



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CARLA BATTISTON

**COMPARAÇÃO ENTRE FLÚOR GEL E VERNIZ
FLUORETADO NA FORMAÇÃO E RETENÇÃO DE
FLUORETO FORMADO NO ESMALTE E LIBERAÇÃO PARA
O BIOFILME DENTAL: UM ESTUDO CLÍNICO
RANDOMIZADO CONTROLADO**

**Piracicaba
2017**

CARLA BATTISTON

**COMPARAÇÃO ENTRE FLÚOR GEL E VERNIZ
FLUORETADO NA FORMAÇÃO E RETENÇÃO DE
FLUORETO FORMADO NO ESMALTE E LIBERAÇÃO PARA
O BIOFILME DENTAL: UM ESTUDO CLÍNICO
RANDOMIZADO CONTROLADO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Cariologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Livia Maria Andaló Tenuta

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CARLA BATTISTON E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA.

**Piracicaba
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B322c Battiston, Carla, 1974-
Comparação entre flúor gel e verniz fluoretado na formação e retenção de fluoreto formado no esmalte e liberação para o biofilme dental : um estudo clínico randomizado controlado / Carla Battiston. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Fluoreto de cálcio. I. Tenuta, Lívia Maria Andaló, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison between fluoride gel and varnish fluoride in the formation and retention of fluoride formed in the enamel and release to the dental biofilm : a randomized controlled trial

Palavras-chave em inglês:

Calcium fluoride

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Lívia Maria Andaló Tenuta [Orientador]

Mariana Minatel Braga

Fernando Borba de Araújo

Vanessa Cavalli Gobbo

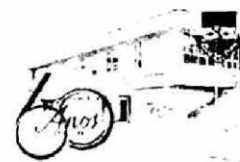
Fernanda Miori Pascon

Data de defesa: 14-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata CARLA BATTISTON aprovada.

PROF^a. DR^a. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

PROF^a. DR^a. MARIANA MINATEL BRAGA

PROF. DR. FERNANDO BORBA DE ARAÚJO

PROF^a. DR^a. VANESSA CAVALLI GOBBO

PROF^a. DR^a. FERNANDA MIORI PASCON

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu filho, **Ricardo**,
por entender a minha ausência em alguns momentos;
pelo amor, confiança e motivação, deixando leve
os meus desafios.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha mãe, **Ieda Gusberti Battiston**, que está sempre ao meu lado, pelo apoio em minha formação acadêmica e também pelo exemplo de vida, coragem e perseverança.

À minha irmã, **Saionara Battiston**, pela amizade, disposição em ajudar e apoio durante todo o tempo, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes.

Ao meu amigo e colega, **Mauro Antonio Dall Agnol**, pela amizade, paciência e ajuda nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

À Prof.^a Dr.^a **Livia Maria Andaló Tenuta**, muito obrigada pela confiança em mim depositada, pela ajuda, ensinamentos e orientações. Sempre me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Levarei comigo cada um dos seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury**, a quem tenho profunda admiração, pelas contribuições, orientação e confiança em todas as fases do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a **Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, por ser sempre tão solícita, pela amizade, ensinamentos e apoio constantes durante todo o tempo.

Aos colegas **Diego Figueiredo Nóbrega** e **Lina Marin Gallon**, pelo auxílio, companheirismo e disposição em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. **Antônio Pedro Ricomini Filho**, por ter aceito contribuir na etapa de qualificação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, em nome do diretor Prof. Dr. **Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

À Universidade Comunitária da Região de Chapecó por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **Claudio Alcides Jacoski**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPG-O) da FOP/UNICAMP, em nome do coordenador Prof. Dr. **Marcelo de Castro Meneghim**.

Aos técnicos **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pela amizade e ajuda fundamentais no laboratório de Bioquímica oral da FOP/UNICAMP.

Aos ex-alunos da Faculdade de Odontologia da Unochapeco, pela ajuda durante as etapas clínicas, **Leonardo Balancin**, **Tatiana Simon**, **Vinicius Souza**, **Eliane Lazzarotto** e **Eduardo Vedana**.

Aos **voluntários** pela valiosa participação, colaboração e dedicação neste estudo.

RESUMO

O benefício no controle da cárie dentária da aplicação tópica profissional de flúor (ATPF), quer seja na forma de gel ou verniz, é bem estabelecido e resulta da formação de uma concentração elevada de flúor (F) nas superfícies dentárias. Embora *in vitro* a concentração de F formada no esmalte após o uso de gel ou verniz fluoretado seja semelhante, desconhece-se a capacidade de retenção de F no esmalte, *in vivo*, e seu efeito enriquecendo o biofilme dental com F. O objetivo deste estudo foi comparar a capacidade do F gel (F-gel) e do verniz fluoretado (VF) de formar depósitos de F no esmalte e avaliar sua liberação para o biofilme dental em função do tempo. Os voluntários (n=51) foram randomizados em três grupos experimentais: 1. Grupo controle negativo: nenhuma intervenção; 2. Grupo VF: aplicação de VF (NaF a 5% - Duraphat[®]) por 24 h; 3. Grupo gel: aplicação de F-gel (flúor fosfato acidulado em gel a 1,23%, DFL[®]) por 4 min. Amostras de esmalte dental foram obtidas de incisivos superiores pela técnica de microbiópsia ácida e utilizadas para determinação da concentração de F no esmalte antes da aplicação dos produtos, imediatamente após a remoção do F-gel e VF e após 7 e 28 dias. Biofilme dental formado sobre os dentes foi coletado antes da aplicação dos produtos e após 3, 7, 14 e 28 dias, para determinação da concentração de F na porção fluida e sólida do biofilme. A concentração do íon F no esmalte dental e nas amostras de biofilme foram determinadas por eletrodo específico. As variáveis resposta foram analisadas estatisticamente considerando um delineamento fatorial, com tratamento e tempo como fatores, com nível de significância de 5%. Na avaliação da concentração de F no esmalte, houve interação significativa entre os fatores tratamento e tempos de coleta; no grupo controle, não foi encontrada diferença entre os tempos de coleta, mas para os grupos F-gel e VF, aumento significativo da concentração de F no esmalte foi observado imediatamente após os tratamentos. Esse aumento permaneceu significativamente mais alto do que o valor inicial até 7 dias para o grupo VF. Não houve diferença entre os tratamentos nos diferentes tempos de coleta, exceto imediatamente após as aplicações de F-gel e VF, quando esses grupos apresentaram concentrações de F no esmalte significativamente maiores do que o controle negativo, sem diferença entre si. Na avaliação da concentração de F no biofilme, não houve interação entre os fatores tratamento e tempos de coleta. Não houve diferença significativa entre os

tratamentos na concentração de F no fluido do biofilme. Na parte sólida o efeito de tratamento foi significativo, com o grupo F-gel diferindo significativamente do grupo controle. Os resultados confirmam que F-gel e VF tem a mesma capacidade de formar F no esmalte e sugerem que seu efeito de longo prazo seja devido a um diminuto enriquecimento do biofilme dental com F.

Palavras-chave: Flúor. Fluoreto de Cálcio. Flúor Tópico.

ABSTRACT

The benefit of the professional topical application of fluoride (ATPF), either as gel or varnish, for caries control is established and results from the formation of a high concentration of fluoride (F) on dental surfaces. Although *in vitro* the concentration of F formed in the enamel after the use of fluoride gel or varnish is similar, its retention *in vivo*, as well as its capacity to enrich dental biofilm with F is unknown. The objective of this study was to compare the capacity of F gel (F-gel) and fluoride varnish (VF) to form F deposits in the enamel and to evaluate their release to the dental biofilm with time. The volunteers (n=51) were randomized into three experimental groups: 1. Negative control group: no intervention; 2. Group VF: application of VF (NaF at 5% - Duraphat®) for 24 hours; 3. Group gel: application of F-gel (acidulated phosphate fluoride at 1.23%, DFL®) for 4 minutes. Samples of dental enamel were obtained from upper incisors using the acid microbiology technique and used to determine the concentration of F in the enamel before the application of the products, immediately after the removal of the F-gel and VF and after 7 and 28 days. Dental biofilm formed on the teeth was collected before application of the products and after 3, 7, 14 and 28 days, to determine the concentration of F in the fluid and solid portion of the biofilm. The concentration of F ion in the dental enamel and in the biofilm samples was determined by a specific electrode. Response variables were statistically analyzed considering a factorial design, with treatment and time as factors, with significance level of 5%. In the evaluation of the F concentration in the enamel, there was a significant interaction between the treatment factors and collection times; in the control group, no difference was found between the collection times, but for the F-gel and VF groups, a significant increase of F concentration in the enamel was observed immediately after the treatments. This increase remained significantly higher than the initial value up to 7 days for the VF group. There was no difference between the treatments at the different collection times, except immediately after the F-gel and VF applications, when these groups had F concentrations in the enamel significantly higher than the negative control, with no difference between them. In the evaluation of the concentration of F in the biofilm, there was no interaction between the treatment factors and the collection times. There was no significant difference between the

treatments in the concentration of F in the biofilm fluid. In the biofilm solids, the treatment effect was significant, with the F-gel group differing significantly from the control group. The results confirm that F-gel and VF have the same ability to form F in the enamel and suggest that its long-term effect is due to a small enrichment of the dental biofilm with F.

Key words: Fluoride. Calcium Fluoride. Fluoride, Topical.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	55
Apêndice 1: Kit fornecido aos voluntários	55
Apêndice 2: Orientações fornecidas aos voluntários	56
ANEXOS	57
Anexo 1: Parecer consubstanciado do CEP	57
Anexo 2: Comprovante de registro do estudo no ClinicalTrials.gov	60
Anexo 3: Relatório estatístico	63

1 INTRODUÇÃO

Os benefícios da aplicação tópica profissional de flúor (ATPF) na redução dos índices de cárie dentária estão estabelecidos com base em evidência de ensaios clínicos (Marinho et al., 2004). Esse efeito anticárie é associado à reatividade do fluoreto (F) com o esmalte e a dentina, formando produtos tipo fluoreto de cálcio (CaF_2), que funcionam como reservatório de liberação lenta de F para a cavidade bucal (Tenuta et al., 2008). Os meios profissionais são indicados para indivíduos com alta/moderada atividade de cárie ou risco de desenvolver a doença (Ogaard et al., 1994; Vaikuntam, 2000; Seppa, 2004; ten Cate, 2013). Dentre os meios profissionais de uso de F, destacam-se o flúor fosfato acidulado em gel (F-gel) e o verniz fluoretado (VF), que possuem concentração de F solúvel, pH e veículo distintos.

No F-gel todo o F (12.300 ppm) está disponível para uma reação imediata com esmalte e dentina porque o sal fluoreto de sódio (NaF) usado é dissolvido em água, permitindo uma aplicação por curto período de tempo, de 1 a 4 min (Calvo, 2012). Além disso, o F-gel tem pH ácido, favorecendo uma reação rápida, pois ocorre uma dissolução do substrato dental com subsequente precipitação de produtos do tipo CaF_2 (Brudevold, 1991). Por outro lado, no VF o pH é neutro e a concentração de F (22.500 ppm) é mais alta do que no F-gel. Entretanto, o NaF do verniz está presente como uma suspensão em base alcoólica, na qual somente uma pequena porcentagem do fluoreto está solúvel para uma reação imediata com esmalte (Fernández et al., 2014). Apesar disso, o F insolúvel no verniz total é dissolvido durante o contato com a saliva, aumentando a reatividade com o esmalte durante o período em que o verniz é mantido sobre a superfície dentária, de modo que sua manutenção prolongada em contato com os dentes, por até 24 h, tem se mostrado mais eficaz na reatividade do F com o esmalte, contrariando a indicação clínica de manter o VF sobre os dentes por 4-6 h (Fernández et al., 2014).

Apesar da diferença em composição, estudos *in vitro* têm demonstrado que a concentração de F formada no esmalte após o uso de F-gel e VF é semelhante (Dijkman et al., 1983; Hayacibara et al., 2004). No entanto, isso nunca foi testado *in vivo*.

Além disso, o principal efeito anticárie do F se dá quando ele está presente no biofilme dental, para interferir com os eventos de desmineralização e remineralização (Cury e Tenuta, 2009). Embora tenha sido demonstrado em um modelo de estudo *in situ* de curta duração que os reservatórios de F formados no esmalte pela ATPF são liberados para o fluido do biofilme e interferem com o processo de desmineralização (Tenuta et al., 2008), não há estudos clínicos que tenham avaliado a concentração de F no biofilme dental formado sobre dentes que receberam ATPF.

Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a capacidade do F-gel e VF de formar reservatório de F no esmalte e de manter concentração aumentada de F no biofilme dental em função do tempo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismo de ação do F no controle da cárie

Atualmente, há consenso de que o efeito do F incorporado ao dente é secundário e que o principal efeito anticárie do F ocorre quando ele estiver presente localmente (fluido do biofilme e saliva) na sua forma livre e solúvel e no momento adequado (exposição à sacarose) para interferir nos eventos de des e remineralização, sendo eficaz até mesmo em baixas concentrações (Cury e Tenuta, 2009). Isso pode ser explicado pela menor solubilidade da FA em relação à HA presente na estrutura dental. Sendo um mineral menos solúvel, a FA é que tende a se precipitar mais facilmente do que a HA em meio contendo cálcio e fosfato inorgânico presentes na saliva e biofilme dental. Desta forma, quando o F estiver presente na cavidade bucal, toda perda mineral que estiver ocorrendo sob o biofilme dental cariogênico tenderá a ser parcialmente revertida pela precipitação da FA no dente, com consequente reposição de parte dos minerais perdidos. Com isso, o mecanismo de ação do F no controle da cárie pode ser atribuído à redução da perda mineral líquida pela sua capacidade de diminuir a desmineralização e ativar a remineralização do esmalte e da dentina (Tenuta e Cury, 2010).

Como o principal efeito do F no controle da cárie é pós-eruptivo, qualquer meio de utilização de F, para ser considerado eficaz, deve ser capaz de fornecer e manter a concentração de íons F na cavidade bucal. Disponibilidade de F no meio bucal durante todo o dia é importante; isto pode ser conseguido quando os produtos fluoretados são utilizados como parte da rotina de higiene diária (em veículos que contenham baixa concentração (<1.500 ppm F-), como, por exemplo os dentifrícios fluoretados e enxaguatórios bucais ou mesmo incorporado a água de abastecimento); ou alternativamente, quando o F é aplicado profissionalmente por meio de produtos que contenham alta concentração (de 9.000 a 56.000 ppm F), como os géis, mousses e vernizes. Esses últimos métodos são particularmente eficazes como tratamentos adicionais em indivíduos com índices elevados de cárie, e o paciente irá beneficiar-se sem a necessidade da sua utilização diária (ten Cate, 2004).

Produtos com alta concentração de F para aplicação profissional (géis e vernizes), além de aumentarem a concentração de F na cavidade bucal no momento da aplicação, formam reservatório de fluoreto de cálcio (“CaF₂”), que se forma pelo contato do F com íons cálcio disponíveis na cavidade bucal. Considerando a temática desse trabalho, as especificidades do mecanismo de ação dos produtos para aplicação profissional de F serão descritos no próximo tópico.

2.2 Mecanismo de ação da aplicação profissional de F (ATPF)

Quando um produto com alta concentração de F é colocado em contato com a superfície dental, ocorre a dissolução das camadas mais superficiais do esmalte, e o cálcio dissolvido é precipitado sobre o dente na forma de fluoreto de cálcio (“CaF₂”). Este mineral, que não é puro mas contaminado por fosfato e proteínas, está também recoberto por esses contaminantes, formando uma espécie de capa protetora que retarda a dissolução do mineral, fazendo com que ele opere como um agente de liberação lenta de F (Saxegaard e Rolla, 1989).

A atuação dinâmica do “CaF₂” ocorre durante desafio cariogênico em função do baixo pH no biofilme dental (Rolla et al., 1993). Em pH baixo, a camada protetora do “CaF₂” é dissolvida, levando a sua exposição e solubilização parcial. O íon F liberado pode exercer seu efeito ativando a remineralização dental (ten Cate, 1997).

Sendo assim, o “CaF₂” age como um reservatório de F disponível para atuar na dinâmica do processo de des-remineralização, interferindo na progressão da lesão de cárie (Cury, 2001).

2.2.1 Reatividade de produtos com alta concentração de F com o dente

Há anos são realizados estudos sobre a formação de depósitos de “CaF₂” após a aplicação de produtos fluoretados.

A formação de glóbulos de “CaF₂” e a precipitação de FA no esmalte após a aplicação tópica de produtos fluoretados foi demonstrada através de raios-X e elétron difração por Brudevold et al. (1967) em um estudo onde espécimes de

esmalte foram imersos em solução aquosa de fluoreto de sódio (NaF) a 4% durante um mês. Concluíram que os depósitos de “CaF₂” formados após aplicação tópica de fluoreto conferiram proteção ácida ao esmalte realizado através de ataque ácido com 10 N de HCl por 10 segundos. Também que a exposição prolongada em solução neutra de NaF aparentemente causou a dissolução da HA e a precipitação na forma de FA no esmalte.

Caslavska et al. (1975) determinaram *in vitro* o “CaF₂” formado no esmalte humano após exposição a soluções fluoretadas. Concluíram que 1 M de hidróxido de potássio (KOH) pode ser utilizado para a avaliação do “CaF₂” formado a partir de tratamentos tópicos em sistemas *in vitro*. Os resultados dessa investigação mostraram que, quando misturas de “CaF₂” e compostos de apatita são expostos a uma solução fortemente alcalina (KOH 1 M), não ocorre dissolução detectável da apatita. “CaF₂” e fluorapatita (FA) se formam pela reatividade do F em altas concentrações com a superfície dental nas aplicações profissionais de F. É provável, portanto, que a fração de F aplicado topicamente, que é mantido após o tratamento com KOH tem significância clínica, e que o método de KOH é útil no rastreio de agentes tópicos que interagem com esmalte para produzir “CaF₂”, como um dos seus produtos de reação.

Dijkman et al. (1983) estudaram a quantidade de F incorporada a blocos de esmalte dental após aplicação de F-gel, verniz Duraphat® e Flúor Protector® e concluíram através de biópsias de esmalte (1, 4 e 12 semanas) e após manterem os blocos dentro da cavidade bucal, que o “CaF₂” incorporado foi perdido em todos os três tratamentos a uma taxa de cerca de 20 µg/cm² durante a primeira semana, sendo que as amostras tratadas com F-gel e Duraphat® perderam quase todo o “CaF₂” *in situ* durante este período. O estudo também mostrou que, se “CaF₂” suficiente é depositado sobre o esmalte *in situ*, durante um tempo suficientemente longo, a quantidade de F no esmalte pode ser significativamente aumentada.

Saxegaard e Rolla (1989), pesquisaram, em estudo *in situ*, a aquisição e perda do “CaF₂” em esmalte hígido e desmineralizado e confirmaram a maior estabilidade do composto no dente do que se pensava. Em ambos os experimentos os voluntários utilizaram blocos de esmalte por oito dias. Os resultados foram: 1. Durante bochechos quantidades moderadas de F foram adquiridas pelo esmalte sem condicionamento, mais como “CaF₂” do que FA, enquanto que no esmalte condicionado, mais F foi depositado como FA. Em esmalte condicionado houve

também uma tendência para que a deposição de “CaF₂” estabilizasse enquanto a incorporação de F total continuou. É provável que o “CaF₂” tenha se transformado em FA através de remineralização durante ciclagem de pH na placa que cobre o esmalte condicionado. 2. Após aplicação tópica única, o esmalte condicionado inicialmente possuía mais “CaF₂” do que o esmalte sem condicionamento, mas também perdeu mais durante o primeiro dia de exposição *in situ*. A perda de “CaF₂” ocorreu depois de 1-2 dias, em esmalte condicionado em 70% e em 40% no esmalte sem condicionamento. Sugeriu-se que o aumento das quantidades de FA é proveniente do “CaF₂” no esmalte, e que este é uma fonte importante e clinicamente significativa de íons de fluoreto no esmalte. Revelaram ainda que uma camada de proteínas e fosfato recobre esses depósitos de “CaF₂”, os estabilizando e permitindo uma lenta liberação de F. Devido a essa velocidade de dissolução diminuída, a capacidade de atuar como um reservatório de F pode ter uma duração suficiente para apresentar significância clínica. Além do que, sendo o F disponível na fase líquida do cristal de apatita e no fluido da placa o mais importante durante o processo de des-remineralização, isso enfatiza que uma liberação lenta do depósito de “CaF₂” é muito importante no mecanismo cariostático de ação do F. Aplicações frequentes de F tópico asseguram um depósito constante de “CaF₂” na superfície dentária.

Bruun e Givskov (1991) avaliaram *in vitro* a formação de “CaF₂” no esmalte com e sem lesões de cárie de esmalte depois do tratamento com 2% de NaF neutro ou Duraphat®. Lesões de cárie semelhantes foram criadas pela exposição ao FFA gel (pH 4,5) em uma área exposta de 0,07 cm². A mesma área foi usada em série (n = 10) na aplicação de NaF durante 1 ou 5 min, ou na aplicação de Duraphat® durante 6 ou 18 h. O “CaF₂” foi extraído com KOH 1 M durante 24 h, e fluoreto foi determinado por cromatografia em fase gasosa. As aplicações de curto prazo de NaF produziram apenas quantidades insignificantes de “CaF₂”. Concluíram que o tratamento convencional de 5 min com NaF produziu a mesma quantidade do “CaF₂” como quando houve a exposição ao Duraphat® por 6 ou 18 h. Uma limitação deste estudo foi que a simulação da lavagem pela saliva que ocorre na boca não foi realizada.

Rölla et al. (1993) publicaram uma revisão sobre a aplicação tópica de fluoretos nos dentes, abordando novos conceitos. Nela reforçaram que o “CaF₂” parece ser o único produto que é formado sobre o esmalte, dentina ou cimento

durante tratamentos tópicos com flúor ou o uso contínuo de dentifrício fluoretado. Relataram também na revisão que o “CaF₂” é estável no ambiente bucal, ao contrário do que se acreditava anteriormente e que a atuação dinâmica desse “CaF₂” formado ocorre durante o desafio cariogênico em função da queda do pH do biofilme, onde a camada protetora do “CaF₂” é dissolvida, levando à sua exposição e solubilização parcial.

Não há consenso sobre a importância dos procedimentos clínicos pré e pós-aplicação que têm sido recomendados quando da aplicação profissional de F-gel. Um fator ainda em discussão quanto à utilização do F-gel é o tempo de aplicação. Segundo Cury (2001), o tempo de 4 min foi estabelecido quando das primeiras ATPFs, por ser o período que a solução aplicada sobre o dente demorava a secar, sendo este o tempo de aplicação recomendado pela ADA (American Dental Association).

Alguns estudos já avaliaram o efeito do tempo de aplicação do F-gel, entre 1 ou 4 min, no efeito anticárie. Delbem e Cury (2002), avaliaram *in vitro* o efeito do tempo de aplicação de géis fluoretados, neutro e acidulado, na incorporação de F pelo esmalte e na resistência do mesmo à desmineralização sob um alto desafio cariogênico. Apesar de terem observado maior incorporação de F ao esmalte após 4 min de aplicação do F-gel acidulado, constataram que esse fato não foi suficiente para aumentar a resistência à desmineralização do esmalte.

Calvo et al (2012) avaliaram o efeito do tempo de aplicação (4 x 1 min) na perda mineral do esmalte de dente decíduo e permanente sob alto desafio cariogênico *in situ*. Em um estudo cego, cruzado, de 14 dias, 16 voluntários adultos utilizaram dispositivos palatinos contendo esmalte humano permanente e decíduo. No início de cada fase, os espécimes de esmalte foram submetidos a um dos seguintes tratamentos: sem aplicação APF (controle negativo); FFA gel (1,23% F) aplicação por 1 ou 4 min. Biofilme foi naturalmente acumulado sobre os espécimes de esmalte, com exposição a solução de sacarose a 20%, 8 vezes ao dia, simulando uma condição de alto desafio cariogênico. No 15º dia de cada fase, o flúor retido como “CaF₂” e FA foi determinado sobre no esmalte e a desmineralização foi avaliada por microdureza. FFA gel reduziu a desmineralização, em ambos os tipos de esmalte ($p < 0,05$), mas a diferença entre 1 e 4 min não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). “CaF₂” e FA formado e retido no esmalte decíduo e permanente foi significativamente maior nos grupos de APF gel ($p < 0,05$), mas

nenhuma diferença significativa foi encontrada entre 1 e 4 min de aplicação ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que 1 min de aplicação de FFA gel proporciona um efeito semelhante na inibição da desmineralização em relação a 4 min, tanto para o esmalte permanente como para o decíduo.

Hayacibara et al. (2004) realizaram um estudo com o objetivo de determinar, *in vitro*, a formação de " CaF_2 " na superfície do esmalte bovino após a ATPF de F-gel, espuma e VF. Foi verificada a concentração de F do F-gel (1,23% F), ATPF espuma (1,23% F) e VF (2,26% F). " CaF_2 " foi determinado após a extração com 1,0 M KOH e analisado por eletrodo íon-seletivo. Os dados mostraram que todos os produtos tópicos formaram uma quantidade significativa de " CaF_2 " sobre a superfície do esmalte, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$), mas a diferença entre eles não foi significativa ($p > 0,05$). No entanto, a formação de " CaF_2 " não foi proporcional ao teor total de F nos produtos. Embora o VF tenha a concentração mais elevada de todos os produtos e manteve-se em contato com o dente durante 24 h, não foi significativamente diferente do F-gel e da espuma e o grupo mostrou uma média inferior de formação de " CaF_2 ". Este resultado está de acordo com Dijkman et al. (1982) que também encontraram resultados semelhantes para o F-gel e tratamentos com VF, relatando que Duraphat® formou menos " CaF_2 " do que o esperado. Algumas características do verniz poderiam explicar este resultado. O NaF está presente no Duraphat® como uma suspensão numa base alcoólica, e não como uma solução. Assim, pode ser esperado que apenas uma porcentagem desprezível de F vai estar disponível no verniz para reagir com o esmalte. Além disso, o verniz tem pH neutro, e o gel e espuma são ácidos. Concluiu-se que a eficácia dos produtos para ATPF na formação de " CaF_2 " está mais relacionada com o pH e com o veículo utilizado do que com a concentração de F no produto.

Fernández et al. (2014) testaram, *in vitro*, a reatividade do VF com esmalte e a formação de reservatórios de " CaF_2 " em função do tempo e também avaliaram a contribuição relativa do F solúvel e insolúvel do VF para formar produtos no esmalte. O verniz com fluoreto solúvel e insolúvel (concentração total de fluoreto de 23699 ± 384 ug de F/g), ou centrifugado, contendo apenas o fluoreto solúvel (concentração de F de 258 ± 97 mg F/g), foram aplicados sobre blocos de esmalte, imersos em saliva artificial. Reservatórios de " CaF_2 " formados no esmalte por aplicação de VF foram extraídos com 1 M KOH e a concentração de F foi medida

com eletrodo específico. O verniz total formou significativamente uma maior concentração de F no esmalte do que o verniz centrifugado, com máxima concentração em 24 h ($22,0 \pm 4,5$ g F/cm²). O verniz centrifugado alcançou concentração máxima em 6 h ($3,20 \pm 0,81$ mg F/cm²). Os achados desse estudo mostraram que a reação do Duraphat® com o esmalte é tempo-dependente e que F insolúvel na fórmula desempenha um importante papel no processo. A maior concentração de F formado no esmalte pelo verniz total e então pelo centrifugado podem ser atribuídas à dissolução de partículas de NaF insolúvel presentes na matriz do verniz e no aumento da concentração de F livre na superfície verniz-esmalte, mas não no F liberado na saliva. A relação entre a concentração de "CaF₂" e o tempo que o verniz é retido nas superfícies dentais e a cinética da formação de "CaF₂" em função do tempo de retenção do verniz devem ser testadas, *in vivo*, em relação aos seus efeitos na desmineralização em esmalte e dentina, dando condições a uma remoção posterior. O estudo mostrou que o F insolúvel no verniz total é uma importante fonte de F que será dissolvida durante a exposição intraoral, aumentando a reatividade do F com o esmalte ao passar do tempo. Isso sugere que a retenção aumentada do verniz aplicado em superfícies dentais pode melhorar o efeito anticárie do Duraphat®.

Falcão et al. (2016) testaram o efeito de bochechos com NaF 0,05% duas vezes por dia sobre a retenção do "CaF₂" formado no esmalte e dentina após ATPF de F-gel. O "CaF₂" formado nas superfícies dentárias após ATPF é instável no meio bucal, mas espera-se que ele possa ser retido por mais tempo com o uso diário de um enxaguatório bucal NaF. Nesse estudo, o "CaF₂" formado no esmalte/dentina pela ATPF diminuiu significativamente após exposição a saliva artificial e o bochecho com NaF 0,05% foi ineficaz para evitar esta redução. Estas descobertas sugerem que a combinação de F-gel e NaF 0,05% não é clinicamente relevante. Os autores concluíram que o tratamento com NaF 0,05% duas vezes por dia não impede a dissolução oral do "CaF₂" formado no esmalte ou dentina após ATPF.

Dall Agnol (2016) avaliou clinicamente o efeito do tempo de manutenção do VF aplicado na reatividade do fluoreto com o esmalte e sua liberação para o biofilme dental. Cinquenta e um voluntários foram distribuídos em 3 grupos, grupo I: controle (sem aplicação de VF); grupos II e III: aplicação de VF e remoção após 4 e 24 h, respectivamente. Todos os voluntários dos grupos II e III tiveram uma fina camada de VF (Duraphat®) aplicada sobre os dentes, suspenderam a escovação

por 4 h (grupo II) ou por 24 h (grupo III) e depois de decorridos os respectivos tempos retornaram para remoção do verniz. Amostras de esmalte para análise do F foram obtidas por meio de biópsia ácida (antes, imediatamente após 4 ou 24 h da aplicação do VF e após 7 e 28 dias). O biofilme foi coletado (antes e após 3, 7 e 28 dias a aplicação de VF) para análise do F nos sólidos e no fluido. A concentração de F no esmalte e no biofilme foi determinada por meio de eletrodo íon-específico para F. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa para a concentração de F no esmalte entre os grupos controle e VF 4 e 24 h após a aplicação do VF e o maior valor foi encontrado quando o VF foi mantido por 24 h ($p < 0,05$). Os resultados confirmaram *in vivo* que a retenção prolongada de verniz sobre superfícies dentárias aumenta a reatividade do F com o esmalte.

2.2.2 Efeito anticárie da ATPF

Marinho et al. (2002) fizeram uma revisão sistemática da literatura, com meta-análise, para avaliar o efeito do F-gel na prevenção de cárie em crianças e adolescentes. Foram incluídos 25 estudos envolvendo 7.747 crianças, sendo que 23 contribuíram com os dados para as análises feitas na revisão. Esses estudos mostraram aproximadamente 28% de redução na incidência de lesões cariosas, concluindo que a aplicação de F-gel foi eficaz na redução de cárie dentária na dentição permanente. Para os 23 estudos que contribuíram com dados de meta-análise, houve heterogeneidade, confirmada estatisticamente ($p < 0,0001$). Há evidência do efeito do F-gel na inibição da cárie. Não há muita informação sobre efeitos adversos ou a aceitabilidade do tratamento na dentição decídua.

Marinho et al. (2004) realizaram nova revisão de literatura comparando a efetividade das formas de aplicação tópica de fluoretos usadas para prevenção de cárie dentária em crianças. Foram selecionados ensaios clínicos aleatorizados e cegos em crianças até 16 anos, com duração de pelo menos um ano, que compararam vernizes, géis, enxaguatórios e dentifrícios fluoretados. Quinze estudos contribuíram para as avaliações. A eficácia dos dentifrícios fluoretados não foi estatisticamente diferente da dos géis e enxaguatórios, e em um único estudo, onde foi comparado dentifrício com verniz, verniz com gel e gel com enxaguatório, os resultados foram inconclusivos. Em relação à prevenção da cárie dentária, os

dentifrícios fluoretados e enxaguatórios parecem ter efeitos similares. Não ficou claro se os vernizes fluoretados são mais efetivos que os enxaguatórios. Além disso, as evidências em relação à diferença de efetividade entre vernizes e géis, e entre enxaguatórios e géis, quando comparados entre si, foram inconclusivas.

Em relação ao efeito anticárie do VF, Marinho et al. (2013) atualizaram a primeira revisão Cochrane sobre vernizes fluoretados usados na prevenção da cárie dentária em crianças e adolescentes, publicada pela primeira vez em 2002. Selecionaram e analisaram ensaios clínicos aleatorizados, cegos, que compararam VF ao verniz placebo, ou controle, em crianças até 16 anos, com acompanhamento de pelo menos um ano. Foram incluídos 22 estudos envolvendo 12.455 crianças (9.595 utilizadas nas análises). Sendo que 13 estudos contribuíram com os dados para as análises realizadas na revisão, mostrando aproximadamente 43% de redução na incidência de lesões cariosas na dentição permanente, através da avaliação do índice CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas). Dez estudos contribuíram com os dados para as análises realizadas na dentição decídua, sendo que esta teve uma média de redução de 37%. As conclusões desta revisão atualizada permanecem as mesmas que aquelas que foram publicadas pela primeira vez. A aplicação de VF duas vezes por ano foi eficaz na redução de cárie dentária na dentição permanente e decídua.

A eficácia das aplicações dos produtos usados para ATPF foram estabelecidas em estudos clínicos, incluindo o estudo de Ogaard et al. (1984), os quais investigaram o mecanismo do efeito anticárie, avaliando a retenção do “CaF₂” e FA no esmalte hígido e desmineralizado *in vivo* após duas semanas da aplicação de um verniz contendo 5% de NaF (Duraphat®). A desmineralização do esmalte foi realizada por quatro semanas antes da aplicação F em pré-molares que seriam extraídos. Um dente de cada par foi extraído como controle. O verniz foi aplicado na superfície vestibular do dente remanescente. No controle, após as quatro semanas, um dente de cada par foi removido como controle. Os outros foram extraídos duas semanas após, depois de um tratamento com Duraphat®. A avaliação pelo MEV mostrou que três camadas consecutivas de esmalte sofreram desmineralização. Uma significativa adsorção de F foi encontrada na primeira e segunda camada de esmalte sadio e nas três camadas do esmalte desmineralizado. Uma maior quantidade de F foi encontrada no esmalte desmineralizado e uma alta proporção desse F foi encontrada na forma insolúvel alcalina, comparada com o F do esmalte

sadio. O padrão de desmineralização diferiu dentro da área atacada. Os autores sugeriram que a variação no padrão de desmineralização pode ser devido às diferenças na orientação dos cristais e a morfologia superficial original.

Holmen et al. (1986) também avaliaram, *in vivo*, o efeito da aplicação de VF (Duraphat®) sob cárie produzida experimentalmente. Após quatro semanas de desafio cariogênico, um dente de cada par foi extraído para controle e o homólogo recebeu uma aplicação do VF e permaneceram com o desafio cariogênico por mais duas semanas, antes de serem extraídos. Os dentes controle mostraram características clássicas de lesões incipientes sub-superficiais ativas. As lesões tratadas com Duraphat® mostraram um aumento na porosidade da superfície em relação ao controle, enquanto a porosidade sub-superficial foi acentuadamente reduzida. Quando examinadas no MEV, a superfície correspondente apareceu lisa com um nivelamento das irregularidades superficiais originais. A aplicação de Duraphat® antes do reestabelecimento do desafio cariogênico aparentemente aumentou a redistribuição dos minerais nas lesões ativas de cáries iniciais.

Estudos clínicos comparando o F-gel e o VF quanto à eficácia das aplicações foram realizados. No estudo de Shobba et al. (1987) feito com crianças em Manipal, na Índia, ambos procedimentos (VF e F-gel) reduziram cáries significativamente (30 - 50%), sendo que o Duraphat® foi mais efetivo quando mensurado a nível superficial, e não a nível dental. Compararam os dois métodos com um grupo controle recebendo aplicações de produtos não fluoretados, houve uma tendência para maiores reduções cariosas frente ao uso de Duraphat®, mas a diferença foi estatisticamente significativa somente quando mensurada na superfície dental.

Seppa, Lanpsen e Housen (1995) também compararam o efeito anticárie do VF e F-gel em um experimento clínico. Um total de 254 crianças com idades entre 12-13 anos com significantes experiências anteriores de cárie foram divididas aleatoriamente em dois grupos. Os participantes receberam aplicações semestrais tanto de VF como de F-gel por três anos. Durante o estudo, a média ($\pm$ SD) total de incrementos DMFS do grupo que recebeu VF e do grupo que recebeu F-gel foram de $6,8 \pm 5,6$ e $7,7 \pm 6,4$, respectivamente, quando as cáries iniciais foram incluídas, e $3,1 \pm 3,7$ e $3,6 \pm 4,6$, quando as cáries iniciais foram excluídas. A diferença foi mais evidente nas superfícies proximais (verniz: $1,4 \pm 2,4$; gel: $1,9 \pm 3,1$). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Embora estudos maiores sejam

necessários para conclusões definitivas sobre o efeito comparativo dos dois métodos de aplicação de F, os resultados sugerem que o VF é tão eficaz quanto o F-gel, pelo menos no que diz respeito à prevenção de cáries proximais. Por razões éticas, não foi possível incluir um grupo controle neste estudo, e assim, este estudo não fornece informações sobre o real efeito preventivo contra cárie dos métodos.

Ögaard et al. (1996) avaliaram o desenvolvimento e a progressão de lesões de cárie induzidas, *in vivo*, com ou sem aplicação de VF (Duraphat®), em esmalte hígido e cariado. A parte do estudo relativa ao desenvolvimento de cárie foi composta por seis pares de pré-molares, sendo que um dente de cada par recebeu, no início, uma aplicação de Duraphat®. O contralateral serviu como controle e os dentes foram extraídos após quatro semanas. A parte do estudo relativa à progressão da lesão de cárie foi composta por quatro pares de pré-molares, que também foram bandados. Após quatro semanas sem tratamento, um pré-molar de cada par foi extraído (controle). Os contralaterais receberam uma aplicação de Duraphat® e foram extraídos após duas semanas. A perda mineral e as mudanças estruturais foram avaliadas através de microrradiografia quantitativa e microscópio de varredura a laser, as imagens ao microscópio estavam de acordo com as mensurações em microrradiografia. O tratamento com Duraphat® em esmalte hígido reduziu a profundidade de lesão perto de 48% quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e controle quanto aos valores de perda mineral. Com relação à progressão da lesão, não houve diferença significativa quanto à profundidade das lesões ou perda mineral entre os dentes não tratados e extraídos após quatro semanas e os dentes com lesões tratados com F e extraídos após duas semanas adicionais.

Alguns estudos *in situ* também avaliaram o efeito anticárie da ATPF, buscando elucidar seus mecanismos. O estudo de Calvo et al., 2012, citado acima, indicou que a aplicação de F-gel por 1 ou 4 min resulta no mesmo efeito anticárie. Em outro estudo *in situ* (Tenuta et al., 2008), utilizando um modelo de estudo de curta duração, com uma placa teste produzida artificialmente, a relação entre a concentração de “CaF₂”, sua dissolução liberando F para o fluido do biofilme dental e a redução da desmineralização do esmalte foi estudada. Blocos de esmalte bovino foram previamente tratados com uma solução não fluoretada (grupo controle negativo) ou uma solução de NaF 0,5 M (pH 3,5). Voluntários utilizaram um dispositivo palatino com oito blocos de esmalte, cobertos por uma placa teste de S.

mutans. A liberação de F para o fluido da placa teste a partir da dissolução do “CaF₂” foi determinada após 30 min de uso do dispositivo, quando a placa teste em contato com dois blocos de cada tratamento foi coletada. Os blocos restantes foram submetidos a um desafio cariogênico, e após 45 min a placa teste e os blocos foram coletados para análises. Os autores concluíram que o efeito anticárie da ATPF deve ser atribuído a liberação de F dos reservatórios de “CaF₂” do esmalte para o fluido do biofilme, pois foi encontrada uma alta correlação entre a concentração de “CaF₂” no esmalte e a concentração de F no fluido da placa teste antes do desafio cariogênico. A perda mineral apresentou uma correlação negativa com a concentração de “CaF₂” no esmalte e a concentração de F no fluido da placa teste.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi comparar a capacidade do F-gel e VF de formar reservatório de F no esmalte e de manter concentração aumentada de F no biofilme dental em função do tempo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

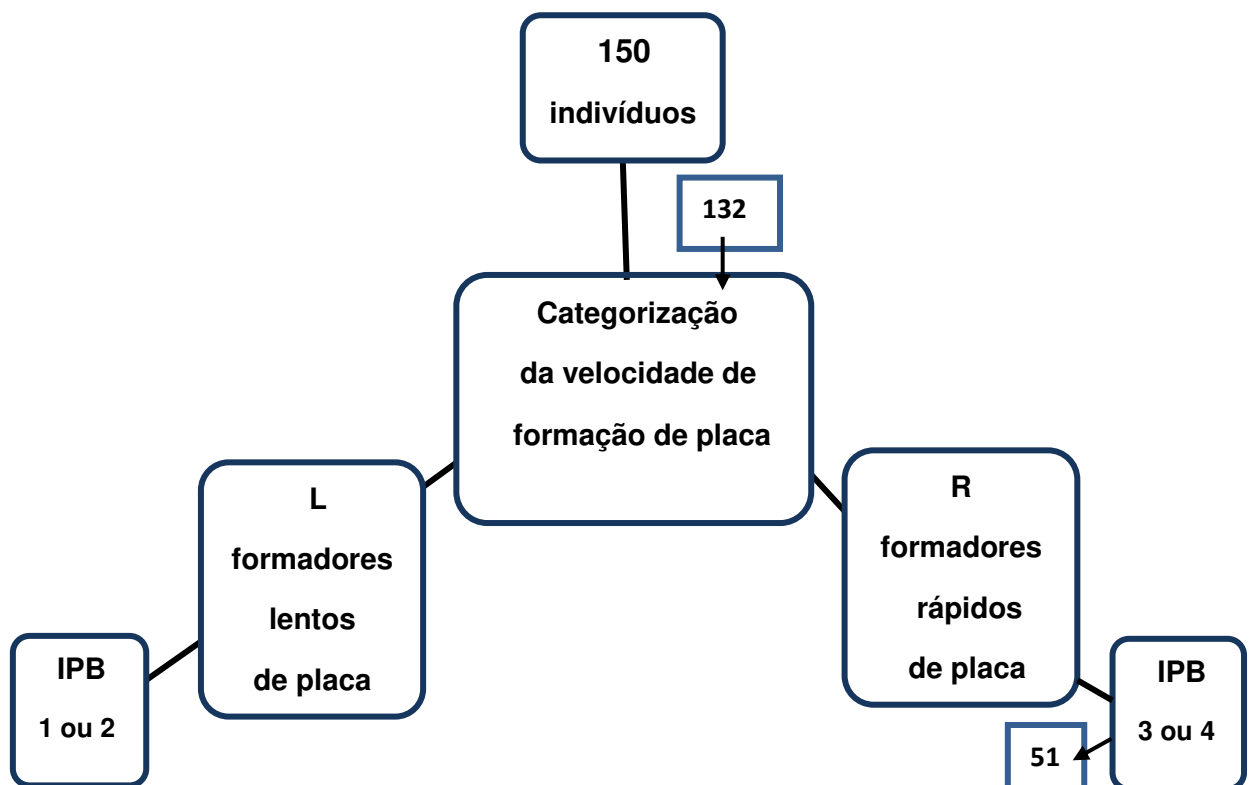
Este estudo é parte de um ensaio clínico randomizado (Clinical Trials # NCT02486458) sobre o efeito da ATPF na concentração de F no biofilme dental, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), protocolo 031/2014 (anexo 1). No presente estudo, o potencial anticárie do F-gel e VF foi estudado. Foi realizado um estudo *in vivo*, aleatorizado, controlado e cego (análises laboratoriais). Voluntários considerados formadores rápidos de placa ($n = 51$), ou seja, aqueles que, após 24 h sem escovação dentária, apresentaram moderado e/ou abundante acúmulo de depósitos moles visualizado a olho nu, foram randomizados e aleatoriamente distribuídos a cada um dos três grupos experimentais: (GC) grupo controle negativo, que não recebeu nenhum tratamento; (F-gel) grupo flúor gel, que recebeu uma aplicação de flúor fosfato acidulado gel por 4 min; (VF) grupo verniz fluoretado, que recebeu uma aplicação de verniz fluoretado 5% mantido na superfície dental por 24 h. A concentração de F no esmalte foi determinada por microbiópsia antes, imediatamente após a remoção dos tratamentos, e após 7 e 28 dias. O biofilme dental acumulado durante 24 h foi coletado antes, 3, 7, 14 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos. A concentração de F no fluido e sólido do biofilme foi determinada. A concentração de F no esmalte e biofilme foram comparados por Análise de Variância a dois critérios, considerando os fatores tratamento e tempo, com nível de significância de 5%.

4.2 Recrutamento, seleção dos voluntários e distribuição nos grupos experimentais

Cento e cinquenta voluntários jovens, entre estudantes de Odontologia e Medicina da Unochapecó, Brasil, foram convidados a participar do estudo. Desses, foram recrutados 132 voluntários, os quais preencheram os critérios de inclusão e exclusão e assinaram termo de consentimento. Foram excluídos gestantes, usuários de medicamentos com potencial de interação com o estudo (causadores de

xerostomia), portadores de doenças crônicas, fumantes e usuários de aparelhos ortodônticos ou próteses dentárias. Foram selecionados aqueles sem evidências de cárie ativa ou doença periodontal, com pelo menos cinco dentes presentes em cada hemi-arco; e quatro incisivos superiores hígidos. Entre estes voluntários, foram selecionados apenas os formadores rápidos de placa, ou seja, os que apresentaram moderado e/ou abundante acúmulo de depósitos moles visualizado a olho nu, de acordo com o índice (plaque index system) proposto por Silness e Loe (1964) (figura 1). Após a seleção, 51 voluntários foram divididos aleatoriamente e proporcionalmente em três grupos experimentais (n=17).

Figura 1 - Determinação da velocidade de formação de placa no grupo pré - amostral (índice proposto por Silness e Loe (1964))



*Voluntários com IPB 3 ou 4 foram classificados com formadores rápidos de placa

Para determinação do IPB (índice de placa bacteriana), foi utilizado o índice proposto por Silness e Loe (1964), como segue:

Grau 1: Não há placa na área gengival da superfície dental quando se passa uma sonda exploradora;

Grau 2: Há um filme de placa aderido à margem gengival livre. A placa somente pode ser reconhecida passando-se uma sonda exploradora sobre a superfície do dente (não é visível a olho nu);

Grau 3: Há um moderado acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival e/ou superfície dental adjacente (que pode ser visualizado a olho nu);

Grau 4: Há abundante acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival, na margem gengival e/ou na superfície dental adjacente.

A distribuição dos voluntários nos grupos experimentais ocorreu de maneira aleatorizada porém estratificada, levando em consideração a concentração de F no fluido do biofilme. Para isso, foi efetuada uma coleta do biofilme dos voluntários após utilizarem exclusivamente dentifrício sem F durante três dias. A coleta foi efetuada no início da manhã, em jejum. A escovação foi suspensa um dia antes da coleta e nessas 24 h os voluntários utilizaram goma de mascar açucarada (3 x / 24 h) para equalizar os níveis de sacarose.

A concentração de F no fluido do biofilme foi determinada e utilizada para ordenar os indivíduos de acordo com a concentração de F (do menor para o maior). Então, em ordem, um sorteio foi feito para distribuir os voluntários nos três grupos experimentais, totalizando um tamanho amostral de 51 voluntários. Indivíduos que se retiraram do estudo pós-randomização não foram substituídos.

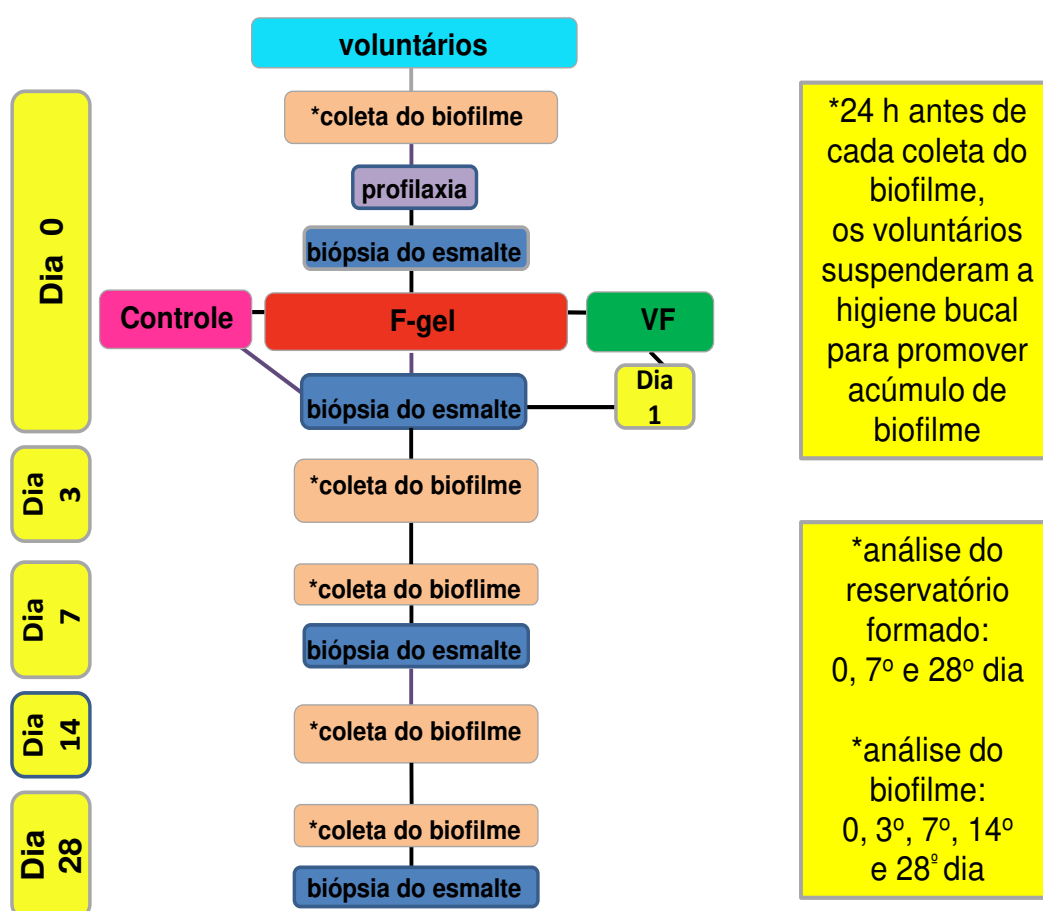
4.3. Etapa Clínica

A fase clínica teve 31 dias de duração (figura 2). Durante o experimento os voluntários utilizaram dentifrício sem F e foram instruídos a não usar enxaguatórios ou outros produtos de higiene bucal com F. Após 72 h de utilização do dentifrício não fluoretado, os dentes de todos os voluntários foram profissionalmente limpos e secos. Então, nos grupos F-gel e VF, os tratamentos foram aplicados. Os voluntários do grupo VF foram instruídos a evitar mastigar alimentos duros e não escovar os dentes por 24 h, quando retornaram para remoção do VF.

Foram obtidas amostras de esmalte dos dentes por meio de biópsia ácida (antes, imediatamente após os 4 min da aplicação do F-gel, imediatamente após as

24 h da aplicação do VF e após 7 e 28 dias). Além disso, biofilme acumulado sobre todos os dentes, exceto dos incisivos inferiores, foi coletado (antes e após 3, 7, 14 e 28 dias da aplicação dos tratamentos). Previamente a cada coleta de biofilme, os voluntários suspenderam a escovação com 24 h de antecedência e utilizaram goma de mascar açucarada (3 x / 24 h) para padronizar a exposição a sacarose durante a formação do biofilme dental, já que este é um fator que interfere na concentração de F no biofilme dental (Cury et al., 1997; 2000). As coletas foram efetuadas no início da manhã, em jejum. As amostras de esmalte e biofilme foram analisadas para investigar as variáveis de resposta, que foram: concentração de F no biofilme ($\mu\text{mol/g}$ proteína (sólidos) e μM (fluido)) e concentração de F no esmalte ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Figura 2 - Fluxograma da sumarização dos procedimentos metodológicos



4.3.1 Aplicação do F-gel e do VF

Previamente à aplicação do F-gel e VF, foi efetuada profilaxia dental em todas as superfícies dentárias dos voluntários. Os dentes foram lavados com jatos de água e posteriormente secos com jatos de ar. Uma amostra de esmalte foi obtida a partir de um dos incisivos centrais superiores utilizando a técnica de microbiopsia (ver abaixo).

Flúor gel (flúor fosfato acidulado, 1,23% de flúor, DFL® - Lote N° 14091446) foi aplicado sob isolamento relativo com rolos de algodão em ambas as arcadas dentárias, com a utilização de hastes flexíveis com pontas de algodão (Cotonetes®, Johnson & Johnson). Após 4 min, o excesso de F-gel foi removido com gaze e solicitado aos voluntários que eliminassem o restante na cuspeira.

O verniz fluoretado (verniz de NaF a 5% (Duraphat®, Colgate-Palmolive Co., New York - Lote N °. 051302)) foi aplicado sob isolamento relativo com rolos de algodão em ambas as arcadas dentárias com a utilização de hastes flexíveis com pontas de algodão (Cotonetes®, Johnson & Johnson). Os voluntários desse grupo foram instruídos a evitar mastigar alimentos duros ou abrasivos e suspender a escovação dos dentes até o seu retorno, 24 h para a remoção completa do verniz. Ao retorno, o verniz foi totalmente removido por meio de escovação supervisionada, complementada por raspagem cuidadosa com curetas de pontas plásticas (IMPLACARE®, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), quando necessário.

4.4 Microbópsia do esmalte para determinação de flúor

4.4.1 Coletas de esmalte

As amostras de esmalte para determinação de F foram feitas usando a técnica de microbiopsia ácida (Brudevold et al., 1975, modificada por Rosalen, 1991) adaptada para o presente estudo. A biópsia realizada antes da aplicação do verniz ocorreu na distal do dente 11 e imediatamente após a remoção do verniz na mesial desse mesmo dente. As biópsias realizadas após 7 e 28 dias da aplicação do verniz foram feitas na mesial e distal do dente 21, respectivamente (figura 3). Resumidamente, foi efetuado isolamento relativo com rolos de algodão e os incisivos

superiores foram cuidadosamente limpos com jatos de água e um disco de algodão embebido em acetona. Os dentes foram secos e uma fita adesiva (Scotch Magic Tape, 3M, Minnesota, EUA) com uma perfuração de 2 mm de diâmetro foi fixada, de modo a deixar exposta apenas uma região de formato circular regular com área de $3,14 \text{ mm}^2$. Cinco microlitros de uma solução de HCl 1,6 M preparada em 70% (v / v) de glicerol foi aplicada à área delimitada com uma pipeta e agitada (por movimentos de pipeta) durante 30 segundos. Depois disso, a solução foi coletada com a pipeta e transferida para um tubo de microcentrifuga contendo 100 μL de água purificada e 100 μL de TISAB II (figura 4 A, B, C e D). Cinco microlitros de TISAB II foram aplicados em seguida sob a área da biópsia e agitado durante 15 segundos, para a neutralização da área. O volume foi coletado com a pipeta e também transferido para o tubo de microcentrifuga. Este último procedimento foi repetido mais uma vez. Foram efetuadas quatro coletas em cada voluntário.

Figura 3 – sequência das regiões onde as coletas foram realizadas nos incisivos centrais superiores

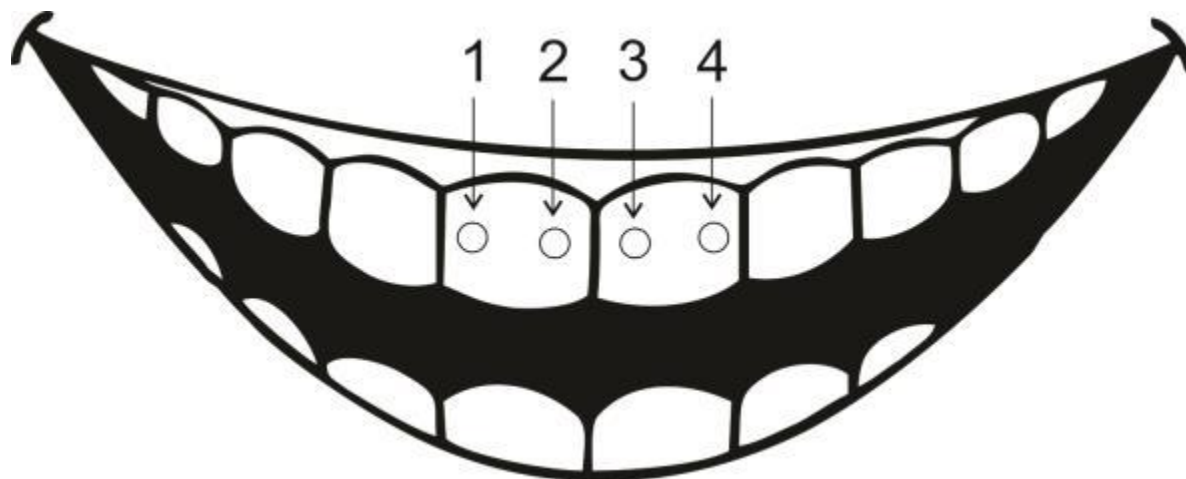
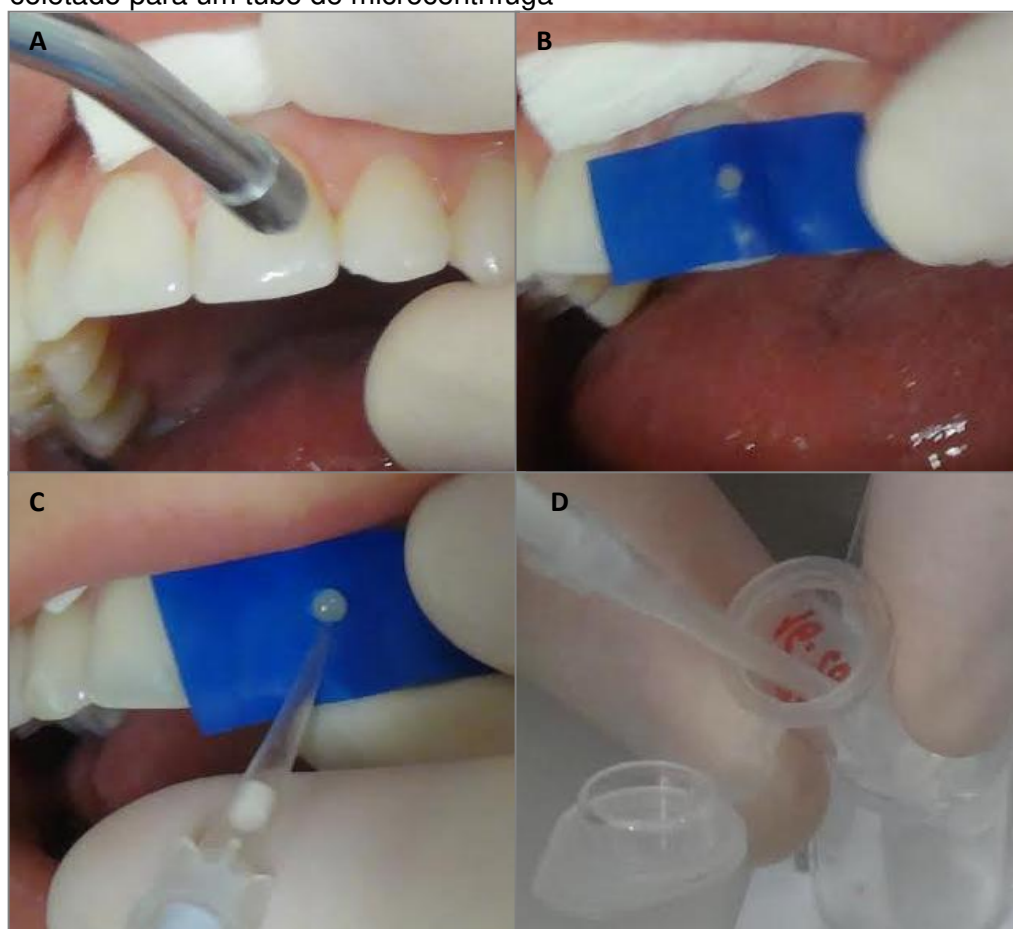


Figura 4 - Técnica da microbiópsia ácida para determinação de F; A - Secagem dos dentes com jatos de ar; B - Fita adesiva fixada expondo a área onde seria realizada a microbiópsia; C - Aplicação da solução; D - Transferência do volume coletado para um tubo de microcentrifuga



4.4.2 Determinação da concentração de F

A concentração de F das amostras foi determinada em duplicata por um eletrodo combinado específico para F (Orion 96-06; Thermo Scientific, EUA), associado a um potenciômetro (Orion EA-940; Thermo Scientific, EUA). O eletrodo foi previamente calibrado ($R = 0,99988$) com seis soluções padrão de F, em concentrações de 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80, 1,00 e 2,00 ppm. As análises foram efetuadas de maneira cega em cada amostra de biópsia ácida.

Foi realizada a dosagem de fósforo inorgânico (Pi) para verificar a espessura da camada de esmalte removida durante a biópsia, calculada com base na concentração de Pi nas amostras de esmalte (estimada em 17,4% para o esmalte) (Lazzari, 1976), foi utilizado o método colorimétrico. Para isso, usou-se o reagente verde de malaquita (Hess e Derr, 1975, Vogel et al., 1983) em microplacas

de 96 poços e a absorbância foi lida a 650 nm em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, EUA) previamente calibrado com blanks e padrões contendo 0,032, 0,08, 0,16, 0,24 e 0,32 mM de fósforo.

4.5 Coleta do biofilme para determinação de flúor

4.5.1 Coleta do biofilme

Para a coleta, foram preparados conjuntos (kits) compostos por um tubo para microcentrífuga com orifício central, uma ponteira de pipeta de 10 µl modificada contendo óleo mineral e uma espátula de plástico para coleta de biofilme, adaptada a partir de ponteiros de 200 µL (figura 5).

A ponteira de pipeta de 10 µl foi modificada através da obstrução da sua extremidade pela fusão do material submetido ao calor e nela foi adicionado cerca de 8 µl de óleo mineral. A ponteira de pipeta modificada com o óleo mineral foi acondicionada em um tubo de centrífuga de 1,5 ml adaptado. A adaptação consistiu na elaboração de um orifício na tampa de maneira que a ponteira de pipeta pudesse ser encaixada perfeitamente no seu interior.

O biofilme dental foi coletado utilizando as espátulas adaptadas para permitir uma raspagem completa das superfícies vestibulares dos dentes bem como das áreas interproximais (figura 6), exceto incisivos inferiores. Os biofilmes coletados com tais espátulas foram então imediatamente transferidos para o óleo mineral (figura 7A e B), para evitar a evaporação do líquido (Vogel et al., 1997; Tenuta et al., 2006). A transferência para o óleo foi realizada logo que uma quantidade razoável de biofilme foi coletado na espátula (isto é, o biofilme coletado de um ou dois dentes), para reduzir a possibilidade de secagem de biofilme. O biofilme foi então centrifugado durante 5 min, a 21000 x g, 4°C (Tenuta et al., 2006) para separar o fluido do estroma (figura 8). O fluido do biofilme foi coletado com uma micropipeta de vidro, sob microscópio, e transferido para novo tubo preenchido com óleo mineral (figura 9). Neste tubo, o líquido foi transportado para a Faculdade de Odontologia de Piracicaba para a determinação da concentração de F (figura 10A, B e C)

Após a remoção do fluido, o remanescente sólido do biofilme foi congelado (-20 ° C).

Figura 5 - Kits utilizados para a coleta do biofilme



Figura 6 - Coleta do biofilme dental



Figura 7 - Transferência do biofilme coletado; A - Transferência com a espátula 3 s para o tubo de microcentrífuga com óleo mineral; B - Biofilme imerso no óleo mineral

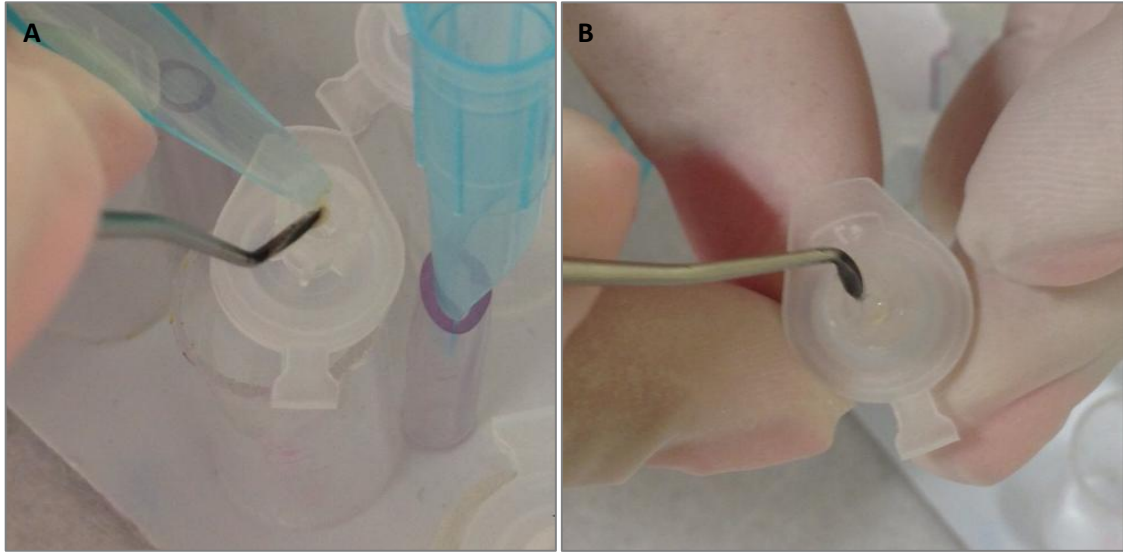


Figura 8 - Fluido e estroma



Figura 9 - Fluido do biofilme



Figura 10A, B e C - Identificação e armazenamento das amostras de fluido e estroma do biofilme coletado para serem transportadas

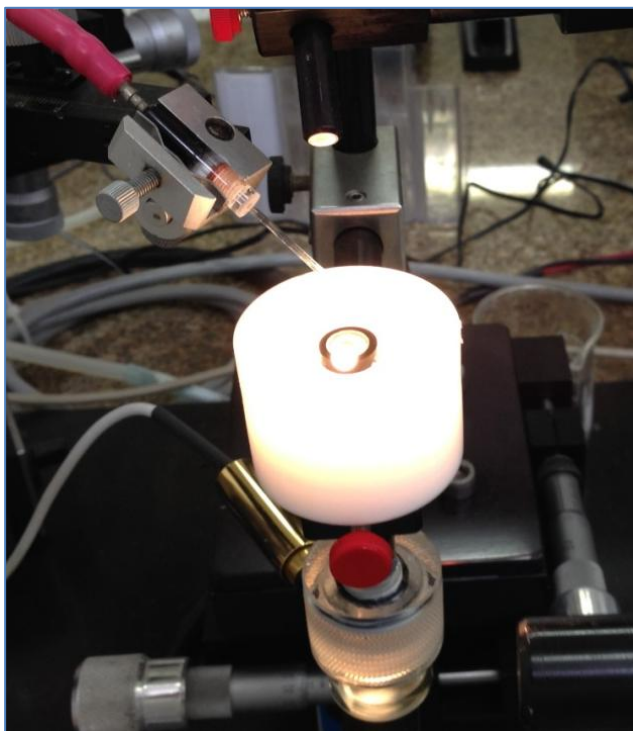


4.5.2 Determinação da concentração de F no fluido do biofilme

A concentração de F foi determinada em triplicata usando um eletrodo invertido seletivo para o íon F (Orion 94-09, Thermo Scientific, EUA), adaptado para microanálise (Vogel et al., 1997) (figura 11). Resumidamente, utilizando um microscópio, as amostras de fluido do biofilme foram tamponadas com TISAB III (Orion) sobre a superfície do eletrodo, em óleo mineral, para evitar a evaporação do líquido. Cada gota de amostra foi tocada com um eletrodo de microrreferência, montado em um micromanipulador, e os resultados registrados em mV num programa de computador (Plot1, Paffenbarger Research Center), a partir de um eletrometro de alta impedância (FD223, WPI Instruments, EUA). A concentração de flúor nas amostras foi determinada em relação a padrões de F com concentração

conhecida, pré-diluídos com TISAB III. Tenuta et al., 2006). A concentração de F no fluido foi expressa em $\mu\text{mol/l}$.

Figura 11 - Determinação da concentração de F



4.5.3. Determinação da concentração de F na porção sólida do biofilme

4.5.3.1. Extração ácida dos reservatórios de F na porção sólida do biofilme

As amostras foram descongeladas e a porção sólida do biofilme transferida para tubos de microcentrífuga contendo 150 μl de HCl 0,5 M. A extração do F do sólido do biofilme foi realizada durante 3 h, sob agitação, a temperatura ambiente (Cury et al., 1997). O extrato ácido foi recolhido para determinação da concentração de F.

A concentração de F nas amostras de extrato ácido foi determinada da mesma forma que descrito para o fluido do biofilme, porém as amostras foram

previamente neutralizadas com NaOH a 2,5 M e TISAB III. Os padrões de F para esta análise também foram preparados contendo HCl, NaOH e TISAB III, nas mesmas proporções das amostras.

Para determinação da biomassa do biofilme, para expressar concentração de F em função da quantidade de porção sólida de biofilme, a determinação da concentração de proteínas totais foi realizada. Para isso, o biofilme remanescente após a extração ácida do F foi tratado com 200 µl de NaOH 1 M e vortexado até a mistura tornar-se homogênea. Em seguida, a amostra foi incubada por 15 min sob agitação (100 °C/ 750 rpm) em um termoreator programável/ dry block (ThermoStat plus 5352; Eppendorf, Hamburg, Germany). Posteriormente a suspensão foi centrifugada durante 3 min (10.000 x g, a 4°C) e o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise das proteínas totais.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). O teor proteico do extrato alcalino foi determinado utilizando um kit de análise de proteínas (Total protein kit-TP03001KT, Sigma Aldrich, MO, USA). A análise foi realizada em microplacas de 96 poços e a absorbância foi lida a 750 nm em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, EUA) previamente calibrado com blanks e padrões contendo 150, 200, 250 e 300 µg de proteína. Ao final, a concentração de F na porção sólida do biofilme foi expressa em µmol/g proteínas.

Análise estatística

Dados da concentração de F no esmalte, no fluido e sólido do biofilme foram analisados utilizando Análise de Variância a 2 critérios, considerando tratamento e tempo como fatores. As pressuposições de equidade de variâncias e distribuição normal dos erros foram testadas considerando-se as variáveis de resposta e os dados que não satisfizeram estes pressupostos foram transformados. As transformações são descritas nas tabelas de resultados. SAS versão 9.4 foi utilizado para a análise final, com o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Completeram o estudo 45 dos 51 voluntários randomizados. Um indivíduo iniciou o tratamento ortodôntico após a triagem e, portanto foi excluído do estudo e 5 indivíduos desistiram do estudo (retiraram o consentimento). Os seis voluntários que não concluíram o estudo foram excluídos das análises. No entanto, como o abandono ocorreu antes do início dos tratamentos, isto não afetou os resultados. As análises foram realizadas utilizando um tamanho amostral de 45.

A Tabela 1 apresenta os resultados da concentração de F no esmalte. A camada de esmalte removida pelo procedimento de biópsia foi de cerca de $0,63 \pm 0,12 \mu\text{m}$, sem diferença entre tempos ou tratamentos. Foi encontrada uma interação significativa entre os fatores tratamento e tempo ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os 3 grupos de tratamento no início do estudo, aos 7 e 28 dias ($p > 0,05$). No entanto, imediatamente após a aplicação de verniz ou de gel, concentração de F significativamente mais elevada foi encontrada nestes grupos, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, nesse momento, os grupos F-gel e VF não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Considerando-se o efeito do tempo na concentração de F no esmalte, não foi observada nenhuma diferença significativa no grupo controle, entre os diferentes tempos de coleta ($p > 0,05$). No grupo F-gel, concentração de F significativamente mais elevada foi encontrada no esmalte imediatamente após a aplicação ($p < 0,05$), mas após 7 e 28 dias, não foi encontrada diferença no que diz respeito aos valores do baseline ($p > 0,05$). No grupo VF, a mais elevada concentração de F em esmalte foi encontrada imediatamente após a aplicação ($p < 0,05$), e após 7 dias, a concentração foi ainda mais elevada do que o baseline ($p < 0,05$).

A concentração de F no biofilme é apresentada nas tabelas 2 e 3. Não foi encontrada interação entre os fatores tempo e tratamento nas concentrações de F no fluido ou sólidos ($p > 0,05$). No fluido, a única significância encontrada foi um aumento na concentração de F aos 14 e 28 dias, quando comparados ao baseline, mas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Na porção sólida, foi encontrado um efeito significativo de tratamento, com o grupo F-gel apresentando uma concentração de F mais elevada do que o grupo controle ($p < 0,05$), mas nenhum efeito significativo de tempo foi encontrado ($p > 0,05$).

Tabela 1. Concentração de F no esmalte ($\mu\text{g F/cm}^2$), de acordo com os tratamentos e tempos de coleta (media $\pm$ DP, n*)

Tratamento	Tempo de coleta			
	Baseline	tratamento	7 dias	28 dias
Controle	$0,59 \pm 0,26$ (16) aA	$0,59 \pm 0,26^*$ (16) aA	$0,61 \pm 0,26$ (16) aA	$0,53 \pm 0,17$ (16) aA
F- gel	$0,71 \pm 0,24$ (14) aA	$2,27 \pm 0,49$ (14) bB	$0,70 \pm 0,29$ (14) aA	$0,64 \pm 0,25$ (14) aA
Verniz	$0,38 \pm 0,13$ (15) aA	$1,83 \pm 0,46$ (15) bB	$0,77 \pm 0,19$ (15) cA	$0,54 \pm 0,11$ (15) acA

n* Valores diferentes de n representam amostras perdidas ou com volume insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas representam diferenças entre os tempos de coleta; letras maiúsculas distintas representam diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$). Para análise estatística, os dados foram transformados à raiz quadrada. * Análise feita uma única vez (baseline = pós-tratamento)

Tabela 2. Concentração de F no fluido do biofilme (μM), de acordo com os tratamentos e tempos de coleta (media $\pm$ DP, n*)

Tratamento	Tempo de coleta				
	Baseline a	3 dias ab	7 dias ab	14 dias b	28 dias b
Controle	$6,1 \pm 4,7$ (16)	$6,4 \pm 2,5$ (15)	$6,9 \pm 3,2$ (14)	$7,2 \pm 3,6$ (16)	$7,7 \pm 3,5$ (15)
F- gel	$5,4 \pm 1,5$ (14)	$7,3 \pm 3,1$ (14)	$7,6 \pm 3,9$ (10)	$7,3 \pm 2,9$ (13)	$8,9 \pm 3,6$ (14)
Verniz	$6,5 \pm 4,4$ (15)	$6,9 \pm 1,8$ (15)	$6,6 \pm 2,1$ (8)	$7,0 \pm 1,2$ (15)	$7,8 \pm 3,9$ (14)

n* Valores diferentes de n representam amostras perdidas ou com volume insuficiente para análise. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Letras minúsculas distintas ao lado dos tempos de coleta representam diferenças significativas entre esses tempos ($p < 0,05$). Para análise estatística, os dados foram transformados ao logaritmo base 10.

Tabela 3. Concentração de F no estroma do biofilme ($\mu\text{mol/g proteínas}$), de acordo com os tratamentos e tempos de coleta (media $\pm$ DP, n*)

Tratamento	Tempo de coleta				
	Baseline	3 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Controle					
A	$3,9 \pm 4,5$ (16)	$5,7 \pm 6,1$ (16)	$4,0 \pm 6,6$ (16)	$6,5 \pm 16,3$ (16)	$5,2 \pm 12,0$ (16)
F- gel					
B	$7,1 \pm 9,8$ (12)	$15,2 \pm 37,9$ (14)	$4,4 \pm 4,2$ (14)	$3,2 \pm 2,5$ (14)	$11,0 \pm 20,1$ (14)
Verniz					
AB	$3,3 \pm 4,4$ (15)	$11,5 \pm 19,2$ (15)	$3,7 \pm 2,8$ (14)	$3,2 \pm 4,3$ (14)	$3,4 \pm 21$ (15)

* Valores diferentes de n representam amostras perdidas ou com quantidade insuficiente para análise. Não houve diferença significativa entre os tempos de coleta ($p > 0,05$). As diferenças entre os tratamentos estão indicadas por letras maiúsculas distintas. Para análise estatística, os dados foram transformados ao logaritmo base 10.

6 DISCUSSÃO

O benefício no controle da cárie dentária dos tratamentos com ATPF é bem estabelecido (Marinho et al., 2004) e resulta da formação de uma concentração elevada de "CaF₂" nas superfícies dentárias. Este é o responsável pelo efeito anticárie desses meios de uso de F, ou seja, quanto mais "CaF₂" formado no esmalte, mais F é liberado para o fluido do biofilme e menor é a desmineralização (Tenuta et al., 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a concentração de F formada no esmalte após o uso de F-gel e VF é semelhante (Dijkman et al., 1983; Hayacibara et al., 2004) e que um maior tempo de retenção do VF sobre os dentes (por até 24 h) aumenta a reatividade do F com o esmalte (Fernández et al., 2016). No entanto, essa reatividade de F-gel e VF com o esmalte nunca foi avaliada em estudos clínicos, bem como a capacidade de retenção desses reservatórios no esmalte e seu efeito enriquecendo o biofilme dental com F.

Os resultados do presente estudo mostram que os tratamentos com F-gel e VF são capazes de aumentar significativamente a concentração de F no esmalte. Além disso, F-gel e VF formaram F no esmalte em concentrações semelhantes (tabela 1). Embora não tenham sido encontrados estudos *in vivo* comparando a reatividade de ambos os produtos com o esmalte, em estudos *in vitro*, o mesmo já foi observado (Dijkman et al., 1983; Hayacibara et al., 2004). Embora no F-gel a reatividade seja rápida, a reatividade do VF com o esmalte ao longo das 24 h, possivelmente devido a dissolução do fluoreto de sódio insolúvel no produto quando em contato com a saliva (Fernández et al., 2014), parece ser suficiente para que ambos formem, ao final dos respectivos tempos de aplicação, concentração de F no esmalte semelhante.

Os resultados de reatividade obtidos no grupo VF não devem ser fruto de contaminação com resíduos de verniz das aplicações tópicas realizadas. Quando o VF é aplicado apenas por 4 h, concentração de F significativamente menor do que a aplicação por 24 h foi observada, sugerindo que não há contaminação da amostra de F obtida do esmalte com resquícios do verniz aplicado (Dall Agnol, 2016).

Os resultados de reatividade semelhante para F-gel e VF parecem indicar que ambos tenham o mesmo efeito anticárie. A literatura traz indícios de que o verniz seja mais efetivo do que o gel, porém os estudos clínicos existentes são

poucos e avaliam a atividade de cárie e não reatividade para afirmar categoricamente isso (Shobba et al., 1987; Seppa, Leppanen e Hausen, 1995).

Com relação à manutenção desses reservatórios de F no esmalte, a aplicação de VF parece ter um efeito mais duradouro do que o F-gel, uma vez que mesmo após 7 dias, a concentração de F no esmalte foi significativamente maior do que antes da aplicação do VF, o que não foi observado para o F-gel (tabela 1). No entanto, em ambos os grupos (F-gel e VF) parece haver redução significativa com o passar dos dias. Essa perda precoce pode ser justificada pelo fato de que a saliva é subsaturada em relação ao " CaF_2 " (Saxegaard et al., 1988), e já foi observada em estudos *in vitro* avaliando a capacidade de retenção dos reservatórios de F formados no esmalte (Dijkman et al., 1983; Falcão et al., 2016).

A rápida perda da maior parte dos reservatórios de F formados no esmalte pode explicar a dificuldade de encontrar concentrações elevadas de F no biofilme formado sobre o esmalte tratado com os diferentes grupos. Embora tenha sido observada diferença significativa na concentração de F no estroma entre os grupos controle e F-gel, e um aumento da concentração de F no fluido do biofilme duas semanas após a aplicação, nenhuma diferença entre os grupos experimentais pode ser observada. Assim, embora as diferenças estatísticas encontradas não suportem uma relação direta entre a aplicação de F feita a partir de gel e verniz e o enriquecimento do biofilme com fluoreto, houve uma tendência de aumento da concentração de F no fluido com o passar do tempo (tabela 2), bem como uma maior concentração de F no estroma do biofilme formado sobre os dentes tratados com F gel (tabela 3). Assim, os produtos fluoretados parecem ser capazes de enriquecer o biofilme com F, porém em concentrações baixas e não facilmente mensuráveis. Essa concentração baixa de F (não mensurável) justifica o efeito anticárie das ATPFs, realizadas de 6 em 6 meses (nos trabalhos existentes na literatura).

O modelo do presente estudo apresenta limitações, como por exemplo a determinação da concentração de F formado no esmalte em dentes anteriores, que são mais facilmente limpos, potencialmente promovendo a liberação mais rápida desses reservatórios para a saliva. Além disso, o biofilme foi coletado de toda a dentição, e não apenas dos dentes anteriores, devido à necessidade de uma quantidade suficiente de biofilme para as análises. Em acréscimo, incorporação de F é maior no esmalte desmineralizado (Ögaard et al., 1984), o que não foi avaliado nesse estudo. Assim, estudos adicionais devem ser realizados para dar suporte a

utilização clínica dos produtos para aplicação profissional de F, visando maximizar seus benefícios.

Com base nos resultados obtidos, não houve diferença na capacidade de formar reservatório de F no esmalte entre F-gel e VF, sugerindo que provavelmente os dois produtos têm ação preventiva e devem funcionar igualmente.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram *in vivo* que F-gel e VF, aplicados por 4 min e 24 h, respectivamente, tem capacidade semelhante de aumentar a concentração de F no esmalte, dando suporte ao seu efeito anticárie observado clinicamente.

REFERÊNCIAS*

1. Almeida MQ, Costa OX, Ferreira JM, Menezes VA, Leal RB, Sampaio FC. Therapeutic potential of Brazilian fluoride varnishes: an in vivo study. *Braz Dent J*. 2011; 22 (3): 193-197.
2. Autio-Gold JT, Courts F. Assessing the effect of fluoride varnish on early enamel carious lesions in the primary dentition. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132 (9): 1247-1253; quiz 1317-1248.
3. Beltran-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc*. 2000; 131 (5): 589-596.
4. Blinkhorn A, Davies R. Using fluoride varnish in the practice. *Br Dent J*. 1998; 185 (6): 280-281.
5. Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci*. 1996; 104 (4 (Pt 2)): 416-422; discussion 423-415, 430-412.
6. Brudevold F. et al. A study of acidulated fluoride solutions I. In vitro effects on enamel. *Arch Oral Biol* 1963; 8: 167-171.
7. Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. *Arch Oral Biol*. 1975; 20 (10): 667-673.
8. 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*. 1991; 25: 96-100.
9. Buzalaf MA, Pessan JP, Honorio HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci*. 2011; 22: 97-114.
10. Carvalho DM, Salazar M, Oliveira BH, Coutinho ES. Fluoride varnishes and decrease in caries incidence in preschool children: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol*. 2010; 13 (1): 139-149.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors Vancouver Group.
Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

11. Cavslavska V, Moreno EC., Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. Archs oral Biol. 1975; 20: 333-339.
12. Chu CH, Lo EC, Lin HC. Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. J Dent Res. 2002; 81 (11): 767-770.
13. Colgate-Palmolive Company. (2013). "Colgate Duraphat® - Especificações do Produto" Retrieved 30 de abril, 2013, from <http://www.colgateprofissional.com.br/produtos/Colgate-Duraphat/especificacoes>.
14. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibalczyk W & Perdok WG. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. Acta Odontologica Scandinavica. 1988; 46: 325-336.
15. Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN et al. Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades. São Paulo: Santos. 2001.
16. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. Adv Dent Res. 2008; 20 (1): 13-16.
17. Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? Braz Oral Res. 2009; 23 Suppl 1: 23-30.
18. Dall Agnol MA. Avaliação clínica do tempo de manutenção do verniz aplicado na reatividade do fluoreto com o esmalte e sua liberação para o biofilme dental. Piracicaba. Tese [Doutorado em Cariologia] – Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas; 2016.
19. Delbem ACB & Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. Am J Dent. 2002; 15(3): 169-172.
20. Delbem AC, Brighenti FL, Oliveira FA, Pessan JP, Buzalaf MA, Sassaki KT. In vitro assessment of an experimental coat applied over fluoride varnishes. J Appl Oral Sci. 2009; 17 (4): 280-283.

21. Dijkman AG, Tak J, Arends J. Fluoride deposited by topical applications in enamel. *Caries Res.* 1982; 16:147-55.
22. Dijkman AG, de Boer P, Arends J. In vivo investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical applications. *Caries Res.* 1983; 17 (5): 392-402.
23. Dijkman TG, Arends J. The role of 'CaF₂-like' material in topical fluoridation of enamel in situ. *Acta Odontol Scand.* 1988; 46 (6): 391-397.
24. Falcão A, Masson N, Leitão TJ, Botelho JN, Ferreira-Nóbilo NP, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride rinse effect on retention of CaF₂ formed on enamel/dentine by fluoride application. *Braz. Oral Res.* 2016; 30: e 31.
25. Fejerskov O. Concepts of Dental Caries and their consequences for understanding the disease. *Comm. Dent Oral Epid.* 1997; 25(1): 5-12.
26. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: consequences for Oral Health Care. *Caries Res.* 2004; 38 (3): 182-191.
27. Fejerskov O, Kidd E. (2008). *Cárie Dentária: A Doença e seu Tratamento Clínico.* 2ª Ed. São Paulo: Santos, 2011.
28. Fernández CE, Tenuta LMA, Zárate P, Cury JA. Insoluble NaF in Duraphat® may prolong fluoride reactivity of varnish retained on dental surfaces. *Braz Dent J.* 2014; 25 (2): 160-164.
29. Hattab FN, Wei SH, Chan DC. A scanning electron microscopic study of enamel surfaces treated with topical fluoride agents in vivo. *ASDC J Dent Child.* 1988; 55 (3): 205-209.
30. Hayacibara MF, Paes Leme AF, Lima YB, Goncalves NC, Queiroz C S, Gomes MJ, et al. Alkali-soluble fluoride deposition on enamel after professional application of topical fluoride in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12 (1): 18-21.
31. Holm AK. Effect of fluoride varnish (Duraphat) in preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1979; 7 (5): 241-245.

32. Holmen L, Ogaard B, Rolla G, Thylstrup A. A polarized light and scanning electron microscope study of the effect of Duraphat treatment on in vivo caries. *Scand J Dent Res*. 1986; 94 (6): 521-529.
33. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*. 1960; 1: 304-320.
34. Lagerlof F, Ekstrand J, Rolla G. Effect of fluoride addition on ionized calcium in salivary sediment and in saliva. *Scand J Dent Res*. 1988; 96 (5): 399-404.
35. Larsen MJ, Jensen SJ. Experiments on the initiation of calcium fluoride formation with reference to the solubility of dental enamel and brushite. *Arch Oral Biol*. 1994; 39 (1): 23-27.
36. Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent*. 2010; 38 (2): 166-171.
37. Leme AF, et al. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent, San Antonio*, april, 2003; 16 (2): 91-5.
38. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride gels for preventive dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; (2): CD002280.
39. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; (4):CD002782.
40. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004; (1): CD002781.

41. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 11; (7): CD002279.
42. Moreno EC, Varughese K, Hay DI. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int*. 1979; 28 (1): 7-16.
43. Murakami C, Bonecker M, Correa MS, Mendes FM, Rodrigues CR. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol*. 2009; 54 (11): 997-1001.
44. Nelson DG, Jongebloed WL, Arends J. Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. *J Dent Res*. 1983; 62 (12): 1201-1208.
45. Ogaard B, Rolla G, Helgeland K. Fluoride retention in sound and demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat). *Scand J Dent Res*. 1984; 92 (3): 190-197.
46. Ogaard B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. *J Dent Res*. 1990; 69(Spec Iss): 813-819.
47. Ogaard B, Seppa L, Rolla G. Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res*. 1994; 8 (2): 190-201.
48. Ogaard B, Duschner H, Ruben J, Arends J. Microradiography and confocal laser scanning microscopy applied to enamel lesions formed in vivo with and without fluoride varnish treatment. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104 (4 (Pt 1)): 378-383.
49. Ogaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res*. 2001; 35(suppl 1): 40-4.
50. Oliveira BH, Salazar M, Carvalho DM, Falcão A, Campos K, Nadanovsky P. Bi annual fluoride varnish applications and caries incidenc in preschoolers: a 24 month follow-up randomized placebo- controlled clinical trial. *Caries Res*. 2014, 48: 238-236.

51. Petersson LG. Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. *Caries Res.* 1993; 27 Suppl 1 35-42.
52. Petersson LG, Koch G, Rasmusson CG, Stanke H. Effect on caries of different fluoride prophylactic programs in preschool children. A two year clinical study. *Swed Dent J.* 1985; 9 (3): 97-104.
53. Petersson LG, Twetman S, Dahlgren H, Norlund A, Holm AK, Nordenram G, et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. *Acta Odontol Scand.* 2004; 62 (3): 170-176.
54. Retief DH, Sorvas PG, Bradley EL, Taylor RE, Walker AR. In vitro fluoride uptake, distribution and retention by human enamel after 1 and 24 hour application of various topical fluoride agents. *J Dent Res.* 1980 mar; 59 (3): 573-82.
55. Rolla G, Ogaard B, Cruz R de A. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol.* 1993; 20 (2): 105-108.
56. Rosalen PL, Cury JA. Estudo in vitro dos efeitos de antiácido na farmacocinética e reatividade do fluoreto com o esmalte dental humano após aplicação tópica de flúor em gel. *Braz Oral Res.* 1992; 9: 5-11.
57. Santos L de M, Reis JI, Medeiros MP, Ramos SM, Araujo JM. In vitro evaluation of fluoride products in the development of carious lesions in deciduous teeth. *Braz Oral Res.* 2009; 23 (3): 296-301.
58. Saxegaard E, Lagerlof F, Rolla G. Dissolution of calcium fluoride in human saliva. *Acta Odontol Scand.* 1988; 46: 355-9.
59. Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96 (6): 523-535.
60. Saxegaard E, Rolla G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Res.* 1989; 23 (6): 406-411.
61. Seppa L. Effect of dental plaque on fluoride uptake by enamel from a sodium fluoride varnish in vivo. *Caries Res.* 1983; 17 (1): 71-75.

62. Seppa L. Effects of a sodium fluoride solution and a varnish with different fluoride concentrations on enamel remineralization in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96 (4): 304-309.
63. Seppa L, Hausen H, Tuutti H, Luoma H. Effect of a sodium fluoride varnish on the progress of initial caries lesions. *Scand J Dent Res.* 1983; 91 (2): 96-98.
64. Seppa L, Leppanen T e Housen H. Fluoride varnish versus acidulated phosphite fluoride gel: A 3-year clinical trial. *Caries Res.* 1995; 29: 327-330.
65. Seppa L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract.* 2004; 13 (6): 307-311.
66. Shobha T, Nandlal B, Prabhakar AR, Sudha P. Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride for schoolchildren in Manipal. *J Indian Dent Association.* 1987; 59(6-9): 157-60. "apud" Seppa L, Leppanen T e Housen H. Fluoride varnish versus acidulated phosphite fluoride gel: A 3-year clinical trial. *Caries Res.* 1995; 29: 327-330.
67. Simonsson T, Ronstrom A, Rundegren J, Birkhed D. Rate of plaque formation--some clinical and biochemical characteristics of "heavy" and "light" plaque formers. *Scand J Dent Res.* 1987; 95 (2): 97-103.
68. Takagi S, Chow LC, Yamada EM, Brown WE. Enhanced enamel F ptake by monocalcium phosphate monohydrate gels. *J Dent Res.* 1987; 66: 1523-1526.
69. ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur. J. Oral Sci.* Oct.1997; 105(5): 461-465.
70. ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res.* 2004; 38 (3): 254-257.
71. ten Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J.* 2013; 214 (4): 161-167.
72. Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res.* 2006; 85 (9): 834-838.

73. Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Fluoride Release from CaF_2 and Enamel Demineralization. J Dent Res. 2008; 87 (11): 1032-1036.
74. Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. Braz Oral Res. 2010; 24 Suppl 1 9-17.
75. Thystrup A & Fejerskov O. Características clínicas e patológicas da cárie dental. In: Cariologia clínica. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995; 6: 111–157.
76. Vaikuntam J. Fluoride varnishes: should we be using them? Pediatr Dent. 2000; 22 (6): 513-516.
77. Vale GC. Efeito da aplicação tópica de flúor e uso de dentifrício fluoretado no biofilme dental e dentina radicular. [tese] Piracicaba: UNICAMP; 2010.
78. Villena RS, Cury JA. Flúor - Aplicação Sistêmica. In Corrêa, M.S.N.P. Odontopediatria na primeira Infância. São Paulo: Editora Santos. 1998.
79. Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased Overnight Fluoride Concentrations in Saliva, Plaque, and Plaque Fluid after a Novel Two-solution Rinse. J Dent Res. 1997; 76 (3): 761-767.
80. Vogel GL, Tenuta L M, Schumacher GE, Chow LC. No calcium-fluoride-like deposits detected in plaque shortly after a sodium fluoride mouthrinse. Caries Res. 2010; 44 (2): 108-115.

APÊNDICE 1 - Kit fornecido aos voluntários



APÊNDICE 2 – Orientações fornecidas aos voluntários





ESTUDO CLÍNICO - UNICAMP/UNOCHAPECÓ

RECOMENDAÇÕES A SEREM SEGUIDAS APÓS APLICAÇÃO DE VERNIZ FLUORETADO

VOCÊ RECEBEU UMA APLICAÇÃO DE VERNIZ FLUORETADO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS SEUS DENTES E, PORTANTO, VOCÊ DEVERÁ MANTER UMA DIETA LEVE (NÃO ABRASIVA) E NÃO DEVERÁ ESCOVAR OS DENTES NEM UTILIZAR FIO DENTAL ATÉ O SEU RETORNO, O QUAL DEVERÁ OCORRER ÀS _____ HORAS DO DIA DE HOJE (DAQUI À 4 HORAS).

Chapécó, ____/____/____





ESTUDO CLÍNICO - UNICAMP/UNOCHAPECÓ

RECOMENDAÇÕES A SEREM SEGUIDAS APÓS APLICAÇÃO DE VERNIZ FLUORETADO

VOCÊ RECEBEU UMA APLICAÇÃO DE VERNIZ FLUORETADO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS SEUS DENTES E, PORTANTO, VOCÊ DEVERÁ MANTER UMA DIETA LEVE (NÃO ABRASIVA) E NÃO DEVERÁ ESCOVAR OS DENTES NEM UTILIZAR FIO DENTAL ATÉ O SEU RETORNO, O QUAL DEVERÁ AMANHÃ, ÀS _____ HORAS (DAQUI À 24 HORAS).

**COLETAS
SEGUNDA-FEIRA**



Obs:
Não utilizar enxaguatórios bucais ou outros produtos fluoretados durante o período de estudo.
Não realizar profilaxia ou polimento coronário durante o período do estudo.





ESTUDO CLÍNICO - UNICAMP/UNOCHAPECÓ
ORIENTAÇÕES PARA PARTICIPANTES DO ESTUDO

Agenda de Compromissos

Início do estudo = 9 de setembro de 2015
Final do estudo = 5 de outubro de 2015

10/9 - Iniciar o uso do dentífrico fornecido, o qual deverá ser o único tipo de dentífrico utilizado até o final do estudo.

13/9 - suspender a escovação - usar apenas goma de mascar fornecida (3x neste dia).
14/9 - comparecer à Unochapecó às 8h para coleta do biofilme, em jejum e sem usar goma de mascar. Será fornecido café da manhã.

16/9 - suspender a escovação - usar apenas goma de mascar fornecida (3x neste dia).
17/9 - comparecer à Unochapecó às 8h para coleta do biofilme, em jejum e sem usar goma de mascar. Será fornecido café da manhã.

20/9 - suspender a escovação - usar apenas goma de mascar fornecida (3x neste dia).
21/9 - comparecer à Unochapecó às 8h para coleta do biofilme, em jejum e sem usar goma de mascar. Será fornecido café da manhã.

27/9 - suspender a escovação - usar apenas goma de mascar fornecida (3x neste dia).
28/9 - comparecer à Unochapecó às 8h para coleta do biofilme, em jejum e sem usar goma de mascar. Será fornecido café da manhã.

4/10 - suspender a escovação - usar apenas goma de mascar fornecida (3x neste dia).
5/10 - comparecer à Unochapecó às 8h para coleta do biofilme, em jejum e sem usar goma de mascar. Será fornecido café da manhã.

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do CEP



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA - UNICAMP



Continuação do Parecer: 688.203

aplicação de VF (NaF a 5% - Duraphat – Colgate) mantido por 24 horas sobre os dentes GFFA – grupo FFA (F-gel a 1,23%). Amostras de esmalte dental obtidas por técnica de micro biópsia ácida serão utilizadas para determinação da concentração de F no início do tratamento, 7º e 28º dia em todos os grupos e imediatamente após a remoção do F-gel e VF para os grupos tratados. O biofilme será coletado no início do tratamento e no 3º, 7º, 14º e 28º dias em todos os grupos. A concentração do íon F no esmalte dental e no fluido do biofilme será determinada por um eletrodo específico. Os resultados serão analisados comparando os grupos e os tempos experimentais, utilizando testes estatísticos apropriados. O estudo terá a duração de quatro meses.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será comparar a capacidade do F-gel e VF de formar reservatório de F no esmalte e de manter concentração aumentada de F no fluido do biofilme dental em função do tempo e a importância do tempo de manutenção do VF aplicado sobre os dentes neste processo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No presente projeto de pesquisa os possíveis desconfortos e riscos a serem discutidos são: a manutenção do verniz fluoretado sobre os dentes em dois dos grupos experimentais, a suspensão da escovação dentária pelo período de 24 horas e a utilização de goma de mascar açucarada, o uso de dentífrício sem flúor durante todo o período do experimento e a realização da biópsia ácida no esmalte dentário. Todos os voluntários estarão cientes dos desconfortos e riscos durante a realização do estudo e terão a liberdade de não aderirem ao mesmo.

Os benefícios esperados com o estudo estarão relacionados à população em geral e estarão centrados na determinação da melhor conduta e indicação desses importantes meios de utilização de fluoretos na Odontologia (gel de flúor fosfato acidulado e verniz fluoretado) e obtenção dos melhores benefícios preventivos e/ou terapêuticos. Aos voluntários que participarem dos grupos experimentais onde será aplicado verniz fluoretado ou gel de flúor fosfato acidulado poderá ser caracterizada uma proteção adicional à cárie dentária, benefício este já conhecido destas intervenções. Por outro lado, todos os participantes, por serem estudantes universitários, poderão se beneficiar pelo conhecimento adquirido nos temas estudados nesta pesquisa, além de receberem um exame intraoral que avaliará sua condição de saúde bucal e indicará as condições inadequadas, se existirem, com possível encaminhamento para tratamento odontológico.

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

E-mail: cep@fop.unicamp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA - UNICAMP



Continuação do Parecer: 688.203

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores apresentaram todas as informações necessárias e descreveram detalhadamente as etapas de realização, os critérios de inclusão e exclusão, a fonte para obtenção do material de análise, a metodologia que será adotada para a execução do protocolo de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram as declarações obrigatórias, o TCLE, bem como o link para o CV Lattes.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo 031/2014 votado e aprovado em reunião do CEP-FOP/UNICAMP 11/06/2014.

PIRACICABA, 16 de Junho de 2014

Assinado por:
Felippe Bevilacqua Prado
(Coordenador)

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

E-mail: cep@fop.unicamp.br

ANEXO 2 - Comprovante de registro do estudo no ClinicalTrials.gov

ClinicalTrials.gov

A service of the U.S. National Institutes of Health

Now Available: Final Rule for FDAAA 801 and NIH Policy on Clinical Trial Reporting

Trial record **1 of 1** for: Long-term Release of Fluoride Formed on Enamel by Fluoride Gel or Varnish to Biofilm Fluid

[Previous Study](#) | [Return to List](#) | [Next Study](#)

Long-term Release of Fluoride Formed on Enamel by Fluoride Gel or Varnish to Biofilm Fluid

This study is ongoing, but not recruiting participants.

Sponsor:

University of Campinas, Brazil

Information provided by (Responsible Party):

Livia Maria Andakó Tenuta, University of Campinas, Brazil

ClinicalTrials.gov Identifier:

NCT02486458

First received: May 26, 2015

Last updated: May 10, 2016

Last verified: May 2016

[History of Changes](#)

[Full Text View](#)

[Tabular View](#)

[No Study Results Posted](#)

[Disclaimer](#)

[How to Read a Study Record](#)

Purpose

The anticaries effect of professional **fluoride** application has been associated with the formation of calcium **fluoride**-like products ("CaF₂") on dental surface, which may function as a slow **release fluoride** reservoir. Among professional **fluoride** products, **fluoride gel** and **varnish** are the most important, and have different soluble **fluoride** concentrations, pHs and vehicles. Although the concentration of **fluoride formed on enamel** after the use of both is similar, the retention of these reaction products is unknown. Also, it is unknown the capacity of these reservoirs to enhance dental **biofilm fluid** with **fluoride**. Moreover, the effect of the **varnish** application time on these parameters is unknown. Therefore, the aim of this study is to compare the capacity of **fluoride gel** and **varnish** to form **fluoride** reservoirs on **enamel** and increase dental **biofilm fluid fluoride** concentration with time. Rapid **biofilm-forming** individuals will be selected to participate and divided into 4 experimental groups: 1. Negative control: no treatment; 2. **Varnish** 4 hours: **fluoride varnish** will be applied and kept on teeth for 4 hours; 3. **Varnish** 24 h: **fluoride varnish** will be applied on teeth and kept for 24 h; and 4. **Gel**: **Fluoride gel** will be applied on teeth. Microbiopsies of **enamel** will be obtained by a microbiopsy technique to assess **fluoride** concentration before, 7 and 28 days after the treatments. Dental **biofilm** will be collected before and 3, 7, 14 and 28 days after treatments. **Fluoride** concentration on **enamel** and in the **biofilm fluid** will be determined by an ion-specific electrode. Data will be analyzed statistically comparing the groups and collection times.

Condition	Intervention	Phase
Dental Caries	Drug: 5% sodium fluoride varnish Drug: 1.23% sodium fluoride acidic gel	Phase 0

Study Type: [Interventional](#)

Study Design: [Allocation: Randomized](#)

[Endpoint Classification: Efficacy Study](#)

[Intervention Model: Parallel Assignment](#)

[Masking: Double Blind \(Subject, Investigator\)](#)

[Primary Purpose: Prevention](#)

Official Title: Retention of **Fluoride Formed on Enamel by Fluoride Gel or Varnish** Application and Its **Release** to Dental **Biofilm Fluid** - in Vivo Study

Resource links provided by NLM:

Drug Information available for: [Sodium fluoride](#) [Fluorine](#) [Fluoride](#) [Listerine](#)

[U.S. FDA Resources](#)

Further study details as provided by University of Campinas, Brazil:

Primary Outcome Measures:

- Change in **fluoride** concentration in **enamel** days after **fluoride** application [Time Frame: Up to 28 days] [Designated as safety issue: No]
- Change in **fluoride** concentration in dental **biofilm fluid** days after **fluoride** application [Time Frame: Up to 28 days] [Designated as safety issue: No]

Secondary Outcome Measures:

- Change in **fluoride** concentration in whole **biofilm** days after **fluoride** application [Time Frame: Up to 28 days] [Designated as safety issue: No]

Enrollment: 62
 Study Start Date: April 2015
 Estimated Study Completion Date: December 2016
 Primary Completion Date: December 2015 (Final data collection date for primary outcome measure)

Arms	Assigned Interventions
No Intervention: Negative control No treatment will be applied	
Experimental: Varnish 4 h Fluoride varnish will be applied on teeth and removed after 4 hours	Drug: 5% sodium fluoride varnish Fluoride varnish containing 22,600 ppm F, as NaF, in a neutral base
Experimental: Varnish 24 h Fluoride varnish will be applied on teeth and removed after 24 hours	Drug: 5% sodium fluoride varnish Fluoride varnish containing 22,600 ppm F, as NaF, in a neutral base
Experimental: Fluoride Gel Fluoride gel will be applied on teeth and removed after 4 minutes	Drug: 1.23% sodium fluoride acidic gel Fluoride gel containing 12,300 ppm F (as NaF) in an acidic pH (by addition of phosphonic acid)

► Eligibility

Ages Eligible for Study: 18 Years to 30 Years (Adult)
 Genders Eligible for Study: Both
 Accepts Healthy Volunteers: Yes

Criteria

Inclusion Criteria:

- Good general health
- Good oral health
- At least 5 teeth in each hemiarch
- All 4 superior incisors in the mouth
- Rapid biofilm forming

Exclusion Criteria:

- Pregnancy
- Intake of medication that reduces salivary flow
- Chronic diseases
- Smokers
- Orthodontic appliances
- Dental prosthesis
- Allergy to fluoride varnish components

► Contacts and Locations

Choosing to participate in a study is an important personal decision. Talk with your doctor and family members or friends about deciding to join a study. To learn more about this study, you or your doctor may contact the study research staff using the Contacts provided below. For general information, see [Learn About Clinical Studies](#).

Please refer to this study by its ClinicalTrials.gov identifier: NCT02486458

Locations

Brazil

Unochapecó
 Chapecó, Santa Catarina, Brazil

Sponsors and Collaborators

University of Campinas, Brazil

► More Information

Responsible Party: Livia Maria Andaló Tenuta, DDS, MSc, PhD, University of Campinas, Brazil
 ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT02486458](#) [History of Changes](#)
 Other Study ID Numbers: FOPBio005
 Study First Received: May 26, 2015

Last Updated: May 10, 2016
Health Authority: Brazil: National Committee of Ethics in Research

Keywords provided by University of Campinas, Brazil:

Fluoride

Biofilm fluid

Calcium **fluoride**

Topical

Additional relevant MeSH terms:

Fluorides

Sodium **Fluoride**

Fluorides, Topical

Dental Caries

Tooth Demineralization

Tooth Diseases

Stomatognathic Diseases

Listerine

Carlostatic Agents

Protective Agents

Physiological Effects of Drugs

Anti-Infective Agents, Local

Anti-Infective Agents

ClinicalTrials.gov processed this record on September 27, 2016

ANEXO 3

RELATÓRIO ESTATÍSTICO

Data: 17/05/2016

Estudo: Carla

Análise realizada por: Livia Tenuta

Programa: SAS v9.0

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Fatores em estudo

- Método de aplicação tópica de F (TRAT), em 3 níveis
 - . Controle
 - . F gel
 - . Verniz 24 h
- Tempo (TEMPO), em 4 ou 5 níveis dependendo da variável resposta:
 - . Baseline
 - . Pós-tratamento (PT) (presente em F no dente e camada removida)
 - . 3 dias (presente nas variáveis de biofilme)
 - . 7 dias
 - . 14 dias (presente nas variáveis de biofilme)
 - . 28 dias

Variáveis resposta:

- Concentração de F no dente
- Camada de esmalte removida
- Concentração de F no fluido do biofilme
- Concentração de F nos sólidos do biofilme

Delineamento experimental:

Um delineamento fatorial 3 x 4 (ou 5) foi considerando na análise estatística, embora o efeito de TEMPO devesse ser estimado por uma análise de "medidas repetidas". O n experimental varia entre os diferentes grupos de TRAT, sendo próximo de 15 por grupo (de 14 a 17).

Modelo Matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \text{TRAT}_i + \text{TEMPO}_j + \text{TRAT}_i * \text{TEMPO}_j + e_{ijk}$$

Y_{ij} : média geral da variável resposta submetida ao i-ésimo nível de TRAT, no j-ésimo TEMPO

μ : média geral do experimento

TRAT_i : efeito do i-ésimo nível de TRAT

TEMPO_j : efeito do j-ésimo nível de TEMPO

$\text{TRAT}_i * \text{TEMPO}_j$: efeito da interação entre TRAT e TEMPO

e_{ijk} : erro aleatório ou resíduo

5. Concentração de F no esmalte

Pressuposições do modelo: As pressuposições de homocedasticidade e normalidade dos resíduos foram checadas e atendidas após a transformação dos dados à raiz quadrada

Fdente = dados transformados a RAIZ QUADRADA

Análise da Variância:

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	Controle Fgel V24h
TEMPO	4	1-Baseli 2-PT 3-7d 4-28d

Number of observations 180

Dependent Variable: **RAIZFDENTE**

Sum of Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	1.73512553	0.86756277	39.90	<.0001
TEMPO	3	6.47724171	2.15908057	99.29	<.0001
TRAT*TEMPO	6	3.54357140	0.59059523	27.16	<.0001
Error	168	3.65324470	0.02174550		
Corrected Total	179	14.99870399			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	RAIZFDENTE Mean		
0.756429	17.00096	0.147464	0.867384		

Portanto, houve efeito significativo de TRAT, TEMPO e da INTERAÇÃO TRAT*TEMPO nos resultados de F no esmalte. Neste caso, prevalece o estudo da interação, cujo desdobramento está apresentado abaixo.

The GLM Procedure

Least Squares Means

TRAT*TEMPO Effect Sliced by TRAT for RAIZFDENTE

Sum of TRAT	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Controle	3	0.017416	0.005805	0.27	0.8491
Fgel	3	4.927495	1.642498	75.53	<.0001
V24h	3	4.665423	1.555141	71.52	<.0001

Dentro do grupo controle, não há efeito de tempo, porém dentro dos grupos Fgel e V24h há.

The GLM Procedure

Least Squares Means

TRAT*TEMPO Effect Sliced by TEMPO for RAIZFDENTE

Sum of TEMPO	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------------	----	---------	-------------	---------	--------

1-Baseli	2	0.368994	0.184497	8.48	0.0003
2-PT	2	4.778666	2.389333	109.88	<.0001
3-7d	2	0.090534	0.045267	2.08	0.1279
4-28d	2	0.040503	0.020252	0.93	0.3961

Dentro do tempo baseline e PT, há diferenças entre os grupos de TRAT; já dentro dos tempos 7 dias e 28 dias, não há diferenças entre os grupos de TRAT.

Para determinar quais grupos diferem de quais dentro de cada nível de TRAT ou TEMPO, usa-se as tabelas abaixo. Para comparar os tempos dentro de F gel ou verniz 24 h, observar as comparações entre os números 5 e 8, ou 9 e 12; para comparar os tratamentos dentro dos tempos baseline ou PT, observar as comparações entre 1, 5 e 9, ou 2, 6 e 10.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

RAIZFDENTE TRAT	TEMPO	LSMEAN	LSMEAN Number
Controle	1-Baseli	0.74909451	1
Controle	2-PT	0.74909451	2
Controle	3-7d	0.76494131	3
Controle	4-28d	0.71933244	4
Fgel	1-Baseli	0.83235268	5
Fgel	2-PT	1.49683902	6
Fgel	3-7d	0.81831760	7
Fgel	4-28d	0.78775372	8
V24h	1-Baseli	0.60983731	9
V24h	2-PT	1.34378368	10
V24h	3-7d	0.87307335	11
V24h	4-28d	0.72770770	12

Least Squares Means for effect TRAT*TEMPO
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: RAIZFDENTE

i/j	1	2	3	4	5	6
1		1.0000	1.0000	1.0000	0.9262	<.0001
2	1.0000		1.0000	1.0000	0.9262	<.0001
3	1.0000	1.0000		0.9993	0.9840	<.0001
4	1.0000	1.0000	0.9993		0.6275	<.0001
5	0.9262	0.9262	0.9840	0.6275		<.0001
6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
7	0.9803	0.9803	0.9978	0.7968	1.0000	<.0001
8	0.9999	0.9999	1.0000	0.9820	0.9997	<.0001
9	0.2731	0.2731	0.1412	0.6474	0.0042	<.0001
10	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1927
11	0.4533	0.4533	0.6653	0.1502	0.9998	<.0001
12	1.0000	1.0000	0.9999	1.0000	0.7516	<.0001
i/j	7	8	9	10	11	12
1	0.9803	0.9999	0.2731	<.0001	0.4533	1.0000

2	0.9803	0.9999	0.2731	<.0001	0.4533	1.0000
3	0.9978	1.0000	0.1412	<.0001	0.6653	0.9999
4	0.7968	0.9820	0.6474	<.0001	0.1502	1.0000
5	1.0000	0.9997	0.0042	<.0001	0.9998	0.7516
6	<.0001	<.0001	<.0001	0.1927	<.0001	<.0001
7		1.0000	0.0105	<.0001	0.9975	0.8861
8	1.0000		0.0608	<.0001	0.9217	0.9945
9	0.0105	0.0608		<.0001	0.0001	0.5599
10	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001
11	0.9975	0.9217	0.0001	<.0001		0.2358
12	0.8861	0.9945	0.5599	<.0001	0.2358	

6. Camada removida

Pressuposições do modelo: As pressuposições de homocedasticidade e normalidade dos resíduos foram checadas e atendidas sem a necessidade de transformação dos dados
Camada = dados originais

Análise da Variância:

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	Controle Fgel V24h
TEMPO	4	1-Baseli 2-PT 3-7d 4-28d

Number of observations 180

Dependent Variable: CAMADA

Sum of Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	0.00628142	0.00314071	0.19	0.8284
TEMPO	3	0.12979168	0.04326389	2.60	0.0542
TRAT*TEMPO	6	0.13768859	0.02294810	1.38	0.2265
Error	168	2.79955525	0.01666402		
Corrected Total	179	3.06970320			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	CAMADA Mean	
0.088005		20.42673	0.129089	0.631962	

Portanto, não houve efeito significativo de TRAT, TEMPO ou da interação entre eles nos resultados de camada.

7. F no fluido do biofilme

Pressuposições do modelo: As pressuposições de homocedasticidade e normalidade dos resíduos foram checadas e atendidas após a transformação logarítmica dos dados.

$F_{\text{fluido}} = \log_{10}(F_{\text{fluido}})$

Análise da Variância:

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	Controle Fgel V24h
TEMPO	5	0-Baseli 1-3d 2-7d 3-14d 4-28d

Number of observations 223

NOTE: Due to missing values, only 208 observations can be used in this analysis.

(Os missing values referem-se a dados não coletados ou perdidos, e dados deliberadamente retirados por apresentarem erros identificados durante a dosagem).

Dependent Variable: LOGFFLUIDO

Sum of Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	0.02042413	0.01021207	0.30	0.7447
TEMPO	4	0.49145860	0.12286465	3.55	0.0080
TRAT*TEMPO	8	0.12784152	0.01598019	0.46	0.8817
Error	193	6.67610705	0.03459123		
Corrected Total	207	7.31382231			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOGFFLUIDO Mean		
0.087193	23.14167	0.185987	0.803690		

Portanto, houve efeito significativo de TEMPO nos resultados de F no fluido do biofilme. O teste de Tukey de comparações entre tempos está apresentado abaixo.

The GLM Procedure

Least Squares Means

Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

LOGFFLUIDO	LSMEAN	LSMEAN Number
TEMPO		
0-Baseli	0.71814178	1
1-3d	0.80570192	2
2-7d	0.80451769	3
3-14d	0.83198289	4
4-28d	0.85944119	5

Least Squares Means for effect TEMPO
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: LOGFFLUIDO

i\j	1	2	3	4	5
1		0.1821	0.2773	0.0395	0.0042
2	0.1821		1.0000	0.9653	0.6574
3	0.2773	1.0000		0.9706	0.7142
4	0.0395	0.9653	0.9706		0.9594
5	0.0042	0.6574	0.7142	0.9594	

Pela análise de Tukey, houve diferença significativa entre baseline e os tempos 14 dias e 28 dias. Atenção: esses resultados referem-se aos dados globais dos tempos baseline, 14 e 28 dias, independentemente do grupo, já que não houve interação TRAT*TEMPO.

8. F na porção sólida do biofilme

Pressuposições do modelo: As pressuposições de homocedasticidade e normalidade dos resíduos foram checadas e atendidas após a transformação logarítmica dos dados.

Fsólido = $\log_{10}(\text{Fsólido})$

Análise da Variância:

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	Controle Fgel V24h
TEMPO	5	O-Baseli 1-3d 2-7d 3-14d 4-28d

Number of observations 223

NOTE: Due to missing values, only 219 observations can be used in this analysis.

(Os missing values referem-se a dados não coletados ou perdidos, e dados deliberadamente retirados por apresentarem erros identificados durante a dosagem).

Dependent Variable: LOGFSOLIDO

Sum of Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	2.39397987	1.19698993	3.54	0.0310
TEMPO	4	1.60296341	0.40074085	1.18	0.3192
TRAT*TEMPO	8	0.67148343	0.08393543	0.25	0.9809
Error	204	69.07421465	0.33859909		
Corrected Total	218	73.77102306			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOGFSOLIDO Mean		
0.063667	143.8391	0.581893	0.404544		

Portanto, houve efeito significativo de TRAT nos resultados de F no sólido do biofilme. O teste de Tukey de comparações entre tratamentos está apresentado abaixo.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

LOGFSOLIDO TRAT	LSMEAN	LSMEAN Number
Controle	0.29765187	1
Fgel	0.55129144	2
V24h	0.37986978	3

Least Squares Means for effect TRAT
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: LOGFSOLIDO

i\j	1	2	3
1		0.0249	0.6601
2	0.0249		0.1953
3	0.6601	0.1953	

Pela análise de Tukey, houve diferença significativa entre o grupo controle e o F gel. Atenção: esses resultados referem-se aos dados globais do grupo controle x F gel, já que não houve interação TRAT*TEMPO (ou seja, esse resultado independe do tempo analisado).

BIÓPSIA

Obs	VOL	TRAT	TEMPO	FDENTE	CAMADA	RAIZFDENTE
1	3	Controle	4-28d	0.5251	0.8035	0.72464
2	3	Controle	3-7d	0.5016	0.4359	0.70824
3	3	Controle	1-Baseli	0.5074	0.6426	0.71232
4	3	Controle	2-PT	0.5074	0.6426	0.71232
5	11	Controle	4-28d	0.6710	0.7766	0.81915
6	11	Controle	3-7d	0.7904	0.8457	0.88904
7	11	Controle	1-Baseli	1.1846	0.6011	1.08839
8	11	Controle	2-PT	1.1846	0.6011	1.08839
9	13	Controle	4-28d	0.5676	0.6409	0.75339
10	13	Controle	3-7d	0.6419	0.7811	0.80119
11	13	Controle	1-Baseli	0.8246	0.7536	0.90807
12	13	Controle	2-PT	0.8246	0.7536	0.90807
13	14	Controle	4-28d	0.6379	0.5226	0.79869
14	14	Controle	3-7d	1.1398	0.8116	1.06761
15	14	Controle	1-Baseli	0.8771	0.7855	0.93654
16	14	Controle	2-PT	0.8771	0.7855	0.93654
17	15	Controle	4-28d	0.8216	0.5222	0.90642
18	15	Controle	3-7d	0.3587	0.4936	0.59892
19	15	Controle	1-Baseli	0.3830	0.7689	0.61887
20	15	Controle	2-PT	0.3830	0.7689	0.61887
21	17	Controle	4-28d	0.6504	0.6811	0.80647
22	17	Controle	3-7d	0.6544	0.5386	0.80895
23	17	Controle	1-Baseli	0.3245	0.6836	0.56965
24	17	Controle	2-PT	0.3245	0.6836	0.56965
25	18	Controle	4-28d	0.1969	0.4783	0.44373
26	18	Controle	3-7d	0.2083	0.6782	0.45640
27	18	Controle	1-Baseli	0.6345	0.6838	0.79656
28	18	Controle	2-PT	0.6345	0.6838	0.79656
29	23	Controle	4-28d	0.4857	0.5140	0.69692
30	23	Controle	3-7d	0.5544	0.6548	0.74458

31	23	Controle	1-Baseli	0.3098	0.6586	0.55660
32	23	Controle	2-PT	0.3098	0.6586	0.55660
33	25	Controle	4-28d	0.4288	0.4504	0.65483
34	25	Controle	3-7d	0.4434	0.5127	0.66588
35	25	Controle	1-Baseli	0.2656	0.5711	0.51536
36	25	Controle	2-PT	0.2656	0.5711	0.51536
37	26	Controle	4-28d	0.6429	0.6861	0.80181
38	26	Controle	3-7d	0.6880	0.6726	0.82946
39	26	Controle	1-Baseli	0.7205	0.8324	0.84882
40	26	Controle	2-PT	0.7205	0.8324	0.84882
41	53	Controle	4-28d	0.4206	0.5116	0.64854
42	53	Controle	3-7d	0.5874	0.4517	0.76642
43	53	Controle	1-Baseli	0.4250	0.5489	0.65192
44	53	Controle	2-PT	0.4250	0.5489	0.65192
45	57	Controle	4-28d	0.3628	0.6293	0.60233
46	57	Controle	3-7d	0.2506	0.5762	0.50060
47	57	Controle	1-Baseli	0.3122	0.5092	0.55875
48	57	Controle	2-PT	0.3122	0.5092	0.55875
49	70	Controle	4-28d	0.2265	0.5776	0.47592
50	70	Controle	3-7d	0.4383	0.5188	0.66204
51	70	Controle	1-Baseli	0.6012	0.5837	0.77537
52	70	Controle	2-PT	0.6012	0.5837	0.77537
53	76	Controle	4-28d	0.5588	0.6049	0.74753
54	76	Controle	3-7d	0.7289	0.6703	0.85376
55	76	Controle	1-Baseli	0.5397	0.6671	0.73464
56	76	Controle	2-PT	0.5397	0.6671	0.73464
57	81	Controle	4-28d	0.7512	0.7372	0.86672
58	81	Controle	3-7d	0.6933	0.6294	0.83265
59	81	Controle	1-Baseli	0.6152	0.5364	0.7843560
81		Controle	2-PT	0.6152	0.5364	0.78435
61	101	Controle	4-28d	0.5810	0.5037	0.76223
62	101	Controle	3-7d	1.1095	0.5995	1.05333
63	101	Controle	1-Baseli	0.8636	0.7247	0.92930
64	101	Controle	2-PT	0.8636	0.7247	0.92930
65	10	Fgel	4-28d	0.7396	0.6675	0.86000
66	10	Fgel	3-7d	0.4042	0.6084	0.63577
67	10	Fgel	1-Baseli	0.4537	0.6836	0.67357
68	10	Fgel	2-PT	2.7893	0.6034	1.67012
69	12	Fgel	4-28d	0.7339	0.7442	0.85668
70	12	Fgel	3-7d	0.9998	0.7363	0.99990
71	12	Fgel	1-Baseli	0.9010	0.7284	0.94921
72	12	Fgel	2-PT	2.3229	0.7087	1.52411
73	24	Fgel	4-28d	0.7367	0.5109	0.85831
74	24	Fgel	3-7d	0.8873	0.6484	0.94197
75	24	Fgel	1-Baseli	0.6960	0.6271	0.83427
76	24	Fgel	2-PT	2.3686	0.5441	1.53903
77	27	Fgel	4-28d	0.8915	0.5684	0.94419
78	27	Fgel	3-7d	1.3821	0.7303	1.17563
79	27	Fgel	1-Baseli	1.3350	0.7835	1.15542
80	27	Fgel	2-PT	3.0387	0.6082	1.74319
81	33	Fgel	4-28d	0.4764	0.7906	0.69022
82	33	Fgel	3-7d	0.4011	0.7021	0.63332
83	33	Fgel	1-Baseli	0.5094	0.6838	0.71372
84	33	Fgel	2-PT	1.4335	0.5286	1.19729
85	51	Fgel	4-28d	0.2784	0.5673	0.52764
86	51	Fgel	3-7d	0.7150	0.5570	0.84558
87	51	Fgel	1-Baseli	0.5397	0.5602	0.73464
88	51	Fgel	2-PT	1.7146	0.5658	1.30943
89	52	Fgel	4-28d	0.5970	0.7338	0.77266
90	52	Fgel	3-7d	0.6105	0.9988	0.78134
91	52	Fgel	1-Baseli	0.5016	0.9822	0.70824
92	52	Fgel	2-PT	2.4626	0.9381	1.56927

93	54	Fgel	4-28d	0.5170	0.4699	0.71903
94	54	Fgel	3-7d	0.7095	0.5120	0.84232
95	54	Fgel	1-Baseli	0.9045	0.5628	0.95105
96	54	Fgel	2-PT	1.8752	0.6337	1.36938
97	69	Fgel	4-28d	0.4953	0.3646	0.70378
98	69	Fgel	3-7d	0.7664	0.6764	0.87544
99	69	Fgel	1-Baseli	0.8342	0.6343	0.91335
100	69	Fgel	2-PT	3.0744	0.7167	1.75340
101	71	Fgel	4-28d	1.1985	0.7238	1.09476
102	71	Fgel	3-7d	0.6801	0.5244	0.82468
103	71	Fgel	1-Baseli	0.7317	0.8084	0.85539
104	71	Fgel	2-PT	2.1075	0.4675	1.45172
105	72	Fgel	4-28d	0.6815	0.5272	0.82553
106	72	Fgel	3-7d	0.6775	0.6009	0.82310
107	72	Fgel	1-Baseli	0.4662	0.5556	0.68279
108	72	Fgel	2-PT	2.1075	0.4989	1.45172
109	102	Fgel	4-28d	0.8184	0.6509	0.90465
110	102	Fgel	3-7d	0.7014	0.6575	0.83750
111	102	Fgel	1-Baseli	0.7605	0.8083	0.87207
112	102	Fgel	2-PT	2.4626	1.0306	1.56927
113	103	Fgel	4-28d	0.2291	0.3697	0.47864
114	103	Fgel	3-7d	0.1698	0.4126	0.41207
115	103	Fgel	1-Baseli	0.5335	0.5378	0.73041
116	103	Fgel	2-PT	1.7013	0.6051	1.30434
117	110	Fgel	4-28d	0.6280	0.4869	0.79246
118	110	Fgel	3-7d	0.6853	0.4862	0.82783
119	110	Fgel	1-Baseli	0.7723	0.6733	0.87881
120	110	Fgel	2-PT	2.2605	0.6061	1.50350
121	5	V24h	4-28d	0.4476	0.6723	0.66903
122	5	V24h	3-7d	0.7431	0.5759	0.86203
123	5	V24h	1-Baseli	0.2338	0.6185	0.48353
124	5	V24h	2-PT	1.0747	0.6921	1.03668
125	7	V24h	4-28d	0.5878	0.6360	0.76668
126	7	V24h	3-7d	0.6960	0.5665	0.83427
127	7	V24h	1-Baseli	0.2233	0.6195	0.47255
128	7	V24h	2-PT	2.3139	0.4507	1.52115
129	16	V24h	4-28d	0.5878	0.7168	0.76668
130	16	V24h	3-7d	0.7843	0.8871	0.88561
131	16	V24h	1-Baseli	0.3859	0.7362	0.62121
132	16	V24h	2-PT	2.4435	0.7497	1.56317
133	43	V24h	4-28d	0.4857	0.5405	0.69692
134	43	V24h	3-7d	0.5523	0.4953	0.74317
135	43	V24h	1-Baseli	0.2970	0.6508	0.54498
136	43	V24h	2-PT	1.3522	0.2977	1.16284
137	44	V24h	4-28d	0.7600	0.6227	0.87178
138	44	V24h	3-7d	0.9328	0.8936	0.96582
139	44	V24h	1-Baseli	0.7693	0.7011	0.87710
140	44	V24h	2-PT	1.7347	0.4119	1.31708
141	45	V24h	4-28d	0.6256	0.4577	0.79095
142	45	V24h	3-7d	0.9186	0.6714	0.95844
143	45	V24h	1-Baseli	0.2868	0.7756	0.53554
144	45	V24h	2-PT	1.8462	0.7808	1.35875
145	46	V24h	4-28d	0.5230	0.4705	0.72319
146	46	V24h	3-7d	0.8246	0.7690	0.90807
147	46	V24h	1-Baseli	0.4752	0.6326	0.68935
148	46	V24h	2-PT	2.0429	0.7129	1.42930
149	49	V24h	4-28d	0.3771	0.4990	0.61408
150	49	V24h	3-7d	0.9186	0.5525	0.95844
151	49	V24h	1-Baseli	0.2981	0.5189	0.54599
152	49	V24h	2-PT	1.1527	0.5291	1.07364
153	55	V24h	4-28d	0.4494	0.6203	0.67037
154	55	V24h	3-7d	0.6394	0.8386	0.79962

155	55	V24h	1-Baseli	0.3771	0.6126	0.61408
156	55	V24h	2-PT	1.5079	0.5034	1.22797
157	73	V24h	4-28d	0.3489	0.6072	0.59068
158	73	V24h	3-7d	0.6620	0.5581	0.81363
159	73	V24h	1-Baseli	0.4698	0.6273	0.68542
160	73	V24h	2-PT	1.6750	0.6584	1.29422
161	74	V24h	4-28d	0.4511	0.9427	0.67164
162	74	V24h	3-7d	1.1224	0.8493	1.05943
163	74	V24h	1-Baseli	0.3615	0.9298	0.60125
164	74	V24h	2-PT	1.7347	0.4001	1.31708
165	77	V24h	4-28d	0.6135	0.6672	0.78326
166	77	V24h	3-7d	0.6827	0.6452	0.82626
167	77	V24h	1-Baseli	0.4417	0.6561	0.66461
168	77	V24h	2-PT	1.9046	0.5447	1.38007
169	104	V24h	4-28d	0.6159	0.4665	0.78479
170	104	V24h	3-7d	0.9960	0.5618	0.99800
171	104	V24h	1-Baseli	0.3771	0.7944	0.61408
172	104	V24h	2-PT	2.6932	0.4729	1.64110
173	113	V24h	4-28d	0.6479	0.8024	0.80492
174	113	V24h	3-7d	0.3491	0.7122	0.59085
175	113	V24h	1-Baseli	0.3491	0.6674	0.59085
176	113	V24h	2-PT	1.8319	0.6126	1.35348
177	114	V24h	4-28d	0.5050	0.4288	0.71063
178	114	V24h	3-7d	0.7965	0.4603	0.89247
179	114	V24h	1-Baseli	0.3685	0.4644	0.60704
180	114	V24h	2-PT	2.1911	0.4187	1.48024

BIOFILME

Obs	VOL	TRAT	TEMPO	FFLUIDO	FSOLIDO	LOGFFLUIDO	LOGFSOLIDO
1	3	Controle	O-Baseli	5.1620	0.6234	0.71282	-0.20523
2	3	Controle	1-3d	6.0046	0.3129	0.77848	-0.50459
3	3	Controle	2-7d	4.9874	0.6092	0.69787	-0.21524
4	3	Controle	3-14d	5.8359	0.3655	0.76611	-0.43711
5	3	Controle	4-28d	8.4710	0.5618	0.92793	-0.25042
6	11	Controle	O-Baseli	4.0098	1.9101	0.60312	0.28106
7	11	Controle	1-3d	1.0643	1.0607	0.02706	0.02559
8	11	Controle	2-7d	5.6973	1.9839	0.75567	0.29752
9	11	Controle	3-14d	5.8336	1.6693	0.76594	0.22253
10	11	Controle	4-28d	8.8431	1.5450	0.94660	0.18893
11	13	Controle	O-Baseli	7.4156	0.2820	0.87015	-0.54975
12	13	Controle	1-3d	6.0823	4.6075	0.78407	0.66347
13	13	Controle	2-7d	12.2378	0.5964	1.08770	-0.22446
14	13	Controle	3-14d	4.1024	2.7338	0.61304	0.43677
15	13	Controle	4-28d	7.0921	0.2690	0.85077	-0.57025
16	14	Controle	O-Baseli	5.8898	15.7478	0.77010	1.19722
17	14	Controle	1-3d	5.6848	17.9573	0.75472	1.25424
18	14	Controle	2-7d	6.2495	25.9727	0.79585	1.41452
19	14	Controle	3-14d	6.3743	11.5511	0.80443	1.06262
20	14	Controle	4-28d	7.4939	49.2599	0.87471	1.69249
21	15	Controle	O-Baseli	4.6622	0.6431	0.66859	-0.19172
22	15	Controle	1-3d	8.8887	19.0031	0.94884	1.27882
23	15	Controle	2-7d	3.0631	1.3491	0.48616	0.13004
24	15	Controle	3-14d	5.6492	5.8218	0.75199	0.76506
25	15	Controle	4-28d	11.0346	8.7951	1.04276	0.94424
26	17	Controle	O-Baseli	4.1342	1.3416	0.61639	0.12762
27	17	Controle	1-3d	8.4970	7.4026	0.92927	0.86938
28	17	Controle	2-7d	6.6967	0.7764	0.82586	-0.10991
29	17	Controle	3-14d	6.2819	0.9123	0.79809	-0.03986
30	17	Controle	4-28d	7.2836	2.1532	0.86235	0.33308

31	18	Controle	O-Baseli	5.8147	1.6059	0.76453	0.20572
32	18	Controle	1-3d	13.1188	7.3708	1.11789	0.86751
33	18	Controle	2-7d	5.8041	0.5480	0.76373	-0.26122
34	18	Controle	3-14d	6.1705	1.0232	0.79032	0.00996
35	18	Controle	4-28d	6.3711	2.0987	0.80421	0.32195
36	23	Controle	O-Baseli	3.2629	8.0180	0.51360	0.90407
37	23	Controle	1-3d	6.0359	0.2039	0.78074	-0.69058
38	23	Controle	2-7d	7.0072	0.6665	0.84554	-0.17620
39	23	Controle	3-14d	5.5262	0.4816	0.74243	-0.31731
40	23	Controle	4-28d	5.9894	5.7943	0.77738	0.76300
41	25	Controle	O-Baseli	6.6529	0.5457	0.82301	-0.26305
42	25	Controle	1-3d	7.0235	1.1484	0.84655	0.06009
43	25	Controle	2-7d	6.6327	0.7316	0.82169	-0.13573
44	25	Controle	3-14d	5.4394	0.6066	0.73555	-0.21710
45	25	Controle	4-28d	6.0345	0.6708	0.78064	-0.17341
46	26	Controle	O-Baseli	22.9464	7.2585	1.36071	0.86085
47	26	Controle	1-3d	6.4862	7.9132	0.81199	0.89835
48	26	Controle	2-7d	6.1941	6.3828	0.79198	0.80501
49	26	Controle	3-14d	5.7327	66.6417	0.75836	1.82375
50	26	Controle	4-28d	15.5421	0.9055	1.19151	-0.04311
51	53	Controle	O-Baseli	3.9157	8.1759	0.59281	0.91254
52	53	Controle	1-3d	5.7202	1.2651	0.75741	0.10212
53	53	Controle	2-7d	4.9787	0.9740	0.69712	-0.01144
54	53	Controle	3-14d	7.0072	1.1539	0.84554	0.06217
55	53	Controle	4-28d	7.3487	1.9394	0.86621	0.28767
56	57	Controle	O-Baseli	2.5578	8.9740	0.40787	0.95299
57	57	Controle	1-3d	-	10.8258	-	1.03446
58	57	Controle	2-7d	8.3269	12.2890	0.92048	1.08952
59	57	Controle	3-14d	6.3142	6.0447	0.80032	0.78137
60	57	Controle	4-28d	7.4059	6.0446	0.86958	0.78137
61	70	Controle	O-Baseli	7.1596	0.2445	0.85489	-0.61172
62	70	Controle	1-3d	6.2013	1.0525	0.79248	0.02222
63	70	Controle	2-7d	-	0.6839	-	-0.16501
64	70	Controle	3-14d	7.0904	2.2629	0.85067	0.35467
65	70	Controle	4-28d	2.0480	0.7090	0.31133	-0.14935
66	76	Controle	O-Baseli	3.7908	0.2964	0.57873	-0.52812
67	76	Controle	1-3d	5.3215	8.9381	0.72603	0.95125
68	76	Controle	2-7d	10.4717	2.6604	1.02002	0.42495
69	76	Controle	3-14d	14.4385	0.6344	1.15952	-0.19764
70	76	Controle	4-28d	4.9969	1.3828	0.69870	0.14076
71	81	Controle	O-Baseli	5.1345	3.5460	0.71050	0.54974
72	81	Controle	1-3d	5.3619	1.6066	0.72932	0.20591
73	81	Controle	2-7d	8.6943	5.1327	0.93923	0.71035
74	81	Controle	3-14d	17.6887	1.9332	1.24770	0.28628
75	81	Controle	4-28d	-	0.8869	-	-0.05213
76	101	Controle	O-Baseli	4.8496	2.9447	0.68571	0.46904
77	101	Controle	1-3d	4.9575	1.1630	0.69526	0.06558
78	101	Controle	2-7d	-	2.1622	-	0.33490
79	101	Controle	3-14d	6.0263	0.8894	0.78005	-0.05090
80	101	Controle	4-28d	10.1244	0.8500	1.00537	-0.07058
81	10	Fgel	O-Baseli	4.6233	1.2474	0.66495	0.09601
82	10	Fgel	1-3d	6.1628	4.5133	0.78978	0.65449
83	10	Fgel	2-7d	6.2640	0.7825	0.79685	-0.10652
84	10	Fgel	3-14d	10.9893	0.5553	1.04097	-0.25547
85	10	Fgel	4-28d	8.7827	0.3354	0.94363	-0.47444
86	12	Fgel	O-Baseli	3.7106	4.8298	0.56944	0.68393
87	12	Fgel	1-3d	6.3300	14.4425	0.80140	1.15964
88	12	Fgel	2-7d	6.8437	12.6532	0.83529	1.10220
89	12	Fgel	3-14d	6.6622	8.0676	0.82362	0.90674
90	12	Fgel	4-28d	6.4309	12.7893	0.80827	1.10685
91	24	Fgel	O-Baseli	4.6200	7.9331	0.66464	0.89944
92	24	Fgel	1-3d	6.5285	2.7238	0.81481	0.43518

93	24	Fgel	2-7d	6.4791	3.1762	0.81151	0.50191
94	24	Fgel	3-14d	5.6672	5.4161	0.75337	0.73369
95	24	Fgel	4-28d	7.3179	5.7197	0.86439	0.75737
96	27	Fgel	O-Baseli	8.0431	10.6981	0.90542	1.02931
97	27	Fgel	1-3d	6.9517	4.5823	0.84209	0.66108
98	27	Fgel	2-7d	6.1663	5.0937	0.79002	0.70703
99	27	Fgel	3-14d	5.1437	4.5085	0.71128	0.65403
100	27	Fgel	4-28d	7.9730	71.9629	0.90162	1.85711
101	33	Fgel	O-Baseli	5.9132	3.426	0.77182	0.53483
102	33	Fgel	1-3d	6.9465	7.250	0.84177	0.86031
103	33	Fgel	2-7d	5.4833	2.651	0.73904	0.42341
104	33	Fgel	3-14d	6.0705	1.301	0.78322	0.11424
105	33	Fgel	4-28d	8.3354	2.218	0.92093	0.34602
106	51	Fgel	O-Baseli	6.6748	7.560	0.82444	0.87850
107	51	Fgel	1-3d	14.9111	2.798	1.17351	0.44688
108	51	Fgel	2-7d	12.1226	4.124	1.08360	0.61528
109	51	Fgel	3-14d	7.6555	2.780	0.88397	0.44398
110	51	Fgel	4-28d	6.0633	1.966	0.78271	0.29365
111	52	Fgel	O-Baseli	3.3773	-	0.52857	-
112	52	Fgel	1-3d	4.0809	3.861	0.61076	0.58672
113	52	Fgel	2-7d	-	12.710	-	1.10413
114	52	Fgel	3-14d	3.0569	2.471	0.48528	0.39293
115	52	Fgel	4-28d	10.3476	2.781	1.01484	0.44414
116	54	Fgel	O-Baseli	5.8471	2.046	0.76694	0.31084
117	54	Fgel	1-3d	10.8265	3.903	1.03449	0.59143
118	54	Fgel	2-7d	7.1544	2.794	0.85457	0.44621
119	54	Fgel	3-14d	9.3123	1.896	0.96906	0.27777
120	54	Fgel	4-28d	6.9328	38.117	0.84091	1.58112
121	69	Fgel	O-Baseli	8.1663	1.676	0.91203	0.22414
122	69	Fgel	1-3d	10.3836	1.604	1.01635	0.20526
123	69	Fgel	2-7d	-	0.560	-	-0.25204
124	69	Fgel	3-14d	9.2416	1.401	0.96575	0.14635
125	69	Fgel	4-28d	18.7662	2.425	1.27338	0.38477
126	71	Fgel	O-Baseli	4.4758	-	0.65087	-
127	71	Fgel	1-3d	3.8075	0.956	0.58064	-0.01963
128	71	Fgel	2-7d	7.6549	0.853	0.88394	-0.06900
129	71	Fgel	3-14d	7.5072	1.263	0.87548	0.10154
130	71	Fgel	4-28d	5.9223	0.190	0.77249	-0.72079
131	72	Fgel	O-Baseli	5.0878	37.877	0.70653	1.57837
132	72	Fgel	1-3d	3.2922	8.510	0.51749	0.92993
133	72	Fgel	2-7d	-	9.884	-	0.99493
134	72	Fgel	3-14d	-	7.225	-	0.85886
135	72	Fgel	4-28d	7.3982	4.241	0.86913	0.62750
136	102	Fgel	O-Baseli	3.8693	1.020	0.58763	0.00877
137	102	Fgel	1-3d	6.6398	146.225	0.82215	2.16502
138	102	Fgel	2-7d	9.4425	3.107	0.97509	0.49238
139	102	Fgel	3-14d	8.8239	5.213	0.94566	0.71705
140	102	Fgel	4-28d	8.5256	1.071	0.93072	0.02975
141	103	Fgel	O-Baseli	6.5295	0.210	0.81488	-0.67861
142	103	Fgel	1-3d	8.5983	0.372	0.93441	-0.42934
143	103	Fgel	2-7d	1.1854	103.000	0.07386	2.01284
144	103	Fgel	4-28d	14.3143	5.651	1.15577	0.75211
145	110	Fgel	O-Baseli	4.4687	6.473	0.65018	0.81112
146	110	Fgel	1-3d	6.1377	10.388	0.78801	1.01655
147	110	Fgel	2-7d	8.3190	2.016	0.92007	0.30451
148	110	Fgel	3-14d	5.1661	2.790	0.71316	0.44554
149	110	Fgel	4-28d	7.1521	4.590	0.85443	0.66184
150	5	V24h	O-Baseli	8.9444	6.580	0.95155	0.81821
151	5	V24h	1-3d	5.8043	4.3356	0.76375	0.63705
152	5	V24h	2-7d	4.6707	8.1775	0.66938	0.91262
153	5	V24h	3-14d	5.0212	2.6409	0.70081	0.42175
154	5	V24h	4-28d	8.9421	7.3094	0.95144	0.86388

155	7	V24h	O-Baseli	6.5028	0.3878	0.81310	-0.41139
156	7	V24h	1-3d	10.1152	0.2652	1.00497	-0.57643
157	7	V24h	2-7d	6.0053	0.3102	0.77853	-0.50836
158	7	V24h	3-14d	7.4646	0.1938	0.87301	-0.71265
159	7	V24h	4-28d	17.1162	5.7130	1.23341	0.75686
160	16	V24h	O-Baseli	6.9351	0.4232	0.84105	-0.37345
161	16	V24h	1-3d	6.8265	0.7395	0.83420	-0.13106
162	16	V24h	2-7d	-	0.1231	-	-0.90974
163	16	V24h	3-14d	7.6057	0.1800	0.88114	-0.74473
164	16	V24h	4-28d	4.1317	6.1842	0.61613	0.79128
165	43	V24h	O-Baseli	19.5335	3.0817	1.29078	0.48879
166	43	V24h	1-3d	6.6981	1.6696	0.82595	0.22261
167	43	V24h	2-7d	7.3386	2.6915	0.86561	0.42999
168	43	V24h	3-14d	5.7468	2.2679	0.75943	0.35562
169	43	V24h	4-28d	0.8808	44.0000	-0.05512	1.64345
170	44	V24h	1-3d	7.0869	0.7186	0.85046	-0.14351
171	44	V24h	2-7d	3.5802	5.3154	0.55391	0.72554
172	44	V24h	3-14d	5.1310	2.3568	0.71020	0.37232
173	44	V24h	4-28d	4.0357	4.1228	0.60592	0.61519
174	45	V24h	O-Baseli	4.9202	0.8008	0.69198	-0.09648
175	45	V24h	1-3d	10.1238	26.7570	1.00534	1.42744
176	45	V24h	2-7d	7.1638	7.0724	0.85514	0.84957
177	45	V24h	3-14d	6.9716	3.0380	0.84333	0.48259
178	45	V24h	4-28d	8.2100	2.2536	0.91434	0.35288
179	46	V24h	O-Baseli	6.2538	17.1176	0.79614	1.23344
180	46	V24h	1-3d	6.9974	8.5413	0.84494	0.93152
181	46	V24h	2-7d	6.0946	7.7727	0.78495	0.89057
182	46	V24h	3-14d	8.9141	4.6708	0.95008	0.66939
183	46	V24h	4-28d	6.9448	5.8828	0.84166	0.76958
184	49	V24h	O-Baseli	4.0859	5.0840	0.61129	0.70621
185	49	V24h	1-3d	3.6063	13.9377	0.55706	1.14419
186	49	V24h	2-7d	-	4.0775	-	0.61039
187	49	V24h	3-14d	8.0240	17.5662	0.90439	1.24468
188	49	V24h	4-28d	5.9825	2.8095	0.77688	0.44863
189	55	V24h	O-Baseli	2.8176	2.4458	0.44988	0.38842
190	55	V24h	1-3d	8.7246	4.8313	0.94075	0.68406
191	55	V24h	2-7d	-	2.3600	-	0.37291
192	55	V24h	3-14d	6.8192	2.1593	0.83373	0.33431
193	55	V24h	4-28d	7.4564	2.5625	0.87253	0.40866
194	73	V24h	O-Baseli	2.7186	0.8759	0.43435	-0.05755
195	73	V24h	1-3d	6.4785	73.5196	0.81147	1.86640
196	73	V24h	2-7d	-	2.4571	-	0.39042
197	73	V24h	3-14d	8.8535	0.5422	0.94711	-0.26584
198	73	V24h	4-28d	8.0433	0.5200	0.90543	-0.28400
199	74	V24h	O-Baseli	3.6164	2.3349	0.55828	0.36827
200	74	V24h	1-3d	6.5911	25.4598	0.81896	1.40585
201	74	V24h	2-7d	7.2770	4.4924	0.86195	0.65248
202	74	V24h	3-14d	6.7247	0.5994	0.82767	-0.22228
203	74	V24h	4-28d	6.6397	4.5611	0.82215	0.65907
204	77	V24h	O-Baseli	2.5376	0.1852	0.40442	-0.73236
205	77	V24h	1-3d	4.0329	0.2060	0.60562	-0.68613
206	77	V24h	2-7d	10.5438	0.1568	1.02300	-0.80465
207	77	V24h	3-14d	6.9061	2.6779	0.83923	0.42779
208	77	V24h	4-28d	5.8760	0.4280	0.76908	-0.36856
209	104	V24h	O-Baseli	5.7395	6.7625	0.75887	0.83011
210	104	V24h	1-3d	7.4318	3.9550	0.87109	0.59715
211	104	V24h	2-7d	-	3.9079	-	0.59194
212	104	V24h	3-14d	6.7948	3.5268	0.83218	0.54738
213	104	V24h	4-28d	6.6255	2.7965	0.82122	0.44661
214	113	V24h	O-Baseli	6.4149	2.3756	0.80719	0.37577
215	113	V24h	1-3d	6.3654	4.3181	0.80383	0.63529
216	113	V24h	2-7d	-	2.6071	-	0.41616

217	113	V24h	3-14d	6.5211	2.0158	0.81432	0.30445
218	113	V24h	4-28d	13.1345	2.2458	1.11841	0.35137
219	114	V24h	O-Basel	4.3942	0.8944	0.64288	-0.04847
220	114	V24h	1-3d	6.9849	2.7277	0.84416	0.43580
221	114	V24h	2-7d	-	-	-	-
222	114	V24h	3-14d	7.9369	-	0.89965	-
223	114	V24h	4-28d	6.5207	2.8316	0.81429	0.45203