4.1.6 Material utilizado para as coletas de urina e saliva do ducto da glândula parótida.....	43
4.1.7 Material utilizado para análise de flúor na urina (método direto), na dieta, na saliva do ducto da glândula parótida e em parte das amostras de saliva total (microdifusão).....	44
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 Estudo de incorporação de F no esmalte dentário.....	47
4.2.2 Estudo de cinética do flúor na saliva total.....	52
4.2.3 Estudo de biodisponibilidade.....	58
5 RESULTADOS.....	70
6 DISCUSSÃO.....	89
6.1 Incorporação de flúor no esmalte dentário e cinética do flúor na saliva total.....	89
6.2 Biodisponibilidade de flúor em dentifrícios com relação ao pH e ao sistema abrasivo.....	97

7 CONCLUSÕES.....	107
ANEXOS.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ABSTRACT.....	141

.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Delineamento do 1º experimento.....	49
FIGURA 2 -	Área demarcada para a realização da biópsia de esmalte dentário – a Fita Mágica® foi colorida de preto para melhor visualização na fotografia.....	52
FIGURA 3 -	Colocação de 5 µL de HCl 0,5 M sobre a superfície do esmalte dentário.....	52
FIGURA 4 -	Leitura imediata de F após a realização da biópsia de esmalte dentário.....	52
FIGURA 5 -	Espectrofotômetro utilizado para a análise da massa de P removida nas biópsias de esmalte dentário.....	52
FIGURA 6 -	Frascos utilizados para coleta de saliva total.....	54
FIGURA 7	Delineamento experimental.....	54
FIGURA 8 -	Preparação da placa de Petri com vaselina.....	57
FIGURA 9 -	Colocação das 3 gotas de NaOH.....	57
FIGURA 10 -	Inserção do HMDS pelo orifício da tampa.....	57
FIGURA 11 -	Padrões pré-difundidos e difundidos prontos para agitação.....	57

FIGURA 12 -	Mesa agitadora (velocidade 2-3).....	57
FIGURA 13 -	Eletrodo Orion 9409 e mini-eletrodo de referência calomelano.....	57
FIGURA 14	Delineamento experimental.....	61
FIGURA 15 -	A – vista externa do Lashley Cup; B – vista interna do dispositivo.....	63
FIGURA 16 -	Dispositivo montado – Lashley Cup acoplado à sonda traqueal e à pêra.....	63
FIGURA 17 -	Dispositivo posicionado para a coleta de saliva do ducto.....	63
FIGURA 18 -	Saliva sendo coletada em eppendorf.....	63
FIGURA 19 -	Detalhe da coleta da saliva do ducto.....	63
FIGURA 20-	Amostras de saliva prontas para serem armazenadas em câmara fria (-20°C) até a leitura.....	63
FIGURA 21 -	Agitação da amostra com o TISAB II.....	67
FIGURA 22 -	Potenciômetro e eletrodo utilizados na leitura da urina...	67
FIGURA 23 -	Média e erro padrão da [F] (ppm) no esmalte dentário, após 15 dias de escovação com cada dentifrício testado	72
FIGURA 24 -	Média e erro padrão da profundidade (μm) da camada de esmalte dentária removida na biópsia após cada tratamento.....	74
FIGURA 25 -	Média e erro padrão da [F] na saliva total após escovação com dentifrícios de diferentes pH e	

concentrações de F, em função do tempo de coleta em minutos.....	77
FIGURA 26 - [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão de dentifrício Sorriso® (I=1500 ppm F, MFP, CaCO_3 , pH 9,5), em função da ordem de coleta ao longo do experimento.....	80
FIGURA 27 - [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão do dentifrício experimental I (1100 ppm F, NaF, sílica, pH 5,5), em função da ordem de coleta ao longo do experimento.....	81
FIGURA 28 - [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão do dentifrício experimental II (1100 ppm F, NaF, sílica, pH 7,0), em função da ordem de coleta ao longo do experimento.....	82
FIGURA 29 - [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão de dentifrício Crest® (VIII=1100 ppm F, NaF, sílica, pH 6,8), em função da ordem de coleta ao longo do experimento.....	83
FIGURA 30 - Média e erro padrão da biodisponibilidade (ASC) de F na saliva do ducto da glândula parótida de cada dentifrício testado.....	84
FIGURA 31 - Quantidade de F excretada na urina antes e depois da ingestão de dentifrício fluoretado em cada regime experimental.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Descrição dos dentifrícios utilizados no presente estudo.....	38
TABELA 2	Características gerais do estudo.....	47
TABELA 3 -	[F] individual e média da superfície do esmalte dentário após a escovação de 15 dias, de acordo com o tratamento utilizado.....	71
TABELA 4 -	Média e erro padrão da profundidade da camada removida (μm) da superfície do esmalte dentário <i>in vivo</i> após os diferentes tratamentos.....	74
TABELA 5 -	Média da [F] ($\mu\text{g/mL}$) $\pm\text{EP}$ (n) na saliva total nos tempos 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 minutos de coleta, após a escovação com diferentes dentifrícios fluoretados.....	76
TABELA 6 -	Biodisponibilidade (área sob a curva - ASC) média (intervalo de confiança de 95%) e individual de quatro diferentes dentifrícios fluoretados, obtida através da saliva do ducto da glândula parótida de nove voluntários.....	79
TABELA 7 -	Média e erro padrão da quantidade de F excretado na urina (mg F/h) antes e após a ingestão de quatro diferentes dentifrícios fluoretados.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

F= flúor
[F]= concentração de flúor
FS= flúor solúvel
NaF= fluoreto de sódio
MFP= monofluorofosfato de sódio
PO₃F= monofluorofosfato
Ca= cálcio
CO₂= gás carbônico
CaCO₃= carbonato de cálcio
CaF₂= fluoreto de cálcio
P= fósforo
FGM= FGM produtos odontológicos Ltda.
ppm= partes por milhão
pH= potencial hidrogeniônico
TISAB= total ionic strength adjustment buffer
HMDS= hexametil-disiloxano
HCl= ácido clorídrico
NaOH= hidróxido de sódio
M= molar
µg= micrograma
mV= milivolt
mL= mililitro
mg= miligrama
s= segundos
sec= seconds
min= minuto (s), minute (s)
h= hora (s)
DP= desvio padrão
EP= erro padrão
p= nível de significância
ASC= área sob a curva

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: avaliar a [F] incorporado ao esmalte dentário clinicamente hígido, após a utilização de dentifrícios com concentrações reduzidas de F; analisar a cinética do F dos dentifrícios fluoretados na saliva total e avaliar a biodisponibilidade do F destes dentifrícios com relação ao pH e sistema abrasivo. No 1º estudo, cruzado e duplo-cego, foram testados os seguintes dentifrícios: formulações experimentais de 1100, 550, 275 ppm F, NaF (pH 5,5), Crest® (1100 ppm F, NaF, pH 6,5 - controle positivo), Colgate Baby® (500 ppm F, NaF, pH 6,9) e um dentifício sem F, pH 5,5 (controle negativo). Dezesseis voluntários (18 - 35 anos) escovaram seus dentes 3 vezes ao dia com os dentifrícios testados, durante 2 semanas com cada concentração. As etapas diferiram de acordo com o dentifício utilizado e foram separadas por um intervalo de 1 semana. Biópsias foram realizadas, aplicando-se 5 µL de HCl 0,5 M, sobre a área delimitada na superfície do incisivo (5 s), seguida da neutralização da área por aplicação de 5 µL de NaOH 0,25 M, por 2 vezes. O 2º experimento constituiu-se de um estudo duplo-cego realizado em cinco etapas, nas quais 10 voluntários (18 - 35 anos) escovaram com os dentifrícios fluoretados descritos anteriormente. As cinco etapas foram separadas por intervalos de uma semana, período durante o qual foi utilizado dentifício placebo. Foram realizadas coletas de saliva não estimulada (3 min) nos tempos “baseline”, 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 min, após a escovação com 1,5 g do dentifício proposto. No 3º experimento, a biodisponibilidade do F foi avaliada em relação ao pH e ao sistema abrasivo em um estudo duplo-cego. Nove

voluntários (18 - 35 anos), em jejum por 12 horas, ingeriram 2 mg F administrados como solução de dentifrício. Nas etapas I a IV, os dentifrícios ingeridos foram: Sorriso Dentes Brancos® – 1500 ppm F (MFP), CaCO_3 , pH 9,5; 1100 ppm F (NaF), sílica, pH 5,5; 1100 ppm F (NaF), sílica, pH 7,0 e Crest® -1100 ppm F (NaF), sílica, pH 6,5, respectivamente. As quatro etapas foram separadas por intervalos de uma semana. Eles ficaram em jejum por mais 8 h, recebendo apenas um lanche padronizado de baixo conteúdo de F (0,07 mg). Amostras de saliva extraída diretamente do ducto da glândula parótida foram coletadas antes da ingestão do F e depois disso, de 20 em 20 min até 2 h, a cada 40 min até 4 h e a cada hora até 8 h. A urina foi coletada 24 horas antes e durante o dia experimental. Nos três experimentos, o F foi analisado pelo método direto ou com o eletrodo íon-específico, após difusão facilitada com HMDS e o P foi analisado pelo método colorimétrico. Os dados foram testados pelo cálculo da ASC da saliva do ducto, por análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dentifrícios testados, quanto à incorporação de F pelo esmalte. Com relação à [F] na saliva total, o dentifrício de 550 ppm F foi similar ao padrão ouro. O cálculo da ASC demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa da biodisponibilidade entre os dentifrícios. Os dados da urina mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dentifrícios ingeridos. Os resultados sugerem que dentifrícios de baixa [F] e pH ácido são efetivos em elevar os níveis de F na saliva adequadamente quanto à

prevenção de cárie dentária, sendo que a biodisponibilidade de F destes dentifrícios não é afetada pelo pH ou sistema abrasivo.

Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

Dentífrícios contendo F são utilizados universalmente em grande parte do mundo e são sugeridos como um dos fatores mais importantes que contribuíram para a diminuição da prevalência da cárie dentária (RØLLA et al.¹²⁶, 1991). Na Suécia e em outros países industrializados, aproximadamente, 90% de todos os dentífrícios vendidos são fluoretados. Assim, é razoável afirmar que a grande diminuição na incidência de cárie dentária observada nos últimos anos seja devida, consideravelmente, aos dentífrícios fluoretados (BRATTHALL¹⁵, 1996; NARVAI⁹⁵, 1999).

Por outro lado, a ingestão excessiva de F durante o período de desenvolvimento dos dentes pode causar fluorose dentária. A exposição ao F tem aumentado nas últimas décadas e várias recomendações têm sido feitas para limitar a ingestão de F a níveis que proporcionem o máximo de benefícios, minimizando riscos. Há evidências de que a ingestão de dentífrícios fluoretados por crianças pequenas contribui para o desenvolvimento de fluorose dentária (EKSTRAND; KOCH; PETERSSON⁴⁶, 1983; BELTRÁN; SZPUNAR¹¹, 1988; OSUJI¹⁰⁷, 1988; WARREN; LEVY¹⁴⁰, 1999; MASCARENHAS⁸⁴, 2000).

Assim, o desenvolvimento de medidas para reduzir a ingestão de F pelas crianças é necessário. Duas alternativas têm sido sugeridas. A primeira é a de reduzir a quantidade do dentífrício colocado sobre as cerdas da escova dentária. Esta é uma medida importante, mas muitos pais trabalham e passam todo o dia fora de casa, sendo que as pessoas que

cuidam das crianças nem sempre seguem estas instruções. Além disso, o sabor dos dentifrícios destinados ao público infantil estimula sua ingestão. Por estes motivos, tem sido proposto que dentifrícios de baixa [F] sejam produzidos e comercializados, como já tem sido feito em muitos países. (BELTRÁN; SZPUNAR¹¹, 1988; PETERSSON et al.¹¹⁶, 1989; HOROWITZ⁷¹, 1992) e, recentemente, no Brasil (BARDAL et al.⁷, 2003). É possível que a redução da [F] do dentifrício reduza a sua efetividade anticárie. Assim, o dentifrício com baixa [F] ideal não deve somente diminuir a ingestão de F, mas também ser igualmente efetivo na prevenção de cárie dentária, assim como os dentifrícios comercializados de 1000-1500 ppm F.

Há um consenso na literatura de que o CaF_2 fracamente ligado ao esmalte dentário é o responsável pelo efeito anti-cárie do F tópico. (SAXEGAARD; ROLLA¹³⁰, 1989; LARSEN; RICHARDS⁸⁰, 2001) e estudos têm demonstrado que o pH influencia consideravelmente na difusão de F no esmalte (PETERSSON et al.¹¹⁶, 1989). Uma diminuição do pH também aumenta a formação de CaF_2 sobre a apatita. Entretanto, a influência do pH na absorção gástrica de F deve ser considerada.

É possível que o pH baixo do dentifrício aumente a absorção gástrica de F. O F é prontamente absorvido pelo estômago (MESSNER; OPHAUGH⁹⁰, 1993). WHITFORD; PASHLEY¹⁵⁰ (1984) relataram que a absorção gástrica é pH dependente, com maior absorção em pH baixo. Além disso, para que o F dos dentifrícios afete o desenvolvimento do esmalte dentário, deve ser absorvido. Embora a absorção de F dos dentifrícios tenha sido relatada como sendo em torno de 100%, se a formulação do dentifrício

contiver um abrasivo à base de Ca, a absorção de F, tanto na forma de NaF como na forma de MFP pode ser reduzida significativamente. Preparações contendo CaCO_3 e/ou fosfato de cálcio como agentes de polimento podem se ligar à considerável parte do F presente no intestino delgado, evitando que esta parte seja absorvida. Dentifrícios contendo abrasivos inertes ao F (partículas plásticas, dióxido de silício, bicarbonato) não exercem efeitos semelhantes sobre a absorção. Análises cinéticas da [F] no sangue e na urina têm tornado possível estudar a biodisponibilidade, fator que expressa o grau de absorção de F que terá atividade biológica. A coleta de sangue, entretanto, requer punção venosa, o que pode ser muito traumático. Estudos em adultos têm demonstrado uma relação proporcional entre a [F] no plasma e na saliva do ducto da glândula parótida, a qual pode ser obtida de maneira simples e não invasiva.

Com o conhecimento de técnicas de microanálise de F e de estudos de sua biodisponibilidade, é necessário que se avalie a incorporação de F dos dentifrícios de baixa concentração pelo esmalte dentário “in vivo” em relação a um dentifrício “gold standard” e, ao mesmo tempo, seja analisada a toxicidade destes dentifrícios quanto à fluorose dentária comparada àquela das formulações comercialmente disponíveis.

Revisão de Literatura

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

O declínio na prevalência e incidência de cárie dentária nas últimas décadas tem sido atribuído ao amplo uso de F. Entretanto, a prevalência de fluorose dentária tem aumentado simultaneamente.

A utilização dos dentífricos fluoretados tem sido considerada como um dos importantes métodos adotados para o controle da cárie dentária, resultando no declínio de sua prevalência e incidência (BRATHALL¹⁵, 1996; NARVAI⁹⁵, 1999; BASTOS¹⁰, 2005). Por outro lado, a ingestão precoce destes produtos pode levar ao desenvolvimento de fluorose dentária (WARREN; LEVY¹⁴⁰, 1999; BUZALAF et al.²³, 2002).

Este capítulo será escrito em subitens de maneira a explorar melhor os assuntos pertinentes a este trabalho.

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS NA PREVALÊNCIA DA FLUOROSE DENTÁRIA

A fluorose dentária é um defeito do esmalte resultante da exposição à ingestão crônica excessiva de F durante o período de formação dos dentes (SZPUNAR; BURT¹³⁵, 1988; PENDRYS; KATZ¹⁰⁹, 1989). O grau de manifestação da fluorose depende da dose total de F ingerida, do tempo de duração da exposição e também da resposta de cada indivíduo. A resposta individual se refere à massa corpórea, fatores nutricionais, taxa de crescimento ósseo, alteração da atividade renal e homeostasia de cálcio (DENBESTEN³⁴, 1994). Recentemente tem sido explorada também a hipótese da sensibilidade genética à fluorose (EVERETT et al.⁵⁴, 2002).

Entretanto, o fator de risco mais importante para a ocorrência e grau da fluorose dentária é a quantidade total de fluoreto consumida de todas as fontes durante o período crítico de desenvolvimento dos dentes (DENBESTEN³⁵, 1999; FOMON; EKSTRAND; ZIEGLER⁵⁹, 2000; MASCARENHAS⁸⁴, 2000).

ISHII; SUCKLING⁷³ (1991) relataram que o período crítico de exposição para toda a dentição permanente é entre 11 meses e 7 anos de idade. A ingestão excessiva de F por crianças acima de 7 anos não causará fluorose dentária. Entretanto, a faixa de maior risco para a ocorrência de fluorose dentária nos incisivos centrais superiores permanentes, dentes com grande comprometimento estético, é de 15 a 24 meses de idade para os meninos e de 21 a 30 meses para meninas (EVANS; DARVELL⁵³, 1995), embora BÄRDSSEN⁸ (1999) afirme que a literatura discutindo períodos de risco para a fluorose dentária é escassa e os diferentes desenhos de estudos realizados dificultam comparações e interpretações. Baseado em seu estudo de meta-análise, o autor concluiu que nenhum período específico da formação do esmalte dentário é único como sendo o mais crítico para o desenvolvimento da fluorose dentária. A duração de exposição ao F durante a amelogênese, ao invés de períodos específicos de risco, poderia explicar o desenvolvimento de fluorose dentária em incisivos centrais superiores permanentes.

OPHAUG; SINGER; HARLAND¹⁰⁵ (1980) afirmaram que a ingestão diária de F entre 0,05 e 0,07 mg/kg peso corporal/dia “é geralmente considerada ótima”. FORSMAN⁶² (1977) relatou que a fluorose dentária

ocorre provavelmente quando a ingestão de F por crianças excede 0,1 mg/kg peso corporal/dia. No entanto, trabalhos realizados no Quênia mostraram fluorose dentária com ingestão média de F tão baixa quanto 0,04 mg/kg peso corporal/dia (BAELUM et al.⁶, 1987). Também FEJERSKOV; BAELUM; RICHARDS⁵⁷ (1996) consideraram que a fluorose dentária poderia ocorrer com doses muito mais baixas que as relatadas até então, observando alterações com doses em torno de 0,02 mg de F/kg peso corporal/dia. Deste modo, pode-se afirmar que a dose “ótima” de ingestão de F adequada para a prevenção de cárie dentária e a não ocorrência de fluorose dentária clinicamente inaceitável ainda não é precisamente conhecida (GUHA-CHOWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE⁶⁶, 1996).

A preocupação com o aumento na prevalência de fluorose dentária fez com que vários estudos fossem desenvolvidos para verificar as razões deste aumento e identificar os fatores de risco (BUZALAF; CURY; WHITFORD²², 2001).

A aplicação regular de F do dentifrício confere proteção contra a cárie dentária por exercer efeito tópico no dente irrompido. O F interage com o sistema dente/placa por quatro mecanismos: redução da solubilidade mineral, inibição da dissolução mineral, inibição da produção de ácidos pelas bactérias da placa e promoção da remineralização (DAWES; CATE³³, 1990; SHELLIS; DUCKWORTH¹³², 1994).

RIPA¹²³ (1991) revisou estudos que investigaram a possível associação entre o uso de dentifrícios fluoretados e a prevalência de fluorose dentária. Ele concluiu que dos dez estudos revisados, nove

(BOHATY et al.¹³, 1989; BUTLER; SEGRETO; COLLINS²¹, 1985; DRISCOLL et al.³⁸, 1983; HOLM; ANDERSON⁶⁹, 1982; KUMAR et al.⁷⁸, 1989; PENDRYZ; KATZ¹⁰⁹, 1989; SOPARKAR; DEPAOLA¹³⁴, 1985; SZPUNAR; BURT¹³⁵, 1988, WOOLFOLK; FAJA; BAGRAMIAN¹⁵⁵, 1989) falharam em encontrar uma associação. Estes estudos, entretanto, não foram desenhados para avaliar os efeitos dos dentifrícios fluoretados como maior foco ou usaram medidas equivocadas para avaliar a exposição ao dentifrício fluoretado. Deste grupo de estudos, somente um (OSUJI¹⁰⁷, 1988) usou metodologias controladas para avaliar a relação entre fluorose dentária e dentifrício fluoretado. Os autores identificaram somente dois fatores, escovação dentária com dentifrício fluoretado antes de 25 meses de idade e uso prolongado de fórmulas infantis, além dos 13 meses de idade, como sendo significativamente associados com fluorose dentária em uma comunidade fluoretada.

Estudos mais recentes, especificamente direcionados ao uso de dentifrícios em maior detalhe, encontraram relação entre o uso precoce de dentifrício e a fluorose dentária (EVANS⁵², 1991; MASCARENHAS; BURT⁸⁵, 1998; MILSON; MITROPOULOS⁹¹, 1990; PEREIRA¹¹², 2000). Além disso, outros estudos usaram métodos controlados para avaliar a relação entre fluorose dentária e o uso precoce de dentifrícios. Todos estes estudos demonstraram relação significativa entre dentifrício fluoretado e fluorose dentária. Um estudo de 157 pacientes com idade entre 8 e 17 anos atendidos na clínica da Universidade de Odontologia Pediátrica, na cidade de Iowa, EUA, identificou a exposição à água fluoretada e ao dentifrício

fluoretado como fatores de risco para fluorose dentária (SKOTOWISK; HUNT; LEVY¹³³, 1995). Um estudo amplo de desenho similar foi conduzido na Prática Odontológica Pediátrica da Carolina do Norte (LALUMANDIER; ROZIER⁷⁹, 1995). Este estudo concluiu que em regiões onde a água de abastecimento público era deficiente em F, a fluorose foi associada com a frequência de ingestão de suplementos fluoretados, sendo que em regiões onde as pessoas consumiram água de abastecimento público fluoretada durante toda sua vida, a fluorose foi associada à idade na qual a criança iniciou a escovação dos dentes com dentifrício contendo F.

De particular interesse é uma série de estudos bem controlados conduzidos por PENDRYS et al. (PENDRYZ; KATZ¹⁰⁹, 1989; PENDRYZ; KATZ; MORSE¹¹⁰, 1994; PENDRYZ; KATZ; MORSE¹¹¹, 1996) em áreas fluoretadas e não fluoretadas da Nova Inglaterra. Nestes estudos, os pais completaram um questionário auto-administrado, detalhado, observando os modelos de alimentação infantil, história residencial, uso de suplementos fluoretados, frequência de escovação com dentifrícios fluoretados e quantidade de dentifrício usada por escovação até os 8 anos de idade. Entre os residentes de áreas fluoretadas, PENDRYS; KATZ encontraram que a fluorose dentária nos graus de leve a moderado estava fortemente associada com o uso (inapropriado) de suplementos fluoretados, freqüente escovação antes da idade de 8 anos e o uso de quantidades de dentifrício maiores que o tamanho de uma ervilha. A porcentagem estimada de casos de fluorose dentária atribuída ao maior uso de dentifrício foi de 21%. (PENDRYS; KATZ; MORSE¹¹⁰, 1994; PENDRYZ¹⁰⁸, 1995).

Entre os residentes de áreas não fluoretadas, PENDRYZ; KATZ¹⁰⁹ (1989) encontraram que a fluorose dentária leve a moderada estava fortemente relacionada com o uso de suplemento de F e à alta renda familiar, mas o uso de fórmulas infantis e dentifrícios fluoretados não foi associado com o aumento de risco para a fluorose. Entretanto, um estudo posterior (PENDRYZ; KATZ; MORSE¹¹¹, 1996) identificou o uso de suplementos de F e freqüentes hábitos de escovação precoce como associados freqüentemente com fluorose dentária de leve a moderada, tanto nas primeiras quanto nas últimas superfícies de esmalte dentário formadas na dentição permanente.

Em um estudo com crianças norueguesas de oito anos de idade, as quais não bebiam água fluoretada, WANG; GROPEN; AGAARD¹³⁹ (1997), identificaram o uso regular de suplementos e dentifrícios fluoretados antes da idade de 14 meses como significantes fatores de risco para a fluorose dentária.

ROCK; SABIEHA¹²⁵ (1997) conduziram um estudo com 325 crianças de 8 e 9 anos de idade vivendo em região otimamente fluoretada, Birmingham, Inglaterra, e encontraram uma forte associação entre fluorose em incisivos centrais superiores e o uso precoce de dentifrícios fluoretados e dentifrícios com alta [F] (1500 ppm). Foi também observado que uma maior proporção de crianças sem fluorose dentária utilizavam dentifrícios comercialmente avaliados como de baixa [F].

Enquanto metodologias de casos controlados, instrumentos de pesquisa mais detalhados e análises de multivariáveis usadas em muitos

destes estudos recentes dão mais crédito às conclusões do que os estudos anteriores, todos estes estudos realizaram avaliação retrospectiva de exposição ao F, somente oito a dez anos depois que as exposições tinham ocorrido. Assim, todos os estudos relacionando o uso de dentifrícios com a fluorose dentária são tendenciosos. Apesar disso, há evidências indicando o uso precoce de dentifrícios fluoretados como um importante fator de risco para a fluorose dentária, considerando que as crianças mais jovens deglutem considerável quantidade de dentifrício. De fato, a quantidade de F ingerida é inversamente relatada à idade da criança (RICHARDS; BANTING¹²⁰, 1996).

2.2 DENTIFRÍCIOS DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR: NECESSIDADES E IMPLICAÇÕES

Há uma grande controvérsia na literatura sobre a efetividade de dentifrícios de baixa [F]. Para NEWBRUN⁹⁸ (1987), os dados documentando que agentes tópicos com baixa [F] sejam tão efetivos quanto agentes de alta [F] em prevenir cáries são esparsos e não convincentes.

Como um acompanhamento de seu estudo de dentifrícios de baixa [F] em crianças com idade entre 3 e 5 anos de idade em uma região fluoretada (WINTER; HOLT; WILLIAMS¹⁵⁴, 1989), HOLT et al.⁷⁰ (1994) compararam a prevalência de fluorose dentária entre grupos que utilizavam dentifrício com alta [F] (1055 ppm) e com baixa [F] (550 ppm), quando as crianças tinham entre 9 a 10 anos de idade. Foi concluído, neste estudo, que o uso de

suplementos de F e o uso de dentifrício padrão (1055 ppm) aumentam significativamente o risco de fluorose dentária na dentição permanente.

Dentifrícios com [F] de 1000 ppm contêm 1,0 mg F/g. Em crianças com menos de 6 anos de idade, a quantidade média de dentifrício por escovação é, mais ou menos, de 0,55 g (RICHARDS; BANTING¹²⁰, 1996), correspondendo a uma exposição de F de 0,55 mg. Uma média de 48% desta quantidade é ingerida por crianças de 2 a 3 anos de idade, 42% por crianças de 4 anos de idade e 34% por crianças de 5 anos de idade (BARNHART et al.⁹, 1974; ERICSSON; FORSMAN⁵⁰, 1969; HARGREAVES; INGRAM; WAGG⁶⁸, 1972; RICHARDS; BANTING¹²⁰, 1996). Assumindo que as médias dos pesos corporais são de 15, 18 e 20 Kg, respectivamente, a ingestão de dentifrício de uma única escovação é de 18, 13 e 9 µg/Kg/dia, respectivamente. Assim, é evidente que a escovação aumenta a exposição ao F, substancialmente, particularmente em crianças de 2 a 3 anos de idade e, logicamente, de maneira especial, se as crianças escovam os dentes mais do que uma vez por dia (FOMON; EKSTRAND; ZIEGLER⁵⁹, 2000). Informação como esta em países em desenvolvimento é rara (CURY²⁹, 2000). Estudos conduzidos com crianças brasileiras de 2 a 3 anos de idade, as quais viviam em áreas com água fluoretada, demonstraram que elas ingeriam 0,061 mg F/Kg de peso corporal/dia (variando de 0,011 a 0,142) de dentifrício e que o mesmo contribuiu com 55% da quantidade total de F ingerido diariamente (LIMA; CURY⁸¹, 2001; PESSAN et al.¹¹⁴, 2002). Em estudo de ALMEIDA¹ (2004), o dentifrício contribuiu com 80% da ingestão diária de F.

LIMA; CURY⁸¹ (2001) realizaram um estudo com crianças de 20 a 30 meses de idade, moradoras de uma cidade com água de abastecimento público fluoretada, no qual verificaram que as crianças estudadas ingeriram, diariamente, uma média de 0,090 mg F/Kg, tendo a dieta contribuído com 45%, e o dentifrício, com 55%. Aceitando-se 0,07 mg F/Kg/dia como limite máximo, para que a dose total encontrada (0,090) seja reduzida até esse valor, três alternativas foram sugeridas: redução da concentração ótima de F na água de abastecimento de 0,7 para 0,3-0,4 ppm; utilização de dentifrícios contendo 600 ppm F solúvel ou utilização de, no máximo, 0,3 g de dentifrício por escovação.

Considerando-se estes achados, é claro que medidas para reduzir a ingestão de F pelas crianças, diminuindo o risco à fluorose dentária são necessárias. É possível que se reduzindo a [F] dos dentifrícios, possa haver redução da atividade anti-cáries. Entretanto, o dentifrício de baixa [F] ideal não deve somente reduzir a ingestão de F, mas também ser igualmente efetivo na prevenção de cáries como as concentrações disponíveis no mercado de 1000-1100 ppm F. Alguns pesquisadores desenvolveram formulações de baixa [F] (550 ppm, NaF) as quais eram tão efetivas quanto ao "gold-standard" Crest® (1100 ppm) em termos de reduzir desmineralização e aumentar a remineralização do esmalte "in situ" (PERES; DEL BEL CURY; CURY¹¹³, 2001) e "in vitro" (BRIGHENTI et al.¹⁶, 2004).

Têm sido realizados muitos estudos clínicos longitudinais sobre a efetividade de dentifrícios com baixas concentrações de F. Alguns deles não

encontraram diferenças significantes entre o dentifrício padrão (1000-1100 ppm) e os dentifrícios com baixa [F] (250-550 ppm F) (FORSMAN⁶¹, 1974; GERDIN⁶⁵, 1974; KOCH et al.⁷⁶, 1982). Em contraste, REED¹¹⁹ (1973); MITROPOULOS et al.⁹² (1984) e KOCH et al.⁷⁶ (1990) concluíram que os dentifrícios com baixas concentrações de F podem ser um pouco menos efetivos do que os dentifrícios de 1000 ppm.

À primeira vista, estes estudos podem sugerir que os dentifrícios com baixa [F] são menos efetivos em termos de prevenção de cárie dentária que o padrão 1100 ppm. Entretanto, destes estudos somente um (GERDIN⁶⁵, 1974) foi conduzido de maneira apropriada, com um grupo pré-escolar. Este estudo não encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre dentifrícios de 250 ppm e os de 1000 ppm. Em vista dos resultados negativos dos estudos citados acima, entretanto, pode ser que a [F] de 250 ppm esteja muito distante do padrão 1100 ppm. Uma formulação mais eficaz pode ter concentrações entre 500-550 ppm F (WARREN; LEVY¹⁴⁰, 1999).

WINTER; HOLT; WILLIAMS¹⁵⁴ (1989) realizaram um estudo com pré-escolares e dentifrícios de 500-550 ppm F. Este estudo de três anos, duplo-cego, comparou a efetividade de dentifrícios com 550 e 1.055 ppm F em crianças que tinham dois anos de idade no “baseline” pela medição dos incrementos no índice ceo. O incremento de cárie foi levemente mais alto (10%) no grupo que utilizou dentifrício de baixa [F] depois de três anos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que "a pasta de dentes com baixa [F] apresentou uma atividade anti-cáries similar ao da pasta controle e poderia, então, ser recomendada para

crianças pequenas". Entretanto, esta conclusão foi baseada em um único estudo e experimentos adicionais de tais dentifrícios devem ser conduzidos.

Em contraste, DAVIES et al.³¹ (2002) conduziram um estudo clínico controlado aleatório por 5 anos com crianças de alto risco à cárie dentária residentes em regiões não fluoretadas, comparando dentifrícios contendo 1450 e 440 ppm F. No início do estudo, as crianças tinham 12 meses e, ao final, 5 a 6 anos. Ao término do estudo, 50% das crianças que escovaram os dentes com dentifrício contendo 1450 ppm F; 58 % das que utilizaram dentifrício com 440 ppm F e 58% daquelas do grupo controle tinham $ceo > 0$, sendo que as diferenças entre o grupo controle e 440 ppm F não foram estatisticamente significantes. Os autores relatam que o fornecimento gratuito de dentifrícios de 1450 ppm F reduziu o ceod das crianças e que um dentifrício contendo 440 ppm F não produziu benefícios significantes em crianças de alto risco à cárie dentária.

Em 2001, BLOCH-ZUPAN¹² afirmou que a efetividade de dentifrícios de baixa [F] não está clara e uma maneira de esclarecer este assunto seria a realização de estudos clínicos adicionais. Assim, AMMARI; BLOCH-ZUPAN; ASHLEY³ (2003) realizaram uma revisão sistemática da literatura para avaliar a eficácia de dentifrícios de baixa [F] quando comparada aos dentifrícios padrão de 1000 ppm ou mais como uma opção aos custos elevados de um estudo clínico deste tipo. Os autores concluíram que a meta-análise dos dados disponíveis indica que dentifrícios de 250 ppm F não são tão efetivos em prevenir cárie dentária na dentição permanente quanto os de 1000 ppm F e que dados comparando dentifrícios de 500 e 1000 ppm

F são muito limitados. Os autores afirmaram que a realização de mais estudos se faz necessária.

Qualquer decisão tomada pelos órgãos oficiais de saúde deveria levar em consideração tanto a efetividade e eficiência anticárie quanto o risco à fluorose dentária. Além disso, os órgãos oficiais de saúde deveriam revisar as exigências feitas para os rótulos dos dentifrícios, de forma que as concentrações de F ficassem mais aparentes, além de formular bulas com instruções de cuidados no uso com crianças jovens. As Agências de Fomento deveriam financiar estudos clínicos adicionais bem controlados com dentifrícios de baixa [F], de duração e acompanhamento suficientes para avaliar tanto a prevenção de cárie dentária, quanto de fluorose dentária. Tais estudos deveriam ser conduzidos com crianças no grupo de idade pré-escolar. Além disto, os fabricantes deveriam ser mais estimulados a produzirem embalagens de dentifrícios com orifícios menores ou com quantidades fixas, como em embalagens "pumps" para o uso de crianças pequenas. Eles também deveriam ser estimulados a alertar os pais sobre o perigo do uso excessivo e da ingestão de dentifrícios flavorizados para as crianças. Dentistas, médicos e outros profissionais, tanto quanto os fabricantes de dentifrício deveriam continuar a recomendar o uso de pequenas quantidades do produto, tanto quanto um grão de ervilha (não mais que 0,25 g) para crianças pequenas. Além disso, os pré-escolares deveriam ser bem supervisionados durante o uso de dentifrícios fluoretados e os mesmos deveriam ser colocados em um local acima da altura da criança, pelos pais ou outro adulto (WARREN; LEVY¹⁴⁰, 1999).

Levando-se em conta a necessidade de se desenvolver um dentífrico de baixa [F] com efetividade anticárie, OGAARD¹⁰⁰ (2001), relata que a interação entre o íon F e os tecidos duros dentais tem sido intensivamente investigada desde que as pesquisas com F foram iniciadas na década de 40. A química deste processo é complicada devido às muitas impurezas da hidroxiapatita como carbonato e magnésio e à grande variedade de concentrações de F, pH e composição dos agentes usados na prevenção de cárie. Durante a ciclagem de pH na placa, o F pode trocar de lugar com a hidroxila, na apatita, e uma série de compostos sólidos com compostos intermediários e propriedades cristalográficas é formada, sendo conhecidos como fluorapatita. Tem sido sugerido que, quando o F é incorporado dentro da estrutura sólida do dente, um mineral mais estável e menos solúvel é produzido. Em baixas concentrações, o F pode se adsorver na superfície dos cristais e estabilizar a estrutura mineral. Em altas concentrações, o CaF_2 é formado, o qual age como um reservatório que libera F durante o desafio cariogênico. O F liberado interfere diretamente nos processos de desmineralização e remineralização. A importância, relativa às diferentes maneiras de interação do F com os minerais dentais, ainda é discutida e, por isso, até certo ponto, influencia o uso clínico de F.

Segundo OGAARD¹⁰⁰ (2001), a formação de CaF_2 sobre os tecidos duros dentais, durante a aplicação tópica de F, depende de muitos fatores tais quais a solubilidade do dente, a superfície hígida ou desmineralizada, a extensão do tempo de exposição ao F, a [F] e o pH dos agentes tópicos. A formação de CaF_2 é maior em lesões iniciais devido à área de superfície

dental aumentada, em comparação ao tecido hígido (BRUUN; GIVSKOV¹⁹, 1991). SAXEGAARD; ROLLA¹²⁹ (1988) visualizaram pelo microscópio eletrônico de varredura e calcularam a formação de CaF_2 sobre a superfície do esmalte depois de diferentes procedimentos. Eles encontraram que a formação de CaF_2 pode ser melhorada pelo aumento da [F] do agente tópico, aumentando a frequência de exposição e diminuindo o pH do agente tópico. Já que a formação de CaF_2 com pH neutro requer altas concentrações de F ou longo período de exposição, um agente fluoretado com baixo pH induz, imediatamente, à formação de grande quantidade de CaF_2 sobre o mineral do dente (OGAARD et al.¹⁰¹, 1988). Usando um modelo *in vivo*, uma inibição quase completa da lesão foi encontrada depois do tratamento tópico com este agente. Isto pode ser possível devido ao maior depósito de F, mas, também, à quase completa cobertura de CaF_2 sobre a superfície, a qual pode bloquear os caminhos de difusão dentro do esmalte. Uma solubilidade mais baixa de CaF_2 comparada à fluorapatita, em pH baixo, parece também um mecanismo provável (ten CATE; DUIJSTERS²⁵, 1983). Em baixo pH, menos fosfato interno é formado, tornando o CaF_2 menos solúvel. Baseado nestes achados, OGAARD et al.¹⁰² (1994) sugeriram a produção de agentes que pudessem induzir CaF_2 de uma qualidade diferente para procedimentos clínicos diferentes: um CaF_2 mais solúvel (por exemplo, com mais fosfato interno) para uso freqüente e um CaF_2 menos solúvel (contendo menos fosfato) para aplicação tópica poucas vezes ao ano. Um CaF_2 de liberação lenta poderia ser benéfico em locais com baixa remoção da cavidade bucal. Em tais locais, um pH baixo

pode desenvolver uma perda rápida e livre de F e reduzir o efeito em longo prazo de aplicações tópicas de F (ARNEBERG et al.⁵, 1997). Isto oferece uma explicação possível da alta prevalência de lesões de mancha branca em dentes superiores anteriores com acessórios ortodônticos colados, apesar da regular exposição ao F, durante a terapia ortodôntica fixa.

A penetração de F no esmalte dentário foi estudada em 1980 por ARENDS; LODDING; PETERSSON⁴. Os autores aplicaram diferentes dentifrícios fluoretados sobre espécimes de esmalte dentário humano e realizaram análises, utilizando espectrometria de massa iônica secundária. Como resultados, os dentifrícios acidulados produziram uma penetração de F no esmalte maior do que os dentifrícios de pH neutro analisados.

Segundo ten CATE²⁴ (1997), das informações disponíveis, o consenso geral sugere que o depósito de CaF_2 se forma em altas concentrações de F. Uma exceção pode ser feita às soluções fluoretadas de pH muito baixo, como com tratamentos com HF “in situ”, onde foram encontradas inibições completas de formação de lesões de esmalte. Este efeito foi atribuído à proporção aumentada da formação de CaF_2 .

2.3 FATORES DE INTERAÇÃO DO F COM O ESMALTE

Este subitem descreve o conhecimento atual dos mecanismos físico-químicos pelos quais o F interage com o esmalte, durante os processos de desmineralização e remineralização. É bem estabelecido na literatura que há dois mecanismos maiores de ação do F que são aumento da

remineralização e inibição da desmineralização (ten CATE; FEATHERSTONE²⁷, 1996).

Em uma exposição simples, pode-se dizer que a bactéria da placa metaboliza carboidratos fermentáveis, produzindo ácidos orgânicos, tais como os ácidos láctico, acético e propiônico. Estes ácidos se difundem da placa para o esmalte e dissolvem o mineral (Ca, fosfato e F) em regiões susceptíveis. Este mineral se difunde para fora do dente, no ambiente bucal, ocorrendo a desmineralização. Se esse processo for revertido, o mineral é reabsorvido para o dente e os cristais danificados são reconstruídos, ocorrendo, assim, a remineralização. O F age inibindo a perda mineral na superfície do cristal e aumentando esta reconstrução ou remineralização do Ca e fosfato para uma forma mais resistente a um subsequente ataque ácido. Esse processo total será mais bem detalhado adiante.

Por muitos anos se acreditou que a incorporação de F no cristal da apatita durante seu desenvolvimento era o mecanismo de ação mais importante do F, deixando o cristal altamente resistente ao ataque ácido quando o dente estivesse erupcionado. Com o conhecimento atual, sabe-se que este modo de ação tem uma pequena importância em comparação com os processos de desmineralização e remineralização.

2.3.1 O esmalte como substrato para o F

A natureza da apatita do esmalte

As várias maneiras como o F interfere no processo carioso podem ser descritas em termos de reações químicas entre o F e o componente inorgânico dos tecidos mineralizados que constituem os dentes.

Para compreender essas reações, é necessário entender a estrutura química, histológica e morfológica dos tecidos mineralizados.

O esmalte dentário tem o mais alto conteúdo mineral de todos os tecidos do corpo humano. É constituído de 96% em peso de um cristal mineral de fosfato de cálcio de composição semelhante à hidroxiapatita. A hidroxiapatita pura tem a fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. No entanto, uma das propriedades intrínsecas de cristais deste tipo é o conteúdo de cristais latentes com grandes quantidades de impurezas. Assim, o esmalte dentário contém muitos elementos traço ou em pequenas quantidades. Essas impurezas podem estar presentes tanto dentro do cristal, como em um estado adsorvido na superfície do cristal. O esmalte dentário contém de 2 a 5% de carbonatos incorporados no cristal e isto representa um papel importante na reatividade do esmalte. Os cristais de esmalte podem assim ser considerados como apatitas carbonatadas, as quais incorporam muitos outros elementos traço, incluindo o F. Vários destes elementos afetam a reatividade do esmalte (CURZON; CUTRESS³⁰, 1983).

A composição do esmalte não é homogênea. Todos os constituintes estão presentes em diferentes concentrações na superfície anatômica e na junção amelodentinária. A densidade e o conteúdo de material orgânico também variam. Tais variações não são encontradas somente em secções transversais, mas em diferentes áreas do dente. O esmalte cervical tem uma

mais baixa densidade mineral que o esmalte oclusal (POOLE; NEWMAN; DIBDIN¹¹⁷, 1981).

Como resultado da precipitação e reações de troca dos fluidos externos, a composição do esmalte muda, tanto durante a formação pré-eruptiva, quanto depois da erupção. Um resultado desta maturação pré e pós-eruptiva é que ambas produzem um gradiente de F no esmalte com valores típicos de 3000 ppm F na superfície anatômica e 100 ppm na junção amelodentinária. O conteúdo de F na superfície de esmalte mais externa depende de diferentes parâmetros, tais como administração de F pré-eruptiva, regimes de F pós-eruptivo, presença de placa, abrasão e atrição (WEATHERELL; NAYLOR; HALLSWORTH¹⁴⁴, 1977).

Histologicamente, o esmalte é arranjado estruturalmente em prismas. Há estruturas semelhantes a cilindros de 4 a 6 μm de diâmetro que se estendem da junção amelodentinária até a superfície anatômica, onde eles alcançam a superfície em um ângulo de 90° a 120°. Embora os prismas possam, em uma primeira aproximação ser descritos como cilindros, em corte transversal, sua aparência tem o formato de buraco de fechadura (ORAMS et al.¹⁰⁶, 1976).

Embora a fase mineral represente em torno de 96% em peso, ocupa somente 85% em volume. Os 15% remanescentes consistem de água, proteínas e lipídios. A proteína e lipídeos, junto com uma grande quantidade de água, constituem os canais de difusão entre os prismas, por onde os ácidos, mineral e F entram ou saem do esmalte durante os processos de des e remineralização.

Solubilidade do esmalte “apatita-like”

A variabilidade da composição e da presença de impurezas, particularmente carbonatos, dentro do cristal, é responsável pela maior solubilidade da apatita do esmalte dentário do que da hidroxiapatita e também pela variabilidade desta solubilidade por todo o esmalte.

Localização do F no esmalte

O F não está homogeneamente distribuído através da espessura do esmalte, mesmo nos estágios mais precoces do desenvolvimento. Em estado não completamente mineralizado, as concentrações de F são mais altas na superfície do dente e baixas no interior. No dente totalmente erupcionado, as concentrações de F aumentam exponencialmente de um nível de platô do interior do esmalte para altas concentrações na superfície do esmalte (IIJIMA; KATAYAMA⁷², 1985; JENKINS; SPIERS⁷⁵, 1953; WEATHERELL; HARGREAVES¹⁴³, 1965). As concentrações também variam topograficamente de maneira consistente na superfície do dente e o padrão muda com a idade e com a experiência dentária. Em um estudo com dentes anteriores jovens, observou-se que as concentrações de F na superfície são mais altas na região incisal e diminuem quando se aproxima do esmalte mais recentemente formado da região cervical. Em dentes de pessoas mais velhas, o padrão é invertido. A [F] na região cervical da superfície do esmalte aumenta, enquanto a inicialmente alta concentração de F na incisal é gradualmente reduzida pelo uso (WEATHERELL; HALLSWORTH; ROBINSON¹⁴¹, 1973).

A aquisição de F pela superfície do esmalte parece continuar enquanto o tecido permanece poroso. O tempo necessário para a oclusão dos espaços de porosidades no dente recém-erupcionado varia com o tipo de dente. Alguns fatores também podem interferir neste processo de maturação pós-eruptiva, o que prolonga o tempo durante o qual o esmalte permanece poroso e o período de incorporação de F. O F, por si só, pode prolongar o processo de maturação e, desde que altas concentrações de F podem se acumular nos poros do tecido, isto pode explicar os altos níveis de F encontrados na camada mais externa do esmalte fluorótico (MCCLURE; LIKINS⁸⁷, 1951).

A penetração de F no esmalte completamente mineralizado é muito lenta. O esmalte completamente mineralizado tem uma densidade aproximada de 2,98 g/mL com uma porosidade tão baixa quanto 0,1% de espaço por volume. Sob circunstâncias normais, o F não penetra em quantidades razoáveis no esmalte hígido e maduro. A criação de porosidades ou a destruição química da estrutura da apatita é necessária antes da [F] em esmalte altamente mineralizado ser significativamente aumentada. Isto acontece quando soluções, géis ou pastas contendo altas concentrações de F são aplicadas à superfície do dente, especialmente em baixo pH, resultando na formação de CaF_2 via dupla decomposição. A formação de apatita fluoretada ou CaF_2 não pode, entretanto, ser o único mecanismo pelo qual o F ocupa a superfície dos tecidos dentários.

Assim, o F ocorre de várias formas em toda a extensão do esmalte e pode ser incorporado dentro ou sobre o cristal como parte da estrutura

cristalina da apatita, fortemente adsorvido à superfície do cristal, fracamente adsorvido à superfície do cristal, ou em alguma outra fase como, por exemplo, o CaF_2 sobre a superfície do cristal de apatita. Cada uma destas possibilidades será brevemente discutida.

F no cristal

O F é incorporado dentro da estrutura do cristal como parte da apatita durante o desenvolvimento do esmalte e a [F] é dependente da incorporação de F durante o desenvolvimento do esmalte e da presença de F no ambiente pós-eruptivo. Recentes estudos têm comprovado que a incorporação de F dentro do cristal não afeta inerentemente a reatividade dos cristais do esmalte. Estudos com apatitas sintéticas incorporando F em concentrações acima de 1000 ppm em apatitas carbonatadas mostraram que as variações de suas dissoluções em ácido não eram diferentes das apatitas carbonatadas que não continham F e que os carbonatos foram os principais responsáveis pela reatividade ao ácido (NELSON et al.⁹⁷, 1983; FEATHERSTONE et al.⁵⁵, 1983).

Estudos similares realizados com esmalte dentário de diferentes origens resultaram em conclusões contraditórias. Uma correlação entre conteúdo de F e susceptibilidade à desmineralização foi encontrada, enquanto outros estudos falharam em estabelecer tal correlação (MELLBERG; RIPA⁸⁸, 1983). Embora essa inconsistência de resultados possa ser explicada pelas diferentes metodologias aplicadas, a conclusão que pode ser tirada é a de que o F firmemente incorporado tem muito menor

importância do que aquele presente no fluido circundante aos cristais, durante os processos de des e remineralização.

F no fluido intercrystalino

É óbvio pelos argumentos acima que a importância da presença do F quando os ácidos penetram entre os cristais durante o processo cariogênico, para diminuir ou inibir o ataque ácido. Preferencialmente, o F deve vir do ambiente externo ou de materiais prontamente solúveis presentes na superfície dos cristais. Isso ocorrerá se o F for aplicado freqüentemente à superfície dentária em pequenas concentrações suficientes para se difundir para dentro do esmalte e também quando houver F presente tanto na superfície, quanto na sub-superfície do esmalte dentário.

Subseqüentemente ao desafio cariogênico, o pH aumenta externamente e dentro da estrutura do dente; se o F estiver presente em baixas concentrações no fluido intercrystalino, aumentará tanto a precipitação de novos minerais como Ca, fosfato e F, quanto o crescimento do cristal quando existirem cristais de esmalte parcialmente dissolvidos. Quando isso acontece, o F presente no fluido intercrystalino aumentará esse processo dramaticamente. A superfície do cristal, então formada, será mais resistente a um subseqüente ataque ácido (FEJERSKOV; BAELUM; RICHARDS⁵⁷, 1996).

Disponibilidade de F no ambiente bucal: fenômenos de transporte e difusão

F no fluido da placa e na saliva e sua relação com a des e remineralização

O F está presente na saliva total em concentrações variando de níveis indetectáveis a níveis mais altos como 10 ou mesmo 20 ppm. O que é importante no processo cariogênico é a [F] na saliva total na boca e não da saliva dos ductos antes, ou depois, do fluido entrar na cavidade bucal. Níveis normais de F na saliva total podem variar entre 0,01 e 0,05 ppm, na maioria das vezes estão mais próximos no nível mais baixo. Alguns estudos têm demonstrado que níveis tão baixos quanto 0,1 ppm F podem ser suficientes para aumentar o crescimento do cristal (BROWN¹⁷, 1974; AMJAD; NANCOLLAS², 1979). O crescimento do cristal é um processo importante durante a desmineralização e remineralização. Assim, níveis elevados de F na saliva durante o dia alterarão favoravelmente o equilíbrio entre dissolução e crescimento do cristal.

Entretanto, no ambiente bucal, a saliva não está em contato direto com o dente e o F pode passar primeiro da placa para a superfície do dente. Tem sido demonstrado que o F pode estar concentrado na placa e, assim, no fluido da placa. Assim, a placa provê uma fonte de F no momento do desafio cariogênico, resultante do metabolismo da placa. Como a placa dentária fermenta carboidratos, ácidos são produzidos, o pH cai e parte do F é complexado na forma de HF, o qual, junto com os ácidos, rapidamente se difunde para dentro do dente. A difusão de F, através da placa, é relativamente alta, aproximadamente 100-10000 vezes mais rápida que a efetiva difusão no esmalte (DIBDIN³⁶, 1984; FEATHERSTONE⁵⁶, 1984).

Assim, do ponto de vista preventivo, é desejável ter uma fonte de F na placa e no fluido da placa e ter isso continuamente recarregado pela saliva. Em termos simples, a placa e saliva agem como fontes de F.

Os tecidos moles bucais como reservatórios de F

Os tecidos moles podem adquirir F durante aplicações tópicas (DUCKWORTH; STEWART⁴¹, 1994). Parte do F é absorvido através do tecido e esta incorporação é pH-dependente porque o F penetra mais facilmente quando é protonado (HF). Depois da absorção, o F é dissociado e pode, não necessariamente, ser facilmente liberado. Entretanto, parte do F presente nos tecidos moles está associado ao Ca; o pré-tratamento com Ca aumenta a retenção de F, enquanto tratamento com EDTA diminui sua retenção (MATSUO; RØLLA; LAGERLÖF⁸⁶, 1990). O F retido nos tecidos moles pode abastecer a saliva com F depois de um bochecho fluoretado, mas provavelmente não é a maior fonte de F (RØLLA; EKSTRAND¹²⁷, 1996).

Difusão de F pelo esmalte

O esmalte dentário é um sólido poroso constituído de cristais em uma matriz de proteínas, lipídios e água. Em média, o esmalte é constituído de 85% de volume mineral, 3% de iguais quantidades de proteínas e lipídeos e o remanescente de água. Os espaços interprismáticos do esmalte são grandes e preenchidos pela matriz orgânica e pela água. Experimentos recentes têm demonstrado que o material orgânico tem um papel muito importante em controlar a variação de difusão de substâncias para dentro do esmalte (tem CATE; FEATHERSTONE²⁶, 1996).

Em resumo, como pode ser visto nas linhas anteriores, o F pode vir do cristal que se dissolve, do fluido intercrystalino, da placa e da saliva. Se está presente no local do ataque ácido ou no local do crescimento do cristal em suficientes e baixas concentrações, pode ter um maior efeito sobre a progressão da cárie ou sua reversão.

Torna-se óbvio pela compreensão do exposto, que dos mecanismos de ação do F com o esmalte, o efeito predominante na inibição da cárie dentária é o F advindo de fontes tópicas.

2.4 BIODISPONIBILIDADE DE F

Não há dúvidas de que dentifrícios contendo F contribuem com a ingestão de F e isso tem sido demonstrado pela medida de elevadas [F] no plasma e na urina, após o uso de dentifrícios (DOOLAND; WYLIE³⁷, 1988; EKSTRAND; ERNEBO⁴⁴, 1980; EKSTRAND; KOCH; PETERSSON⁴⁶, 1983; RAJAN; GNANASUNDARAM; SANTHINI¹¹⁸, 1987).

O assunto do *workshop* realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisa Odontológica em 1994 foi avaliar os possíveis biomarcadores para o acúmulo de F no corpo humano. As vantagens e limitações do plasma, saliva do ducto, urina, unhas, osso e dentina como indicadores da quantidade total de F no corpo foram discutidas (WHITFORD¹⁴⁶, 1994). As evidências demonstraram uma relação direta entre a [F] no osso, o qual contém mais de 99% da quantidade total de F no corpo, e do plasma, obtido de indivíduos em jejum. A coleta de sangue, no entanto, requer que seja feita punção venosa, o que se torna uma desvantagem, principalmente

quando crianças são envolvidas. Isso estimulou a busca por outro fluido corporal com [F] próxima ao plasma e que pudesse ser obtido de maneira simples e não invasiva (WHITFORD et al.¹⁵³, 1999).

Estudos em adultos têm demonstrado uma relação proporcional entre a concentração de F no plasma e na saliva do ducto da glândula parótida (EKSTRAND⁴², 1977; WHITFORD¹⁴⁸, 1996). Nesses estudos, as concentrações salivares foram levemente mais baixas do que no plasma, mas mudaram proporcionalmente, mesmo depois da ingestão de 10 mg F, o que provocou um expressivo e rápido aumento em relação aos níveis “baseline”. Esses achados indicam que [F] na saliva do ducto em adultos é determinada pela concentração simultânea no plasma. Estudo de WHITFORD et al.¹⁵³ (1999) demonstrou esta correlação, também, com crianças de 5 a 10 anos de idade.

Análises cinéticas da [F] no sangue e na urina tornam possível o estudo da sua biodisponibilidade, a qual expressa o grau de absorção de F de uma preparação, a quantidade de F que terá atividade biológica (EKSTRAND; ERNEBO⁴⁴, 1980). Novas preparações estão, continuamente, sendo introduzidas no mercado e um grande número delas contém altas concentrações de F. Estudos sobre a biodisponibilidade dessas preparações providenciam um melhor conhecimento da exposição total da população ao F.

Os dentífrícios são preparações comumente consumidas pela população e a maioria contém por volta de 1000 ppm (EKSTRAND; EHRNEBO⁴⁴, 1980). O dentífrício age pelo contato tópico com os dentes,

mas uma parte deste produto é, geralmente, ingerida durante a escovação (ERICSSON⁴⁷, 1961; BARNHART et al.⁹, 1974). Como já visto anteriormente, o F ingerido dessa maneira, em conjunto com outras fontes de F, pode aumentar a ingestão diária de F. Muitos estudos avaliando a absorção de dentifrícios fluoretados ingeridos têm sido realizados utilizando a excreção urinária de F. No entanto, a excreção urinária é influenciada por mudanças no “clearance” renal e exposição anterior ao F (EKSTRAND; EHRNEBO⁴⁴, 1980). Assim, os autores comparam a [F] no plasma e na urina, após a aplicação intravenosa de F (3 mg) e administração oral (6 mg F) de dois diferentes dentifrícios fluoretados (NaF + partículas plásticas e MFP + carbonato de cálcio) em um estudo com 4 voluntários. Em seus resultados, os autores encontraram que a maioria do F do dentifrício ingerido é absorvida. Em adição, houve uma tendência de biodisponibilidade mais alta de F do dentifrício contendo NaF (111%) contra o MFP (96%).

A absorção do F é de maior importância que sua ingestão, entretanto, quando dentifrícios fluoretados são utilizados há razões teóricas para se esperar variações nessa absorção dependendo das diferentes composições dos produtos. Em preparações contendo carbonato de cálcio e/ou fosfato de cálcio como agentes abrasivos, estes podem se ligar a uma considerável parte do F no intestino delgado, prevenindo, assim, que parte desse F seja absorvida. A esse respeito o MFP difere um pouco das preparações iônicas de F, já que os PO_3F são rapidamente hidrolizados pelas fosfatases intestinais, resultando em íons F e ortofosfato (ERICSSON⁴⁸, 1967). Formulações contendo agentes de polimento inertes ao F (partículas

plásticas, dióxido de silício, bicarbonato) não exercem nenhum efeito similar sobre sua absorção.

O F é rapidamente absorvido pelo estômago, embora o esvaziamento gástrico para o intestino delgado limite a absorção total do estômago para aproximadamente 20-25% de uma dose de F moderada em ratos (NOPAKUN; MESSNER; VOLLER⁹⁹, 1989). WHITFORD; PASHLEY¹⁵⁰(1984) relataram que a absorção gástrica de F é pH-dependente, com maior absorção em baixo pH. O efeito do pH foi observado tanto com animais tratados com agentes estimulantes ou inibidores da secreção gástrica, quanto em experimentos empregando animais com ligaduras em seus estômagos e tratados com soluções de alto e baixo pH. Baseados nessas observações, os autores propuseram que o F atravessa a mucosa gástrica, predominantemente, como ácido fraco HF, ao invés de atravessar como íon F⁻. Os autores também sugeriram que a variação e magnitude da [F] no plasma, após ingestão oral, está em função da acidez gástrica, resultando em maior toxicidade em baixo pH (WHITFORD¹⁵⁰, 1984).

Entretanto, NOPAKUN; MESSNER; VOLLER⁹⁹ (1989); MESSNER; OPHAUG⁸⁹ (1991) demonstraram em seus estudos que, em ratos intactos, sem nenhuma influência sobre a acidez gástrica, o aumento da [F] no plasma foi dependente do esvaziamento gástrico para o intestino delgado. Mesmo em períodos de tempo anteriores, quando a maioria do F permanecia no estômago, a maior parte da absorção de F ocorreu no intestino delgado. O esvaziamento gástrico demorado resultou em um menor aumento na [F] no plasma.

Em 1993, MESSNER; OPHAUG⁹⁰ compararam a importância da acidez gástrica e do esvaziamento gástrico na absorção total de F. Os resultados demonstraram que, inicialmente, a absorção de F foi influenciada pelo pH. Após 40 min, a absorção de F foi comparável em todos os grupos, medindo, aproximadamente 70% da dose inicial. A extensão da absorção do estômago foi inversamente proporcional ao pH, mas a aumentada absorção do intestino delgado compensou a baixa absorção gástrica em alto pH.

Assim, mediante o conhecimento atual, torna-se necessário estudar a incorporação de F pelo esmalte dentário “in vivo” e a cinética do F na saliva de dentifrícios com concentrações reduzidas de F. Além, disso, a probabilidade de um efeito tóxico das formulações propostas em relação à fluorose dentária também deve ser avaliada.

Proposição

---

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo será realizado em três etapas distintas e complementares que terão como objetivo geral compreender os efeitos de dentifrícios de baixa [F]. Seus objetivos específicos são:

- Analisar a incorporação de F ao esmalte dentário clinicamente hígido “in vivo” após o uso de dentifrício placebo com pH 5,5, dentifrícios com pH 5,5 e várias concentrações de F (NaF) (1100, 550 e 275 ppm F), Crest® (1100 ppm F, NaF, pH 6,5) e Colgate Baby® (500 ppm F, NaF, pH 6,9);
- Avaliar a cinética do F na saliva total, após a escovação dentária com os dentifrícios fluoretados descritos acima;
- Analisar a biodisponibilidade de F com relação ao pH e ao tipo de abrasivo utilizado na formulação dos dentifrícios testados em comparação com um dentifrício popular do mercado brasileiro (Sorriso Dentes Brancos®).

Material e Métodos

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Dentifrícios

Os dentifrícios utilizados neste estudo estão descritos e codificados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos dentifrícios utilizados no presente estudo

Marca (Código)	Forma química do F	Agente abrasivo	[F], ppm (rótulo)	[FS], ppm (analisada)	pH (analisado)
FGM, Joinville* (I)	NaF	Sílica	1100	1060,1	5,5
FGM, Joinville* (II)	NaF	Sílica	1100	1060,1	7,0
FGM, Joinville* (III)	NaF	Sílica	550	550,3	5,5
FGM, Joinville* (IV)	NaF	Sílica	275	287,6	5,5
FGM, Joinville* (V)	NaF	Sílica	placebo	54,4	5,5
FGM, Joinville* (VI)	NaF	Sílica	placebo	40,8	6,5
Sorriso Dentes Branços® (VII)	MFP	CaCO ₃	1500	1325,3	9,5
Crest® (VIII)	NaF	Sílica	1100	1062,8	6,5
Colgate Baby® (IX)	NaF	Sílica	500	550,7	6,9

*dentifrícios produzidos especialmente para a pesquisa. Não estão disponíveis no mercado para a comercialização.

O material utilizado nos diferentes procedimentos realizados nesta pesquisa está descrito a seguir.

4.1.2 Material utilizado para a realização das biópsias de esmalte dentário e respectivas análises de F

- ❑ Toalha de papel absorvente (Chifon® Scott, Klabin Kimberly S.A., Mogi das Cruzes, SP, Brasil)
- ❑ Pipeta automática modelo P10 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P20 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P200 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P10 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Caneta marcador permanente CD para plásticos, acrílicos, vinil e vidros (Pilot Pen do Brasil S.A., São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Filme laboratorial (American National Can™, Menasha, WI, EUA)
- ❑ Béqueres de vidro de 50 mL e 150 mL n^{os}. 1000 e 1005, respectivamente (Pyrex®, EUA)
- ❑ Água Bideionizada Dentalville, Joinville, SC, Brasil

- NaOH 0,5 M (a partir de hidróxido de sódio em lentilhas puríssimo para análise, lote 501024, Merck S.A. Indústrias químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- NaOH 0,25 M (a partir de hidróxido de sódio em lentilhas puríssimo para análise, lote 501024, Merck S.A. Indústrias químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- HCl 0,5 M (a partir de ácido clorídrico 37% P.A., lote K27124617 – 945, Merck, Darmstadt, Alemanha)
- TISAB II
- Placas de Petri de poliestireno estéril – 60 x 15 mm, Falcon nº1007 (Becton Dickson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, EUA)
- Estabilizador de corrente elétrica No Break (SMS) – Manager One, Line Interactive, microprocessado (SMS Tecnologia Eletrônica Ltda., Indústria Brasileira)
- Analisador de íons Procyon, modelo SA 720 (Procyon Instrumentos Científica, São Paulo, SP, Brasil)
- Eletrodo específico para íon flúor Orion, modelo 9409 (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA)
- Solução interna do eletrodo (Single Junction, Reference Electrode, Orion Filling Solution, 900001 Orion – Orion Research, Inc. – Beverly, MA, EUA)
- Cronômetro Cronus, modelo TEC 965 (Technos, Zona Franca de Manaus, AM, Brasil)
- Programa Excel - Microsoft®

- ❑ Fita Mágica 3M
- ❑ Pinças
- ❑ Perfurador de fita
- ❑ Escovas Robnson
- ❑ Máscaras
- ❑ Gorro
- ❑ Luvas
- ❑ Roletes de algodão
- ❑ Pasta profilática sem flúor
- ❑ Padrão de NaF Ionplus 100 ppm F⁻ (nº. 940907, Orion Research Inc., Beverly, MA, EUA)

4.1.3 Material utilizado para a análise de P das biópsias

- ❑ Padrão fósforo 3 mg%
- ❑ Ácido molibídico (preparado a partir de 6,25 g de molibdato de amônio, 27 mL de ácido sulfúrico concentrado e tendo seu volume final completado para 250 mL com água deionizada)
- ❑ Reativo redutor (preparado a partir de 0,2 g de ácido alfa amino naftal sulfônico; 1,2 g de sulfeto de sódio e 1,2 g de dissulfito de sódio)
- ❑ Espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV / Visible (Pharmacia Biotech®)
- ❑ Toalha de papel absorvente (Chifon® Scott, Klabin Kimberly S.A., Mogi das Cruzes, SP, Brasil)
- ❑ Agitador de tubos, modelo 251 (Fanem®, São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Balança AND GR202 (Japan)

4.1.4 Material utilizado para a coleta de saliva total

- ❑ Dentífrícios
- ❑ Balança AND GR202 (Japan)
- ❑ Escovas dentárias (Sanifill)
- ❑ Papel alumínio para pesar o dentífrício
- ❑ Espátula para pesar o dentífrício
- ❑ Potes plásticos vazios de filme fotográfico
- ❑ Água bideionizada Dentalville
- ❑ Cronômetro Cronus, modelo TEC 965 (Technos, Zona Franca de Manaus, AM, Brasil)
- ❑ Toalha de papel absorvente (Chifon® Scott, Klabin Kimberly S.A., Mogi das Cruzes, SP, Brasil)

4.1.5 Material utilizado para análise da saliva total (método direto)

- ❑ Frascos JP10
- ❑ TISAB III, Orion Research, Inc Beverly, USA
- ❑ Cronômetros Cronus, modelo TEC 965 (Technos, Zona Franca de Manaus, AM, Brasil)
- ❑ Água bideionizada Dental Ville, Joinville, SC, Brasil
- ❑ Toalha de papel absorvente (Chifon® Scott, Klabin Kimberly S.A., Mogi das Cruzes, SP, Brasil)
- ❑ Pipeta automática modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)

- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Estabilizador de corrente elétrica No Break (SMS) – Manager One, Line Interactive, microprocessado (SMS Tecnologia Eletrônica Ltda., Indústria Brasileira)
- ❑ Filme laboratorial (American National Can™, Menasha, WI, EUA)
- ❑ Béqueres de vidro de 50 mL e 150 mL nºs. 1000 e 1005, respectivamente (Pyrex®, EUA)
- ❑ Analisador de íons Procyon, modelo SA 720 (Procyon Instrumentos Científica, São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Eletrodo específico para íon flúor Orion, modelo 9409 (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA)
- ❑ Solução interna do eletrodo (Single Junction, Reference Electrode, Orion Filling Solution, 900001 Orion – Orion Research, Inc. – Beverly, MA, EUA)

4.1.6 Material utilizado para as coletas de urina e saliva do ducto da glândula parótida

- ❑ Potes plásticos com tampas de rosca
- ❑ Coletor de saliva “Lashley Cup” (SESI, Bauru-SP)
- ❑ Sondas para aspiração traqueal nº 6 (Embramed Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Eppendorfs Axygen (EUA)

- ❑ Suco de limão fresco
- ❑ Pinças clínicas
- ❑ Compressas de Gaze (Johnson & Johnson®, São José dos Campos, SP, Brasil)
- ❑ Conta-gotas plástico
- ❑ pH-metro Micronal B371

4.1.7 Material utilizado para a análise de F na urina (método direto), na dieta, na saliva do ducto da glândula parótida e em parte da saliva total (microdifusão)

- ❑ Toalha de papel absorvente (Chifon® Scott, Klabin Kimberly S.A., Mogi das Cruzes, SP, Brasil)
- ❑ Frascos JP10
- ❑ Pipeta automática modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P200 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Pipeta automática modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P100 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Ponteiras para pipeta modelo P1000 (Gilson®, Villiers-le-Bel, França)
- ❑ Caneta marcador permanente CD para plásticos, acrílicos, vinil e vidros (Pilot Pen do Brasil S.A., São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Filme laboratorial (American National Can™, Menasha, WI, EUA)
- ❑ Béqueres de vidro de 50 mL e 150 mL n^{os}. 1000 e 1005, respectivamente (Pyrex®, EUA)

- Água Bideionizada Dentalville, Joinville, SC, Brasil
- NaOH 0,05 M (a partir de hidróxido de sódio em lentilhas puríssimo para análise, lote 501024, Merck S.A. Indústrias químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- TISAB II
- Soldador - modelo 113540410 (Craftsman Soldering Iron, Taiwan)
- Vaselina sólida branca (industria Farmacéutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil)
- Bisnaga de “catchup” para colocação da vaselina – Referência 150/3 (Plastigel, Brasil)
- HMDS em HCl 6M (HMDS-HCl: a partir de HMDS, código H 4875, Sigma e Ácido Clorídrico 37% P.A., lote K27124617-945, Merck, Darmstadt, Alemanha)
- HMDS Aquecido
- Ácido Acético 0,2 M (a partir de Ácido Acético Glacial 100%, lote 1216067001, Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Placas de Petri de poliestireno estéril – 60 x 15 mm, Falcon nº1007 (Becton Dickson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, EUA)
- Estabilizador de corrente elétrica No Break (SMS) – Manager One, Line Interactive, microprocessado (SMS Tecnologia Eletrônica Ltda., Indústria Brasileira)
- Analisador de íons Procyon, modelo AS 720 (Procyon Instrumentos Científica, São Paulo, SP, Brasil)

- ❑ Eletrodo específico para íon flúor Orion, modelo 9409 (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA)
- ❑ Mesa agitadora orbital plana modelo NT 145 (Nova Técnica, São Paulo, SP, Brasil)
- ❑ Potes plásticos vazios de filmes fotográficos
- ❑ Provetas de vidro de 1000 mL
- ❑ Funis de vidro
- ❑ Solução interna do eletrodo (Single Junction, Reference Electrode, Orion Filling Solution, 900001 Orion – Orion Research, Inc. – Beverly, MA, EUA)
- ❑ Cronômetro Cronus, modelo TEC 965 (Technos, Zona Franca de Manaus, AM, Brasil)
- ❑ Programa Excel - Microsoft®
- ❑ Pinças
- ❑ Máscaras
- ❑ Gorro
- ❑ Luvas
- ❑ Padrão de NaF Ionplus 100 ppm F⁻ (nº. 940907, Orion Research Inc., Beverly, MA, EUA)
- ❑ Agitador de tubos, modelo 251 (Fanem®, São Paulo, SP, Brasil)

4.2 MÉTODOS

Tabela 2: Características gerais do estudo

Descrição	Experimentos		
	Incorporação F no esmalte (1º experimento)	Cinética do F na saliva total (2º experimento)	Biodisponibilidade de F (3º experimento)
Número de Voluntários	16	10	9
Número de fases	6	5	4
Material biológico utilizado	Esmalte dentário	Saliva total	Saliva do ducto da glândula parótida, urina
Dentifrícios utilizados*	I, III, IV, V, VI, VIII, IX	I, III, IV, VIII, IX	I, II, VII, VIII

* Códigos relativos aos dentifrícios da Tabela 1.

4.2.1 Estudo de incorporação de F no esmalte dentário

1- Delineamento experimental:

Participaram deste estudo, cruzado e duplo-cego, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP, 16 indivíduos adultos jovens, com idades entre 18 e 35 anos. Os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos voluntários foram: não ter recebido aplicação tópica de F nos três meses anteriores ao início da pesquisa, não se encontrar sob tratamento odontológico, apresentar os incisivos centrais superiores hígidos, encontrar-se na faixa etária pré-estabelecida. Os

voluntários utilizaram dentifrícios experimentais 3 vezes ao dia, com as seguintes concentrações: 1100, 550, 275 ppm F (NaF) (pH 5,5), Crest® (1100 ppm F (NaF), pH 6,5 - controle positivo), Colgate Baby® (500 ppm F (NaF), pH 6,8) e dentifrício sem F, pH 5,5 (controle negativo) durante 2 semanas cada, com intervalo de uma semana entre uma concentração e outra, quando foi utilizado dentifrício placebo (sem F, pH 6,5). Durante os períodos experimentais, os voluntários utilizaram escovas dentárias Johnson & Johnson®, foram instruídos verbalmente e por escrito a evitar o uso de outros produtos fluoretados e de agentes químicos bucais (ANEXO 1), além de receber um cronograma com as fases da pesquisa (ANEXO 2). Nenhuma orientação quanto aos hábitos de escovação foi realizada. Os voluntários receberam profilaxia profissional com dentifrício placebo nos incisivos centrais superiores, previamente à realização da biópsia.

A biópsia de esmalte foi realizada pela colocação de 5 μ L de HCl 0,5 M, por 5 s sobre o esmalte demarcado por um orifício (0,9 mm de raio) feito na fita adesiva (Fita Mágica 3M) (Figura 2). O ácido foi dispensado usando-se uma pipeta, formando uma hemi-esfera sobre a superfície do esmalte demarcada (Figura 3). Decorridos os 5 s, o ácido foi removido por aspiração através da ponteira plástica acoplada à pipeta automática e foi colocado sobre uma placa de Petri plástica contendo 50 μ L de TISAB II. Duas lavagens separadas no sítio da biópsia, cada uma delas usando 5,0 μ L de NaOH 0,25 M foram então feitas, por 5 s cada, para neutralizar e permitir a coleta de qualquer ácido remanescente. As lavagens com NaOH foram adicionadas à mesma placa (WHITFORD et al.¹⁴⁷, 1995). As biópsias foram

realizadas no terço médio do dente. Após um intervalo de uma semana, usando dentifrício placebo (sem F), os voluntários escovaram seus dentes por outras 2 semanas, com outra concentração experimental até que todas as concentrações propostas tivessem sido testadas. As biópsias foram realizadas no incisivo central contralateral ao analisado anteriormente. A água de abastecimento utilizada pelos participantes contém 0,7 ppm de F.

A Figura 1 ilustra o estudo cruzado e duplo cego.

FIGURA 1 - Delineamento do 1º experimento

Voluntários	Tratamentos	Fases do experimento					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
1,2,3	I	X	X	X	X	X	X
4,5	II	X	X	X	X	X	X
6,7	III	X	X	X	X	X	X
8,9,10	IV	X	X	X	X	X	X
11,12,13	V	X	X	X	X	X	X
14,15,16	VI	X	X	X	X	X	X

Tratamentos:

I = formulação não fluoretada pH 5,5

II = formulação experimental fluoretada (1100 ppm F)

III = formulação experimental fluoretada (550 ppm F)

IV = formulação experimental fluoretada (275 ppm F)

V = dentifrício padrão Crest®

VI = Colgate Baby®

2- Análise de F

A análise do F presente nas biópsias de esmalte foi realizada imediatamente após cada biópsia, usando-se o eletrodo F^- sensível (Orion 9409) e um microeletrodo calomelano de referência, acoplado ao aparelho analisador de pH/ F^- (Procyon, SA 720) (Figura 4). Para tanto, a solução de biópsia, adicionada a 50 μ L de TISAB II, teve seu volume completado para 65 μ L com água deionizada, previamente à análise.

2.1. Validação da análise

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 100 ppm F (Orion). A curva de calibração foi feita em triplicata, adicionando-se, aos padrões, NaOH, HCl e TISAB, na mesma concentração presente nas amostras. A cada hora, foram feitos testes para se checar a calibração do eletrodo.

As leituras obtidas, em mV, foram convertidas para μ g de F, através do programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

3 - Análise de P

Para o cálculo da massa de esmalte removida pela biópsia, foi analisada a concentração de P presente, através do método colorimétrico de FISKE; SUBARROW⁵⁸ (1925) (Figura 5). O valor encontrado na análise foi convertido em área, considerando-se que aproximadamente 17,4% do peso do esmalte é de P, e que a densidade do esmalte é de 2,95 g/cm³. Os padrões de P (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mL P) foram preparados em triplicata.

FIGURA 2: Área demarcada para a realização da biópsia de esmalte dentário – a Fita Mágica® foi colorida de preto para melhor visualização na fotografia.

FIGURA 3: Colocação de 5 μ L de HCl 0,5 M sobre a superfície do esmalte dentário.

FIGURA 4: Leitura imediata de F após a realização da biópsia de esmalte dentário.

FIGURA 5: Espectrofotômetro utilizado para a análise da massa de P removida nas biópsias de esmalte dentário

4.2.2 Estudo da cinética do F na saliva total

1 - Voluntários

Participaram do estudo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, dez voluntários com idade entre 18 e 35 anos. Os objetivos do estudo foram descritos aos voluntários e os termos de consentimento obtidos (ANEXO 5).

2 - Substâncias testadas

Este estudo duplo-cego foi realizado em cinco etapas (ANEXO 4). Nas diversas etapas, os voluntários escovaram seus dentes com um dos seguintes dentífrícios: Crest®; Colgate Baby®; formulação experimental 1100 ppm F, pH 5,5; formulação experimental 550 ppm F, pH 5,5; formulação experimental 275 ppm F, pH 5,5. Antes do início do experimento e entre as cinco etapas, os voluntários utilizaram dentífrício placebo por uma semana para evitar qualquer problema relacionado à coleta de saliva.

3 – Procedimento experimental

Os voluntários compareceram ao laboratório de Bioquímica no dia pré-estabelecido, entre 13 e 14h. Inicialmente era feita uma coleta de saliva “baseline” por 3 min. Após isto, eles escovavam seus dentes com 1,5 g do dentífrício proposto por 1 min e enxaguavam a boca por 10 seg com 10 mL de água deionizada. Imediatamente, iniciavam-se as coletas de saliva nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 min, sendo que a coleta de cada tempo era feita por 3 min em um frasco devidamente lavado, seco e rotulado (Figura 6). Foi realizada a coleta de saliva não estimulada. Durante os 60 min de coleta, os voluntários permaneceram sentados. As amostras

coletadas foram, então, congeladas (-20°C) até que as leituras de F fossem realizadas.

FIGURA 6: Frascos utilizados para coleta de saliva total.

FIGURA 7: Delineamento experimental

4 – Procedimento de análise para a saliva total nos tempos de coleta 0, 3 e 6 minutos

A análise do F nas amostras de saliva total coletadas nos tempos 0, 3 e 6 min foi realizada utilizando-se o eletrodo íon-específico (Orion Research, Cambridge, MA, USA, modelo 9609), depois da amostra ser tamponada com 0,1 mL de TISAB III. Os padrões (contendo 0,2; 0,4; 0,8;

1,6; 3,2; 6,4; 12,8 e 25,6 µg F) foram preparados utilizando diluição em série de uma solução de estoque de 100 ppm F (Orion). Os potenciais de milivoltagem foram convertidos em ppm F, utilizando para isso uma curva padrão com coeficiente de correlação de $r \geq 0.99$.

4.1- Validação da análise de F:

Foi feita uma curva de calibração com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 e 25,6 µg F.

5 - Procedimento de análise para a saliva total nos tempos de coleta restantes

A análise do F nas amostras de saliva total coletada nos tempos “baseline”, 9, 15, 30, 45 e 60 min. foi realizada após difusão facilitada por HMDS, pelo método de TAVES¹³¹ (1968), como modificado por WHITFORD¹⁴³ (1996) (Figura 8). Entretanto, por se tratar a saliva de um fluido biológico, contendo, portanto, CO₂, foi feita uma pré-difusão para se eliminar o CO₂. Para tanto, a amostra de saliva foi colocada numa placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado em HMDS num volume que correspondesse a 20% do volume da amostra de saliva. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e

então a difusão seguiu normalmente como descrito por TAVES¹³⁶ (1968) e modificado por WHITFORD¹⁴⁸ (1996). Na tampa das placas, foram colocados 50 μ L de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas (Figura 9). As placas foram então fechadas e vedadas com vaselina, e por um orifício feito previamente (com um Soldador - modelo 113540410) na tampa foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL, em ácido sulfúrico 3 M) (Figura 10). O orifício foi imediatamente vedado com vaselina e parafilme (Figura 11). As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite (Figura 12). No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μ L com água deionizada usando uma pipeta. A gota, que continha todo o F da saliva foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figura 13).

Todas as análises, nas quais o volume de amostra permitiu, foram feitas, no mínimo em duplicata.

FIGURA 8: Preparação da placa de Petri com vaselina.

FIGURA 9 – Colocação das 3 gotas de NaOH.

FIGURA 10: Inserção do HMDS pelo orifício da tampa.

FIGURA 11 – Padrões pré-difundidos e difundidos prontos para agitação.

FIGURA 12: Mesa agitadora (velocidade 2-3)

FIGURA 13: Eletrodo Orion 9409 e mini-eletrodo de referência calomelano.

5.1 - Validação da análise:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de F na saliva total geralmente giram em torno de 0,01 µg/mL, utilizando-se 1 mL de saliva para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,01 µg, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo.

As soluções-padrão (contendo 0,00475; 0,0095; 0,019; 0,095; 0,19; 0,95; 1,9; 4,75 e 9,5 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F⁻ (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de saliva a serem analisadas. Foi realizada a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de saliva, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV), foram convertidas para µg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação

de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofrem difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma [F] que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos tinha sido completamente captado e analisado.

Foi feita também uma seqüência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV devessem ser as mesmas, tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

4.2.3 Estudo de biodisponibilidade

1 - Voluntários

Participaram do estudo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, nove voluntários com idade entre 18 e 35 anos. Os objetivos do estudo foram descritos aos voluntários e os termos de consentimento obtidos (ANEXO 5).

2 - Substâncias testadas

Este estudo duplo-cego foi realizado em quatro etapas. Na primeira etapa, os voluntários ingeriram uma solução (2 mg F/6 mL água deionizada)

de um dentifrício disponível no mercado (VII) (Sorriso Dentes Brancos® – 1500 ppm F (MFP), pH 9,5). Na segunda etapa, os mesmos voluntários ingeriram uma solução (2 mg F/6 mL água deionizada) do dentifrício experimental I (1100 ppm F (NaF), sílica, pH 5,5). Na terceira etapa, estes voluntários receberam uma solução (2 mg F/6 mL água deionizada) do dentifrício experimental II (1100 ppm F (NaF), sílica, pH 7,0). Na quarta etapa, os voluntários receberam uma solução (2 mg F/6 mL água deionizada) de outro dentifrício disponível no mercado - Crest® (VIII) (1100 ppm F (NaF), sílica, pH 6,5). As quatro etapas foram separadas por intervalos de uma semana, quando foi utilizado dentifrício placebo, para evitar qualquer problema relacionado à coleta de saliva.

3- Procedimento Experimental

Os voluntários fizeram jejum por 12 horas (durante a noite), no dia anterior ao período experimental. Todos os experimentos começaram às 8h. Na primeira etapa, os voluntários ingeriram 6 mL de solução do dentifrício I (2 mg F), na segunda etapa ingeriram 6 mL de solução do dentifrício II (2 mg F), na terceira etapa, 6 mL de solução do dentifrício III (2 mg F) e, na quarta etapa, 6 mL de solução do dentifrício IV (2 mg F). Não foi permitida a ingestão de nenhum alimento ou bebida até às 11 h, quando os voluntários receberam um lanche padronizado de conteúdo de F baixo e conhecido (0,07 mg), constituído de duas fatias de pão de forma, cenoura, alface, tomate e suco de limão preparado com água mineral sem F. Durante o período experimental de 8 horas, somente estes alimentos foram permitidos e toda a água ingerida era deionizada.

FIGURA 14: Delineamento experimental

4- Coleta de saliva

O orifício do ducto da parótida foi localizado e a mucosa circundante limpa com uma gaze umedecida em água deionizada e, então, seca. Para cada etapa, um total de 14 amostras de saliva foram coletadas com o uso de um dispositivo desenvolvido para este fim ("Lashley cup"). Este coletor foi fabricado pelo SENAI (Bauru-SP) a partir de uma amostra vinda da Dinamarca. O dispositivo consiste de uma câmara externa que providencia o vácuo, responsável pela adesão do coletor à mucosa e de uma câmara interna, por onde escoar a saliva (Figura 15). Feito de alumínio, possui, ainda, duas cânulas que se ligam às respectivas câmaras e se prendem a uma sonda traqueal nº 6, como pode ser visto na Figura 16. Três a cinco gotas de suco de limão foram depositadas sobre as línguas dos voluntários

para estimular o fluxo salivar. Coletou-se a amostra durante cinco minutos, após se descartar as primeiras gotas para evitar que houvesse contaminação da amostra com algum possível remanescente de F na mucosa bucal (Figuras 17, 18 e 20). As amostras foram coletadas antes do início do experimento, e então a cada 20 min por 2 horas, a cada 40 min até 4 horas de experimento e, então, em intervalos de 1 hora até completarem-se 8 horas do início do experimento. A saliva foi armazenada a uma temperatura de -20°C até a análise do F (Figura 19).

FIGURA 15: A – vista externa do Lashley Cup; B – vista interna do dispositivo.

FIGURA 16: Dispositivo montado – Lashley Cup acoplado à sonda traqueal e à pêra.

FIGURA 17: Dispositivo posicionado para a coleta de saliva do ducto.

FIGURA 18: Saliva sendo coletada em eppendorf

FIGURA 20: Amostras de saliva prontas para serem armazenadas em câmara fria (-20°C) até a leitura.

FIGURA 19: Detalhe da coleta da saliva do ducto.

5 - Coleta de urina

A urina foi coletada durante as 24 horas antecedentes à ingestão de F (dia controle) até 8 horas depois. Os voluntários foram instruídos para coletar sua urina somente em frascos plásticos rotulados fornecidos pela pesquisadora. A coleta de urina do dia controle teve início às 8 h e foi armazenada no frasco 1, contendo toda a urina coletada até as 20 h. Este frasco 1 foi fechado e entregue em nosso laboratório, onde o volume e o pH de cada amostra individual foi imediatamente determinado, da qual uma amostra (50 mL) foi congelada (- 20°C) até a análise do F ser realizada, dentro das próximas 48 horas. No frasco 2 foi armazenada toda a urina coletada das 20h do dia anterior à ingestão de F até às 8 h do dia experimental, quando o F foi ingerido. O frasco 3 conteve toda a urina coletada das 8 h até as 16 h do dia experimental. Todos os frascos, contendo amostras de urina, foram mantidos permanentemente fechados em um refrigerador até que eles pudessem ser trazidos ao laboratório (ANEXO 4).

6 - Procedimentos de análise

6.1 – Saliva do ducto da glândula parótida

A análise de F da saliva do ducto da glândula parótida foi feita pela técnica de difusão facilitada por HMDS, como anteriormente descrito (TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996)).

6.1.1 - Validação da análise:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo

concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 µmol/L (0,0095-0,019 µg/mL) e a saliva do ducto corresponde geralmente a 70-80% da concentração de F plasmática, utilizando-se 1 mL de saliva para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,007-0,014 µg, portanto acima do limite de detecção do eletrodo.

As soluções-padrão (contendo 0,00475; 0,0095, 0,019, 0,095, 0,19 e 0,095 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F⁻ (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de saliva a serem analisadas. Foi realizada a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de saliva, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV), foram convertidas para µg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação

de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofrem difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma [F] que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos tinha sido completamente captado e analisado.

Foi feita também uma seqüência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV devessem ser as mesmas, tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

6.2 – Dieta

A análise de F foi realizada em triplicata, como descrito para a saliva do ducto, com exceção da pré-difusão, após difusão facilitada por HMDS (TAVES¹³⁶, 1968, WHITFORD¹⁴⁸, 1996).

Validação da análise:

Os critérios para realização da curva de calibração foram os mesmos descritos para a saliva do ducto, com exceção de que os padrões com adição do ácido aquecido não foram feitos. Foi feita uma curva padrão com quantidades de F variando de 0,00475; 0,019; 0,095; 0,19 e 0,95 μg F.

6.3 - Urina

A análise do F nas amostras de urina foi realizada utilizando-se o eletrodo íon-específico (Orion Research, Cambridge, MA, USA, modelo 9609) (Figura 20), depois da amostra ser tamponada com igual volume (1,0 mL) de TIBAB II (Figura 19). Os padrões (contendo 0,20; 0,40; 0,80; 1,6; 3,2 e 6,4 ppm F) foram preparados utilizando diluição em série de uma solução de estoque de 100 ppm F (Orion). Os potenciais de milivoltagem foram convertidos em ppm F, utilizando para isso uma curva padrão com coeficiente de relação de $r \geq 0.99$.

FIGURA 21: Agitação da amostra com o TISAB II.

FIGURA 22: Potenciômetro e eletrodo utilizados na leitura da urina.

6.3.1 - Validação da análise

A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação da análise de F na saliva. Foi feita uma curva de calibração com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 $\mu\text{g F}$.

Foi calculado, para cada voluntário, diariamente, o volume urinário (mL), bem como medido o pH de cada amostra de urina coletada, com eletrodo (Orion), acoplado a pH-metro (Orion, modelo 420 A) .

Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o software InStat. Todos os dados foram checados em relação à sua normalidade e homogeneidade (métodos de Kolmogorov e Smirnov) e foi então realizada análise estatística paramétrica.

Para a avaliação da incorporação de F no esmalte e da profundidade da camada removida, foi utilizada análise de variância a um critério com medidas repetidas.

A biodisponibilidade do F foi calculada a partir da área sob a curva das concentrações de F na saliva do ducto da glândula parótida em função do tempo e este dado foi testado por análise de variância a um critério. O intervalo de confiança (IC) também foi descrito.

A cinética do F na saliva total foi avaliada por análise de variância a um critério (tipo de dentifrício) para cada tempo experimental e teste de Tukey.

As diferenças nas quantidades de F excretadas através da urina foram detectadas por análise de variância a dois critérios (tipo de dentifrício e dia da coleta), complementada pelo teste de Tukey.

Foi adotado nível de significância de 5%.

Resultados

---

5 RESULTADOS

A Tabela 3 apresenta a [F] individual e média no esmalte dentário, além do erro padrão após os 15 dias de cada tratamento aplicado. A Figura 23 traz as médias e erros-padrão de incorporação de F no esmalte dentário após a utilização de cada dentifrício. A análise de variância com medidas repetidas demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diversos dentifrícios testados ($p= 0,0797$)

TABELA 3: [F] individual, média e erro padrão da superfície do esmalte dentário após a escovação de 15 dias, de acordo com o tratamento utilizado.

Voluntário	Placebo (V)	1100 ppm F (I)	550 ppm F (III)	275 ppm F (IV)	Crest® (VIII)	Baby® (IX)
1	1008,65	399,67	444,63	*	661,54	703,79
2	452,85	520,67	460,33	872,82	610,33	1154,00
3	837,28	574,68	429,70	1134,63	526,52	931,07
4	811,43	563,86	1646,72	968,91	1234,11	*
5	624,55	577,42	810,27	499,95	456,54	1465,22
6	361,97	348,44	342,75	391,69	311,03	402,98
7	1716,43	1477,74	2087,82	1718,72	2408,06	1640,27
8	607,21	311,77	282,18	498,29	634,12	315,87
9	619,89	596,87	830,26	786,79	556,16	488,07
10	184,48	195,20	147,35	175,06	286,26	257,80
11	216,52	312,48	563,60	180,68	449,13	465,07
12	394,31	769,22	*	996,49	1107,45	2193,70
13	300,17	393,19	424,73	364,81	*	596,69
14	483,85	821,53	381,05	486,22	581,55	613,00
15	1959,61	621,47	1062,32	841,79	790,62	1428,70
16	355,68	505,78	311,65	752,36	726,48	467,19
Média	683,43	561,87	681,69	711,28	755,99	874,89
EP	126,76	74,13	131,15	98,41	126,72	138,99

* amostra não coletada devido ausência do voluntário no dia da realização da biópsia.

ANOVA ($p > 0,05$)

FIGURA 23: Média e erro padrão da [F] (ppm) no esmalte dentário, após 15 dias de escovação com cada dentífrico testado

Os dentífricos estão codificados: V= placebo (pH 5,5), I= formulação experimental 1100 ppmF (pH 5,5), III= formulação experimental 550 ppmF (pH 5,5), IV= formulação experimental 275 ppmF (pH 5,5), VIII= Crest (1100 ppmF, pH 6,5), IX= Colgate Baby (500 ppmF, pH 6,9)

A Tabela 4 e a Figura 24 trazem as médias e os erros-padrão da profundidade das camadas de esmalte dentário removidas. A análise de variância a um critério não mostrou diferenças estatisticamente significantes nas profundidades de camadas entre as biópsias realizadas ($p=0,8958$).

TABELA 4: Média e erro padrão da profundidade da camada removida (μm) da superfície do esmalte dentário “in vivo” após os diferentes tratamentos

	Placebo	1100 ppm F	550 ppm F	275 ppm F	Crest®	Baby®
Média	3,32	3,21	3,03	3,09	2,91	3,00
EP	0,30	0,19	0,24	0,16	0,15	0,42

ANOVA, $p=0,8958$

FIGURA 24: Média e erro padrão da profundidade (μm) da camada de esmalte dentária removida na biópsia após cada tratamento.

Os dentifrícios estão codificados: V= placebo (pH 5,5), I= formulação experimental 1100 ppmF (pH 5,5), III= formulação experimental 550 ppmF (pH 5,5), IV= formulação experimental 275 ppmF (pH 5,5), VIII= Crest (1100 ppmF, pH 6,5), IX= Colgate Baby (500 ppmF, pH 6,9)

Na Tabela 5 e na Figura 25, encontram-se as médias e os erros-padrão da [F] presente na saliva total de acordo com o dentífrico utilizado e o tempo de coleta. Com exceção da coleta de 15 minutos, a escovação com o dentífrico Crest® não ocasionou concentrações de F diferentes na saliva total daquela dos dentífricos de 275, 550 ppm F e Colgate Baby®. Ainda no tempo 15, como nos demais, o dentífrico “padrão ouro” Crest® não apresentou diferença estatisticamente significativa do dentífrico acidulado de 550 ppm F. No entanto, o dentífrico acidulado de 1100 ppm F se mostrou estatisticamente superior aos dentífricos de baixa [F] até os seis minutos de coleta, tempo no qual se tornou semelhante estatisticamente ao dentífrico de 550 ppm F. Como pode ser observado, o dentífrico Colgate Baby® apresenta-se estatisticamente semelhante ao dentífrico acidulado de 275 ppm F em todos os tempos de coleta.

TABELA 5: Média da [F] ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ EP (n) na saliva total nos tempos 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 minutos de coleta, após a escovação com diferentes dentifrícios fluoretados.

Tempos de Coleta	Dentifrícios				
	275 ppm F, pH 5,5 (IV)	550 ppm F, pH 5,5 (III)	Colgate Baby® (IX)	1100 ppm F, pH 5,5 (I)	Crest® (VIII)
Baseline	0,01 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,01 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,02 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,02 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,01 $\pm$ 0,00 ^a (6)
0	2,43 $\pm$ 0,50 ^a (10)	4,63 $\pm$ 0,85 ^a (10)	2,96 $\pm$ 0,48 ^a (10)	11,74 $\pm$ 2,16 ^b (9)	6,36 $\pm$ 1,11 ^a (10)
3	0,63 $\pm$ 0,16 ^a (10)	1,14 $\pm$ 0,25 ^a (10)	0,56 $\pm$ 0,07 ^a (10)	2,44 $\pm$ 0,44 ^b (10)	1,75 $\pm$ 0,43 ^{a,b} (9)
6	0,26 $\pm$ 0,05 ^a (10)	0,58 $\pm$ 0,10 ^{a,b} (8)	0,27 $\pm$ 0,04 ^a (10)	1,11 $\pm$ 0,24 ^b (10)	0,63 $\pm$ 0,10 ^{a,b} (9)
9	0,19 $\pm$ 0,03 ^a (10)	0,28 $\pm$ 0,04 ^{a,b} (10)	0,16 $\pm$ 0,02 ^a (10)	0,62 $\pm$ 0,14 ^b (10)	0,47 $\pm$ 0,13 ^{a,b} (10)
15	0,07 $\pm$ 0,01 ^a (10)	0,11 $\pm$ 0,02 ^{a,b} (10)	0,09 $\pm$ 0,01 ^{a,b} (10)	0,22 $\pm$ 0,03 ^{b,c} (10)	0,17 $\pm$ 0,04 ^{b,c} (10)
30	0,04 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,05 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,05 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,11 $\pm$ 0,02 ^b (10)	0,06 $\pm$ 0,01 ^a (10)
45	0,03 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,04 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,04 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,09 $\pm$ 0,02 ^b (10)	0,06 $\pm$ 0,01 ^{a,b} (10)
60	0,02 $\pm$ 0,00 ^a (10)	0,03 $\pm$ 0,00 ^{a,b} (10)	0,03 $\pm$ 0,00 ^{a,b} (10)	0,06 $\pm$ 0,01 ^b (10)	0,05 $\pm$ 0,00 ^{a,b} (10)

As letras sobrescritas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os dentifrícios em cada tempo de coleta (ANOVA, $p < 0,05$).

FIGURA 25: Média e erro padrão da [F] na saliva total após escovação com dentifrícios de diferentes pHs e concentrações de F, em função do tempo de coleta em minutos

Os dentifrícios estão codificados: IV= formulação experimental 275 ppmF (pH 5,5), III= formulação experimental 550 ppmF (pH 5,5), IX= Colgate Baby (500 ppmF, pH 6,9), I= formulação experimental 1100 ppmF (pH 5,5), VIII= Crest (1100 ppmF, pH 6,5)

A Tabela 6 apresenta os valores individuais e médios, além dos respectivos erros-padrão das áreas sob as curvas em cada regime experimental. A Figura 30 traz as médias e respectivos erros-padrão da biodisponibilidade de F para os diferentes dentifrícios testados. As Figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam as curvas de biodisponibilidade de F para cada voluntário da pesquisa, nas diversas etapas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dentifrícios de diferentes pHs e sistemas abrasivos ($p=0,9619$).

TABELA 6: Biodisponibilidade (área sob a curva – ASC) média (intervalo de confiança de 95%) e individual de quatro diferentes dentifrícios fluoretados, obtida através da saliva do ducto da glândula parótida de nove voluntários

Voluntário	Sorriso® (VII)	Experimental, pH 5,5 (I)	Experimental, pH 7,0 (II)	Crest® (VIII)
	Saliva do ducto da glândula parótida			
	ASC (min.µg.mL ⁻¹)			
A	6,05	3,15	2,38	3,11
B	2,58	2,77	3,27	1,58
C	6,59	9,36	8,79	5,94
D	4,31	4,59	3,80	5,79
E	3,91	4,59	3,80	2,57
F	6,66	4,36	7,83	7,04
G	3,92	3,21	1,01	4,87
H	5,06	7,25	4,55	7,73
I	5,13	5,52	5,07	4,63
Média	4,91	4,98	4,50	4,80
	(3,86-5,97)	(3,33-6,62)	(2,60-6,40)	(3,22-6,39)
EP	0,46	0,71	0,82	0,69

ANOVA, p=0,9619

FIGURA 26: [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão de dentifrício Sorriso® (VII=1500 ppm F, MFP, CaCO_3 , pH 9,5), em função da ordem de coleta ao longo do experimento

FIGURA 27: [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão do dentifrício experimental I (1100 ppm F, NaF, sílica, pH 5,5), em função da ordem de coleta ao longo do experimento

FIGURA 28: [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão do dentifrício experimental II (1100 ppm F, NaF, sílica, pH 7,0), em função da ordem de coleta ao longo do experimento

FIGURA 29: [F] na saliva do ducto da glândula parótida ($\mu\text{g/mL}$) de cada voluntário após a ingestão de dentifrício Crest® (VIII=1100 ppm F, NaF, sílica, pH 6,8), em função da ordem de coleta ao longo do experimento

FIGURA 30: Média e erro padrão da biodisponibilidade (ASC) de F na saliva do ducto da glândula parótida de cada dentífrico testado

Os dentífricos estão codificados: VII= Sorriso Dentes Brancos (1100 ppm F, CaCO₃, pH 9,5); I= formulação experimental 1100 ppmF, sílica, pH 5,5; II= formulação experimental 1100 ppmF, sílica, pH 7,0; VIII= Crest (1100 ppmF, sílica, pH 6,5).

A Tabela 7 e a Figura 31 demonstram a média e erro padrão da quantidade de F excretada na urina antes e depois de cada regime experimental. A diferença da quantidade de F na urina (mg F/h) do dia controle para o dia experimental foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), mas não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de F na urina entre os diferentes dentifrícios ingeridos ($p = 0,154$). Não houve interação entre os critérios.

TABELA 7: Média e erro padrão da quantidade de F excretado na urina (mg F/h) antes e após a ingestão de quatro diferentes dentifrícios fluoretados

	VII		I		II		VIII	
	antes	após	antes	após	antes	após	antes	após
Média	0,016 ^a	0,044 ^b	0,015 ^a	0,044 ^b	0,023 ^a	0,074 ^b	0,017 ^a	0,064 ^b
EP	0,005	0,015	0,006	0,015	0,007	0,025	0,006	0,021
n	9		9		9		9	

As letras sobscritas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os dias controle (antes) e experimental (depois) ($p < 0,05$). A diferença entre os dentifrícios não foi estatisticamente significativa ($p = 0,154$)

FIGURA 31: Quantidade de F excretada na urina antes e depois da ingestão de dentifrício fluoretado em cada regime experimental

Os dentifrícios estão codificados: VII= Sorriso Dentes Brancos (1100 ppm F, CaCO_3 , pH 9,5); I= formulação experimental 1100 ppmF, sílica, pH 5,5; II= formulação experimental 1100 ppmF, sílica, pH 7,0; VIII= Crest (1100 ppmF, sílica, pH 6,5).

Discussão

---

6 DISCUSSÃO

Inicialmente, apenas o primeiro experimento foi planejado para esta dissertação de Mestrado. Concomitantemente à realização deste primeiro estudo, a literatura foi sendo pesquisada e, mediante os resultados prévios das biópsias de esmalte, sentiu-se a necessidade de se desenvolver os outros dois experimentos.

A cinética do F na saliva total poderia trazer informações adicionais que explicassem a incorporação de F semelhante no esmalte dentário após a utilização dos diversos dentifrícios testados. Com relação à biodisponibilidade, havia a possibilidade de que o baixo pH e o sistema abrasivo empregados nas formulações experimentais aumentassem a biodisponibilidade de F dos dentifrícios.

Os três experimentos realizados neste estudo se completam e se mostram importantes para a compreensão dos efeitos de dentifrícios de baixa [F]. A Tabela 4 e a Figura 24 demonstram que as profundidades das biópsias foram similares o que torna as biópsias comparáveis. Uma falha deste estudo é a ausência de um grupo amostral que apresentasse fatores de risco à cárie dentária para o estudo de incorporação de F no esmalte dentário. Como pôde ser visto nos resultados, o esmalte clinicamente hígido de pacientes que não apresentam fatores de risco à cárie dentária parece não incorporar F, devido, provavelmente, aos poucos desafios cariogênicos a que estão submetidos. No entanto, a questão ética deve ser avaliada. Entre um período experimental e outro, há a necessidade de se suspender o dentifrício fluoretado, além de não ser permitido o uso de outro agente

fluoretado, além da água de abastecimento público. O ataque ácido da biópsia deveria ser efeito sobre esmalte hígido para não causar risco ao paciente. No entanto, sabe-se que quanto maior a área desmineralizada, maior a incorporação de F, como pode ser verificado em experimentos que simulam cárie dentária “in situ” (PERES, DEL BEL CURY; CURY¹¹³, 2001).

Ainda se tivesse sido incluído um grupo de risco à cárie dentária, poderia ter sido avaliada a cinética do F na saliva sob outro prisma. Pacientes com maior acúmulo de placa dentária possuem sítios de retenção de F em maior número o que poderia retardar o declínio da [F] na saliva total. Uma pesquisa empregando coleta de saliva total e de placa dentária após a utilização de dentifrícios de baixa [F] deve ser realizada posteriormente a esta.

A seguir dividiremos a discussão por tópicos a fim de facilitar a compreensão do leitor a respeito dos diversos pontos abordados.

6.1 INCORPORAÇÃO DE F NO ESMALTE DENTÁRIO E CINÉTICA DO F NA SALIVA TOTAL

Quando se observa o aspecto de toxicidade, o dentifrício fluoretado ingerido regularmente por crianças pequenas pode levar ao desenvolvimento de fluorose dentária. Em um estudo de EKSTRAND; KOCH; PETERSSON⁴⁶ (1982), a [F] no plasma foi estudada, em crianças de 3 a 4 anos de idade, após a ingestão de dentifrícios de 1000 e 250 ppm F, respectivamente. Foi encontrado que a ingestão de dentifrícios de 250 ppm F causou um aumento insignificante da [F] no plasma, enquanto a ingestão de um dentifrício de

1000 ppm F causou um marcado aumento de F no plasma. Em 1982, KOCH⁷⁶ et al. realizaram um estudo clínico de três anos para avaliar a eficácia anti-cárie de um dentifrício de 250 ppm F com relação a um dentifrício de 1000 ppm F em 541 crianças de 12 e 13 anos de idade. O incremento de cárie dentária foi igual durante o período e os autores concluíram que os resultados deste estudo indicaram que um dentifrício de 250 ppm F teria o mesmo efeito preventivo que o dentifrício de 1000 ppm F e poderia ser utilizado, independentemente da idade.

Considerando-se que crianças com menos de 6 anos de idade ingerem uma média de 0,55 g de dentifrício por escovação e que crianças de 2 a 3 anos de idade ingerem 48% desta quantidade, pode-se afirmar que, se a criança realiza três escovações diárias, ela ingere, em média 0,792 g de dentifrício/dia. Assim, se o dentifrício utilizado contém 1100 ppm F, levando-se em conta a média do peso corporal para esta faixa etária, tem-se que esta criança, somente com o F advindo da escovação, sem levar em conta as outras fontes de F (alimentos, bebidas, etc), já ingere 0,058 mg F/Kg/dia, valor este que está na faixa de ingestão diária ótima recomendada de F, a qual, segundo BURT²⁰ (1992), é entre 0,05 e 0,07 mg F/Kg/dia. Seguindo-se o mesmo raciocínio, a utilização de um dentifrício de 275 ppm F diminuiria esta ingestão para 0,0145 mg F/Kg/dia.

Além disso, se fosse demonstrada a efetividade de um dentifrício contendo [F] reduzida em relação à incorporação de F pelo esmalte, comparando-se a um dentifrício padrão, esta nova formulação seria indicada não somente para o público infantil que se encontra na faixa etária de risco à

fluorose dentária, mas também a toda a população, pois, neste caso, não se justificaria uma quantidade de F superior à necessária, aumentando o risco de toxicidade. Assim, toda a família poderia utilizar um mesmo produto, dispensando-se o gasto adicional com um dentifrício destinado somente ao público infantil. Esta opção poderia se tornar possível reduzindo-se o pH do dentifrício (PERES; DEL BEL CURY; CURY¹¹³, 2001; NEGRI; CURY⁹⁶, 2002; OLYMPIO et al.¹⁰⁴, 2004; BRIGHENTI et al.¹⁶, 2004). No entanto, apesar dos resultados positivos para os dentifrícios de baixa [F] nos estudos citados, quanto à incorporação de F pelo esmalte dentário, nenhum deles utilizou experimentos “in vivo”, o que despertou a iniciativa do presente estudo.

Segundo ARENDS; LODDING; PETTERSSON⁴, (1985); ten CATE; SIMONS²⁸ (1986); PETERSSON et al.¹¹⁶ (1989), a eficácia de dentifrícios contendo NaF não aumenta na [F] variando entre 300 a 1000 ppm F, enquanto que em dentifrícios contendo MFP um aumento na eficácia pode ser esperado quando se aumenta a [F] total.

No presente estudo, a [F] encontrada no esmalte após a utilização de dentifrício placebo não foi estatisticamente diferente daquelas encontradas após a utilização de dentifrícios fluoretados. Se a quantidade de F existente na hidroxiapatita foi suficientemente alta para mascarar a quantidade de CaF_2 recentemente formado, durante o estudo, sugere-se que não houve formação de CaF_2 na superfície do esmalte dentário suficiente que diferisse daquela presente durante a utilização do dentifrício placebo a ponto de ser detectada pela técnica de microanálise (biópsia de esmalte “in vivo”). Além

disso, segundo estudo de WEATHERELL; NAYLOR; HALLSWORTH¹⁴⁴ (1977), em incisivos de pessoas de 20 a 30 anos de idade, a [F] no terço incisal, sem que tenha sido aplicado nenhum tratamento, fica em torno de 400 ppm F e em torno de 100 ppm em indivíduos de 30 a 40 anos de idade. Segundo ROBINSON; KIRKHAM; WEATHERELL¹²⁴ (1996), a superfície mais externa do esmalte apresenta, normalmente, uma [F] acima de 65 ppm. Em estudo de NAKASONE et al.⁹⁴. (2004), com pacientes de 15 a 35 anos de idade, a [F] no esmalte dentário, antes de qualquer tipo de tratamento, variou de 214,4 a 3937,2 ppm, confirmando a variabilidade da [F] no esmalte dentário humano. Estas diferenças também foram encontradas em nosso estudo, como pode ser analisado na Tabela 1. Pode ser acrescentado, ainda, que todos os experimentos “in vitro”, acima citados, tiveram como única fonte de F os banhos de dentifrícios entre as ciclagens de pH. “In vivo”, o processo de aquisição de F pelo esmalte dentário é algo dinâmico, onde o dentifrício fluoretado é apenas uma das fontes. Os nossos voluntários não apresentavam importantes fatores indicadores de risco à cárie dentária e a formação de CaF_2 em superfície de esmalte hígida é questionável após tratamentos fluoretados realizados em tempos clínicos. De acordo com HARDING et al.⁶⁷ (1994), foi possível demonstrar a presença de F alcali-solúvel sobre superfícies de esmalte híginas após tratamento com soluções fluoretadas para tempos de tratamento clinicamente relevantes, mas não a presença de CaF_2 , uma vez que a razão Ca:F encontrada não correspondia à do CaF_2 . Não parece haver uma evidência científica direta de que a formação de CaF_2 resultante do uso clínico do F tópico seja um importante

reservatório de F em dentes hígidos. Os achados de estudos utilizando soluções bem definidas não são necessariamente comparáveis à situação clínica a qual envolve dentes cobertos por película, presença de matéria orgânica e inorgânica em saliva e placa e tempos de reação relativamente curtos de 5 minutos ou menos. As concentrações de F na saliva e na placa caem rapidamente a níveis abaixo daqueles que favorecem a formação de CaF_2 depois da aplicação de dentifrícios, bochechos e géis fluoretados (ZERO et al.¹⁵⁶, 1992). Este fato também pôde ser observado no presente estudo (Tabela 3 e Figura 23). Estudo de ZERO et al.¹⁵⁷ (1992) indicou que a retenção de F pelos tecidos bucais é a maior fonte de F encontrada na saliva total durante as primeiras 2 h após a aplicação de preparações tópicas fluoretadas de uso caseiro. Para HARDING et al.⁶⁷ (1994), até que uma evidência seja obtida que definitivamente estabeleça que o F álcali-solúvel formado sob condições de tratamento clínico é de fato o CaF_2 , esta afirmação de que o CaF_2 é um importante reservatório de F deve ser moderada.

Quando altas concentrações de F são aplicadas no esmalte dentário “in vivo”, a diferença na [F] antes e depois do tratamento é bastante significativa (NAKAZONE et al.⁹⁴, 2004; WHITFORD et al.¹⁵², 1995), diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, onde as diferentes concentrações de F presentes no dentifrício não foram suficientes para serem detectadas pela microanálise, demonstrando que a quantidade de CaF_2 formada pode ter sido baixa, independentemente do pH do produto (5,5, 6,5 ou 6,9). Se a quantidade de F do tratamento utilizado é alta, a

biópsia de esmalte “in vivo” pode ser utilizada, validando o procedimento. No entanto, segundo estudo de WEATHERELL; NAYLOR; HALLSWORTH¹⁴⁴ (1977), quando o esmalte é tratado por dentifrícios fluoretados de pH alcalino ou neutro, ou quando o intervalo entre o tratamento e biópsia foi extenso, a quantidade de F incorporado pode ser muito pequena.

O gel fluoretado apresenta um pH em torno de 3,0, além de ter maior concentração de F e ser aplicado diretamente sobre os dentes. Os dentifrícios utilizados neste estudo apresentavam pH 5,5, mas, durante a escovação, a saliva dilui o dentifrício, o que eleva seu pH. Este fator também pode ter reduzido a reatividade do esmalte dentário ao dentifrício.

Assim, há a necessidade de se realizar um estudo longitudinal com crianças pré-escolares utilizando-se rotineiramente de dentifrícios fluoretados com pH ácido e baixas concentrações de F. O problema encontrado para este tipo de estudo é o financiamento dos dentifrícios para as crianças por um período prolongado, mas estudos já vêm sendo realizados na Guatemala, com uma amostra significativa (WHITFORD¹⁴⁹, 2004, comunicação pessoal).

Além disso, a aquisição de F pelo esmalte dentário parece continuar enquanto o esmalte permanece poroso (ROBINSON; KIRKHAM; WEATHERELL¹²⁴, 1996). O tempo necessário para a oclusão dos poros do esmalte varia consideravelmente com o tipo do dente. Alguns fatores externos também podem interferir na maturação pós-eruptiva do esmalte. O F pode prolongar esse processo de maturação, o que explica as elevadas concentrações de F encontradas nas camadas mais externas do esmalte

fluorótico. A penetração de F no esmalte totalmente mineralizado é lenta. A criação de porosidade na apatita é necessária para aumentar a [F] no esmalte mineralizado para resultar na formação de CaF_2 . Assim, pode ser que os resultados deste estudo fossem diferentes se a amostra fosse composta por crianças. No presente estudo, a cooperação seria fundamental para a validade dos resultados. Nenhum outro dentífrico poderia ser utilizado, além do fornecido para a pesquisa. Como a criança vai à escola e nem sempre está sob a supervisão dos pais, a opção para a amostra foi o adulto. Se os resultados da incorporação de F de dentífricos de baixa [F] pelo esmalte maduro fossem positivos, poderiam ser estendidos para crianças. Como não houve diferenças, não podemos afirmar que também não haveria para crianças com o esmalte dentário ainda em maturação pós-eruptiva.

A princípio, para o presente estudo, não foi delineada a pesquisa da análise da [F] na saliva total. Após a obtenção dos resultados da [F] no esmalte, percebeu-se a necessidade de se investigar a cinética do F na saliva total após a utilização dos dentífricos propostos.

Surpreendentemente, todas as concentrações testadas foram capazes de elevar a [F] na saliva a níveis considerados benéficos na prevenção de cárie dentária. Assumindo-se que os níveis basais de F na saliva estão em torno de 0,02 ppm e que uma pequena elevação destes níveis já é benéfica (FUKUSHIMA et al.⁶³, 2000), os resultados do presente estudo indicam que, com relação à saliva total, todos os dentífricos testados são eficazes em termos de prevenção de cárie dentária, em todos os

intervalos de tempo analisados, sendo que na coleta de 60 min, o dentifrício de 275 ppm (pH 5,5) já apresentava concentração de 0,02 ppm F na saliva total, pouco acima da concentração “baseline” de 0,01 ppm F.

Além disso, estudos têm demonstrado que níveis tão baixos quanto 0,1 ppm F podem ser suficientes para aumentar o crescimento do cristal (BROWN¹⁷, 1974). O crescimento do cristal é importante durante os processos de des e remineralização. Assim, níveis elevados de F na saliva como os encontrados neste estudo (cinética do F na saliva) favoreceriam o equilíbrio entre dissolução e crescimento do cristal.

A possível explicação para o melhor desempenho dos dentifrícios de pH acidulado em relação aos outros pode residir nos tecidos moles bucais. A interação do F com os tecidos moles pode ligar o F no filme salivar que cobre os tecidos moles e/ou ocasionar uma interação química específica com componentes salivares cobrindo os tecidos moles bucais. O F presente no filme salivar que cobre a mucosa bucal (a qual representa 80% da área da superfície da boca) pode agir como um importante reservatório de F. Muito pouco é conhecido sobre as possíveis interações químicas do F com os tecidos moles bucais. A mucosa bucal é coberta por uma película salivar a qual é formada pela adsorção seletiva de componentes salivares. (BRADWAY et al.¹³, 1989). É possível que o F possa se ligar ao Ca o qual é complexado com grupos ácidos de proteínas adsorvidas seletivamente e glicoproteínas formando a película da mucosa bucal. Assim, se o F é ligado quimicamente a locais da mucosa bucal, as características de força e reversibilidade da interação determinarão o quão prontamente o F será

liberado deste local de ligação. Obviamente, o F que estiver ligado irreversivelmente à mucosa bucal não servirá como um reservatório clinicamente relevante de F.

A mucosa também pode ser uma rota do “clearance” de F da cavidade bucal. GABLER⁶⁴ (1968) relatou que o F pode ser absorvido através da mucosa bucal de ratos, embora esta absorção pareça ser relativamente lenta. Segundo WHITFORD; CALLAN; WANG¹⁵¹ (1982), a absorção de F pode ocorrer mais rapidamente em pH baixo. Os resultados do presente estudo sugerem que os dentifrícios de pH baixo tiveram mais F absorvido pela mucosa bucal, a qual funcionou como um reservatório de F para a saliva total. Dentifrícios de mesmo pH e concentrações de F diferentes apresentaram relação dose-efeito na medida em que se dobrava a [F] da formulação. Quando se comparam dentifrícios de pHs diferentes, aqueles de baixa [F] e pH ácido apresentam [F] na saliva semelhante do que dentifrícios com o dobro da [F], porém com pH mais próximo do neutro. Este achado é relevante, já que um dentifrício de pH ácido e baixa [F] mostrou-se semelhante ao Crest®, podendo ser indicado para crianças pequenas, a fim de se diminuir os riscos para fluorose dentária.

6.2 BIODISPONIBILIDADE DE F EM DENTIFRÍCIOS COM RELAÇÃO AO PH E AO SISTEMA ABRASIVO

A influência do pH sobre a absorção gástrica de F deve ser considerada (WHITFORD¹⁴⁷, 1996). É possível que diminuindo o pH do dentifrício, aumente-se a absorção gástrica de F. Assim, um estudo de biodisponibilidade de F de um dentifrício de baixo pH deveria ser conduzido.

Além disso, para o F dos dentifrícios afetar o desenvolvimento do esmalte dentário, deve ser absorvido. Embora tenha se relatado que a absorção de F dos dentifrícios seja em torno de 100% (EKSTRAND; EHRNEBO⁴⁴, 1980; EKSTRAND; KOCH; PETERSSON⁴⁶, 1983), se na formulação do dentifrício estiver presente o Ca como abrasivo (FORSMAN; ERICSSON⁶⁰, 1973; DRUMMOND; CURZON³⁹, 1985), a absorção de F tanto de NaF, quanto de MFP pode ser reduzida significativamente. Preparações contendo CaCO_3 e/ou fosfato de cálcio como agente abrasivo podem se ligar a uma parte considerável do F no intestino delgado e, assim, evitar que esta parte seja absorvida. Formulações contendo agentes abrasivos inertes ao F (partículas plásticas, dióxido de silício, bicarbonato) não exercem nenhum efeito similar na absorção. Como nos dentifrícios contendo NaF não são adicionados abrasivos à base de Ca pela formação de CaF_2 dentro do tubo, haveria o risco de um dentifrício de baixa [F] com sílica como abrasivo apresentar a mesma absorção de F de um dentifrício padrão com CaCO_3 como agente abrasivo. No presente estudo, não houve diferença na biodisponibilidade do F quando se comparam dentifrícios contendo CaCO_3 e dentifrícios contendo sílica como agentes abrasivos (Tabela 5 e Figura 28).

Segundo LIMA; CURY⁸¹ (2001), a prevalência real de fluorose dentária em crianças expostas exclusivamente a dentifrícios é menor do que a esperada pela dose a que elas são submetidas. Isto tem sido explicado pelo fato de que nem todo F ingerido é absorvido. Assim, alimentos no estômago reduzem a absorção de F, podendo variar de 20 a 40%. Em acréscimo, a absorção gastrointestinal de F depende do abrasivo do

dentífricio. Se este for à base de CaCO_3 (e 90% dos dentífrícios brasileiros são, segundo DUARTE; PISANESCHI; CURY⁴⁰, 1999), parte do F se liga ao Ca e não é absorvida. Outro aspecto é que a frequência de escovação relatada geralmente é superestimada pelos pais. Em nosso estudo, a biodisponibilidade de F foi analisada em voluntários sob condições de jejum para que nenhum outro fator além do pH e do conteúdo abrasivo pudesse interferir em sua absorção. Como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, a absorção de F não diferiu com relação ao pH ou ao conteúdo abrasivo do dentífricio. Se o dentífricio Sorriso® (1500 ppm F – MFP – CaCO_3 , pH 9,5), marca popular do mercado brasileiro, apresentasse menor biodisponibilidade de F, não haveria razão de se recomendar um dentífricio à base de sílica e pH 5,5, mesmo com baixa [F]. No entanto, os resultados demonstram que o CaCO_3 presente no dentífricio Sorriso® não causou maior complexação do F, a ponto de diminuir sua biodisponibilidade, ao mesmo tempo que o pH 5,5 das formulações experimentais não aumentou a absorção gástrica de F, o que favorece sua recomendação.

Medir o F excretado na urina (RUGG-GUNN et al.¹²⁸, 1993; MARTHALER et al.⁸², 1995; MARTHALER et al.⁸³, 2000) é um método bem estabelecido para avaliar a exposição de F de uma população ou quantificar a ingestão diária de F de uma criança. Baseando-se em estudos anteriores, é afirmado que, sob exposições estáveis de F, a excreção urinária de F é de, aproximadamente, 50% da ingestão em adultos e de 30% da ingestão em crianças. (MURRAY; RUGG-GUNN; JENKINS⁹³, 1991). Avaliações pertinentes ao equilíbrio de F, como a relação entre a ingestão de F e sua

excreção em crianças pequenas são escassas e seus resultados conflitantes. Enquanto em seus estudos com crianças de 3-5 anos de idade, VILLA; ANABALLÓN; CABEZAS¹³⁸ (2000) encontraram uma proporção da excreção urinária de F da média de 35,5% da quantidade ingerida, as investigações de BRUNETTI; NEWBRUN¹⁸ (1983) e de ZOHOURI; RUGG-GUNN¹⁵⁸ (2000) em pré-escolares indicou excreções de F, consideravelmente mais altas na proporção de 80-85%. PESSAN et al.¹¹⁵ (2004) estudaram a excreção urinária de F de crianças com idades entre 4 e 7 anos após o uso de dentifrício ou dentifrício e verniz fluoretados. Os autores observaram um aumento estatisticamente significativo na quantidade de F excretada em 24 horas, apenas quando se usou o verniz fluoretado em adição ao dentifrício. Baseados na estimativa da quantidade de F ingerida através do dentifrício, os autores esperavam que fosse possível encontrar um aumento significativo na excreção urinária de F após o uso do produto. Os autores sugeriram que a biodisponibilidade do F ingerido a partir do dentifrício é reduzida. Neste estudo a excreção urinária fracional de F foi de 51,2 % após a aplicação tópica do verniz fluoretado Duraphat e de 37,7% com a utilização de dentifrício fluoretado.

No presente estudo, não houve diferenças entre os dentifrícios na excreção urinária de F após a ingestão dos diferentes dentifrícios testados para biodisponibilidade. Independentemente do pH ou sistema abrasivo da formulação, as médias de quantidade de F na urina foram estatisticamente semelhantes.

Alguns fatores podem influenciar a excreção urinária de F. É sabido que um baixo pH urinário pode aumentar a reabsorção de F pelos túbulos renais, reduzindo, assim, sua excreção (WHITFORD; PASHLAY¹⁵⁰, 1984).

A porcentagem do F filtrado que é reabsorvido pelos túbulos renais pode variar de 10 a 90%. O grau de reabsorção depende do pH do fluido tubular e do fluxo urinário. Assim, a variação do “clearance” pode ser aumentada ou diminuída por mudanças de fluxo urinário (JÄRNBERG; EKSTRAND; EHRNEBO⁷⁴, 1983), tanto quanto por alterações do pH urinário (EKSTRAND et al.⁴³, 1980; EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO,⁴⁵, 1982). Como pode ser observado no ANEXO 6, os voluntários deste estudo não apresentaram grandes variações em relação ao pH urinário (5.3-7.1). Somente o voluntário C apresentou pH urinário de 7,1 após a ingestão do dentifrício II, enquanto os outros voluntários apresentaram uma variação entre 5,3 e 6,7. De acordo com EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO⁴⁵ (1982), uma grande variedade de fatores pode influenciar o pH urinário, incluindo composição da dieta, altas altitudes, certas drogas e muitas doenças respiratórias e metabólicas. Alguns destes fatores podem ter um significativo impacto sobre o metabolismo do F, através de alterações do pH urinário. Um pH mais alcalino causa um balanço menos positivo para o F, isto é, proporcionalmente menos do F ingerido permaneceria no organismo para ser depositado nos ossos e nos dentes. No caso citado neste estudo, o pH 7,1 não foi suficiente para aumentar a excreção de F do voluntário C.

Assim, devido aos vários fatores que podem comprometer a utilização da urina como biomarcador, optou-se, neste estudo, por também utilizar a

saliva do ducto da glândula parótida como biomarcador para o F ingerido dos dentifrícios.

Fatores que poderiam afetar as concentrações de F na saliva do ducto, independentemente das concentrações de F no plasma incluem fluxo salivar e pH (WHITFORD¹⁵³, 1999). No entanto, estudo de WHITFORD¹⁵³ (1999) demonstrou que a variação do fluxo salivar de 0,25 a 1,10 mL/min não foi significativamente relacionada com as concentrações de F ($r = 0,071$). Este achado está de acordo com OLIVEBY et al.¹⁰³ (1989) e com SHANNON; SUDDICK; EDMONDS¹³¹ (1973) que, usando vários estímulos gustativos produziram fluxos salivares variando de 0,37 a 0,90 mL/min. O pH não foi avaliado pelo autor, mas é conhecido, entretanto, que a concentração de bicarbonato na saliva e o pH são diretamente relacionados à variação do fluxo (DAWES³², 1974). Assim, como as concentrações de F foram independentes do fluxo, é provável que sejam independentes do pH também. No presente estudo não foi avaliado fluxo ou pH da saliva do ducto da glândula parótida.

A literatura tem se mostrado contraditória no que diz respeito à biodisponibilidade do F a partir do NaF e do MFP. O F presente no MFP ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$) não é iônico, e sim covalentemente ligado ao P. Segundo WHITFORD¹⁴⁵ (1990), a absorção do F presente no MFP ocorre, principalmente, após hidrólise enzimática da molécula por fosfatases. Após a administração oral, a absorção do MFP ocorre mais lentamente que a do NaF e de outros compostos solúveis e iônicos, o que resulta em picos plasmáticos menores e tardios. Isto tem sido atribuído à relativa perda de

atividade da fosfatase ácida na mucosa gástrica (ERICSSON⁴⁹, 1983). No presente estudo, como pode ser observado nas Figuras 24, 25, 26 e 27, não houve diferenças nas médias dos picos de [F] entre os dentífrícios testados para a biodisponibilidade.

Contraditoriamente, RIGALLI et al.¹²² (1994) relataram que, em ratos, o MFP é absorvido no estômago sem hidrólise. Este fenômeno, juntamente com o fato de que o MFP se liga a globulinas plasmáticas, formando o complexo MFP- α -2 macroglobulina, causa um aumento imediato na concentração de MFP ligado a proteínas, significativamente maior que o aumento na concentração plasmática de F ultrafiltrável. O metabolismo do complexo MFP- α -2-macroglobulina envolve a ligação a receptores, incorporação pelas células, degradação lisossomal e retorno do F ligado a moléculas de baixo peso molecular (2200 ± 600 Da) para o espaço extracelular. Segundo ESTEBAN; RIGALLI; PUCHE⁵¹ (1997) o F inorgânico seria o produto final da hidrólise lisossomal dos complexos. Por outro lado, no lúmen intestinal o MFP é hidrolisado numa proporção 3 vezes maior que a absorção de F. Após o preenchimento do “loop” duodenal com MFP, o F ultrafiltrável contribui para o aumento da concentração plasmática de F, sem evidência de MFP ligado a proteínas (RIGALLI et al.¹²², 1994). RIGALLI; MOROSANO; PUSCHE¹²¹ (1996) relataram que, em humanos, após a administração oral de NaF, todo o F plasmático é difusível. Por outro lado, após a ingestão de MFP, o plasma contém F difusível e ligado a proteínas durante 6-8 horas após a administração. A ASC do F plasmático total para o MFP (1540 ± 117 $\mu\text{mol.min/L}$) foi o dobro daquela do NaF (812 ± 52

$\mu\text{mol.min/L}$) ($p < 0,001$). Baseado nisto, os autores concluíram que a biodisponibilidade do F a partir do MFP é o dobro daquela do NaF, embora nem todo o F do MFP esteja disponível para ultrafiltração.

Já o trabalho de TRAUTNER; EINWAG¹³⁷ (1986) relatou uma biodisponibilidade semelhante para o F presente no MFP ou no NaF em humanos. Os autores testaram algumas variáveis, observando que o pico da concentração plasmática de F foi diminuído quando os compostos eram administrados concomitantemente com alimentos. Do mesmo modo, a administração conjunta de leite, reduziu a biodisponibilidade em 30% aproximadamente. Entretanto, quando o leite era ingerido juntamente com outros alimentos, a biodisponibilidade não era alterada. Isto levou os autores a hipotetizarem que a formação de sais de cálcio e o aprisionamento do F nos produtos de coagulação do leite são importantes fatores que levam à redução na biodisponibilidade. No entanto, o aumento na permanência do quimo após a ingestão concomitante de alimentos permite que, pelo processo digestivo, o F seja liberado dos compostos e produtos de coagulação aos quais se encontrava ligado.

Apesar destas contradições, há uma tendência a se considerar biodisponibilidades semelhantes para o F ingerido na forma de NaF e de MFP (WHITFORD¹⁴⁷, 1996), com o que corrobora o presente estudo.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que, diferentemente do que acontece “in vitro”, a [F] no esmalte dentário “in vivo” é influenciada por diversas fontes de F, além do dentifrício, sendo que, em esmalte hígido, a quantidade de CaF_2 formada de um tratamento para outro não diferiu o

suficiente para ser detectada pela técnica de microanálise a ponto de apresentar diferenças com relação às concentrações dos dentifrícios; os resultados da [F] na saliva total demonstram relação dose-efeito com o dentifrício utilizado, porém há diferenças estatisticamente significantes quando são comparados dentifrícios de concentrações semelhantes e pHs diferentes, sugerindo que o dentifrício de pH ácido torna o F mais disponível em quantidade e por maior tempo na saliva total em comparação com dentifrícios de pH mais próximo do neutro; o tipo de sal de F (NaF ou MFP), o pH e o abrasivo utilizados não influenciaram na biodisponibilidade dos dentifrícios testados.

Assim, nossos resultados sugerem que dentifrícios de baixa [F] e pH ácido são efetivos na prevenção de cárie dentária no que diz respeito ao aumento da [F] na saliva total e que a formulação testada não aumenta a biodisponibilidade de F, o que poderia indicá-la, principalmente para crianças de baixo risco à cárie dentária, de maneira a diminuir riscos para fluorose dentária sem, contudo, prejudicar o efeito preventivo dos dentifrícios fluoretados quanto à cárie dentária.

Conclusões

---

7 CONCLUSÕES

Baseando-se nos três experimentos realizados neste estudo, pode-se concluir que:

1. Não houve diferença estatisticamente significativa na incorporação de F no esmalte dentário clinicamente hígido “in vivo” após a utilização dos dentifrícios testados;
2. A [F] na saliva total demonstrou relação dose-efeito com o dentifrício utilizado, havendo diferenças estatisticamente significantes entre dentifrícios de [F] semelhantes e pH diferentes;
3. O pH e o sistema abrasivo não influenciaram na biodisponibilidade dos dentifrícios testados, não havendo diferenças estatisticamente significantes na [F] na saliva do ducto da glândula parótida e nem na quantidade de F excretada na urina após a ingestão dos dentifrícios analisados.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1: Instruções transmitidas aos voluntários da pesquisa (experimento 1 – biópsias de esmalte)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

e-mail: dep-oosc@fob.usp.br – Fone: (0XX14)235-8218

Durante os seis meses do experimento, favor seguir as seguintes instruções:

Instruções aos voluntários

- Não realizar bochechos químicos;
- Não receber aplicações tópicas de flúor;
- Não utilizar outros dentífrícios que não seja o fornecido por nós;
- Escovar os dentes com o dentífrício fornecido 3x/dia. Se precisar escovar mais, realizar escovação sem o dentífrício;
- Não utilizar chicletes com flúor;
- Colocar uma quantidade de dentífrício que cubra somente a parte azul das cerdas da escova fornecida por nós;
- Comparecer no laboratório de Bioquímica nas datas marcadas para a realização das biópsias de esmalte.
- Em caso de dúvidas, ligar para Kelly: 227 9614.

A sua colaboração é essencial para o sucesso desta pesquisa. Obrigada!

ANEXO 2: Instruções transmitidas aos voluntários da pesquisa (experimento 1 – biópsias de esmalte)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Departamento de Ciências Biológicas
e-mail: dep-cibi@fob.usp.br – Fone: (0XX14)235-8282

Favor seguir atentamente às seguintes datas:

- ☐ **1ª Biópsia: 12/09/03***
- ☐ Utilização de placebo (dentifrício cor roxo): 13/09 – 18/09
- ☐ Escovação com a 2ª concentração teste: 19/09 – 03/10

- ☐ **2ª Biópsia: 03/10/03***
- ☐ Utilização de placebo (dentifrício cor roxo): 04/10 – 09/10
- ☐ Escovação com a 3ª concentração teste: 10/10 – 24/10

- ☐ **3ª Biópsia: 24/10***
- ☐ Utilização de placebo (dentifrício cor roxo): 25/10 – 30/10
- ☐ Escovação com a 4ª concentração teste: 31/10 – 14/11

- ☐ **4ª Biópsia: 14/11***
- ☐ Utilização de placebo (dentifrício cor roxo): 15/11 – 20/11
- ☐ Escovação com a 5ª concentração teste: 21/11 – 05/12

- ☐ **5ª Biópsia: 05/12*(**)**

*Sempre que o voluntário for ao laboratório de Bioquímica para a realização da biópsia, favor levar o dentifrício em uso para ser trocado por outro, evitando confusões.

**A partir do dia 05/12, o voluntário poderá utilizar o dentifrício de sua preferência, ficando uma concentração restante para ser testada no início do ano letivo de 2004. Agradecemos a colaboração de todos!

ANEXO 3: Instruções transmitidas aos voluntários da pesquisa (experimento 2 – coleta de saliva total)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

e-mail: dep-oosc@fob.usp.br – **Fone:** (0XX14)235-8218

22/03 – 29/03: placebo

29/03 (2ª feira): coleta de saliva

29/03 – 05/04: placebo

05/04 (2ª feira): coleta de saliva

05/04 – 12/04: placebo

12/04 (2ª feira): coleta de saliva

12/04 – 19/04: placebo

19/04 (2ª feira): coleta de saliva

19/04 – 26/04: placebo

26/04 (2ª feira): coleta de saliva

No dia de coleta, sob supervisão dos pesquisadores, os voluntários escovarão seus dentes com 1,5 g de um dos dentífrícios utilizados no experimento, durante 1 minuto, com posterior enxágüe (15 mL de água deionizada), sem bochecho. Imediatamente após a escovação, inicia-se a coleta de saliva total não estimulada, durante 1 hora, nos tempos 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 minutos (frascos separados para cada intervalo de tempo).

O voluntário deverá permanecer no laboratório por 1 hora, podendo escolher um horário dentro do intervalo abaixo:

☐ 13h – 14h

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Kelly: 32279614 / 97979878

Agradecemos a sua participação.

ANEXO 4: Instruções transmitidas aos voluntários da pesquisa (experimento 3 – biodisponibilidade de F)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

e-mail: dep-oosc@fob.usp.br – **Fone:** (0XX14)235-8218

Durante o experimento, favor seguir as seguintes instruções:

Instruções aos voluntários

- Iniciar a coleta de urina às 8 h do dia 21/08/2003 nos frascos determinados:
  1. Frasco 1: urina das 8h às 20 h do dia 21/08/2003.
  2. Frasco 2 : urina das 20 h do dia 21/08/2003 às 8 h do dia 22/08/2003.
  3. Frasco 3: urina das 8 h do dia 22/08/2003 às 16 h do mesmo dia
- Manter o frasco bem fechado no refrigerador
- Iniciar jejum às 20 h do dia 21/08/2003 (quinta-feira). Não ingerir nada que não seja fornecido por nós a partir deste horário.
- Comparecer ao laboratório de Bioquímica às 8 h do dia 22/08/2003 e levar os potes com a urina devidamente coletada
- Em caso de dúvidas, ligar para Kelly: 227 9614.

A sua colaboração é essencial para o sucesso desta pesquisa. Obrigada!

ANEXO 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 –
C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar de pesquisa proposta.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Autor

ANEXO 6: Volume e pH da urina coletada de cada voluntário em cada etapa experimental (experimento 3 – biodisponibilidade de F)

URINA				Sorriso		
	Frasco I		Frasco II		Frasco III	
	Volume	pH	Volume	pH	Volume	pH
A	350mL	6,2	315 mL	5,9	386 mL	5,9
B	480mL	5,9	540 mL	6,2	990 mL	6,6
C	1250 mL	6,3	555 mL	5,8	1140 mL	6,6
D	470 mL	5,6	320 mL	6,5	560 mL	5,8
E	780 mL	6,1	890 mL	6,7	565 mL	5,6
F	340 mL	5,7	510 mL	5,6	1140 mL	5,5
G	460 mL	5,4	760 mL	6	1600 mL	5,8
H	820 mL	7	440 mL	6	1340 mL	6,3
I	1080 mL	6,2	800 mL	5,8	780 mL	6,1

URINA				1100 pH 5,1		
	Frasco I		Frasco II		Frasco III	
	Volume	pH	Volume	pH	Volume	pH
A	280 mL	5,9	512 mL	6,1	600 mL	6,3
B	435 mL	5,9	850 mL	6,3	650 mL	6,2
C	1350 mL	6,7	670 mL	6,2	400 mL	7,1
D	350 mL	7,1	400 mL	5,6	240 mL	5,3
E	570 mL	6,4	750 mL	6,8	110 mL	5,6
F	630 mL	6,3	790 mL	6,4	1380 mL	6,2
G	240 mL	5,5	440 mL	5,9	1960 mL	6,5
H	640 mL	6,7	340 mL	6	1130 mL	6,7
I	580 mL	6,2	540 mL	5,9	980 mL	6,5

URINA				1100 pH 7,0		
	Frasco I		Frasco II		Frasco III	
	Volume	pH	Volume	pH	Volume	pH
A	400 mL	5,8	560 mL	5,9	250 mL	6
B	380 mL	5,6	250 mL	5,7	445 mL	6
C	630 mL	6,8	730 mL	6,2	685 mL	6,4
D	295 mL	6,1	240 mL	5,7	490 mL	5,4
E	900 mL	6,5	680 mL	5,7	455 mL	5,6
F	760 mL	5,9	1540 mL	5,7	1220 mL	5,7
G	260 mL	6	380 mL	5,6	2040 mL	6,7
H	380 mL	6,2	400 mL	5,9	725 mL	6
I	600 mL	6,6	560 mL	6,4	1340 mL	6,5

URINA Crest

	Frasco I		Frasco II		Frasco III	
	Volume	pH	Volume	pH	Volume	pH
A	340 mL	6	370 mL	5,7	600 mL	5,8
B	440mL	6,1	460 mL	5,9	1020 mL	7
C	650 mL	5,2	660 mL	5,9	1000 mL	5,4
D	445 mL	6,1	320 mL	6	320 mL	5,3
E	465 mL	6,3	420 mL	5,9	640 mL	6,6
F	820 mL	5,4	580 mL	5,7	1500 mL	6,4
G	540 mL	5,5	500 mL	5,7	960 mL	5,4
H	320 mL	5,9	620 mL	6,2	1180 mL	6,2
I	560 mL	6,6	710 mL	6,1	880 mL	6,4

ANEXO 7: Exemplo de planilha Excel utilizada para calcular a [F] presente no esmalte dentário

11/9/2003

Curva de calibração p/ Análise de Flúor no Esmalte (biopsia)

TISAB II (20g NaOH/L) : HCl 0,5 M

ppm F	vol.	µg F	log F	mV	log F calc.	µg F calc.	c.V. %
0,8	0,1	0,080	-1,096910013	147,4	-1,076126119	0,084	4,90
1,6	0,1	0,160	-0,795880017	133,2	-0,805676559	0,156	-2,23
3,20	0,1	0,320	-0,494850022	117,4	-0,504753808	0,313	-2,25
6,40	0,1	0,640	-0,193820026	102,5	-0,220972228	0,601	-6,06
12,80	0,1	1,280	0,10720997	83,9	0,133278605	1,359	6,19

Para Curva Total	
intercepção	1,7312
inclinação	-0,0190
Rquad	0,998

Para Curva de Baixa	
intercepção	1,8564
inclinação	-0,0200
Rquad	1,000

Para Curva de Alta	
intercepção	1,6188
inclinação	-0,0179
Rquad	0,996

	mV	log F calc.	µg F calc.	Conc. P	g. Esmalte	ppm F	Camada	
						/20	µm	
1	106,8	-0,302868925	0,498	4,294466426	0,0000247	20173,03	1008,65	3,29
2	124,3	-0,63616944	0,231	4,440115249	0,0000255	9057,02	452,85	3,40
3	100,1	-0,175262443	0,668	6,94042005	0,0000399	16745,61	837,28	5,32
4	106,8	-0,302868925	0,498	5,338282993	0,0000307	16228,51	811,43	4,09
5	128,2	-0,71044784	0,195	3,711871132	0,0000213	9130,79	456,54	2,84
6	130,5	-0,754253051	0,176	4,925611327	0,0000283	6220,65	311,03	3,77
7	115,1	-0,460948598	0,346	2,036909664	0,0000117	29554,86	1477,74	1,56
8	127,4	-0,695211245	0,202	5,62958064	0,0000324	6235,37	311,77	4,31
9	115	-0,459044024	0,348	4,877061719	0,0000280	12397,87	619,89	3,74
10	140,2	-0,938996764	0,115	6,794771227	0,0000391	2946,98	147,35	5,20
11	121	-0,573318486	0,267	5,265458582	0,0000303	8826,62	441,33	4,03
12	112,8	-0,417143387	0,383	3,906069564	0,0000224	17047,70	852,39	2,99
13	116,6	-0,489517213	0,324	5,556756228	0,0000319	10144,03	507,20	4,26
14	115,2	-0,462853172	0,344	6,163626326	0,0000354	9724,33	486,22	4,72
15	106,7	-0,300964351	0,500	5,168359366	0,0000297	16835,74	841,79	3,96
16	112,6	-0,413334239	0,386	4,464390053	0,0000257	15047,10	752,36	3,42

ANEXO 8: Exemplo de planilha utilizada para calcular a quantidade de F na urina

27/2/2004

Análise de F na urina

TISAB II

ppm F	vol. mL	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,2	1	0,2	-0,698970	-27	-0,702263088	0,198	0,76
0,4	1	0,4	-0,397940	-38,8	-0,384286501	0,413	-3,19
0,8	1	0,8	-0,096910	-49,1	-0,106730667	0,782	2,24
1,6	1	1,6	0,204120	-60,4	0,197772336	1,577	1,45
3,2	1	3,2	0,505150	-72	0,510359488	3,239	-1,21
6,4	1	6,4	0,806180	-83	0,80677834	6,409	-0,14

intercepção	-1,4298366

inclinação	-0,0269472

Rquad.	0,9997720

	mV	µg F calc.	µg F calc.	µg F esp.	ppm F	%
Blanck1	-5,00	-1,2951008	0,051	0	0,05	
Teste	-60	0,1869935	1,538	1,6	1,54	-3,867

Experimento I Dentífrício SORRISO

Voluntário	mV	log F	µg F/mL	V(mL)	mg F total	média	pH
FI1	-36,7	-0,4408756	0,362	340	0,123	0,122	5,7
FI1'	-36,4	-0,4489597	0,356	340	0,121		
FI2	-38,4	-0,3950654	0,403	510	0,205	0,209	5,6
FI2'	-39	-0,3788971	0,418	510	0,213		
FI3	-40,1	-0,3492552	0,447	1140	0,510	0,517	5,5
FI3'	-40,5	-0,3384763	0,459	1140	0,523		
GI1	-40,8	-0,3303922	0,467	460	0,215	0,217	5,4
GI1'	-41,1	-0,3223080	0,476	460	0,219		
GI2	-39,3	-0,3708129	0,426	760	0,324	0,329	6
GI2'	-39,8	-0,3573393	0,439	760	0,334		
GI3	-35,7	-0,4678227	0,341	1600	0,545	0,548	5,8
GI3'	-35,9	-0,4624333	0,345	1600	0,552		
HI1	-36,5	-0,4462650	0,358	820	0,293	0,296	7,00
HI1'	-36,8	-0,4381808	0,365	820	0,299		
HI2	-39,7	-0,3600340	0,436	440	0,192	0,192	6,00
HI2'	-39,7	-0,3600340	0,436	440	0,192		
HI3	-36,1	-0,4570439	0,349	1340	0,468	0,463	6,3
HI3'	-35,8	-0,4651280	0,343	1340	0,459		
II1	-31,8	-0,5729167	0,267	1080	0,289	0,290	6,2
II1'	-31,9	-0,5702220	0,269	1080	0,291		
II2	-30,3	-0,6133374	0,244	800	0,195	0,199	5,8
II2'	-31	-0,5944744	0,254	800	0,204		
II3	-45,1	-0,2145193	0,610	780	0,476	0,477	6,1
II3'	-45,2	-0,2118246	0,614	780	0,479		

ANEXO 9: Exemplo de planilha utilizada para calcular a [F] na saliva do ducto da glândula parótida

13/10/2004 Análise de F - Saliva Ducto

nm F	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,25	0,00475	-2,323306	126,1	-2,3256689	0,0047	0,54
0,5	0,0095	-2,022276	108,6	-2,0251454	0,0094	0,66
1	0,019	-1,721246	90,4	-1,7126010	0,0194	-2,01
5	0,095	-1,022276	50,4	-1,0256903	0,0943	0,78

intercepção -0,1601828

inclinação -0,0171728

Rquad. 0,9999

Amostra	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	vol (mL)	µg/mL	Média
DI1	124,6	-2,2999097	0,005	1	0,005	0,007
GI1	106,7	-1,9925171	0,010	1	0,010	
HI1	119,3	-2,2088940	0,006	1	0,006	
HI1'	116,4	-2,1590930	0,007	1	0,007	
HI14'	110,5	-2,0577737	0,009	0,7	0,013	0,012
HI14	104,5	-1,9547371	0,011	1	0,011	0,009
GI14	116,4	-2,1590930	0,007	0,7	0,010	
DI14	110,5	-2,0577737	0,009	1	0,009	
DI14'	111,6	-2,0766637	0,008	1	0,008	
HI13	97,5	-1,8345277	0,015	1	0,015	0,014
HI13'	99,8	-1,8740250	0,013	1	0,013	0,014
GI13	104,1	-1,9478680	0,011	1	0,011	
DI13	101,5	-1,9032188	0,012	1	0,012	
DI13'	103,9	-1,9444334	0,011	0,7	0,016	
HI12	100,6	-1,8877633	0,013	1	0,013	0,011
DI12'	112,2	-2,0869674	0,008	0,8	0,010	
GI12	110,6	-2,0594909	0,009	1	0,009	
HI12'	109,6	-2,0423182	0,009	0,9	0,010	
DI12	106,9	-1,9959517	0,010	1	0,010	0,016
DI11	99,1	-1,8620041	0,014	1	0,014	
DI11'	115,2	-2,1384857	0,007	1	0,007	
GI11	97,4	-1,8328104	0,015	1	0,015	
HI11	101,2	-1,8980669	0,013	1	0,013	0,013
HI11'	108,8	-2,0285800	0,009	0,7	0,013	
HI10'	100,3	-1,8826114	0,013	1	0,013	
HI10	92,3	-1,7452293	0,018	1	0,018	
DI10'	98,3	-1,8482659	0,014	0,9	0,016	0,013
DI10	105,3	-1,9684753	0,011	1	0,011	

ANEXO 10: Exemplo de planilha utilizada para calcular a [F] na saliva total

5/11/2004 Análise de F - Saliva Total

nm F	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,25	0,00475	-2,323306	123	-2,3000128	0,0050	-5,51
0,5	0,0095	-2,022276	107,8	-2,0319041	0,0093	2,19
1	0,019	-1,721246	91	-1,7355735	0,0184	3,25
5	0,095	-1,022276	50,1	-1,0141494	0,0968	-1,89
10	0,19	-0,721246	34	-0,7301659	0,1861	2,03
50	0,95	-0,022276	-6	-0,0246167	0,9449	0,54
100	1,9	0,278754	-23	0,2752417	1,8847	0,81
250	4,75	0,676694	-45	0,6632937	4,6057	3,04
500	9,500	0,977724	-64	0,9984296	9,964	-4,88

intercepção **-0,1304491**

inclinação **-0,0176387**

Rquad. **0,9999**

Experimento Crest						
Amostra	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	vol (mL)	µg/mL	Média
L Base	82,9	-1,5926998	0,026	1	0,026	0,02
LBase'	85,4	-1,6367966	0,023	1	0,023	
B Base	106,1	-2,0019183	0,010	1	0,010	0,01
B Base'	117,1	-2,1959443	0,006	1	0,006	
E Base	98,3	-1,8643362	0,014	1	0,014	0,01
E Base'	96	-1,8237671	0,015	1	0,015	
B 6	-6,4	-0,0175612	0,960	1	0,960	0,78
B6'	14,2	-0,3809191	0,416	0,7	0,594	
J Base	108,8	-2,0495429	0,009	0,8	0,011	0,01
F0	-63	0,9807908	9,567	1	9,567	9,51
F0'	-62,7	0,9754992	9,451	1	9,451	
H Base	117,5	-2,2029998	0,006	1	0,006	0,005
H Base'	126,4	-2,3599845	0,004	1	0,004	
H6	-13,2	0,1023821	1,266	1	1,266	1,09
H6'	3,7	-0,1957124	0,637	0,7	0,910	
F6	1,8	-0,1621988	0,688	1	0,688	0,64
F6'	5,8	-0,2327537	0,585	1	0,585	
B0	-41,9	0,6086137	4,061	1	4,061	4,91
B0'	-50,5	0,7603067	5,758	1	5,758	
D Base'	118,8	-2,2259302	0,006	0,6	0,010	0,01

ANEXO 11: Exemplo de planilha utilizada para calcular a [F] na dieta e no limão utilizados no experimento de biodisponibilidade de F

20/9/2003 Análise de F - Dieta e limão

nm F	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,5	0,0095	-2,022276	121,6	-2,0059432	0,0099	-3,83
1	0,019	-1,721246	106,45	-1,7396132	0,0182	4,14
5	0,095	-1,022276	66,05	-1,0293999	0,0935	1,63
10	0,19	-0,721246	48	-0,7120892	0,1940	-2,13

Intercepção 0,1317286

inclinação -0,0175795

Rquad. 0,999323

Amostra	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	vol (mL)	µg/mL	Vol. Total	mg F total
IA (30/08)	49,4	-0,7367006	0,183	1	0,183	365	0,07
IB (30/08)	49,9	-0,7454904	0,180	1	0,180	365	0,07
IC (30/08)	52,8	-0,7964710	0,160	1	0,160	365	0,06
IIA (10/09)	51	-0,7648278	0,172	1	0,172	380	0,07
IIB (10/09)	49,6	-0,7402165	0,182	1	0,182	380	0,07
IIC (10/09)	52,8	-0,7964710	0,160	1	0,160	380	0,06
IIIA (13/09)	46,9	-0,6927517	0,203	1	0,203	368	0,07
IIIB (13/09)	49	-0,7296688	0,186	1	0,186	368	0,07
IIIA (19/09)	47,3	-0,6997836	0,200	1	0,200	367	0,07
IIIB (19/09)	48,5	-0,7208790	0,190	1	0,190	367	0,07
IIC (19/09)	50,2	-0,7507642	0,178	1	0,178	367	0,07
LimãoIII	86,1	-1,3818696	0,042	1	0,042	1,5	0,00

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, B.S. **Avaliação da ingestão de flúor através dos diferentes componentes da dieta e da escovação por crianças de 2-3 anos residentes em área fluoretada no Brasil: impacto nos níveis de flúor nas unhas.** Bauru, 2004. 115 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2. AMJAD, Z.; NANCOLLAS, G.H. Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel. **Caries Res**, v. 13, p. 250-8, 1979.
3. AMMARI, A.B.; BLOCH-ZUPAN, A.; ASHLEY, P.F. Systematic review of studies comparing the anti-caries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride of less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. **Caries Res**, v. 37, p. 85-92, 2003.
4. ARENDS, J.; LODDING, A.; PETTERSSON, L.G. Fluoride uptake in enamel. **Caries Res**, v. 14, p. 403-13, 1980.
5. ARNEBERG, P. et al. Intra-oral variations in total plaque fluoride related to plaque pH. A study in orthodontic patients. **Caries Res**, v. 31, p. 451-6, 1997.
6. BAELUM, V. et al. Daily dose of fluoride and dental fluorosis. **Tandlaegebladet**, v. 91, n. 10, p. 452-6, June 1987.
7. BARDAL, P.A.P. et al. Evaluation of total pH and soluble and ionic fluoride concentrations in dentifrices commercially available in Brazil. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v. 1, n. 4, p. 283-9, 2003.

8. BARDESEN, A. "Risk periods" associated with the development of dental fluorosis in maxillary permanent central incisors: a meta-analysis. **Acta Odontol Scand**, v. 57, n. 5, p. 247-56, 1999.
9. BARNHART, W.E. et al. Dentifrice usage and ingestion among four age groups. **J Dent Res**, v. 53, n. 6, p. 1317-22, 1974.
10. BASTOS, R.S. et al. Trends in dental caries prevalence in 12-year-old schoolchildren between 1976 and 2001 in Bauru, Brazil. **Public Health**, 2005. /no prelo/
11. BELTRAN, E.D.; SZPUNAR, S.M. Fluoride in toothpastes for children suggestions for change. **Pediatr Dent**, v. 10, p. 185-8, 1988.
12. BLOCH-ZUPAN, A. Is the fluoride concentration limit of 1,500 ppm in cosmetics (EU Guideline) still up to date? **Caries Res**, v. 35, p. 22-25, 200. Supplement.
13. BOHATY, B.S. et al. Prevalence of fluorosis-like lesions associated with topical and systemic fluoride usage in an area of optimal water fluoridation. **Pediatr Dent.**, v. 11, n. 2, p. 1989.
14. BRADWAY et al. Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. **Biochem J**, v. 261, p. 887-96, 1989.
15. BRATTHALL, D.; HAND-PETERSON, G.; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? **Eur J Oral Sci**, v. 104, p. 416-22, 1996.
16. BRIGHENTI, F.L. et al. Avaliação "in vitro" de formulações de dentifrícios acidulados com baixa concentração de flúor. **Braz Oral Res**, v. 18, p.

- 173, 2004. Supplement (Proceedings of the 21st Annual SBPqO Meeting).
17. BROWN, W.E. Physicochemical mechanisms of dental caries. **J Dent Res**, v. 53, p. 204-16, 1974.
18. BRUNETTI, A.; NEWBRUN, E. Fluoride balance of children 3 and 4 years old (abstract 41). **Caries Res**, v. 17, p. 171, 1983.
19. BRUUN, C.; GIVSKOV, H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications in vitro. **Caries Res**, v. 25, p. 96-100, 1991.
20. BURT, B.A. The changing patterns of systemic fluoride intake. **J Dent Res**, v. 71, n. 5, p. 1228-37, May 1992.
21. BUTLER, W.J.; SEGRETO, V.; COLLINS, E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. **Amer J Public Health**, v. 75, n.12, p. 1408-12, 1985.
22. BUZALAF, M.A.R.; CURY, J.A.; WHITFORD, G.M. Fluoride exposures and dental fluorosis: a literature review. **Rev Fac Odontol Bauru**, v. 9, n. ½, p. 1-10, jan./jun. 2001.
23. BUZALAF, M.A.R. et al. Association between the early use of toothpaste and other variables with dental fluorosis: a transversal retrospective study. **Rev. Fac. Odont. Bauru**, v. 10, n. 3, p. 196-200, jul/set. 2002.
24. ten CATE, J.M. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **Eur J Oral Sci**, v. 105, p. 461-5, 1997.

25. ten CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P.E. The influence of fluoride in solution on tooth enamel demineralization . I. Chemical data. **Caries Res**, v. 17, p. 193-9, 1983.
26. ten CATE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.B. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: Fejerskov, O.; Ekstrand, J.; Burt, B.A. **Fluoride in Dentistry**. 2 ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996. p. 252.
27. ten CATE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.B. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: Fejerskov, O.; Ekstrand, J.; Burt, B.A. **Fluoride in Dentistry**. 2 ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996. p. 259.
28. CATE, J.M.; SIMONS, Y. The efficacy of toothpastes with different fluoride contents, a pH-cycling study. In: **Factors Relating to the demineralization of the teeth**. SA Leach Ed, IRL Press Oxford, p. 35-44, 1986.
29. CURY, J.A. Determination of appropriate exposure of fluoride in non-EME countries in the future. **J Dent Res**, v. 79, n. 4, p. 901, 2000.
30. CURZON, M.E.J.; CUTRESS, T.W. **Trace elements and dental disease**. Bristol: J Wright, 1983.
31. DAVIES, G.M. et al. A randomized controlled trial of the effectiveness of providing free fluoride toothpaste from the age of 12 months on reducing caries in 5-6-year old children. **Community Dent Health**, v. 19, n. 3, p. 131-6, 2002.
32. DAWES, C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human submandibular saliva. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 887-95, 1974.

- 33.DAWES, C.; TEN CATE, J.M. International symposium on fluorides: mechanisms of action and recommendation for use. **J Dent Res**, v. 69 (special issue), p. 505-836, 1990.
- 34.DENBESTEN, P.K. Dental fluorosis: its use as biomarker. **Advanc Dent Res**, v. 8, n. 1, p. 105-10, June 1994.
- 35.DENBESTEN, P.K. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. **Community Dent oral Epidem**, v. 27, n. 1, p. 41-7, Feb 1999.
- 36.DIBDIN, G.H. A brief survey of recent in vitro work on diffusion of small ions and molecules in dental plaque. In: Guggenheim B, ed. **Cariology today**. Basel, Karger, p. 191-9, 1984.
- 37.DOOLAND, M. B.; WYLIE, A. Urinary fluoride levels in pre-school children in relation to the use of fluoride toothpaste. **Aust Dent J**, v. 33, p. 101-3, 1988.
- 38.DRISCOLL, W.S. et al. Prevalence of dental caries and dental fluorosis in areas with optimal and above optimal water fluoride concentrations. **J Amer Dent Ass**, v. 107, n. 1, p. 42-7, 1983.
- 39.DRUMMOND, B.K., CURZON, M.E.J. Urinary excretion of fluoride following ingestion of MFP toothpastes by infants aged two to six years. **J Dent Res.**, v. 64, p. 1145-8, 1985.
- 40.DUARTE, F.F.; PISANESCHI, E.; CURY, J.A. Avaliação do flúor dos dentifrícios mais consumidos no Brasil e comercializados nas cinco regiões do país. **Rev ABOPREV**, v. 2, n. 2, p. 3-10, 1999.

41. DUCKWORTH, R.M.; STEWART, D. Effect of mouthwashes of variable NaF concentration but constant NaF content on oral fluoride retention. **Caries Res**, v. 18, n. 1, p. 43-7, Jan/Feb. 1994.
42. EKSTRAND, J. A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. **Calcif Tissue Res**, v. 23, p. 225-8, 1977.
43. EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics during acid – base changes in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 18, p. 189-94, 1980.
44. EKSTRAND, J., EHRNEBO, M. Absorption of fluoride from fluoride dentifrices. **Caries Res**, v. 14, p. 96-102, 1980.
45. EKSTRAND, J; SPAK, C.J.; EHRNEBO, M. Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. **Acta Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 321-5, 1982.
46. EKSTRAND, J. KOCH, G.; PETERSSON, L. Plasma fluoride concentration in preschool children after ingestion of fluoride tablets and toothpaste. **Caries Res**, v. 17, N. 4, p. 379-84, 1983.
47. ERICSSON, Y. Fluoride in dentifrices. Investigation using radioactive fluorine. **Acta Odont Scand**, v. 19, p. 41-77, 1961.
48. ERICSSON, Y. Biologic splitting of PO₃F ions. **Caries Res**, v. 1, p. 144-52, 1967.
49. ERICSSON, Y. Monofluorophosphate physiology: general considerations. **Caries Res**, v. 17, p. 46-55, 1983. Supplement 1.
50. ERICSSON, Y.; FORSMAN, B. Fluoride retained from mouthrinses and dentifrices in preschool children. **Caries Res**, v. 3, n. 3, p. 290-9, 1969.

51. ESTEBAN, L.; RIGALLI, A.; PUCHE, R.C. Metabolism of the complex monofluorophosphate-alpha-2-macroglobulin in the rat. **Medicina** (Buenos Aires), v. 59, n. 2, p. 151-6.
52. EVANS, D.J. A study of developmental defects in enamel in 10-year-old-high social class children residing in an non-fluoridated area. **Comm Dent Health**, v. 8, n.1, p. 31-8, 1991.
53. EVANS, R.W.; DARVELL, B.W. Refining the estimate of the critical period for susceptibility to enamel fluorosis in human maxillary central incisors. **J Publ Hlth Dent**, v. 55, n. 4, p. 238-49, Fall, 1995.
54. EVERETT, E.T. et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **J Dent Res**, v. 81, n. 11, p. 794-8, Nov. 2002.
55. FEATHERSTONE et al., Acid reactivity of carbonated apatite with strontium and fluoride substitutions. **J Dent Res**, v. 62, p. 1049-53, 1983.
56. FEATHERSTONE, J.D.B. Diffusion phenomena and enamel caries development. In: Guggenheim N, **Cariology Today**. Basel, Karger, p. 259-68, 1984.
57. FEJERSKOV, O.; BAELUM, V.; RICHARDS, A. Dose-response and dental fluorosis. In: Fejerskov, O.; Ekstrand, J.; Burt, B.A. **Fluoride in Dentistry**. 2 ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996. p. 153-66.
58. FISKE, C.H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem**, v. 66, p. 375-400, 1925.
59. FOMON, S.J.; EKSTRAND, J.; ZIEGLER, E.E. Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: trends in fluoride intake with special

- attention to infants. **J Publ Hlth Dent**, v. 60, n. 3, p. 131-9, Summer 2000.
- 60.FORSMAN, B; ERICSSON, Y. Fluoride absorption from swallowed fluoride toothpaste. **Community Dent Oral Epid**, v. 1, p. 115-20, 1973.
- 61.FORSMAN, B. Studies on the effect of dentifrices with low fluoride content. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v. 2, n. 4, p. 166-75, 1974.
- 62.FORSMAN, B. Early supply of fluoride and enamel fluorosis. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 22-30, Jan. 1977.
- 63.FUKUSHIMA, R et al. Cinética do flúor na saliva de adultos e crianças após o uso de dentifrícios fluoretados. **Rev Fac Odontol Bauru**, v. 8, n. ½, p. 45-50, jan./jun., 2000.
- 64.GABLER, W.L. Absorption of fluoride through the oral mucosa of rats. **Arch Oral Biol**, v. 13, p. 619-23, 1968.
- 65.GERDIN, P. Studies in dentifrices, VIII: Clinical testing of an acidulated, nongrinding dentifrice with reduced fluoride contents. **Swed Dent J**, v. 67, n. 5, p. 283-97, 1974.1974
- 66.GUHA-CHOWDHURY, N.; DRUMMOND, B.K.; SMILLE, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years – a longitudinal study. **J Dent Res**, v. 75, n. 7, p. 1451-7, July 1996.
- 67.HARDING, A.M. et al. Calcium fluoride formation on sound enamel using fluoride solutions with and without lactate. **Caries Res**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 1994.

68. HARGREAVES, J.A.; INGRAM, G.S.; WAGG, B.J. A gravimetric study of the ingestion of toothpaste by children. **Caries Res.**, v. 6, n. 3, p. 237-43, 1972.
69. HOLM, A. K.; ANDERSON, R. Enamel mineralization disturbances in 12-year old children with known early exposure to fluorides. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v. 10, n. 6, p. 335-9, 1982.
70. HOLT, R.D. et al. Enamel opacities and dental caries in children who used a low fluoride toothpaste between 2 and 5 years of age. **Int Dent J.**, v. 44, n. 4, p. 331-41, 1994.
71. HOROWITZ, H.S. The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentrations for preschool-aged children. **J Public Health Dent**, v. 52, p. 216-21, 1992.
72. IJIMA, Y.; KATAYAMA, T. Fluoride concentration in deciduous enamel in high- and low-fluoride areas. **Caries Res**, v. 19, p. 262-5, 1985.
73. ISHII, T.; SUCKLING, G. The severity of dental fluorosis in children exposed to water with a high fluoride content for various periods of time. **J Dent Res**, v. 70, n. 6, p. 952-6, June 1991.
74. JÄRNEBERG, P.O.; EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M. Renal excretion of fluoride during water diuresis and induced urinary pH changes in man. **Toxicol Lett**, v. 18, p. 141-6, 1983.
75. JENKINS, G.N.; SPIERS, R.C. Distribution of fluoride in human enamel. **Proceedings of the Physiological Society of London**, v. 121, p. 21, 1953.

- 76.KOCH, G. et al. Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries. A three-year clinical study. **Swed Dent J**, v. 6, n. 6, p. 233-8, 1982.
- 77.KOCH, G. et al. Caries-preventive effect of fluoride dentifrices with and without anticalculus agents: a 3-year controlled clinical trial. **Caries Res**, v. 24, n. 1, p. 72-9, 1990.
- 78.KUMAR, J. V. et al. Trends in dental fluorosis and dental caries prevalence in Newburgh and Kingston, NY. **Amer J Public Health**, v. 79, n. 5, p. 565-9, 1989.
- 79.LALUMANDIER, J.A.; ROZIER, G.R. The prevalence and risk factors of fluorosis among patients in a pediatric dental practice. **Pediatr Dent**, v. 17, p. 19-25, 1995.
- 80.LARSEN, M.J.; RICHARDS, A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride material on human dental enamel. **Caries Res**, v. 35, n. 1, p. 57-60, 2001.
- 81.LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Fluoride intake by children from water and dentifrice. **Rev Saúde Publ**, v. 35, n. 6, p. 576-81, 2001.
- 82.MARTHALER, T.M. et al. Urinary fluoride excretion in children with low fluoride intake or consuming fluoridated salt. **Caries Res**, v. 29, p. 26-34, 1995.
- 83.MARTHALER, T.M. et al. Urinary fluoride excretion in Swiss children aged 3 and 4 consuming fluoridated domestic salt. **Acta Med Dent Helv**, v. 5, p. 89-97, 2000.
- 84.MASCARENHAS, A.K. Risks factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. **Pediatr Dent**, v. 22, p. 296-77, 2000.

85. MASCARENHAS, A.K.; BURT, B.A. Fluorosis risk from early exposure to fluoride toothpaste. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v. 26, n. 4, p. 241-8, 1998.
86. MATSUO, S.; RØLLA, G.; LAGERLÖF, F. Effects of fluoride addition on ionized calcium in salivary sediment and in saliva containing various amount of solid calcium fluoride. **Scand J Dent Res**, v. 98, p. 482-5, 1990
87. MCCLURE, F.J.; LIKINS, R.C. Fluorine in human teeth studied in relation to fluorine in the drinking water. **J Dent Res**, v. 236, p. 391-8, 1951.
88. MELBERG; J.R.; RIPA, L.W. **Fluorides in preventive dentistry**. Chicago, Quintessence, p. 44, 1983.
89. MESSNER; H.H.; OPHAUGH, R.H. Effect of delayed gastric emptying on fluoride absorption in the rat. **Biol Trace Element Res**, v. 31, p. 305-15, 1991.
90. MESSNER, H.H.; OPHAUG, R.H. Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. **J Dent Res**, v. 72, n. 3, p. 619-22, 1993.
91. MILSOM, K.; MITROPOULOS, C.M. Enamel defects in 8-year-old children in fluoridated and non-fluoridated parts of Cheshire. **Caries Res**, v. 24, n. 4, p. 286-9, 1990.
92. MITROPOULOS, C.M. et al. Relative efficacy of dentifrices containing 250 or 1000 ppm F in preventing dental caries - report of a 32-month clinical trial. **Comm Dent Health**, v. 1, n. 3, p. 193-200, 1984.
93. MURRAY, J.J.; RUGG-GUNN, A.J.; JENKINS, G.N. **Fluoride in caries prevention**. 3 ed. Oxford, Wright/Butterworth-Heinemann, 1991.

94. NAKASONE et al. Effects of the low-intensity red laser radiation on the fluoride uptake in human enamel. A preliminary study. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, special issue, AbsSL136, 2004.
95. NARVAI, P.C.; FRAZÃO, P.; CASTELLANOS, R.A.. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. **Odontologia e Sociedade**, v. 1, n. ½, p. 25-9, 1999.
96. NEGRI, H. M. D.; CURY, J. A. Efeito dose-resposta de uma formulação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto – estudo in vitro. **Pesq Odontol Bras**, v. 16, n. 4, p. 361-365, 2002.
97. NELSON et al. Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. **J Dent Res**, v. 62, p. 1201-8, 1983.
98. NEWBRUN, E. Topical fluoride therapy: discussion of some aspects of toxicology, safety and efficacy. **J Dent Res**, v. 66, n. 5, p. 1084-6, 1987.
99. NOPAKUN, J.; MESSNER, H.H.; VOLLER, V. Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. **J Nutr**, v. 119, p. 1411-7, 1989.
100. OGAARD, B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res**, v. 35, n. 1, p. 40-4, 2001.
101. OGAARD, B. et al. Orthodontic appliances and enamel demineralization. 2. Prevention and treatment of lesions. **Amer J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 94, p. 123-8, 1988.

102. OGAARD, B. et al. Professional topical fluoride applications - clinical efficacy and mechanism of action. **Adv Dent Res**, v. 8, p. 190-201, 1994.
103. OLIVEBY, A. et al. Influence of flow rate, pH and plasma fluoride concentrations on fluoride concentration in human parotid saliva. **Archs Oral Biol**, v. 34, n. 3, p. 191-4, 1989.
104. OLYMPIO et al. Incorporação de flúor no esmalte bovino in vitro após o uso de dentifrícios com concentração reduzida de flúor. **Journal of Applied Oral Sciences**, special issue, 2004. /no prelo/
105. OPHAUG, R.H.; SINGER, L.; HARLAND, B.F. Estimated fluoride intake of 6-month-old infants in four dietary regions of the United States. **Amer J clin Nut**, v. 33, n. 2, p. 324-7, Feb. 1980.
106. ORAMS, H.J. et al. Ultrastructural study of human dental enamel using selected area argon ion-beam thinning. **Arch Oral Biol**, v. 21, p. 659-61, 1976.
107. OSUJI, O.O. et al. Risk factors for dental fluorosis a fluoridated community. **J Dent Res**, v. 67, n. 12, p. 1488-92, 1988.
108. PENDRYZ, D.G. Risk of fluorosis in a fluoridated population. Implications for the dentist and hygienist. **J Amer Dent Ass**, v. 126, n. 12, p. 1617-24, 1995.
109. PENDRYZ, D.G.; KATZ, R.V. Risk of enamel fluorosis associated with fluoride supplementation, infant formula and fluoride dentifrice use. **Amer J Epid**, v. 130, n. 6, p. 1199-208, 1989.

110. PENDRYZ, D.G.; KATZ, R.V.; MORSE, D.E. Risk factors for enamel fluorosis in a fluoridated population. **Amer J Epidemiol**, v. 140, n. 5, p. 461-71, 1994.
111. PENDRYZ, D.G.; KATZ, R.V.; MORSE, D.E. Risk factors for enamel fluorosis in a nonfluoridated population. **Amer J Epidemiol**, v. 143, n. 8, p. 808-15, 1996.
112. PEREIRA, A.C. et al. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. **ASDC J dent Child**, v. 67, n. 2, p. 132-5, 2000.
113. PERES, P.E.C.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Avaliação in situ de uma formulação de dentifrício com concentração reduzida de flúor. **Pesq Odont Bras**, v. 15, p. 83, 2001. (Abs A103)
114. PESSAN, J.P. et al. Avaliação da ingestão total de flúor de crianças entre 4 e 7 anos de idade através da dieta e escovação. **Pesq Odont Bras**, v. 16 (suplemento), p. 69, 2002 (Res. Ib068).
115. PESSAN, J.P. et al. Analysis of fingernails and urine as biomarkers of fluoride exposure from dentifrice and varnish in 4-7-year-old children. **Caries Res**, 2005. /no prelo/
116. PETERSSON, L.G. et al. Fluorine profiles in human enamel after in vitro treatment with dentifrices of different compositions and acidities. **Swed Dent J**, v. 13, p. 177-83, 1989.
117. POOLE, D.F.G.; NEWMAN, H.N.; DIBDIN, G.H. Structure and porosity of human cervical enamel studied by polarizing microscopy and

- transmission electron microscopy. **Arch Oral Biol**, v. 26, p. 977-82, 1981.
118. RAJAN, B. P.; GNANASUNDARAM, N.; SANTHINI, R.; Serum and urine fluoride levels in toothpaste users. **J Indian Dent Assoc**, v. 59, p. 137-42, 1987.
119. REED, M.W. Clinical evaluation of three concentrations of sodium fluoride in dentifrices. **J Amer Dent Ass**, v. 87, n. 7, p. 1401-3, 1973.
120. RICHARDS, A.; BANTING, D.W. Fluoride toothpastes. In: Fejerskov, O.; Ekstrand, J.; Burt, B.A. eds. **Fluoride in dentistry**. Copenhagen, Munksgaard, 1996, p. 328-46.
121. RIGALLI, A.; MOROSANO, M.; PUCHE, R.C. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 5, p. 531-3, May 1996.
122. RIGALLI, A. et al. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. **Arzneimittelforschung**, v. 44, n. 5, p. 651-5, May 1994.
123. RIPA, L.W. A critique of topical fluoride methods (dentifrices, mouthrinses, operator-, and self-applied gels) in an era of decreased caries and increased fluorosis prevalence. **J Public Health Dent**, v. 51, n. 1, p. 23-41, 1991.
124. ROBINSON, C.; KIRKHAM, J.; WEATHERELL, J.A. Fluoride in teeth and bone. In: FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B.A.

- Fluoride in Dentistry**, 2 ed. Denmark, Munksgaard, 1996. Cap. 12, p. 75.
125. ROCK, W.P.; SABIEHA, A.M. The relationship between reported toothpaste usage in infancy and fluorosis of permanent incisors. **Brit Dent J.**, v. 183, n. 5, p. 165-70, 1997.
126. RØLLA, G.; ÖGAARD, B.; DE ALMEIDA CRUZ, R. Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. **Int Dent J.**, v. 41, p. 171-4, 1991.
127. RØLLA, G.; EKSTRAND, J. Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B.A. **Fluoride in Dentistry**, 2 ed. Denmark, Munksgaard, 1996. Cap. 12, p. 225.
128. RUGG-GUNN, A.J. et al. Urinary fluoride excretion in 4-year-old children in Sri Lanka and England. **Caries Res**, v. 27, p. 478-83, 1993.
129. SAXEGAARD, E.; RØLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scand J Dent Res.**, v. 96, p. 523-35, 1988.
130. SAXEGAARD, E.; RØLLA, G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. **Caries Res**, v. 23, p. 406-11, 1989.
131. SHANNON, I.L.; SUDDICK, R.P.; EDMONDS, E.J. Effect of rate of gland function on parotid saliva fluoride concentration in the human. **Caries Res**, v. 7, p. 1-10, 1973.
132. SHELLIS, R.P.; DUCKWORTH, R.M. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. **Int Dent J**, v. 44, p. 263-273, 1994.

133. SKOTOWSKI, M.C.; HUNT, R.J.; LEVY, S.M. Risk factors for dental fluorosis in pediatric dental patients. **J. Public Health Dent**, v. 55, n. 3, p. 154-9, 1995.
134. SOPARKAR, P.M.; DEPAOLA, P.F. History of fluoride ingestion among children diagnosed with and without fluorosis. **J Dent Res**, v. 64, p. 230, 1985. Special Issue. Abst.
135. SZPUNAR, S.M.; BURT, B.A. Dental caries, fluorosis and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. **J Dent Res**, v. 67, n. 5, p. 802-6, 1988.
136. TAVES, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v. 15, p. 969-74, 1968.
137. TRAUTNER, K.; SIEBERT, G. An experimental study of bioavailability of fluoride from dietary source in man. **Arch Oral Biol**, v. 31, n. 4, p. 223-8, 1986.
138. VILLA, A.; ANABALÓN, M.; CABEZAS, L. The fractional urinary fluoride excretion in young children under stable fluoride intake conditions. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 28, p. 344-55, 2000.
139. WANG, N.J.; GROPER, A.M.; AGAARD, B. Risk factors associated with fluorosis in a non-fluoridated population in Norway. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v. 25, n. 6, p. 396-401, 1997.
140. WARREN, J.J.; LEVY, S.M. A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. **Pediatr Dent**, v. 21, n. 4, p. 265-71, 1999.

141. WEATHEREL, J.A.; HALLSWORTH, A.S.; ROBINSON, C. Effect of tooth wear in the distribution of fluoride in the enamel surface of human teeth. **Arch Oral Biol**, v. 18, p. 1175-89, 1973.
142. WEATHERELL, J.A. et al. Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth. **Caries Res**, v. 11, p. 85-115, 1977.
143. WEATHERAL, J.A.; HARGREAVES, J.A. The microsampling of enamel in thin layers by means of strong acids. **Arch Oral Biol**, v. 10, p. 139-42, 1965.
144. WEATHERELL, J.A.; NAYLOR, G.; HALLSWORTH, A.S. Measurement of topical fluoride acquired by sound human enamel. **Caries Res**, v. 11, p. 231-6, 1977.
145. WHITFORD, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J Dent Res**, v. 69, p. 539-49, Feb. 1990. Special issue.
146. WHITFORD, G.M. Intake and metabolism of fluoride. **Adv Dent Res**, n.1, p. 8-14, 1994.
147. WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monogr Oral Sci**, v.16, Rev 2, p. 1-153, 1996.
148. WHITFORD, G.M. **The metabolism and toxicity of fluoride**, 2 ed. Karger, Basel, p. 107-11, 1996.
149. WHITFORD, G.M. Comunicação pessoal, 2004.
150. WHITFORD, G.M.; PASHLEY, D.H. Fluoride absorption: the effects of gastric acidity. **Calisf Tissue Inter**, v. 36, p. 302-7, 1984.

151. WHITFORD, G.M.; CALLAN, R.S.; WANG, H.S. Fluoride absorption through the ramster check pouch: a pH-dependent event. **J Appl Toxicol**, v. 2, p. 303-306, 1982
152. WHITFORD, G.M. et al. Enamel uptake and patient exposure to fluoride: comparison of APF gel and foam. **Pediatric Dentistry**, v. 17, n. 3, p. 199-203, 1995.
153. WHITFORD, G. M. et al. Fluoride in whole saliva, parotid ductal saliva and plasma in children. **Arch Oral Biol**, v. 44, p. 785-8, 1999.
154. WINTER, G.B.; HOLT, H.D.; WILLIAMS, B.F. Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. **Int Dent J**, v. 39, n. 4, p. 227-35, 1989.
155. WOOLFOLK, M.W.; FAJA, B.W.; BAGRAMIAN, R. A. Relation of sources of systemic fluoride to prevalence of dental fluorosis. **J Public Health Dent**, v. 49, n. 2, p. 78-82, 1989.
156. ZERO, D.T. et al. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. **J Dent Res**, v. 71, p. 1768-75, 1992.
157. ZERO, D.T. et al. Studies of fluoride retention by oral soft tissues after application of home-use topical fluorides. **J Dent Res**, v. 71, n. 9, p. 1546-52, 1992.
158. ZOHOURI, F.V.; RUGG-GUNN, A.J. Total fluoride intake and urinary excretion in 4-year-old Iranian children residing in low-fluoride areas. **Br J Nutr**, v. 83, p. 15-25, 2000.

Abstract

ABSTRACT

Analysis of the fluoride uptake in dental enamel “in vivo” after the use of low fluoride concentrations dentifrices and its relation to bioavailability of fluoride in these dentifrices compared to others available commercially

The aims of this study were: to assess the fluoride uptake in dental enamel clinically sound from low fluoride dentifrices; to analyze the kinetics of F in saliva of these F dentifrices and to assess the F bioavailability from these dentifrices in relation to pH and abrasive system. In the 1st study, double-blind and crossover, it were tested the follow dentifrices: experimental formulations containing 1,100; 550; 275 ppm F, NaF (pH 5.5), Crest™ (positive control), Colgate Baby™ (500 ppm F, NaF, pH 6.9) and a placebo dentifrice, pH 5.5 (negative control). Sixteen 18-35-year-old volunteers tooth brushed 3 times a day with the tested dentifrices during 2 weeks with each concentration. The phases differed according to dentifrice used and they were separated by an interval of 1 week. Biopsies were obtained applying 5 µL 0.5 M HCl on the delimited area (5 s), followed by neutralization of the area applying 5 µL 0.25 M NaOH, 2 times. The 2nd study was a double – blind study, carried out in 5 phases, which 10 18-35-year-old recruits brushed with one of the F dentifrices described early. Intervals of one week separated the five phases, period during which was utilized placebo dentifrice. The collections of unstimulated total saliva (3 min) were done in the times

baseline, 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 and 60 min, after the brushing with 1.5 g of the proposed dentifrice. In the 3rd experiment, the F bioavailability of the fluoridated formulations was analyzed in relation to the abrasive system and pH, in a double-blind protocol. Nine 18-35-year-old volunteers fasted for 12 h and ingested 2 mg F in solution of dentifrice. In phases I – IV, the dentifrices used were: Sorriso Dentes Brancos™ – 1,500 ppm F (MFP), CaCO₃, pH 9.5; 1,100 ppm F (NaF), silica, pH 5.5; 1,100 ppm F (NaF), silica, pH 7.0 and Crest™ - 1,100 ppm F (NaF), silica, pH 6.5, respectively. Intervals of one week separated the four phases. They fasted by additional 8 h and received a standard breakfast with low fluoride content (0.07 mg). Samples of total saliva were collected before the intake of dentifrices and, after this, every 20 min up to 2h, every 40 min up to 4 h and then every hour up to 8 h. Urine was collected during 24 h before and during the experimental day. In the three experiments, F was analyzed by direct method or with the ion specific electrode, after HMDS facilitated diffusion and P was analyzed by the colorimetric method. Data were tested using the ductal saliva AUC estimate, ANOVA and Tukey's post hoc test (p<0.05). There were not statistically significant differences among the tested dentifrices in relation to F uptake in dental enamel. Considering the total saliva, the 550 ppm F dentifrice was similar to gold standard. The AUC estimate demonstrated that there was not statistically significant difference of the bioavailability among them. Urine data showed that there was not statistically significant difference among the intaked dentifrices. The results suggest that acidulated and low F concentration dentifrices are effective to increase the F levels in total saliva

appropriately in relation to prevent dental caries, being that the F bioavailability of these dentifrices is not affected by pH or abrasive system.

Apêndice

APÊNDICE 1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº086/2002

Bauru, 18 de setembro de 2002

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação pendente, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê denominado "**Análise da incorporação de flúor ao esmalte dental "in vivo" após o uso de dentifrícios com concentração reduzida de flúor**", de autoria de Kelly Polido Kaneshiro Olympio, que será desenvolvido sob a sua orientação e co-orientação do Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos, foi **APROVADO**.

Comunicamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Álvares Capelozza
Coordenadora

Ilmª Srª Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas (Bioquímica)

APÊNDICE 2. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 70/2003

Bauru, 26 de junho de 2003

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **“Biodisponibilidade do flúor a partir do fluoreto de sódio e do monofluorofosfato de sódio em função do pH e do tipo de abrasivo do dentífrico”**, de autoria de Kelly Polido Kaneshiro Olympio / Priscila Ariede Petinuci Bardal, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 25 de junho de 2003 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alvares Capelozza
Coordenadora

Ilmª Srª Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas (Bioquímica)

APÊNDICE 3. Carta do Comitê de Ética aprovando a troca do título da dissertação.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)

Of.nº CEP/28 2004/FOB

Bauru, 18 de novembro de 2004.

Senhora Professora,

Tendo em vista a informação de que os resultados obtidos com os trabalhos *“Análise da incorporação de flúor ao esmalte dental in vivo após o uso de dentifrícios com concentração reduzida de flúor”* e *“Biodisponibilidade de flúor a partir do fluoreto de sódio e do monofluorofosfato de sódio em função do pH e do tipo de abrasivo do dentifrício”*, serão apresentados na dissertação de Mestrado da aluna Kelly Polido Kaneshiro Olympio, sob sua orientação, com o título *“Análise da incorporação de flúor no esmalte dentário in vivo após o uso de dentifrícios com concentração reduzida de flúor e sua relação com a biodisponibilidade de flúor nestes dentifrícios em comparação com outros comercialmente disponíveis”*, autorizamos a alteração do título, considerando que a metodologia do trabalho não foi modificada.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos,

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas