



UNICAMP

Diego Figueiredo Nóbrega

**Efeito da frequência de uso de dentifrício
fluoretado na desmineralização e remineralização
do esmalte e da dentina**

Piracicaba

2014



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Diego Figueiredo Nóbrega

**Efeito da frequência de uso de dentifrício
fluoretado na desmineralização e remineralização
do esmalte e da dentina**

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

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Diego Figueiredo Nóbrega e orientada pelo Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury.

Assinatura do orientador

Piracicaba

2014

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

N239e Nóbrega, Diego Figueiredo, 1986-
Efeito da frequência de uso de dentífrico fluoretado na desmineralização e remineralização do esmalte e da dentina / Diego Figueiredo Nóbrega. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Jaime Aparecido Cury.
Coorientador: Lívia Maria Andaló Tenuta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentífricos. 2. Cárie dentária. 3. Flúor. 4. Desmineralização do dente. 5. Remineralização dentária. I. Cury, Jaime Aparecido, 1947-. II. Tenuta, Lívia Maria Andaló, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of frequency of fluoridated dentifrice use on enamel and dentin demineralization/remineralization

Palavras-chave em inglês:

Dentifrices

Dental caries

Fluorine

Tooth demineralization

Tooth remineralization

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Jaime Aparecido Cury [Orientador]

Fausto Medeiros Mendes

Carlos Alberto Feldens

Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato DIEGO FIGUEIREDO NÓBREGA aprovado.



Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY



Prof. Dr. CARLOS ALBERTO FELDENS



Prof. Dr. FAUSTO MEDEIROS MENDES

RESUMO

Para uma maior eficácia no controle da cárie de esmalte, tem sido recomendado que a escovação dental com dentifrício fluoretado (DF) deveria ser feita pelo menos 2x/dia, entretanto além de frequências maiores não terem sido experimentalmente testadas, nada é conhecido a esse respeito quanto ao controle da cárie radicular. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da frequência de uso de dentifrício fluoretado (0, 1, 2, ou 3x/dia) na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina, em condições de acúmulo de biofilme dental e exposição à sacarose. Foi desenvolvido um estudo in situ do tipo cruzado, duplo-cego em 4 fases de 14 dias cada, durante as quais 18 voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo, no mesmo aparelho, blocos dentais de esmalte e de dentina, tanto hígidos como cariados, cujas durezas de superfície (DS) foram pré-determinadas. Em cada fase, os voluntários utilizaram dentifrício fluoretado (DF) de 0 a 3x/dia, submetendo os blocos dentais a um dos seguintes tratamentos: 1) Escovação com dentifrício placebo de flúor (DP) 3x/dia; 2) Escovação com DF (1.100 µg F/g) 1x/dia e com DP 2x/dia; 3) Escovação com DF 2x/dia e 1x/dia com DP e 4) Escovação com DF 3x/dia. Sobre os blocos dentais foi permitido o acúmulo de biofilme e solução de sacarose a 20% foi gotejada 8x/dia sobre os blocos hígidos, os quais estavam dispostos de um lado do aparelho, e 3x/dia sobre os cariados, colocados do outro lado. Ao final de cada fase, o biofilme formado sobre os blocos dentais foi individualmente coletado para análise da concentração de fluoreto no fluido do biofilme. A desmineralização nos blocos dentais hígidos e a remineralização nos cariados foi respectivamente estimada pela porcentagem de perda (%PDS) e recuperação da dureza de superfície (%RDS). A concentração de flúor solúvel em álcali nos blocos dentais foi também determinada. Os resultados foram analisados por regressão linear e análise de variância, de forma independente para os blocos dentais de esmalte e de dentina, hígidos ou cariados. No esmalte, a %PDS, a %RDS e a concentração de F solúvel em álcali foram função direta da frequência de escovação com dentifrício fluoretado ($p < 0,05$), havendo diferença significativa entre os tratamentos. Para dentina, a %PDS e a concentração F solúvel em álcali também foram função da frequência de uso de dentifrício fluoretado ($p < 0,05$), mas não a %RDS ($p = 0,15$). Com relação à análise do fluido do biofilme, só foi encontrada associação significativa entre concentração

de fluoreto e frequência de uso de dentifrício fluoretado para o biofilme formado sobre os blocos hígidos de esmalte ($p < 0,05$). Os dados sugerem que a frequência de uso de dentifrício fluoretado é importante para reduzir a desmineralização tanto do esmalte como da dentina radicular, mas quanto à remineralização o efeito do dentifrício fluoretado é mais relevante para o esmalte do que para a dentina.

Palavras chave: Dentifrícios. Cárie dentária. Flúor. Desmineralização do dente. Remineralização Dentária.

ABSTRACT

For more effective control of enamel caries it has been recommended that toothbrushing with fluoride dentifrice should be made at least 2x/day, however higher frequencies have not been experimentally assessed. Also, the effect of frequency on root caries is unknown. The aim of this study was to evaluate the effect of frequency of fluoridated dentifrice use (0, 1, 2 or 3 times daily) on demineralization and remineralization of enamel and dentin, under conditions of biofilm accumulation and sucrose exposure. A crossover, in situ double-blind study was developed in 4 phases of 14 days each, during which 18 volunteers wore palatal appliances containing enamel and dentin blocks, sound and carious, whose surface hardness (SH) were pre-determined. In each phase, volunteers used fluoride dentifrice (FD) from 0 to 3 times daily, undergoing the dental blocks to one of the following treatments: 1) Brushing with fluoride placebo dentifrice (PD) 3x/day; 2) Brushing with FD (1,100 µg F/g) 1x/day and PD 2x/day; 3) Brushing with FD 2x/day and PD 1x/day and 4) Brushing with FD 3x/day. Over the dental blocks biofilm accumulation was allowed and 20% sucrose solution was dripped 8x/day on the sound blocks, which were disposed on one side of the device and 3x/day on carious, placed on the other side. At the end of each phase, the biofilms formed on the dental slabs was collected separately for analysis of fluoride concentration in the fluid phase. The demineralization in sound dental blocks and remineralization in carious was respectively estimated by the percentage of surface hardness loss (% SHL) or recovery (SHR%). The concentration of soluble alkali fluoride on dental blocks was also determined. The results were analyzed by linear regression and analysis of variance independently for enamel and dentin blocks, sound or carious. In enamel, the %SHL, %SHR and the soluble alkali fluoride concentration was a direct function of the frequency of FD use ($p < 0.05$), with significant difference between treatments. In dentin, %SHL and soluble alkali fluoride concentration were also a direct function of the frequency of FD ($p < 0.05$), but not the %SHR ($p = 0.15$). About biofilm fluid analysis, the only significant association between fluoride concentration and frequency of FD use was found in biofilm formed on sound enamel blocks ($p < 0.05$). Data suggests that the frequency of use of FD is important to

reduce demineralization of enamel and root dentin, but regarding remineralization the effect of FD seems more relevant to enamel than dentin.

Key-words: Dentifrices. Dental Caries. Fluorides. Tooth Demineralization. Tooth Remineralization.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO	42

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que me concedeu o dom da vida e que durante todos esses anos tem guiado meus passos e iluminado meu caminho. Agradeço-lhe por mais essa vitória.

Aos meus pais, **Ison Medeiros da Nóbrega & Sandra Aparecida de Figueiredo Nóbrega**, aos meus irmãos **Victor Figueiredo Nóbrega** e **Raphael Figueiredo Nóbrega** e a minha namorada **Ana Camila Batista Medeiros de Assis** por serem meu porto seguro, meus melhores amigos, minha referência e minha maior inspiração. A vocês agradeço por todo o incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

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

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, mentor deste trabalho, por ter participado ativamente de minha formação científica, crítica e intelectual. Agradeço por todos os ensinamentos, pela sabedoria a mim repassada, pela paciência, pelo incentivo, dedicação e principalmente por toda a confiança em mim depositada. Suas cobranças sempre vieram acompanhadas de ensinamentos, os quais levarei por toda minha vida;

À **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**, figura sempre presente durante minha formação acadêmica, a quem tenho profunda admiração. Agradeço pela colaboração e coorientação na realização desta pesquisa;

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pelos ensinamentos e por ter participado de toda a minha formação durante a pós-graduação.

À **Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury**, por ter participado ativamente do planejamento e execução deste estudo.

Aos **Profs. Drs. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Livia Maria Andaló Tenuta e Antônio Pedro Ricomini Filho** pelas considerações e contribuições realizadas no exame de qualificação.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2012/02815-9), sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

À aluna de doutorado **Constanza E. Fernandez González**, pela amizade, pelos ensinamentos e pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pela amizade, pela disponibilidade e pela agradável convivência no dia a dia.

Aos **voluntários** desta pesquisa, por sua colaboração, pelo seu compromisso, por não medirem esforços para que pudéssemos obter êxito na realização deste estudo.

Aos amigos **Helenice Inocência Porta e família, Marcelo Azevedo e família, Irlan Almeida, Livia Araújo Alves, Renally Wanderley e Marina Moreno**, pela amizade e por serem minha família em Piracicaba.

À todos que direta, ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem sido observado um declínio de cárie dental, não apenas nos países desenvolvidos (Bratthall et al., 1996) como também nos em desenvolvimento (Cury et al., 2004). Esse fenômeno tem sido atribuído principalmente à utilização de dentifrício fluoretado (Rolla et al., 1991), o qual é considerado o meio mais racional de usar fluoretos, pois associa a desorganização do biofilme dental com o aumento da concentração de fluoreto na cavidade bucal (Cury e Tenuta, 2010).

Os mecanismos pelos quais o fluoreto de creme dental controla cárie dentária foram recentemente revisados (Tenuta e Cury, 2013). Assim, toda vez que os dentes são escovados com dentifrício fluoretado (DF) ocorre um aumento da concentração de F na cavidade bucal. Nas superfícies dentais limpas pela escovação onde há lesões pré-existentes de cárie, o fluoreto presente momentaneamente na saliva poderá ativar a remineralização. Naquelas superfícies não perfeitamente limpas pela escovação, o fluoreto se difunde e é retido no biofilme. Diante da exposição desses residuais de biofilme à açúcar e a conseqüente queda de pH, o fluoreto presente no fluido do biofilme interferirá com o processo de cárie, reduzindo a desmineralização (Des-). Quando o pH volta ao normal, o fluoreto ainda presente no biofilme ativará o fenômeno de remineralização (Re-). Logo, lesões de cárie irão progredir ou se reverter dependendo do equilíbrio Des-Re à que os dentes são submetidos diariamente na cavidade bucal (Cury e Tenuta, 2009). Desta forma, em uma situação clínica de alto desafio cariogênico (Des > Re) o efeito do fluoreto será de reduzir a progressão das lesões de cárie. Por outro lado, em condições de baixo consumo de açúcar (Re > Des) o fluoreto poderá inclusive ativar a reversão de lesões de cárie pré-existentes. Este efeito do fluoreto reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização, pode ser viabilizado pela utilização diária de DF.

Por outro lado, a eficácia anti-cárie do DF é influenciada por diversos fatores, como a concentração de fluoreto (Walsh et al., 2010), o período (Kusano et al., 2011) e frequência de uso (Marinho et al., 2003). Especificamente com relação à frequência de uso, tem sido mostrado que este fator é importante para uma maior eficácia do DF na redução de cárie de esmalte (Marinho et al., 2003). Essa revisão sistemática mostrou evidências que

quando a frequência de escovação aumenta de uma para 2x/dia, a redução de cárie foi 14% mais eficiente. Assim, tem sido recomendado que dentifrício fluoretado deva ser usado 2 vezes ao dia para o melhor controle de cárie de esmalte, entretanto frequências maiores não tem sido testadas.

Em acréscimo, nada é conhecido em relação à importância da frequência de uso de DF no controle da cárie de dentina. Considerando que a dentina é constituída por um mineral mais solúvel que o esmalte (Hoppenbrouwers et al., 1987) e que as lesões de cárie progridem mais rapidamente na dentina que no esmalte (Ogaard et al., 1988), o fluoreto pode não ter o mesmo efeito no controle de cárie de dentina que aquele encontrado para o esmalte. Neste sentido, dentifrício contendo 5.000 ppm F foi mais eficaz do que dentifrício de concentração convencional (1.100 - 1.450 ppm F) na remineralização de lesões de cárie radicular (Baysan et al., 2001; Ekstrand et al., 2013). Logo, é provável que uma maior frequência de uso de dentifrício fluoretado de concentração convencional seja necessária para o controle de cárie de dentina que aquela para o esmalte e isso ainda não foi avaliado.

Assim, o objetivo do presente estudo *in situ* foi avaliar o efeito da frequência de uso de dentifrício fluoretado (0, 1, 2, ou 3x/dia) na redução da desmineralização de blocos de esmalte e de dentina inicialmente hígidos, e na remineralização de blocos desses substratos dentais apresentando lesão inicial de cárie, simulando respectivamente duas situações clínicas de efeito do fluoreto, na redução da progressão de lesões de cárie e na reparação das já existentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie Dentária e fatores etiológicos envolvidos

Cárie é uma doença biofilme-açúcar dependente que provoca uma destruição progressiva e localizada da estrutura mineral dos dentes por ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano quando da exposição frequente à açúcares fermentáveis da dieta (Fejerskov e Kidd, 2008). Assim, a dissolução do mineral dentário só ocorre em superfícies onde há o acúmulo de biofilme (fator necessário) e se houver exposição frequente a carboidratos fermentáveis da dieta (fator determinante negativo). Se o fluoreto estiver presente poderá interferir no desenvolvimento da cárie, sendo considerado um fator determinante positivo (Tenuta e Cury, 2010). Se levarmos em conta a multifatorialidade da doença, fatores sociais e comportamentais (Fejerskov e Manji, 1990) também devem ser considerados.

Dessa forma, a doença cárie ocorre como um desequilíbrio dos processos de perda e ganho de minerais entre o dente e o fluido do biofilme, formando um processo dinâmico decorrente de alterações progressivas do mineral dental que, se não controladas, resultarão na formação de uma lesão ou cavitação clínica (Kidd e Fejerskov, 2004). A cavitação, portanto, é um reflexo ou consequência do processo cariioso, representando uma fase terminal de uma perda mineral crônica, e o seu desenvolvimento é o resultado da atividade metabólica passada ou atual no biofilme bacteriano (Cury e Tenuta, 2009). No entanto, se o biofilme for removido parcialmente ou totalmente, a perda mineral pode ser interrompida e até mesmo revertida pelo processo de remineralização (Kidd e Fejerskov, 2004).

O consumo de frequente de açúcares é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da cárie dental (Moynihan e Kelly, 2013), uma vez que a fermentação desses carboidratos por meio do metabolismo bacteriano irá levar a produção de ácidos orgânicos, resultando em uma redução no pH do meio, com dissolução mineral do esmalte e dentina (Dawes, 2003). Dentre os carboidratos da dieta, a sacarose é considerado o mais cariogênico, devido a sua capacidade de alterar a composição da matriz do biofilme, pois serve de substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares. Estes polissacarídeos

tornam o biofilme mais cariogênico por alterar suas propriedades de permeabilidade e aderência (Dibdin e Shellis, 1988). Neste sentido, Cury et. al.(1997), relataram que o consumo de sacarose em altas frequências está diretamente relacionado com o desenvolvimento de cárie. O estudo in situ contou com 12 voluntários, que utilizaram dispositivos acrílicos durante 28 dias em quatro fases, contendo quatro blocos de esmalte humano. Solução de sacarose 20% foi gotejada 0, 2, 4 e 8 vezes ao dia sobre os blocos. Os resultados mostraram a formação de lesões de mancha branca em dentes expostos a sacarose 4x e 8x/dia, quando comparado ao controle (0x/dia) e 2x/dia. Além disto, o biofilme formado na presença de sacarose 8 vezes ao dia apresentou 3x mais glucanos insolúveis. Em outro estudo in situ, Cury et al. (2000) avaliaram a composição e a cariogenicidade do biofilme formado na presença de sacarose, ou de glicose e frutose. Os autores observaram que o biofilme formado na presença de sacarose foi mais cariogênico que aquele formado na presença de glicose e frutose, resultando em maior perda mineral do esmalte e maior concentração de glucanos insolúveis.

O controle da cárie, assim como qualquer outra doença, deve estar direcionado aos fatores etiológicos envolvidos, no caso, a remoção ou desorganização do biofilme e o aconselhamento dietético. Embora o controle de placa (Axelsson et al., 2004) e o aconselhamento dietético (Feldens et al. 2007, 2010) sejam estratégias efetivas para redução dos índices de cárie sob o ponto de vista individual, o sucesso dessas estratégias a nível populacional tem sido limitado (Duggal e van Loveren, 2001; Nyvad, 2008), o que reforça a utilização do flúor como método mais indicado para controlar cárie (Cury e Tenuta, 2008). Assim, embora o flúor não seja capaz de interferir nos fatores responsáveis pela doença, não sendo capaz de impedir a cárie isoladamente (ten Cate, 1999), ele é extremamente efetivo em reduzir sua progressão, diminuindo quantidade de minerais perdidos quando do fenômeno da desmineralização e aumentando a quantidade repostada quando da remineralização salivar. Para isto, é importante que o flúor esteja presente constantemente no ambiente bucal, na sua forma livre e solúvel, interferindo diretamente nos processos de des-remineralização, sendo efetivo mesmo em baixas concentrações (Cury e Tenuta, 2008).

2.2 Influência do tipo de substrato dental no desenvolvimento da cárie

Embora não seja um fator primário relacionado à etiologia da cárie dentária, tal como o acúmulo de biofilme e a exposição frequente a carboidratos fermentáveis, o tipo de substrato dental, esmalte ou dentina, sobre o qual o processo está ocorrendo pode exercer grande influência no desenvolvimento da lesão. Assim, torna-se importante uma explanação acerca das diferenças existentes entre estes dois substratos dentais, o que é pertinente, uma vez que tem sido demonstrado que as superfícies radiculares são mais vulneráveis à cárie dentária que o esmalte dental, provavelmente devido a sua estrutura e composição química (Nyvad e Fejerskov, 1982).

As lesões de cárie progridem mais rapidamente na dentina que no esmalte (Ogaard et al., 1988). Essas diferenças são devidas ao fato da dentina possuir um pH crítico para desmineralização superior aquele esperado para o esmalte (Hoppenbrouwers et al., 1987), permanecendo por maior período de tempo em dissolução quando em comparação com este tecido (Cury et al., 2011). Além disto, a dentina tem uma maior permeabilidade (ten Cate et al., 1998) e composição inorgânica diferenciada, apresentando cristais menores, mais espaçados (maior área de superfície e reatividade) e com maior conteúdo de carbonato que o esmalte, o que a torna um mineral mais solúvel (Nyvad e Fejerskov, 1982).

Hoppenbrouwers et al.(1986) demonstraram em um estudo in vitro, as diferenças existentes entre a solubilidade do esmalte e da dentina radicular. Para tal, foram utilizados molares humanos que não tiveram suas raízes expostas ao meio bucal, a partir dos quais foram obtidos blocos de esmalte e dentina radicular. Estes blocos foram então introduzidos em recipientes contendo 100 ml de solução tampão desmineralizante (pH 5) que apresentavam diferentes níveis de saturação em relação ao mineral da Hidroxiapatita (HA). O período de armazenamento nessas soluções variou de 3, 5, 7 e 14 dias, a uma temperatura constante de 20°C. Após análise microrradiográfica, os autores observaram que sob as condições experimentais adotadas houve perda mineral superficial na dentina radicular, enquanto no esmalte foram observadas lesões na subsuperfície. Além disto, enquanto os blocos de esmalte sofriam desmineralização apenas quando os valores de produto de atividade iônica da solução eram superiores ao da HA ($IAP_{HA} = 117$), a dentina radicular foi desmineralizada com valores de IAP inferiores ($IAP = 114$) ao do mineral dentário, situação na qual a solução ainda apresentava-se supersaturada em relação à HA,

demonstrando assim, que o mineral da dentina radicular é mais solúvel que o esmalte. Os autores atribuíram as diferenças encontradas na solubilidade ao maior conteúdo de carbonato e magnésio presentes na dentina radicular, assim como às diferenças existentes nos valores de pH crítico para esmalte (5,9-5,2) e dentina (6,8-6,0), uma vez que pequenas variações no pH seriam capazes de levar à desmineralização dos tecidos duros radiculares.

Outra diferença importante existente entre esmalte e dentina diz respeito ao fato das lesões de cárie progredirem de maneiras distintas, dependendo do substrato envolvido. Este comportamento foi demonstrado por Ogaard et al.(1988), que investigaram, in vivo, a desmineralização do esmalte e da dentina radicular em função do tempo, sob acúmulo de biofilme. Neste estudo, foram utilizados dois métodos para o desenvolvimento das lesões cáries. Para a desmineralização do esmalte, bandas ortodônticas foram cimentadas em pré-molares que seriam extraídos para fins de tratamento ortodôntico, permanecendo por 4, 6, ou 8 semanas até que o dente fosse extraído. Na análise de desmineralização das superfícies radiculares, pré-molares previamente extraídos foram montados em um dispositivo palatino removível e cobertos por bandas ortodônticas, deixando uma espessura de 0,8 mm entre os blocos e a banda, para possibilitar o acúmulo de biofilme. A princípio, 6 pacientes utilizaram os dispositivos palatinos por 4 semanas, removendo-os depois de 1, 2, 3, ou 4 semanas. Em um segundo experimento, 5 pacientes utilizaram os dispositivos por 4 semanas. As superfícies radicular e do esmalte foram analisadas por microrradiografia e o volume mineral presente nestes substratos foi estimado densitometricamente, por meio da profundidade da lesão e da perda mineral total (ΔZ). Os resultados demonstraram que os dois métodos utilizados para desenvolver lesões de cárie são equivalentes. Além disto, foi observado que enquanto a desmineralização do esmalte ocorre de maneira linear em função do tempo, a desmineralização da dentina radicular ocorre mais rapidamente na primeira semana, e depois se torna notadamente mais lenta. Por fim, os autores concluíram que a progressão da lesão na dentina radicular é 2,5 vezes mais rápida que no esmalte.

Além dos fatores já elencados, como solubilidade e composição mineral, um outro fator que tem sido utilizado para evidenciar a importância do tipo de substrato no desenvolvimento da cárie dental é o pH. Sabe-se que o pH crítico para a dissolução do esmalte (5,5) é diferente daquele que leva à dissolução da dentina (6,5). Abaixo deste pH,

os fluidos orais (fluido do biofilme e saliva) tornam-se subsaturados em relação ao mineral dentário, sendo, portanto, o limite que determinará se haverá a perda mineral no esmalte ou dentina. Neste sentido, Cury et al. (2011) discutiram o tempo que o pH do biofilme dental permanece abaixo do crítico após a realização de um desafio cariogênico. De acordo com os autores, após uma queda de pH no biofilme dental induzida pelo consumo de carboidratos fermentáveis, o período de tempo que o pH permanece abaixo do crítico para a dissolução do esmalte (15 minutos) é menor que aquele encontrado para a dentina (40 minutos). Em decorrência disto, a perda mineral na dentina se iniciaria antes e se prolongaria por um período de tempo maior, até que haja o tamponamento e o clearance salivar, neutralizando e lavando os ácidos.

2.3 Mecanismo do fluoreto no controle de cárie dentária

Devido à impossibilidade de se controlar totalmente os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie, biofilme (fator necessário) e açúcar (fator determinante negativo) (Duggal e van Loveren, 2001; Nyvad, 2008), medidas relacionadas ao uso de fluoretos são capazes reduzir a progressão de lesões de cárie e reverter aquelas já existentes, tendo um efeito terapêutico sobre este processo (ten Cate, 1999).

A principal ação do flúor no controle da cárie está relacionada à precipitação de minerais perdidos pelo dente, reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização. A diminuição da desmineralização diz respeito à precipitação de minerais na forma de fluorapatita quando a estrutura dental está sendo solubilizada pelo baixo pH gerado no biofilme dental exposto a carboidratos fermentáveis. Quando o desafio cariogênico cessa, ou quando o biofilme é removido pela escovação, o pH do biofilme dental volta a valores normais expondo a estrutura dental à capacidade remineralizadora da saliva. Se o fluoreto estiver presente no meio bucal ele irá promover a reposição de parte dos minerais que foram perdidos, ativando remineralização (Tenuta e Cury, 2010).

Por muito tempo acreditou-se que a ação do flúor sobre o processo carioso era estritamente sistêmica, e que o flúor incorporado ao dente, na forma de fluorapatita, tornaria os dentes menos solúveis à dissolução mineral, e assim, mais resistentes à cárie. No entanto, sabe-se a ingestão de flúor durante o desenvolvimento dos dentes leva a

incorporação de apenas 5% a 10% deste mineral nos cristais presentes na superfície do esmalte, por substituição parcial da hidroxiapatita por fluorapatita (FA). Além disto, foi observado que mesmo nas camadas mais ricas em fluoretos, como os 50 µm mais externos do esmalte, a concentração de flúor não ultrapassa 3.000 ppm, valor muito inferior ao necessário para formar um mineral composto exclusivamente por FA (aproximadamente 38.000 ppm F), que seria de fato um mineral menos solúvel (Fejerskov, 2004; Tenuta e Cury, 2010). Em decorrência disto, há atualmente um consenso na literatura de que o efeito do flúor incorporado ao dente é secundário, e que seu principal efeito se deve ao fluoreto presente localmente, na sua forma livre e solúvel, em concentrações constantes, interferindo na dinâmica do processo cariioso. Para isto, o flúor deve estar presente no lugar certo (fluido do biofilme, saliva) e no momento certo (exposição à sacarose) para interferir nos eventos de desmineralização e remineralização, sendo eficaz até mesmo em baixas concentrações (Cury e Tenuta, 2009).

Esclarecido o fato de que o principal efeito do flúor no controle de cárie é pós-eruptivo, qualquer meio de utilização de flúor, para ser considerado eficaz, deve ser capaz de manter uma concentração de flúor no meio bucal. Diante disto, a água fluoretada e o dentifrício fluoretado destacam-se, respectivamente, como os métodos comunitários e individuais de utilização do flúor mais apropriados para interferir com o processo de cárie (Cury e Tenuta, 2008).

Em relação ao consumo de água fluoretada, tem sido demonstrado (Oliveby et al., 1990) que pessoas que vivem em áreas com fluoretação possuem concentrações maiores de fluoreto na saliva, quando comparadas a indivíduos que não usufruem deste benefício. Este seria um reflexo das concentrações de flúor no plasma sanguíneo, uma vez que o sangue é responsável pela distribuição do flúor absorvido após a ingestão. Contudo, como não há um mecanismo homeostático para a manutenção do flúor no organismo, as concentrações salivares de flúor são dependentes da sua ingestão. Neste sentido, Nobre dos Santos e Cury (1988) demonstraram as mudanças ocorridas nas concentrações de flúor no biofilme dental, quando da interrupção do fornecimento de água fluoretada. Os pesquisadores coletaram o biofilme dental de crianças de 6-8 anos antes da fluoretação ser paralisada (concentração ótima de 0,8 ppm F na água) e também após a interrupção

(redução da concentração de F na água para 0,06 ppm). Após extração ácida (0,5 M de HClO₄) sob agitação, a concentração de fluoreto nas amostras foi determinada por meio de um eletrodo íon específico. Os resultados mostraram que 2 meses após a interrupção a concentração de flúor no biofilme foi significativamente menor (cerca de 20 vezes) do que aquela encontrada antes da paralisação. No entanto, após o reestabelecimento da fluoretação de água no ano seguinte (Cury e Tenuta, 2008), a concentração de flúor no biofilme das crianças retornou aos níveis encontrados anteriormente.

Além da água fluoretada, outros meios de utilização que disponibilizam o fluoreto de maneira constante para a cavidade bucal tem obtido sucesso no controle de cárie. Um exemplo é a utilização de dentifrício fluoretado, apontado como o principal responsável pela fenômeno de redução dos índices de cárie ao redor do mundo (Rolla et al., 1991) e considerado o método mais racional na utilização de fluoretos, por associar a desorganização/remoção mecânica do biofilme à exposição constante ao flúor (Cury e Tenuta, 2008). Sua eficácia clínica no controle da cárie está baseada nos resultados de uma revisão sistemática (Marinho et al., 2003) que evidenciou que a utilização de dentifrício fluoretado representa um efeito cárie-preventivo de 23% em comparação à utilização de dentifrício placebo de flúor.

O efeito do dentifrício fluoretado no controle da cárie dental também tem sido evidenciado por estudos laboratoriais. Queiroz et al. (2008), compararam *in vitro* o efeito anti-cárie de 4 dentifrícios, um placebo de flúor, um com baixa concentração de flúor (500 µg F/g) e dois com 1.100 µg F/g (um controle ativo e um controle positivo). Os resultados demonstram que todos os DF reduziram significativamente a desmineralização do esmalte, quando comparados ao controle negativo, sendo os DF com 1.100 µg F/g mais eficazes que os de 500 µg F/g. De maneira semelhante, os DF obtiveram melhores resultados que o dentifrício placebo na ativação da remineralização, mas a resposta do DF com 500 µg F/g foi menor. Além disto, foi observado efeito dose-resposta com relação à concentração de F, tanto na redução da desmineralização como na remineralização do esmalte. Em outro estudo, Nobre dos Santos et al., (1998) verificaram a capacidade do creme dental fluoretado convencional (1.100 ppm F, com NaF) em remineralizar lesões de cárie artificial em esmalte dental humano. Para tal, durante 45 dias os voluntários utilizaram dispositivos

palatinos acrílicos, nos quais os blocos eram protegidos com tela plástica para acúmulo de biofilme. Os blocos que receberam DF apresentaram 73% de remineralização e menor extensão da cárie em relação ao dentifrício sem flúor, que apresentaram 43% de remineralização. Diante disto, os autores concluíram que o flúor do dentifrício dobrou a capacidade de reposição mineral da saliva.

A comparação do efeito anticárie do fluoreto em esmalte e dentina também tem despertado o interesse da comunidade científica, uma vez que este íon parece ser menos eficiente para interferir com cárie de dentina que a cárie de esmalte, necessitando de uma maior quantidade de flúor para inibição de sua desmineralização (Herkstroter et al., 1991). Neste sentido, alguns estudos têm mostrado diferenças no efeito do fluoreto em esmalte e dentina. Featherstone et al. (1983) observaram em um modelo de ciclagens de pH, que uma concentração 10 vezes maior de F na solução de tratamento é necessária para produzir na dentina resultados comparáveis com o esmalte na ativação da remineralização. Em outro estudo, Herkströter et al. (1991) estudaram o efeito do fluoreto na perda mineral de esmalte e dentina, por meio de um modelo de ciclagens de pH. O fluoreto foi acrescentado na solução desmineralizante em concentrações de 0; 0,02; 0,2 e 2 ppm F, sendo os espécimes expostos por 8 h a esta solução, e posteriormente mais 16 h em solução remineralizante. Mediante análise por microradiografia longitudinal, foi demonstrado que a taxa de desmineralização foi significativamente reduzida nas amostras onde o fluoreto foi adicionado a solução desmineralizante, tanto em esmalte, como em dentina. Os autores concluíram que o efeito do fluoreto é mais pronunciado no esmalte, sendo capaz de reduzir significativamente a desmineralização na presença de 2 ppm F, e que esta mesma concentração, no caso da dentina, não foi capaz de impedir a perda mineral, sugerindo a necessidade de maiores quantidades de fluoreto para interferir no processo de cárie neste tecido.

O efeito de produtos fluoretados (bochechos, géis e vernizes) utilizados de maneira isolada ou combinada ao DF no controle da cárie de esmalte foi alvo de uma revisão sistemática desenvolvida por Marinho et al., (2004). Este estudo mostrou evidências de que a associação desses produtos com o dentifrício fluoretado (DF) resulta em uma modesta redução de cárie em esmalte (10%), não significativa quando comparada a

utilização de DF de forma isolada. Este resultado para o esmalte foi confirmado por um estudo experimental controlado, o qual não encontrou efeito da combinação da aplicação profissional de flúor nos dentes e uso de DF pelos voluntários (Paes Leme et al., 2004). Entretanto, usando o mesmo protocolo experimental foi mostrado que para dentina radicular esta combinação foi mais eficaz que o efeito dos meios isolados (Vale et al., 2011). Nesses dois estudos os voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte (Paes Leme et al., 2004) ou dentina radicular (Vale et al., 2011) em 4 fases, sob condições de acúmulo de biofilme e exposições frequentes a solução de sacarose 20% (4 ou 8x/dia no primeiro estudo e 8x/dia no segundo). Em ambos os estudos os voluntários foram divididos em quatro grupos de tratamento: Dentifrício placebo (DP), dentifrício fluoretado (1.100 ppm F, NaF/SiO₂), FFA (1,23% F) + DP e FFA + DF. A aplicação profissional de FFA gel era realizada antes de cada fase experimental, e os dentifrícios fluoretados foram utilizados 3x/dia, após as principais refeições. Após as análises de desmineralização e F no biofilme, os dois estudos apontaram resultados diferentes para esmalte e para dentina. Enquanto no primeiro foi demonstrado que a associação de DF + FFA não foi mais efetiva do que a utilização de DF isoladamente em esmalte, o segundo trabalho mostrou que esta combinação de métodos de uso é benéfica para a dentina, promovendo efeito adicional à utilização de DF de maneira isolada, sendo o efeito sinérgico demonstrado pelo aumento da disponibilidade de F no fluido do biofilme e redução da desmineralização da dentina radicular. Diante disto, os autores sugerem que em dentina são necessárias maiores concentrações, ou maiores frequências de uso de dentifrício fluoretado (1.000 – 1.500 ppm F) para o controle de cárie.

Diante do exposto, pode-se concluir que o importante em termos de controle da cárie dental é manter o fluoreto constantemente na cavidade bucal, pois independente do método de utilização, o mecanismo de ação será sempre o mesmo, ou seja, local (Tenuta e Cury, 2010). Além disto, observa-se que efeito do fluoreto no controle de cárie de dentina é diferente daquele esperado para o esmalte, o que pode implicar na necessidade de diferentes concentrações, ou frequências de exposição ao flúor.

2.4 Efeito do dentifrício fluoretado no controle da cárie e mecanismos de ação

A utilização frequente de dentifrícios fluoretados tem mostrado eficiência no controle da cárie dentária (Marinho et al., 2003), devido à disponibilização de F na cavidade bucal, sendo capaz de interferir nos fenômenos de des-remineralização na interface dente-biofilme, além de promover a desorganização do biofilme dental, considerado um fator necessário para o desenvolvimento da cárie (Cury e Tenuta, 2008).

Embora a principal proposta da escovação dental seja a remoção mecânica do biofilme, o principal efeito anticárie do dentifrício fluoretado tem sido atribuído ao efeito físico-químico do fluoreto na redução da desmineralização e ativação da remineralização (ten Cate, 1999). Após a escovação, o fluoreto é distribuído pela saliva, difunde-se para remanescentes de biofilme e potencialmente pode reagir com a superfície dental, especialmente naquelas superfícies com lesões pré-existentes (Ekstrand e Oliveby, 1999). Em cada um destes sítios o fluoreto poderá agir positivamente no equilíbrio mineral, reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização. A redução da desmineralização poderia se dar pela retenção de fluoreto em residuais de biofilme em superfícies não perfeitamente limpas pela escovação. Diante de uma queda do pH, induzida pela exposição a açúcares fermentáveis, o fluoreto presente no fluido do biofilme interferirá com o processo de cárie, reduzindo a desmineralização (Des-). Quando o pH volta ao normal, o fluoreto ainda presente no biofilme ativará o fenômeno de remineralização (Re-). Por outro lado, nas superfícies dentais limpas pela escovação, especialmente aquelas com lesões de cárie pré-existentes, o fluoreto presente na saliva terá efeito direto na ativação da remineralização (Tenuta e Cury, 2013).

Neste sentido, Tenuta et al. (2009) utilizaram um modelo *in situ* de curta duração para avaliar o mecanismo de ação de dentifrício fluoretado (DF) na desmineralização do esmalte. Para tal, foram conduzidos dois experimentos diferentes. No primeiro, foi avaliado o efeito da pré-formação de depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície do esmalte, enquanto que no segundo, observou-se o efeito do flúor retido no biofilme após escovação com DF e sua associação com o CaF_2 pré-formado. Os resultados demonstraram que apenas uma pequena quantidade de CaF_2 pode ser depositado sobre as superfícies limpas após a escovação com DF, e que o papel desses reservatórios durante os eventos desmineralizatórios tem pouca significância, sugerindo que o enriquecimento do

biofilme não removido durante a escovação com fluoretos é o principal responsável pelo efeito anticárie do DF.

No entanto, a eficácia anti-cárie do DF pode sofrer influência de alguns fatores, tais como a concentração de fluoreto (Walsh et al., 2010), o período (Kusano et al., 2011) e frequência de uso (Marinho et al., 2003). No que diz respeito à concentração de F, recente revisão sistemática da literatura (Walsh et al., 2010) mostrou evidências de que existe uma forte relação dose-resposta entre o aumento da concentração de fluoreto no dentifrício e a sua eficácia clínica. Foi comparado o uso de DF com grupos placebo de fluoreto, ou cremes dentais de diferentes concentrações de flúor em crianças e adolescentes de até 16 anos de idade. Para esta revisão, foram utilizados 66 ensaios clínicos randomizados que tiveram pelo menos um ano de acompanhamento. Após analisar os estudos, os autores relataram que o efeito cárie-preventivo do dentifrício aumentou significativamente com maiores concentrações de flúor. O efeito preventivo do DF quando comparado com o placebo (sem flúor) foi na fração de 23% para as concentrações de 1.000/1.055/1.100/1.250 partes por milhão (ppm); e 36% para cremes dentais com concentração de 2.400/2.500/2.800 ppm F. Concentrações menores (440, 500, 550 ppm F) não apresentaram diferença estatisticamente significativa do placebo. Por conseguinte, constatou-se a existência de evidência científica na literatura comprovando os benefícios da utilização de DF em comparação à sua não utilização, sendo recomendadas concentrações acima de 1.000 ppm F.

Kusano et al. (2011) estudaram, *in situ*, a influência do período de escovação com DF convencional (1,100 µg F/g, NaF/SiO₂) na desmineralização de esmalte e dentina, sob acúmulo de biofilme e 8 exposições diárias à solução de sacarose 20%. Os resultados demonstraram que a escovação à noite, para remineralizar as perdas minerais diárias foi mais efetiva que a escovação matinal, para inibir os episódios desmineralizantes. Além disto, a utilização do DF (1x/dia) foi capaz de reduzir a desmineralização tanto em esmalte, quanto em dentina, quando comparado ao grupo controle, que utilizou dentifrício placebo de fluoreto. No entanto, o DF teve um efeito mais pronunciado na redução da perda mineral do esmalte do que em dentina.

Além dos dois fatores já citados, o efeito anticárie do creme dental fluoretado é fortemente influenciado pela frequência de escovação. Marinho et al. (2003) em uma revisão sistemática da literatura, abordando 74 estudos randomizados, controlados e com avaliação cega do desfecho, analisaram a eficácia do creme dental fluoretado na prevenção da cárie dentária em crianças e adolescentes de até 16 anos de idade, em comparação com o grupo placebo de fluoreto. Os resultados demonstram um aumento de 14% no efeito preventivo do dentifrício quando a frequência de escovação aumentou de uma vez ao dia para duas vezes ao dia.

Semelhantemente, Ellwood et al. (2008) recomendam que a escovação seja realizada pelo menos 2 vezes ao dia, sendo uma durante o dia, preferencialmente na hora de uma refeição e a outra a noite, antes de dormir, para aumentar a efetividade do flúor no controle da cárie, pela manutenção de níveis elevados de fluoreto na boca durante o dia. Twetman et al. (2009) revisaram a literatura publicada nas bases de dados PubMed e Cochrane entre os anos de 2002 e 2008 sobre o tema creme dental fluoretado. Após minuciosa análise crítica a respeito da metodologia adotada, apenas 15 dos 179 artigos encontrados preencheram os critérios de inclusão pré-determinados. Os autores concluíram que existem fortes evidências que o uso diário do dentifrício fluoretado tem um efeito cárie-preventivo significativo nas crianças em comparação com o placebo (efeito preventivo de 24%). Tal efeito foi impulsionado pela escovação dental supervisionada, utilização de uma concentração de creme dental fluoretado de 1.500 ppm F e aumento da frequência de escovação de uma para duas vezes ao dia. No entanto, há carência de estudos controlados avaliando a importância de frequências maiores que 2x/dia da escovação com dentifrício fluoretado para o controle de cárie de esmalte e nada há sobre esse efeito para o controle da cárie de dentina.

Assim, se justifica a realização do presente trabalho quer seja pelo conhecimento limitado sobre a importância da frequência da escovação com dentifrício fluoretado para o controle da cárie coronária (esmalte), relevante para crianças e adultos, como para o controle da cárie radicular (dentina), importante para adultos e idosos.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar in situ o efeito da frequência de uso de dentifrício fluoretado (0, 1, 2, ou 3x/dia) na redução da desmineralização e ativação da remineralização do esmalte e da dentina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas e seleção dos voluntários

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, protocolo 104/2009 (Anexo 1). A importância, objetivos, riscos e benefícios do estudo foram explicitados aos voluntários e aqueles que concordaram em participar da pesquisa o fizeram mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Na seleção dos voluntários os critérios de inclusão foram: taxa de fluxo salivar normal; bom estado de saúde geral e bucal; capacidade de cumprir com o protocolo experimental proposto; não ter feito uso de antibióticos pelo menos 2 meses antes do estudo; não utilizar aparelho ortodôntico fixo ou removível. Dos 20 voluntários selecionados, dezoito completaram o estudo. Dois voluntários foram excluídos por não terem cumprido o protocolo experimental proposto. Todos os participantes desse trabalho residiam em Piracicaba, cidade tendo água fluoretada na concentração ótima de 0,7 mg F/L (na faixa de 0,6-0,8 mg F/L. O fluxo salivar médio não estimulado e estimulado dos voluntários foi de $0,65 \pm 0,28$ mL/min e $1,76 \pm 0,77$ mL/min, respectivamente, e o CPO-D médio foi de $3,33 \pm 4,09$.

4.2 Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo in situ, cruzado, duplo cego, realizado em quatro fases de 14 dias cada, durante as quais 18 voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo 8 blocos dentais bovinos, 4 de esmalte e 4 de dentina, sendo 2 hígidos e 2 com lesão de cárie, cujas durezas de superfície foram pré-determinadas. De um lado do aparelho foram colocados, em posições alternadas, os 4 blocos hígidos de esmalte e de dentina, e do outro lado os cariados (Figura 1A). Os blocos hígidos e o biofilme formado sobre eles foram expostos 8x/dia a sacarose a 20%, enquanto que os cariados foram submetidos à frequência de 3x/dia (Figura 1B), simulando situações de alto e baixo desafio cariogênico. Em cada fase, os voluntários utilizaram dentifrício fluoretado (DF) contendo 1.100 ppm F (NaF/SiO₂) de 0 à 3x/dia, submetendo os blocos dentais a um dos seguintes tratamentos:

1 = Escovação com dentifrício placebo de fluoreto (DP) 3x/dia;

2 = Escovação com DF 1x/dia à noite e 2 escovações com DP;

3 = Escovação com DF 2x/dia, pela manhã e à noite, e uma escovação com DP;

4 = Escovação com DF 3x/dia.

As escovações foram feitas 3x/dia, de manhã antes da primeira exposição à sacarose, após o almoço e a noite após a última exposição à sacarose. Os dentífrícios placebo e fluoretado eram idênticos em termos de cor e sabor, e estavam embalados em bisnagas que foram codificadas pelo horário de uso do dentífrícios, manhã, almoço e noite. Logo os voluntários não sabiam qual dos dentífrícios eles estavam usando tornando o estudo cego. O tipo e sequência de tratamentos feitos pelos voluntários em cada fase foram aleatorizadas. Assim, em cada fase todos os tratamentos estavam sendo feitos por grupos de voluntários e ao final do experimento todos os voluntários fizeram todos os tratamentos (Figura 2).

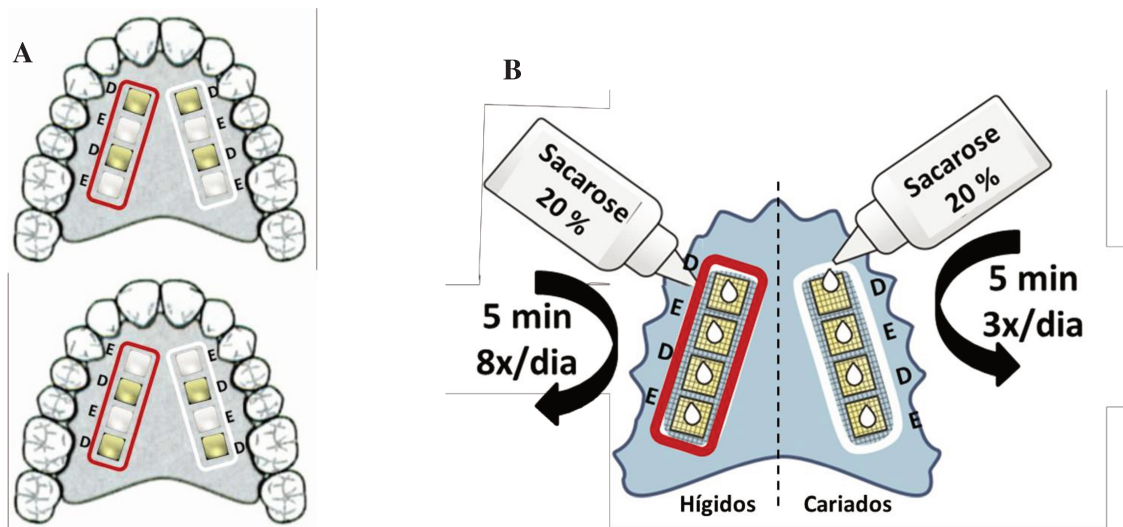


Figura 1. Diagrama da distribuição dos blocos de esmalte (E) e dentina (D) no dispositivo palatino (A) e da frequência de exposição à sacarose (B). Os blocos de esmalte e de dentina hígidos foram colocados do lado direito do aparelho em posições alternadas e expostos à sacarose 8x/dia. Os blocos com lesão de cárie foram colocados do lado esquerdo e expostos à sacarose 3x/dia. A alternância dos blocos começando da região anterior para posterior com E ou D foi prefixada para cada voluntário.

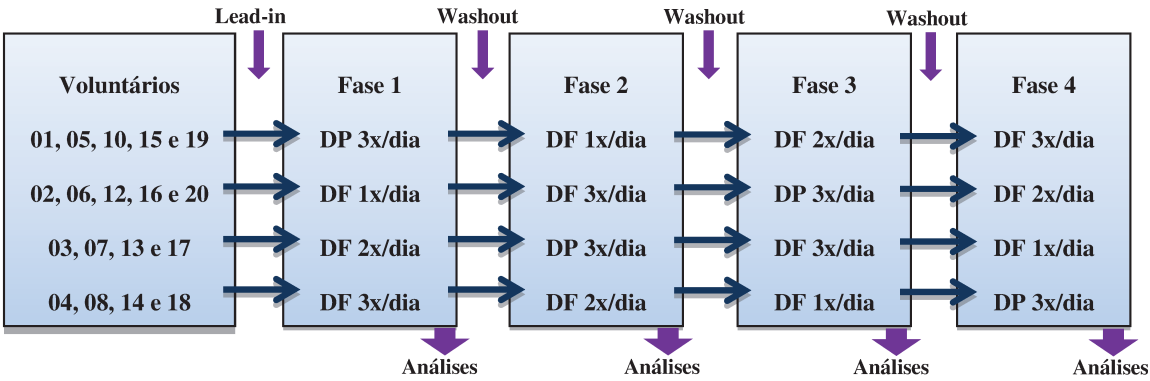


Figura 2. Fluxograma da frequência dos tratamentos com dentifrícios feitos por grupos de voluntários em cada fase (DP = Dentifrício placebo de F e DF = fluoretado). Os voluntários 9 e 11 foram excluídos do estudo por não conseguirem cumprir com o protocolo experimental proposto.

Antes do início do experimento e entre as fases foi obedecido um período mínimo de 3 dias de washout, no qual os voluntários utilizaram o dentifrício placebo de fluoreto. Esse tempo de washout foi determinado através de um estudo piloto, o qual mostrou que 2 dias após a interrupção da utilização de DF a concentração de F na saliva coletada em jejum retorna aos valores iniciais (dados não publicados). No 14^o dia de cada fase o biofilme formado sobre os blocos de esmalte e de dentina, hígidos ou cariados, foi coletado separadamente para análise da concentração de íon flúor. As coletas foram realizadas pela manhã, com os voluntários em jejum, cerca de 10h após a última escovação. Todos os blocos foram removidos do dispositivo para a avaliação da desmineralização ou remineralização ocorridas e determinação da concentração de fluoreto. O efeito dos tratamentos na desmineralização foi avaliado nos 2 blocos hígidos de esmalte e dentina por porcentagem de perda de dureza de superfície. O efeito dos dentifrícios na remineralização foi avaliado nos 2 blocos cariados de esmalte e dentina pelo cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície. Após determinação da dureza foi determinada nos blocos dentais a concentração de flúor solúvel em álcali. Para a avaliação estatística a média dos 2 blocos de esmalte e dentina, inicialmente hígidos ou cariados de cada voluntário foi considerada unidade experimental (n=18). O efeito da frequência de uso de DF para cada substrato dental e sua condição inicial foi avaliado estatisticamente por análise de regressão linear e o efeito dos tratamentos foi avaliado por análise de variância.

4.3 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina radicular e Confecção dos dispositivos palatinos

Foram confeccionados blocos de esmalte e dentina radicular, utilizando-se incisivos bovinos, os quais permaneceram armazenados em solução de formol a 2%, pH 7,0 por pelo menos 30 dias antes do corte (Cury et al., 1997). Os dentes foram seccionados na porção cervical, separando coroa e raiz, em uma máquina de corte Isomet (Buehler), utilizando-se um disco diamantado (Buehler). As coroas e as raízes foram posteriormente seccionadas obtendo-se blocos de esmalte e dentina radicular com dimensões de 4 x 4 x 2 mm (Hara et al., 2003). Os blocos foram lixados e polidos, por meio de uma máquina politriz AROTEC APL-4, com lixa de granulação de 600 a 1200 seguida por discos de feltro e suspensão diamantada, deixando a porção central da superfície plana. Entre uma lixa e outra os blocos foram lavados em ultra-som (T7, Thornton), durante 2 min, utilizando água destilada e deionizada, e ao final com solução detergente.

Com o intuito de selecionar blocos dentais com valores de microdureza Knoop de superfície padronizados e determinar a dureza inicial dos blocos de esmalte e dentina, 3 endentações paralelas foram realizadas próximas à região central de cada bloco, utilizando um microdurômetro (Future-Tech FM hardness tester, acoplado ao software FM-ARS 900) e penetrador tipo Knoop, carga de 50 g para esmalte e 5 para dentina, mantendo-se 100 µm de distância entre cada endentação. Antes das medições de microdureza na dentina, os blocos foram deixados à temperatura ambiente, por pelo menos 30 minutos, a fim de minimizar a interferência da desidratação durante a mensuração (Vale et al., 2011). Os critérios de seleção foram baseados na média e desvio padrão da microdureza de cada bloco, bem como na média geral da microdureza determinada para todos os blocos. Assim, primeiramente foram excluídos do experimento blocos que apresentavam variabilidade entre as endentações maior ou menor do que 10% (variabilidade intra blocos). Em seguida, aqueles que apresentavam variabilidade dos valores de microdureza maior ou menor do que 10% da média de microdureza calculada para todos os blocos (variabilidade entre blocos) foram também excluídos. Deste modo, dos 545 blocos de esmalte confeccionados 433 foram selecionados pelos critérios descritos acima e dos 667 blocos de dentina, 369 foram incluídos. Deste total, 144 blocos de cada substrato foram utilizados hígidos no experimento para avaliar o efeito da redução da desmineralização pelos dentifrícios. A média de microdureza desses blocos foi de $328,9 \pm 15,7 \text{ kg/mm}^2$ e $35,8 \pm 2,8 \text{ kg/mm}^2$ para

esmalte e dentina, respectivamente. Esses blocos foram ordenados em valores crescentes de dureza de superfície e então foi realizado o sorteio dos tratamentos a que cada bloco seria exposto utilizando-se a ferramenta números aleatórios do Excel. Lesão de cárie foi provocada nos 289 blocos de esmalte e nos 225 de dentina restantes para avaliar o efeito da frequência do dentifício fluoretado na remineralização dental.

4.4 Indução de lesão de cárie no esmalte e dentina

Seguindo o protocolo de Queiroz et al., (2008), os 289 blocos de esmalte foram imersos por 16 h a 37 °C, sem agitação, em tampão acetato 0,05 mol/L, pH 5,0 contendo 1,28 mmol/L Ca, 0,74 mmol/L Pi e 0,03 µg F/mL, na proporção de 2 ml de solução/mm² de área de esmalte. Esse procedimento induz no esmalte uma lesão de cárie subsuperficial.

Para a indução de lesão de cárie na dentina, os 225 blocos foram inicialmente tratados com saliva artificial (1,5 mM Ca, 0,9 mM P, 150 mM KCl e 0,1 M de tampão Tris, pH 7) por 24 h, mantidos em estufa a 37°C, sem agitação (Hara et al., 2004). Este pré-tratamento objetivou minimizar a variabilidade dos blocos em relação ao desenvolvimento de lesão de cárie. Em seguida, os blocos foram imersos por 16 horas, a temperatura de 37 °C, sem agitação, em uma solução composta por 0,05 mol/L de tampão acetato, pH 5, 1,4 mmol/L Ca, 0,91 mmol/L Pi e 0,06 µg F/mL, na proporção de 2 ml de solução/mm² de área de dentina (Queiroz, 2004).

A análise de dureza de superfície dos blocos de esmalte e dentina cariados foi repetida, realizando-se uma nova linha de 3 endentações 100 µm abaixo daquelas iniciais, com carga de 25 g para esmalte e 5 g para dentina. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS). Foram selecionados 144 blocos de cada substrato cariado, com valores de %PDS de 77,4 ± 5,0 para o esmalte cariado e 76,0 ± 2,7 para a dentina cariada. Esses blocos foram ordenados em número crescente de %PDS e aleatorizados como descrito para o esmalte.

4.5 Confeção dos dispositivos palatinos

Foram confeccionados 36 dispositivos palatinos intra-orais em resina acrílica (dois para cada voluntário), de tal forma que enquanto um estava sendo utilizado, o outro já

estava preparado para a próxima fase. Em cada dispositivo foram feitas oito cavidades (quatro de cada lado) com uma extensão de 5x5x4 mm, que serviram de sítio para os blocos. A disposição dos blocos nessas cavidades foi fixada para cada voluntário (figura 1A) e mantida por todo o experimento, sendo colocados 4 blocos hígidos de um lado do dispositivo (dois de esmalte e dois de dentina) e 4 blocos cariados do outro (dois de esmalte e dois de dentina). Para 9 voluntários a sequência anteroposterior dos blocos foi E-D-E-D e para os demais D-E-D-E. Sobre a resina acrílica ao redor dos blocos foi fixada uma tela plástica, deixando-se um espaço de 1 mm entre o bloco e a tela plástica que o recobre para proteger a superfície da atrição mecânica, assim como permitir o acúmulo de biofilme (Hara et al., 2003). Para facilitar a identificação dos blocos que deveriam ser expostos à sacarose 8 ou 3x/dia, foi utilizada uma resina colorida para a fixação da tela no lado onde estavam os blocos hígidos. A cada fase do estudo, novos blocos de esmalte e dentina foram posicionados nas cavidades.

4.6 Tratamentos e instruções aos voluntários

Para simulação de uma alto desafio cariogênico, os blocos de esmalte e dentina hígidos foram tratados 8 vezes ao dia com solução de sacarose a 20% (às 8:00, 9:00, 10:00, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, e 19:00 h), enquanto os blocos de esmalte e dentina cariados foram expostos à sacarose 3 vezes ao dia (8:00, 14:00 e 19:00 h), simulando um baixo desafio cariogênico (Cury et al., 1997, 2001; Ccahuana-Vásquez et al., 2007). O aparelho palatino era removido da cavidade bucal, o excesso de saliva sobre os blocos era eliminado com gaze e uma gota da solução de sacarose era gotejada sobre cada bloco. Após 5 min, o aparelho era reinsertado na cavidade bucal.

O dentifrício fluoretado e seu de placebo de flúor foram formulados pela Colgate-Palmolive e se diferenciavam apenas quanto a adição ou não de NaF. Eles foram embalados em bisnagas não identificadas, sendo codificadas pelos pesquisadores quanto ao período de uso (manhã, almoço e noite) para que os voluntários não soubessem qual dentifrício estava sendo usado. Como consequência, em cada fase os voluntários utilizaram dentifrício fluoretado nas frequências de 0 à 3x/dia, seguindo um dos seguintes tratamentos: 1) Escovação com dentifrício placebo de flúor (DP) 3x/dia; 2) Escovação com DF (1.100 µg

F/g) 1x/dia e com DP 2x/dia; 3) Escovação com DF 2x/dia e 1x/dia com DP e 4) Escovação com DF 3x/dia.

Os voluntários receberam recomendações verbais e escritas, tais como: o dispositivo deveria ser diariamente utilizado inclusive para dormir, removendo apenas durante as refeições e mantendo em ambiente úmido; a escovação deveria ser feita somente com o dentifrício fornecido pelos pesquisadores. Para tal, depois de os voluntários realizarem a escovação habitual dos seus dentes, eles escovaram os aparelhos. Entretanto, depois de escovarem a porção interna do dispositivo, eles foram orientados para apenas espalharem com a escova a espuma do dentifrício sobre os blocos dentais. Esses não foram escovados para evitar a remoção do biofilme. Não houve restrição quanto à dieta dos voluntários considerando-se o delineamento cruzado deste estudo, mas os mesmos foram instruídos a evitar alimentos com alto teor de fluoreto biodisponível, como o chá preto. Também foram orientados para não usar enxaguantes bucais durante o estudo.

4.7 Coleta e análise do biofilme

No 14^o dia de cada fase, de manhã, aproximadamente 10 h após a última escovação, o biofilme formado sobre cada bloco de esmalte e de dentina, hígidos ou cariados foi coletado com uma espátula plástica, que foi imediatamente imersa em uma ponteira com óleo mineral, para evitar o ressecamento. A ponteira contendo a amostra foi pesada para determinação do peso do biofilme coletado. Após a pesagem, a ponteira foi centrifugada por 5 min (21.000 g) a 4 °C e o fluido do biofilme foi coletado com auxílio de micropipetas de vidro sob microscópio (Tenuta et al., 2006).

As amostras do fluido do biofilme foram aplicadas na superfície de um eletrodo específico para o íon fluoreto (Orion 94-09), adaptado para microanálise (Vogel et al., 1997) e em seguida tamponadas com TISAB III (total ionic strength adjustment buffer) na proporção de 10 partes de amostra para 1 de TISAB III, sob microscópio. Um microeletrodo de referência foi colocado em contato com cada uma das amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da diferença de potencial (Δ mV) entre a amostra e a solução no interior do eletrodo. Posteriormente, foi calculada a concentração de flúor por

meio de regressão linear da curva de calibração, uma vez que a diferença de potencial é função inversa do logaritmo da concentração de flúor na solução.

4.8 Determinação da desmineralização e remineralização do esmalte e dentina

Ao final de cada fase experimental os 4 blocos de esmalte (2 hígidos e 2 cariados) e os 4 de dentina radicular (2 hígidos e 2 cariados) foram removidos do dispositivo, limpos, secos e a dureza de superfície foi novamente determinada, como descrito no item 4.3. Três endentações distantes 100 µm de cada foram feitas na parte central dos blocos e a média da %PDS ou %RDS dos dois blocos de cada condição foi calculada para análise estatística, de acordo com as fórmulas:

$$\% \text{ PDS} = \frac{\text{microdureza inicial} - \text{microdureza após o experimento}}{\text{microdureza inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ RDS} = \frac{\text{microdureza após tratamento} - \text{microdureza após lesão de cárie artificial}}{(\text{microdureza inicial} - \text{microdureza após lesão de cárie artificial})} \times 100$$

A dureza de superfície tem sido amplamente utilizada em pesquisa como um indicador substituto de cárie (Zero, 1995), para avaliar não só a redução da desmineralização do esmalte (Cury et al., 2000) como da dentina (Vale et al., 2011). Também, ela tem sido usada para avaliar a remineralização de lesões iniciais de cárie tendo em vista existir uma boa correlação (0.94) com a área de lesão remineralizada quantificada por TMR (White, 1987).

4.9 Determinação do F solúvel em álcali

Após a análise de dureza de superfície, os 2 blocos de esmalte e de dentina, hígidos ou cariados foram seccionados longitudinalmente através de um corte passando pelo centro do bloco. As dimensões de um desses hemi-blocos foram medidas utilizando-se um paquímetro digital ($\pm 0,01$ mm) e suas superfícies isoladas com cera 7, com exceção da superfície onde se formou biofilme e que sofreu efeito dos tratamentos. Os hemi-blocos foram imersos em 0,3 mL de KOH 1 M e permaneceram 24 h sob agitação (120 rpm), à temperatura ambiente (Caslavská et al., 1975). Após este tempo, as amostras foram tamponadas com o mesmo volume de HCl 1 M. A concentração de F na solução extraída

foi determinada com eletrodo íon-específico (Orion 96-09, Boston, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-940, Boston, USA), previamente calibrado com soluções padrão de F preparadas nas mesmas condições da amostra. A média da concentração de flúor nos 2 hemi-blocos foi calculada e os dados expressos em $\mu\text{g F/cm}^2$ ($n = 18$).

4.10 Análise Estatística

Os dados de esmalte dentina, hígidos ou cariados, foram analisados de forma independente. Para a avaliação estatística a média dos 2 blocos de esmalte e dentina, inicialmente hígidos ou cariados de cada voluntário foi considerada unidade experimental ($n=18$). Para estimar o efeito da frequência de uso de dentifício fluoretado para cada substrato dental, foi realizada análise de regressão linear. O efeito dos tratamentos também foi avaliado por meio de análise de variância. As pressuposições de equidade de variâncias e distribuição normal dos erros foram checadas considerando-se as variáveis de resposta e os dados que não satisfizeram as pressuposições foram transformados. Todas as análises foram executadas com auxílio do software SAS/LAB (versão 9.0; instituto SAS, Cary, N.C., USA), com nível de significância estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Para o esmalte

Efeito na desmineralização e remineralização

A análise de regressão dos dados de dureza mostrou um ajuste linear significativo entre a frequência de uso de DF e a %PDS do esmalte inicialmente hígido ($p = 0,0069$). Esta relação (Figura 3) também foi observada no efeito da frequência de uso de DF na %RDS do esmalte inicialmente cariado ($p = 0,0003$).

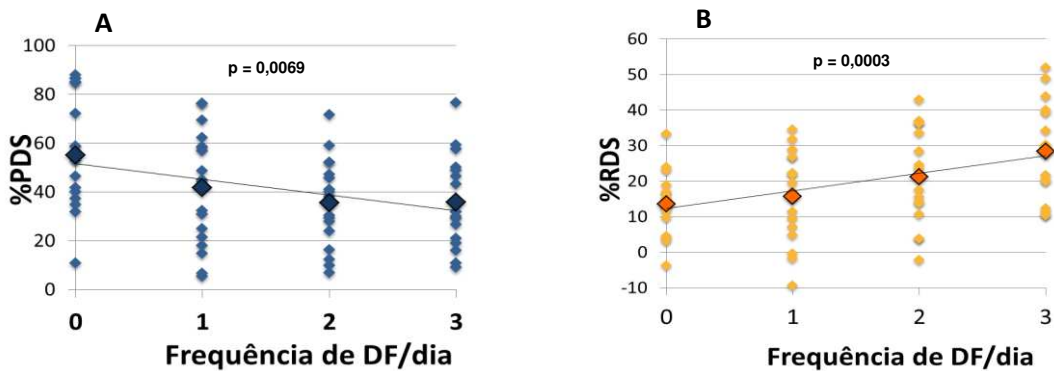


Figura 3. Relação entre porcentagem de perda (%PDS) (A) e recuperação de dureza de superfície (%RDS) (B) do esmalte em função da frequência de uso de dentifrício fluoretado (DF). A significância estatística para as associações está descrita nos gráficos.

Análise de Variância (ANOVA) dos dados mostrou um efeito estatisticamente significativo para a frequência de uso do dentifrício fluoretado, tanto para %PDS ($p = 0,0043$) como para %RDS ($p = 0,0114$).

Concentração de F no fluido do biofilme:

Os resultados da análise de regressão linear mostraram uma relação significativa ($p = 0,0252$) entre a frequência de uso de DF e a concentração de F no fluido do biofilme para o substrato esmalte hígido, porém ANOVA não mostrou haver efeito dos tratamentos ($p = 0,3103$).

Concentração de F solúvel em álcali:

A concentração de flúor solúvel em álcali encontrada no esmalte variou em função direta da frequência de uso do dentifrício fluoretado (Figura 4), sendo a associação significativa para o esmalte inicialmente hígido ($p = 0,0001$) e para o cariado ($p = 0,0002$). Dados de ANOVA mostraram um efeito estatisticamente significativo dos tratamentos tanto para o esmalte hígido ($p < 0,0001$) como para o cariado ($p < 0,0001$).

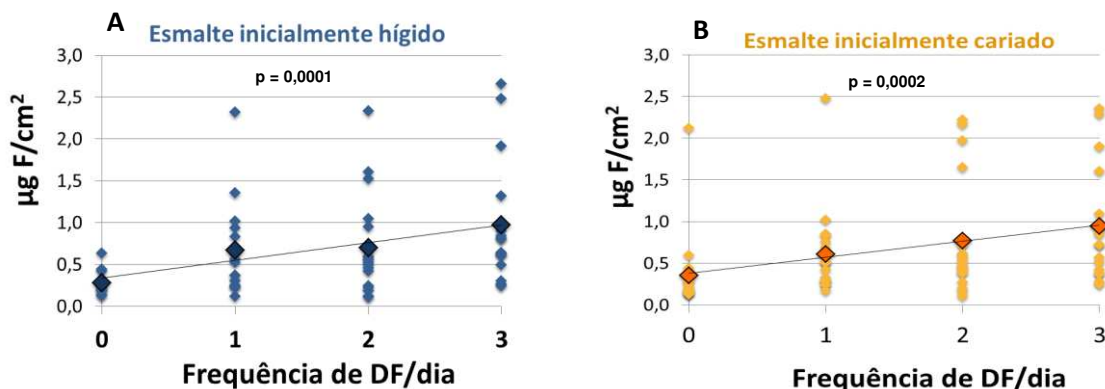


Figura 4. Concentração de flúor solúvel em álcali ($\mu\text{g F/cm}^2$) no esmalte inicialmente hígido* (A); e com lesão de cárie** (B) em função da frequência de uso de dentifrício fluoretado (DF). A significância estatística para as associações está descrita nos gráficos. Os dados foram transformados em \log_{10} .

*Blocos expostos à acúmulo de biofilme e 8 desafios cariogênicos diários; **Blocos expostos à acúmulo de biofilme e 3 desafios cariogênicos diários.

5.2 Para a dentina

Efeito da frequência de uso de DF na desmineralização e remineralização da dentina

Os dados da análise de regressão linear mostraram que a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) da dentina inicialmente hígida foi função inversa ($p = 0,0002$) da frequência de uso de dentifrício fluoretado. No entanto, quanto à remineralização da dentina inicialmente cariada, não foi encontrada associação significativa ($p = 0,1536$) com a frequência de uso de DF (Figura 5).

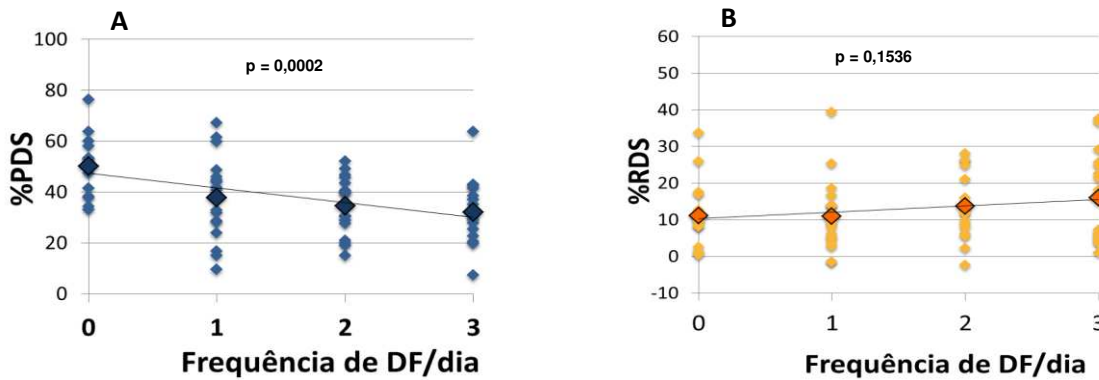


Figura 5. Relação entre porcentagem de perda (%PDS) (A) e recuperação de dureza de superfície (%RDS) (B) da dentina em função da frequência de uso de dentifrício fluoretado (DF). A significância estatística para as associações está descrita nos gráficos. Os dados de %RDS da dentina cariada foram transformados em \log_{10} .

ANOVA dos dados mostrou um efeito estatisticamente significativo para a frequência de uso do dentifrício fluoretado na %PDS ($p = 0,0013$), mas não na %RDS ($p = 0,5793$).

Concentração de F no fluido do biofilme:

Os resultados da análise de regressão linear mostraram não haver uma relação significativa entre a frequência de uso de DF e a concentração de F no fluido do biofilme ($p > 0,05$). Semelhantemente, ANOVA dos dados mostrou não haver efeito dos tratamentos ($p > 0,05$).

Concentração de F solúvel em álcali:

A concentração de flúor solúvel em álcali encontrado na dentina variou em função direta da frequência de uso do dentifrício fluoretado (Figura 6), sendo a associação significativa para a dentina hígida ($p = 0,0024$) e cariada ($p = 0,0017$). ANOVA dos dados mostrou um efeito estatisticamente significativo dos tratamentos tanto para a dentina hígida ($p = 0,0008$) quanto para a cariada ($p = 0,0005$).

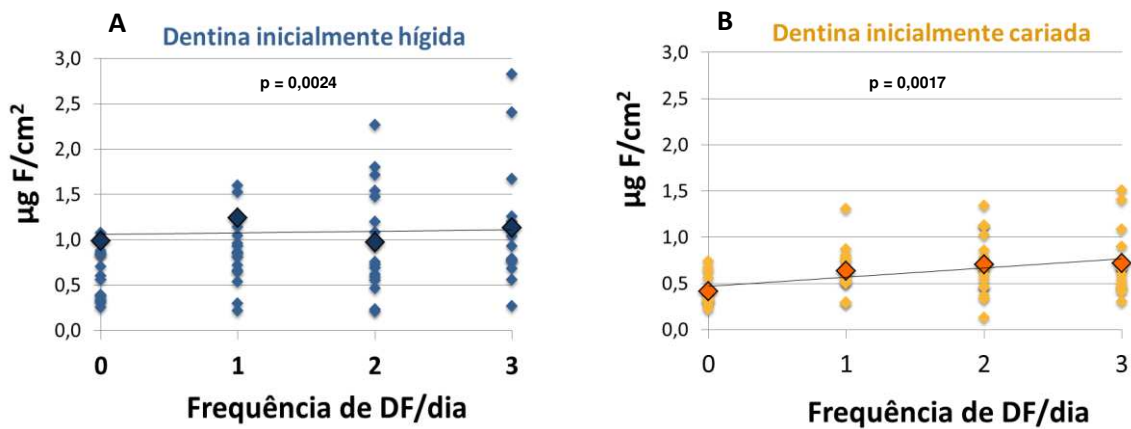


Figura 6. Concentração de flúor solúvel em álcali ($\mu\text{g F/cm}^2$) na dentina inicialmente hígida* (A) e com lesão de cárie** (B) em função da frequência de uso de dentifrício fluoretado (DF). A significância estatística para as associações está descrita nos gráficos. Os dados foram transformados em \log_{10} .

*Blocos expostos à acúmulo de biofilme e 8 desafios cariogênicos diários; **Blocos expostos à acúmulo de biofilme e 3 desafios cariogênicos diários.

6 DISCUSSÃO

Cárie é uma doença que provoca alterações progressivas na porção mineral dos dentes, mas essas lesões podem ser paralisadas ou revertidas. O fluoreto exerce um papel importante tanto na redução da progressão das lesões como na sua reversão. Entretanto, para que esses efeitos sejam possíveis, o fluoreto deve estar disponível constantemente na cavidade bucal. Neste sentido a frequência de uso de dentifrício fluoretado pode influenciar o efeito do fluoreto no controle da cárie do esmalte ou dentina, quer seja reduzindo a progressão das lesões, como revertendo as já existentes.

No presente trabalho, o efeito da frequência de uso de dentifrício fluoretado na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina foi estudado simulando duas situações clínicas. Para avaliar o efeito na redução da desmineralização, blocos dentais hígidos foram submetidos a acúmulo de biofilme e exposição à sacarose 8x/dia, simulando uma condição altamente cariogênica. Para avaliar o efeito na remineralização, blocos dentais apresentando lesões iniciais de cárie também foram sujeitos a acúmulo de biofilme, mas a exposição de sacarose foi de apenas 3x/dia. Em ambas as condições, não foi estudado o efeito da frequência da escovação na redução da desmineralização e ativação da remineralização do esmalte e dentina, mas sim o efeito do fluoreto do creme dental, porque o biofilme não foi mecanicamente perturbado.

Em uma análise global, nossos resultados mostraram que o efeito da frequência de tratamento com o fluoreto do dentifrício foi importante tanto para a redução da desmineralização, como para a remineralização ocorrida nos blocos dentais. Estes resultados estão de acordo com o atual entendimento de que o fluoreto interfere com o processo de cárie, reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização do esmalte e dentina (Tenuta e Cury, 2010). Para tal, ele precisa estar presente constantemente na cavidade bucal (Cury e Tenuta, 2008) e isso pode ser viabilizado pelo aumento da frequência de uso de dentifrício.

Com relação aos dados encontrados para o esmalte, quanto maior a frequência de tratamento com dentifrício fluoretado, maior foi o efeito de redução da desmineralização e aumento da remineralização (Figura 3). Esse resultado experimental dá suporte a revisões

sistemáticas mostrando evidências que a frequência de escovação com dentifrício fluoretado é fator importante para o efeito de redução de cárie em crianças e adolescentes (Marinho et al., 2003). Com base em revisões sistemáticas e estudos isolados, tem sido recomendado que os dentes devam ser escovados 2x/dia (Parnell e O'Mullane, 2013), mas nossos resultados sugerem que uma terceira exposição diária ao fluoreto de dentifrício pode conferir um benefício adicional não só na redução da progressão de lesões de cárie em esmalte como na reparação das já existentes.

Por outro lado, analisando os dados da associação entre %PDS do esmalte e frequência de uso de fluoreto pelo tratamento com dentifrício, mostrados no gráfico A da figura 3, é possível notar pela média dos resultados que o efeito da frequência não é proporcional a redução da perda dureza de superfície. Ao contrário, o gráfico B da figura 3 mostra uma proporcionalidade entre o efeito da frequência de tratamento com dentifrício e o efeito de recuperação da dureza do esmalte. Esses resultados podem ser explicados pelo conhecimento sobre cárie dentária, o mecanismo de ação do fluoreto e o modelo utilizado no presente experimento. Assim, fluoreto não evita cárie, acúmulo de biofilme não foi controlado e esses foram expostos à açúcar nas frequências de 8x ou 3x/dia. O biofilme exposto à açúcar 8x/dia provocou desmineralização no esmalte, mas quando açúcar foi usado apenas 3x/dia, além da desmineralização existente não progredir, houve inclusive reversão das lesões de cárie. Desse modo, embora nossos dados mostrem a importância do fluoreto de dentifrícios na redução da desmineralização e na ativação da remineralização do esmalte, eles dão suporte ao sinergismo de efeito que se esperaria se ao mesmo tempo o biofilme estivesse sendo desorganizado (Nyvad, 2008). Nossos dados também dão suporte à importância do controle da dieta (Zero, 2004) para um maior controle da cárie do esmalte pelo uso de dentifrício fluoretado, tendo em vista o efeito antagônico observado quando a frequência de exposição à sacarose passou de 3 para 8x/dia. Tem sido sugerido que fluoreto de dentifrício é capaz de evitar a desmineralização do esmalte se sacarose não fosse usada em frequência maior que 6x/dia (Duggal et al., 2001; Ccahuana-Vásquez et al., 2007). Os dados do presente trabalho vão além, mostram que se a dieta em açúcar se limitasse à 3x/dia (refeições principais) e dentifrício fluoretado estivesse sendo usado para escovar os dentes, poderia inclusive haver reparação das lesões de cárie provocadas.

Esse é primeiro trabalho que avalia a importância da frequência de uso de dentifrício fluoretado para o controle de cárie radicular. À semelhança do esmalte, nossos dados mostraram que o efeito da frequência do fluoreto de dentifrício é também importante para interferir como o desenvolvimento de cárie na dentina (Figura 5, A). Assim, apesar da dentina ser um mineral mais solúvel que o esmalte (Hoppenbrouwers et al. 1986), e considerando-se ainda o fato da realização de desafio cariogênico 8x/dia, o fluoreto do dentifrício foi capaz de reduzir a progressão das lesões de cárie neste substrato. A importância de dentifrício fluoretado na frequência de 1x/dia (Kusano et al., 2011) ou 3x/dia (Hara et al., 2003; Cenci et al., 2008; Vale et al., 2011) na redução da desmineralização da dentina radicular já era conhecido e foram confirmados pelo presente trabalho.

Por outro lado, enquanto que a frequência de tratamento com dentifrício fluoretado teve efeito significativo na remineralização do esmalte (Fig 3B) o mesmo não foi encontrado para dentina (Fig 5B). Este resultado pode ser atribuído a concentração de 1.100 ppm de fluoreto no dentifrício usado, uma vez que tem sido mostrado que maiores concentrações de fluoreto são necessárias para remineralização da dentina (Heijnsbroek et al., 2007). Isto tem sido evidenciado por estudos clínicos que mostram que dentifrício fluoretado contendo 5.000 ppm F é mais eficaz do que dentifrício de concentração convencional (1.100 - 1.450 ppm F) na reversão de lesões de cárie radicular (Baysan et al., 2001; Ekstrand et al., 2013). Assim, a discussão feita anteriormente nesse trabalho sobre o uso de fluoreto, controle de biofilme e restrição do consumo de açúcar para o controle de cárie de esmalte é de importância maior para o controle da cárie radicular.

De uma maneira geral, os dados do efeito da frequência de tratamento com fluoreto de dentifrício na redução da desmineralização e ativação da remineralização do esmalte (Fig 3) e dentina (Fig 5) estão suportados pela concentração de fluoreto fracamente ligado (“CaF₂”) encontrada nesses substratos (Figs 4 e 6). Esses dados inéditos sugerem que depósitos de “CaF₂” podem contribuir para o efeito do dentifrício fluoretado no controle de cárie (Tenuta e Cury, 2013). No entanto, as concentrações de fluoreto encontradas no fluido do biofilme não refletem a relação entre frequência de tratamento com dentifrício fluoretado e concentração de “CaF₂”. Isso pode ser devido a baixa

concentração de “CaF₂” encontrada nos blocos dentais (Figs 4 e 6), ratificando que o fluoreto que se difunde para residuais de biofilme durante a escovação dental seja mais importante para explicar o mecanismo de ação de dentifrício fluoretado no controle de cárie (Tenuta et al., 2009; Tenuta e Cury, 2013). De fato, aumento de concentração de íon flúor no fluido do biofilme só é encontrado nas primeiras horas após a escovação (Vogel et al., 2000; Tenuta et al., 2008; Tenuta et al., 2009; Newby et al., 2013). Entretanto, não era objetivo do presente trabalho avaliar a concentração de fluoreto no fluido do biofilme decorrente do momento de tratamento com dentifrício fluoretado e assim os biofilmes foram coletados 10 h após os tratamentos.

Em resumo, os resultados mostraram que a redução da desmineralização do esmalte e dentina, e da ativação da remineralização do esmalte, é função da frequência de tratamento com dentifrício fluoretado.

7 CONCLUSÃO:

Os dados sugerem que a frequência de uso de dentifício a 1.100 μg F/g é importante para reduzir o desenvolvimento de novas lesões de cárie tanto no esmalte como na dentina radicular, mas para a reversão de lesões pré-existentes o efeito é mais relevante para o esmalte do que para a dentina.

REFERÊNCIAS

- Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2004 Sep;31(9):749-57.
- Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Petersson L, Borsboom P. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. *Caries Res.* Jan-Feb;35(1):41-6, 2001.
- Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 416–422.
- Caslavska V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 20:333-339, 1975.
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res.* 2007;41(1):9-15.
- Cenci MS, Tenuta LM, Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA. Effect of microleakage and fluoride on enamel-dentine demineralization around restorations. *Caries Res.* 2008;42(5):369-79.
- Cury JA. Fluoride use. In: *Operative dentistry: preventive and restorative procedures.* Baratieri LN, editor. Rio de Janeiro: Editora Santos, 1989. pp.43-67 [in Portuguese].
- Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31: 356-360.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000; 34, 491–497.

Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J.* 2001;12(2):101-4.

Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15: 167–174.

Cury JA, Tenuta LMA. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. *Adv Dent Res.* 2008; 20 (1): 13-6.

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009; 23 Suppl 1: 23-30.

Cury JA, Tenuta LMA. Evidências para o uso de fluoretos em Odontologia. *Odontologia baseada em evidências.* 2010; 4: 18p.

Cury JA, Tenuta LMA, Tabchoury, CPM. Funções e propriedades da saliva. In: Livro do congresso do centenário da APCD. 1a. ed. São Paulo: Napoleão, 2011.

Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res.* 1988. Jun;67(6):890-5.

Duggal MS, van Loveren C. Dental considerations for dietary counselling. *Int Dent J*. 2001;51(6 Suppl 1):408-12.

Ekstrand J, Oliveby A. Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 1999 Dec;57(6):330-3.

Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5,000 compared to 1,450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res*. 2013;47(5):391-8.

Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, Clarkson B. Fluoride in caries control. In: *Dental caries: the disease and its clinical management*. Fejerskov O, Kidd E, editors. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008. p. 287-323.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res*. 1983; 17(5): 385-391.

Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dental caries. In: Bader J, ed. *Risk assessment in dentistry*. Chapel Hill, NC: University of North Carolina Dental Ecology, 1990: 215–17.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004; 38(3): 182-91.

Fejerskov O, Kidd E. *Dental caries: The disease and its clinical management*. 2a. ed. Oxford: Blackwell & Munksgaard, 2008.

Feldens CA, Vítolo MR, Drachler Mde L. A randomized trial of the effectiveness of home visits in preventing early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007 Jun;35(3):215-23.

Feldens CA, Giugliani ER, Duncan BB, Drachler Mde L, Vítolo MR. Long-term effectiveness of a nutritional program in reducing early childhood caries: a randomized trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010 Aug;38(4):324-32.

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

Hara AT, Queiroz CS, Giannini M, Cury JA, Serra MC. Influence of the mineral content and morphological pattern of artificial root caries lesion on composite resin bond strength. *Eur J Oral Sci.* 2004 Feb;112(1):67-72.

Heijnsbroek M, Paraskevas S, Van der Weijden GA. Fluoride interventions for root caries: a review. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(2):145-52.

Herkstroter FM, Witjes M, Arends J. Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. *Caries Res.* 1991; 25(5): 317-322.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res.* 1986; 65(7): 955-8.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol.* 1987; 32: 319-322.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83 (Spec Iss C): C35-C38.

Kusano SC, Tenuta LMA, Cury AADB, Cury JA. Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization. *Braz. oral res.* 2011; 25(5): 383-387.

Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev In: The Cochrane Library, Issue 1, 2003.*

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.

Moynihan PJ, Kelly SA. Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res.* 2014 Jan;93(1):8-18.

Newby EE, Martinez-Mier EA, Zero DT, Kelly SA, Fleming N, North M, Bosma ML. A randomised clinical study to evaluate the effect of brushing duration on fluoride levels in dental biofilm fluid and saliva in children aged 4-5 years. *Int Dent J.* 2013 Dec;63 Suppl 2:39-47.

Nobre-dos-Santos M, Cury JA. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. *Caries Res.* 1988; 22(5): 316-7.

Nobre-dos-Santos M, Koo H, Cury JA. Evaluación in situ de la incorporación de flúor y remineralización del esmalte dental con un dentífrico brasileiro fluorado comercializado para niños. *Rev. Fola Oral*. 1998;4(12); 110-14.

Nyvad B, Fejerskov O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J*. 1982; 32(4): 311-326.

Nyvad B. The role of oral hygiene. In: Fejerskov O, Kidd E . *Dental caries. The disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008: 257-264.

Ogaard B, Rolla G, Arends J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res*. 1988: 22(5); 302-305.

Oliveby A, Twetman S, Ekstrand J. Diurnal fluoride concentration in whole saliva in children living in a high- and a low-fluoride area. *Caries Res*. 1990: 24; 44-47.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res*. 2004; 83:71-5.

Parnell C, O'Mullane D. After-brush rinsing protocols, frequency of toothpaste use: fluoride and other active ingredients. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:140-53.

Queiroz CS. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina [Tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2004.

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

Rolla G, Oggard B, Cruz RA. Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J.* 1991; 41:171-174.

ten Cate JM, Damen JJ, Buijs MJ. Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res.* 1998; 32(2):141-147.

ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999 Dec;57(6):325-9.

Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortoloin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res.* 2006; 85(9): 834-8.

Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res.* 2008 Nov;87(11):1032-6.

Tenuta LMA, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2009; 43(4): 278-285.

Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010; 24 Suppl 1: 9-17.

Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:108-24.

Twetman S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009; 10(3): 162-7.

Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 77-81.

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 Mar;76(3):761-7.

Vogel GL, Mao Y, Chow LC, Proskin HM. Fluoride in plaque fluid, plaque, and saliva measured for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. *Caries Res.* 2000 Sep-Oct;34(5):404-11.

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

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res.* 1987;21(2):126-40.

Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995 Nov;9(3):214-30.

Zero DT. Sugars - the arch criminal? *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):277-85.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Frequência de uso de dentifício fluoretado e desmineralização do esmalte e dentina radicular", protocolo nº 104/2009, dos pesquisadores Livia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury, Diego Figueiredo Nóbrega, Jaime Aparecido Cury e Sandro Carvalho Kusano, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 21/05/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Frequency of fluoride dentifrice use in enamel and root dentine demineralization", register number 104/2009, of Livia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury, Diego Figueiredo Nóbrega, Jaime Aparecido Cury and Sandro Carvalho Kusano, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 05/21/2012.


Prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.