

Regiane Cristina do Amaral

“Dentifrício de baixa concentração de fluoreto e redução da desmineralização do esmalte decíduo frente ao acúmulo de biofilme dental e exposição a sacarose”

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Saúde Coletiva.

Orientador: Prof. Dr. Jaime A. Cury

**Piracicaba
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Am13d	Amaral, Regiane Cristina do. Dentífrício de baixa concentração de fluoreto e desmineralização do esmalte decíduo frente ao acúmulo de biofilme dental e exposição à sacarose. / Regiane Cristina do Amaral. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Jaime Aparecido Cury. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Saúde coletiva. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Low fluoride dentifrice and deciduous enamel demineralization under different cariogenic challenge and sucrose exposure

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Public health

Área de Concentração: Saúde Coletiva

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Jaime Aparecido Cury, Maria da Luz Rosário de Sousa, Cecília Cláudia Costa Ribeiro

Data da Defesa: 25-02-2010

Programa de Pós-Graduação em 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 25 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata REGIANE CRISTINA DO AMARAL aprovada.

Handwritten signature of Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury in blue ink.

Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY

Handwritten signature of Profa. Dra. Cecília Claudia Costa Ribeiro in blue ink.

Profa. Dra. CECÍLIA CLAUDIA COSTA RIBEIRO

Handwritten signature of Profa. Dra. Maria da Luz Rosario de Sousa in blue ink.

Profa. Dra. MARIA DA LUZ ROSARIO DE SOUSA

***Aos meus pais, Luíz e Marli e
irmãos, Renata e Luis Júnior pelo
constante carinho, amor e
dedicação.***

***A minha melhor amiga, Cláudia
Uituke Angelini, pelo apoio sempre.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, por ter me dado a oportunidade de aprender dentre tantas coisas a ter profissionalismo e dedicação pelo trabalho.

À **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta** pela constante orientação nas atividades de laboratório, por me ensinar todos os passos do meu experimento, sempre com carinho e paciência, pelas discussões científicas, pela análise estatística sobre este trabalho, e, sobretudo pela amizade.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury** pela orientação no desenvolvimento do trabalho, pela perseverança e dedicação em tudo o que faz, sempre buscando ensinar a pessoas tão distintas o argumento de serem melhores profissionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da UNICAMP, **Prof. Dr. Fernando Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião**.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury** agradeço por toda ajuda, apoio e colaboração para a execução deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa** por ser a primeira pessoa a acreditar no meu trabalho e me orientar em toda graduação.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP/UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho e José Alfredo da Silva** pela amizade construída durante todos estes anos e pela colaboração, sempre.

Aos colegas **Fabiana Gouveia, Antônio Pedro Ricomini Filho e Marília Ferreira Correia** pela colaboração em fases desta pesquisa.

Aos amigos **Juliana Braga Fernandes, Sandro Kussano, Carolina Patrícia Aires e Ana Flávia Bissoto Calvo**, pela sincera amizade construída nos anos de convívio durante o mestrado.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, **Patrícia Lima, Patrícia Batista, Luciano Gonçalves, Waldemir Vieira Júnior, Plínio Senna, Antônio Pedro Ricomini Filho, Renato Pereira, Paula Aníbal, Willian Custódio, Gabriel Jordão, Monique Lourenço, Renzo Ccahuana-Vásquez e Maria Clara de Souza** pela cooperação, dedicação e amizade.

Aos colegas **Rosana Hoffmann, Danilo Catani, Renato Pereira, Lilian Rihs, Maria Paula Meirelles, Frederico Fernandes, Sílvia Lucena, Priscila Gomes, Simone Gomes, Paulo Peres, Rodrigo Arthur, Gisele Moi, Renzo Ccahuana-Vásquez e Gláuber Vale** pela valiosa convivência.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2007/05994-3).

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

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá; porque, em parte conhecemos, e em parte profetizamos; mas, quando vier o que é perfeito, então o que é em parte será aniquilado. Quando eu era menino, pensava como menino; mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino. Porque agora vemos como por espelho, em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei plenamente, como também sou plenamente conhecido. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor (Coríntios 13).

RESUMO

O uso de dentifrício fluoretado com menor concentração de flúor (500 ppm F) tem sido recomendado para crianças devido ao risco de fluorose, entretanto sua eficácia anticárie em relação ao dentifrício com concentração convencional de fluoreto (1100 ppm F) é desconhecida quando de acúmulo de biofilme dental e diferentes exposições à sacarose. Assim, um estudo *in situ*, cruzado e duplo cego relativo aos dentifrícios e boca dividida quanto à frequência de exposição à sacarose foi conduzido em 4 fases de 14 dias cada. Em cada fase, 14 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais palatinos contendo 8 blocos de esmalte decíduo, de dureza de superfície pré-determinada, os quais foram submetidos a acúmulo de biofilme dental e expostos à sacarose 20% nas frequências de 2 a 8x/dia. Três vezes por dia os voluntários usaram formulações de dentifrício com 500 ou 1.100 ppm F (NaF, base sílica). No 14º dia, o biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado antes e 15 min após a escovação com o respectivo dentifrício para a determinação da concentração de flúor no fluido e parte sólida do biofilme. A desmineralização do esmalte foi avaliada pela porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e área de lesão de cárie (ΔS). Também foi avaliada a concentração de F no esmalte. A concentração de F no fluido e parte sólida do biofilme foi significativamente maior quando o dentifrício de 1.100 ppm F foi utilizado ($p < 0,05$). Os dentifrícios não diferiram estatisticamente em termos de %PDS, ΔS e F no esmalte ($p > 0,05$), entretanto somente o dentifrício com concentração convencional de F reduziu a área da lesão de cárie de acordo com a frequência de exposição de sacarose ($p < 0,05$). Em conclusão, os dados sugerem que a alta disponibilidade de fluoreto no biofilme dental, resultante da utilização do dentifrício com concentração convencional em comparação com o dentifrício de baixa concentração de F, é importante para reduzir a progressão da lesão de cárie em uma alta frequência de exposição de sacarose.

Palavras chave: dentifrício, fluoreto, baixa concentração, desmineralização, fluido da placa.

ABSTRACT

The use of fluoride dentifrice with low concentration (500 ppm F) has been recommended for children due to the fluorosis risk, but its effectiveness in anti-caries compared to conventional dentifrice with fluoride concentration (1100 ppm F) is unknown when accumulation of dental biofilm and different sucrose exposure. Thus, an *in situ* study, crossed, double-blind in relation to the dentifrices and split-mouth considering the frequency of sucrose exposure was conducted in 4 phases of 14 days each. In each phase, 14 volunteers used intra-oral palatal appliances containing 8 blocks of deciduous enamel with pre-determined surface hardness, which were submitted to the accumulation of dental biofilm and exposed to 20% sucrose in the frequencies of the 2 to 8x/day. Three times a day the volunteers used dentifrices formulations with 500 or 1,100 ppm F (NaF, silica-based). On the 14th day, the biofilm formed on the enamel blocks was collected before and 15 min after brushing with the respective dentifrice for determination of fluoride concentration in the biofilm fluid and solids. Enamel demineralization was assessed by surface hardness loss (%SHL) and cross-sectional hardness (ΔS = area of hardness loss). F uptake by enamel was also determined. F concentration in fluid and solid part of the biofilm was statistically higher when 1,100 ppm F dentifrice was used ($p < 0.05$). The dentifrices did not differ statistically in terms of %SHL, ΔS and F in enamel ($p > 0.05$), but only the conventional F dentifrice significantly reduced caries lesion progression according to the frequency of sucrose exposure ($p < 0.05$). The findings suggest that the high F availability in biofilm, resulting from the use of conventional compared to low F dentifrice, is important to reduce caries lesion progression under a high frequency of sucrose exposure.

Key words: dentifrice, fluoride, low concentration, demineralization, plaque fluid.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO 1	04
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
CONCLUSÃO GERAL.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
APÊNDICES	30
ANEXOS	39

INTRODUÇÃO GERAL

Desde a descoberta de que o fluoreto poderia ser utilizado para prevenção de cárie dentária, seu uso foi sempre discutido em termos do balanço benefícios (redução de cárie) e riscos (fluorose dental). Há aproximadamente 100 anos e com base no histórico estudo de Dean (1936) da relação entre cárie e fluorose em função da concentração de fluoreto natural presente em águas de abastecimento público se chegou no que até hoje é conhecida como concentração ótima de flúor na água. Essa concentração, a qual depende da temperatura ambiental, é chamada de ótima na água de abastecimento público não porque quem a ingere durante a formação dos dentes não teria fluorose, mas sim pelo fato de que a fluorose decorrente é considerada aceitável em termos do benefício de redução de cárie. Assim, considerando a alta prevalência de cárie da época e o fato de que a fluorose decorrente do efeito sistêmico da água fluoretada não comprometia a estética dental, os benefícios desse meio de usar fluoreto superavam os riscos em termos de saúde pública e desse modo, a agregação desse íon ao tratamento da água de abastecimento público foi aceita mundialmente.

Por outro lado até aproximadamente a década de 80, água fluoretada era a única forma abrangente de usar fluoreto para benefício anticárie em termos populacionais e nessa época também era aceito que o efeito principal do fluoreto na prevenção de cárie era sistêmico, isto é, seria necessário o ingerir durante a formação do dentes para ser formado um esmalte mais resistente ao processo de cárie dental. Esse conceito começou a mudar a partir de 1981 (Fejerskov *et al.*, 1981) com o relato de declínio de cárie em países que não utilizavam a fluoretação da água como medida de saúde pública para controlar os níveis de cárie das suas populações. Paralelamente, evidências diretas ou indiretas sugeriam que esse declínio de cárie era devido ao uso abrangente de dentifrícios fluoretados nesses países (Rölla *et al.*, 1991; König, 1993).

Desse modo, evidências se acumularam de que o principal mecanismo de ação do fluoreto no controle de cárie não era sistêmico e sim dependeria do uso de meios de

manter fluoreto na cavidade bucal para interferir com o processo de desenvolvimento de lesões de cárie. Entre esses meios o destaque tem sido dado para a importância da água fluoretada e de dentifrício fluoretado (Cury e Tenuta, 2008).

Entretanto, embora água e dentifrício possam se complementar como meios de usar fluoreto em termos do benefício anticárie (Marinho *et al.*, 2004), dúvidas quanto ao efeito colateral de fluorose surgiram desde que crianças de menor idade ingerem certa quantidade de dentifrício toda vez que escovam os dentes (Paiva *et al.*, 2003). Essa preocupação seria pertinente em regiões onde a água é fluoretada desde que certa prevalência de fluorose sempre será encontrada mesmo que a concentração na água esteja dentro do nível considerado ótimo para a região. Por outro lado, para regiões sem o efeito sistêmico da fluoretação da água essa preocupação seria marginal.

Assim, à semelhança do ocorrido com água fluoretada em termos do balanço benefícios/riscos, o mesmo é válido para os dentifrícios fluoretados. Esses têm sido considerados como a razão principal para o declínio de cárie ocorrida tanto em países desenvolvidos (Bratthal *et al.*, 1996) como naqueles em desenvolvimento (Cury *et al.*, 2004), mas ao mesmo tempo eles têm sido considerados como fatores de risco de fluorose dental (Mascarenhas, 2000).

Com relação ao benefício do dentifrício fluoretado no controle do processo de cárie, embora haja evidência que seu efeito é concentração dependente (Ellwood *et al.*, 2008) e em concentração de no mínimo 1.000 ppm F (Walsh *et al.*, 2009), dentifrício de baixa concentração (500 ppm F ou menos) tem sido sugerido para reduzir o risco de fluorose dental (Horowitz, 1995).

Essa recomendação, principalmente em saúde pública, deve ser vista com cautela com relação ao balanço benefícios/riscos do uso de flúor (Ellwood e Cury 2009; Brasil 2009). Afinal, não há evidências que seu uso ao invés do convencional 1000-1.100 ppm F garanta os benefícios anticárie com o mínimo de fluorose dental. Em acréscimo, sua

recomendação é incoerente porque se o declamado declínio de cárie é devido ao uso abrangente de dentifrício fluoretado, isso é consequência de uso de dentifrícios de concentração de 1.000 ppm F ou superior. Desse modo a recomendação indiscriminada do de baixa concentração coloca em riscos os benefícios do fluoreto de dentifrício no controle de cárie, sem garantir a segurança quanto à fluorose dental.

Quanto à relação entre fluorose dental e dentifrício, a maioria dos estudos se baseia na quantidade estimada de ingestão de dentifrício pela criança quando da escovação dos dentes e não no valor de biodisponibilidade, isto é, quanto do fluoreto ingerido atinge o esmalte em formação, sendo superestimada (Ellwood *et al.*, 2008). Além do mais, a dose de ingestão tem sido comparada com chamada dose de risco de 0,05-0,07 mg F/kg/dia, a qual foi estabelecida empiricamente (Burt, 1992) e estudos prospectivos não tem mostrado relação entre dose de ingestão de fluoreto e o consequente efeito de fluorose (Martins *et al.*, 2008).

Considerando que a recomendação de dentifrício de baixa concentração de fluoreto põe em risco os benefícios do uso de dentifrício fluoretado no controle do processo de cárie, o objetivo dessa tese foi avaliar o efeito de dentifrício de 500 ppm F na desmineralização do esmalte de dente decíduo quando submetido ao acúmulo de placa dental e risco aumentado de cárie por frequências crescentes de exposição à açúcar.

CAPÍTULO 1

***Low fluoride dentifrice and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and different sucrose exposure**

Regiane Cristina do Amaral, Livia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury,
Cínthia Pereira Machado Tabchoury, Jaime Aparecido Cury

Piracicaba Dental School, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

Running Title: Low F dentifrice and deciduous enamel demineralization

Corresponding author:

Prof. Jaime A. Cury
Av. Limeira, 901, Piracicaba, SP
13414-903 Brazil
Phone: #55- 19-21065303
Fax: #55- 19-21065302
Email jcury@fop.unicamp.br

*Submetido à publicação no Eur J Oral Sci (comprovante anexo)

Amaral RC, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Low fluoride dentifrice and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci*

ABSTRACT: Since low fluoride dentifrice (500 ppm F) is not as effective as the conventional (1,100 ppm F) to control caries in caries-active children, this experimental *in situ* study was conducted to evaluate whether its effect would depend on the cariogenic challenge. During four phases of 14 days each, 14 volunteers used 500 or 1,100 ppm F dentifrice, and wore palatal appliances containing deciduous enamel slabs, on which biofilm was accumulated and exposed to 20% sucrose solution at frequencies increasing from 2 to 8 times/day. Fluoride concentration in biofilm formed was determined and enamel demineralization was assessed by surface hardness loss (%SHL) and integrated area of hardness x lesion depth (ΔS). F uptake by enamel was also determined. Fluoride in biofilm fluid and solids was statistically higher when conventional F dentifrice was used ($p < 0.05$). The dentifrices did not differ statistically in terms of %SHL, ΔS and F in enamel ($p > 0.05$), but only the conventional F dentifrice significantly reduced the area of caries lesion according to the frequency of sucrose exposure ($p < 0.05$). The findings suggest that the high F availability in biofilm, resulting from the use of conventional compared to low F dentifrice, is important to reduce caries lesion progression under a high frequency of sucrose exposure.

Key Words: dentifrice, fluoride, plaque fluid, demineralization, primary enamel

INTRODUCTION

Fluoride dentifrice use has been considered the main reason for the worldwide caries decline observed in the last decades in developed (1) and developing countries (2) but an increase in the prevalence of dental fluorosis has been reported in areas with or without fluoridated water (3). Thus, dentifrice is considered as a risk factor for dental fluorosis (4) and the use of low-F concentration dentifrice (500-550 ppm F) has been recommended for young children as an alternative to reduce this risk (5). However, when compared to the conventional dentifrice (1,100 ppm F), there is no evidence of clinical effectiveness of low-F dentifrice (6).

In fact, considering that there is a dose-response relationship between the concentration of fluoride in toothpaste and its anticaries efficacy in permanent teeth (7), it is plausible to expect that the low F-dentifrice does not show the same anticaries effect than 1,100 ppm F dentifrice. Moreover, since low-F concentration dentifrice is indicated for children, it should be effective to control caries in enamel of deciduous teeth, which is considered more susceptible to caries than enamel of permanent teeth (8).

Indeed, a recent study showed that the 500 ppm F dentifrice was not as effective as the 1,100 ppm F one to control caries in young children with active lesions (9). Since frequency of sugar intake is intimately related to caries experience in young children (10,11), it may affect the caries inhibitory effect of fluoride dentifrices. Thus, for permanent teeth the conventional 1100 ppm F dentifrice is able to reduce demineralization if sucrose consumption is not higher than 6x/day (12,13). However, it is not known the extent of caries inhibition by the 500 ppm F dentifrice under increasing frequencies of

sucrose exposure, which is also expected to diminish as the frequency of sugar use increases.

Thus, we investigated the effect of conventional and low F dentifrices on deciduous enamel exposed to a cariogenic challenge under increasing frequencies of sucrose exposure and biofilm accumulation. Also, the ability of these dentifrices to increase and retain F in biofilm fluid and solids was evaluated to support the findings.

MATERIALS AND METHODS

Ethical aspects and volunteers

This study was approved by the Research and Ethics Committee of FOP-UNICAMP (Protocol No. 074/2007), and volunteers signed an informed, written consent to participate (Resolution N° 196 of the National Health Council, Health Ministry, Brasília, DF, 10/03/1996).

Fourteen volunteers (18-32 years old), who fulfilled inclusion criteria (normal salivary flow rate, good general and oral health, ability to comply with the experimental protocol, not having used antibiotics during the 2 months prior to the study, not using fixed or removable orthodontic device) were selected to participate in the study.

Experimental design

The study involved a factorial 2 x 4 design of caries induction by plaque accumulation and sucrose use. The factors under evaluation were dentifrice at 2 levels (containing 500 or 1,100 ppm F) and frequency of 20% sucrose solution exposure at 4 levels (2, 4, 6 or 8 times/day). During 4 phases of 14 days each, the volunteers wore palatal appliances containing 8 enamel deciduous slabs, 4 at each side, to which sucrose solution was applied

extraorally at one of two frequencies: 2 and 8 times/day or 4 and 6 times/day. The use of 2 treatments in the same appliance (split-mouth design) was supported by the absence of a cross-effect in previous in situ studies (13, among others). During 2 phases volunteers used a dentifrice containing 500 ppm F and during the other 2 a dentifrice containing 1,100 ppm F (crossover design) After each phase, the biofilm formed on enamel slabs was collected for F analysis and enamel demineralization was assessed by surface hardness, estimating surface hardness loss (%SHL), and by cross-sectional hardness, evaluating the integrated area of hardness loss as a function of lesion depth (ΔS). Fluoride uptake by enamel was also determined. After a washout period of at least 7 days, during which the volunteers wore the dentifrice of the next phase new enamel slabs were placed in the appliance for the next sequence of frequencies of sucrose treatment and dentifrice use. After the four phases, all volunteers had undergone the 8 combinations of treatments. For the statistical analysis, the volunteer was considered as an experimental block (n=14). The study was double blind concerning the dentifrice use, but only blind to the examiner regarding the sucrose treatment because the volunteers were instructed to follow the frequencies of sucrose exposure.

Enamel Slabs and Palatal Appliance Preparation

Enamel slabs (3 x 3 x 2 mm) were obtained from sound deciduous human teeth, which were polished flat to remove about 50 μm of the outer enamel surface (14). Enamel surface hardness (SH) was determined by making 3 indentations, spaced 100 μm from each other, using a Knoop indenter with a 50 g load for 5 s and a Future-Tech FM microhardness tester coupled to software FM-ARS 900. Slabs with discrepant hardness values were excluded from the sample and a total of 448 slabs presenting a mean hardness of 339.9 kg/mm^2 (SD=20.7) were selected and randomly divided to the groups of treatment. An acrylic resin intraoral palatal appliance, containing 8 cavities measuring 4 x 4 x 3 mm (4 at each side of intraoral palatal) was made for each volunteer. In these cavities new enamel

slabs were placed for each phase of the study. Plastic meshes were fixed over the cavities to protect the enamel slab surfaces from mechanical attrition, leaving a 1-mm space for accumulation of dental biofilm. Colorless or red acrylic resin was used to fix the meshes, indicating the different frequencies of use of sucrose solution at the different sides of the appliances. Further details of appliance preparation are given in a previous publication (15).

Treatments

During a 1-week lead-in period preceding each phase, and during the experimental phase, the volunteers brushed their teeth with a dentifrice containing 500 ppm F or 1,100 ppm F (NaF) and silica as abrasive (formulations prepared by Colgate-Palmolive in coded tubes) according to the experimental phase of the study. To provide a cariogenic challenge, the volunteers were instructed to remove the appliances from the oral cavity and drip one drop of 20% sucrose solution (16) on each enamel slab at the following times, according to the frequency of sucrose exposure: 2 times/day (11.00 and 21.00 h); 4 times/day (8.00, 11.00, 15.30 and 21.00 h); 6 times/day (8.00, 11.00, 14.00, 15.30, 19.00 and 21.00 h) and 8 times/day (8.00, 9.30, 11.00, 14.00, 15.30, 17.00, 19.00 and 21.00 h). The excess of fluid was removed with gauze and 5 min later the device was reinserted in the mouth. The volunteers were also instructed to wear the appliances all the time, removing them only during the meals and a washout interval of at least 1 week was established between the experimental phases (17). Volunteers brushed their teeth and the device with the assigned dentifrice 3 times/day after the main mealtimes (7.30, 12.30, 20.00 h). The device was cleaned by brushing with the dentifrice, except for the area containing the slabs, where only the slurry from the dentifrice in use was gently spread. Volunteers lived in an optimally

fluoridated city (0.7 mg F/L, for the region), and drank and consumed foods prepared with this water. No restriction was made with regard to the volunteers' diet, but they were instructed to avoid F-rich food as tea. They also received oral and written information to refrain from using any antibacterial substance.

Collection of dental biofilm and Analysis of Fluoride in the Fluid and Solids

On the 14th day of each experimental phase, the biofilm formed on two slabs in each side of the appliance was collected before (10 h after the last use of dentifrices) and 15 min after toothbrushing with the assigned dentifrices. Biofilm was collected with plastic spatula and immediately placed inside a mineral oil-filled centrifuge tube (18). After determination of the sample weight ($\pm 10 \mu\text{g}$), the tube was centrifuged for 5 min (21,000 g) at 4°C to separate the fluid from the biofilm solids. The fluid phase was recovered with oil-filled capillary micropipettes, and immediately analyzed for F concentration, using an inverted F electrode (18). Samples were applied on the surface of the oil-covered F electrode and diluted with TISAB III (1:10) under microscope. A micro-reference electrode was used to close the circuit, and the signal was read using a high-impedance electrometer (WPI, FD223, Sarasota, FL) coupled to the computer software Plot 1 (Paffenbarger Research Center, ADA Foundation, Gaithersburg, MD).

After fluid extraction, biofilm solids were treated with 0.5 M HCl (0.1 mL/10 mg of biofilm wet weight) for extraction of whole biofilm fluoride. Samples were agitated for 3 h at room temperature, centrifuged, and the supernatant neutralized with a solution of TISAB III containing 2.5 M NaOH (0.02 mL/10 mg biofilm). F in the acid extract was measured as

described above, but the standards used contained HCl and NaOH in the same proportion as the samples.

Enamel demineralization assessment

At the end of each experimental phase, all enamel slabs were removed from the appliances and SH was again measured. One row of three adjacent indentations spaced by 100 μm was made 100 μm from the three baseline measurements. The mean values of the three baseline indentations and the three measurements after treatments were then averaged and the percentage of surface hardness loss (%SHL) was calculated (baseline SH – SH after in situ test)/baseline SH). The results of the 4 enamel slabs for each volunteer subjected to each treatment were averaged and submitted to statistical analysis (n=14).

After SH analysis, After SH analysis, one randomness chosen slab of each treatment from each volunteer was longitudinally sectioned, embedded in acrylic resin and the cut surface was exposed and polished. From the outer enamel surface, 3 rows of 13 indentations each were made, the first six spaced 10 μm from the previous one and the last ones at 20 μm intervals, using a Knoop diamond with 25 g load for 5 s. The mean hardness values of the 3 rows at each distance from the surface were then averaged and expressed as Knoop hardness number (kg/mm^2). The area of hardness x lesion depth (ΔS) was calculated by numerical integration using the trapezoidal rule by the difference between the area under the curve ($\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) of the sound enamel minus the area of the demineralized one (19).

Determination of Fluoride in Enamel

Total fluoride concentration was determined in two slabs of each treatment from each volunteer. The area of enamel surface was measured and all other slab surfaces were

protected with wax. Each slab was immersed in 0.25 mL of 0.5 M hydrochloric acid for 30 s under constant agitation and the extract was buffered with equal volume of TISAB II, pH 5.0, modified with 20 g NaOH/L (20). The concentration of F was determined using an ion-selective electrode (Orion 96-09, Orion Research Inc., Boston, MA, USA) and an ion analyzer (Orion EA-940), previously calibrated with standard F solutions containing 0.06 to 2.00 µg F/ml prepared according to the reagents used. Due to difference of composition between sound and carious enamel, the data were expressed as µg F/cm² rather than in ppm (21). The results of the 2 enamel slabs for each volunteer subjected to each treatment were averaged and submitted to statistical analysis (n=14).

Statistical Analysis

A factorial, randomized block design was used for the statistical analyses, considering the volunteers as statistical blocks, and type of dentifrice and frequency of sucrose exposure as factors in the analysis of variance. The normality of errors distribution and the degree of non-constant variance were checked for each response variable using the SAS/LAB package (SAS software, version 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and data were transformed (22) as suggested by the software. When a significant effect of frequency of sucrose exposure was found, a regression analysis was used to fit the data under each dentifrice used. Data of dental biofilm fluid and solids 10 h and 15 min after brushing were compared using paired tests. SAS software was used for all analysis and the significance limit was set at 5%.

RESULTS

For all response variables studied, no significant interaction between the factors dentifrice and frequency of sucrose use was found ($p>0.05$).

Statistically significant differences were found between dentifrices in F concentration in dental biofilm fluid and solids, irrespective of the collection time ($p<0.05$, Table 1).

Table 1. Concentration of F in biofilm fluid (μM) and solids ($\mu\text{mol/g}$) 15 min or 10 h after brushing with the assigned dentifrice, and according to sucrose exposure (2-8x/day) (mean $\pm$ SD, $n=14$; $^{\#}n=13$ and $^{\text{¥}}n=12$).

Dentifrice	Sucrose frequency	Biofilm fluid (μM)		Biofilm solids ($\mu\text{mol/g}$)	
		10 h after brushing $^{\text{§}}$	15 min after brushing $^{\text{£}}$	10 h after brushing $^{\text{§}}$	15 min after brushing $^{\text{§}}$
500 ppm F	2x/day	$5.6 \pm 4.7^{\#}$	$168.0 \pm 191.3^{\uparrow}$	$1.5 \pm 1.7^{\#}$	1.5 ± 1.3
	4x/day	4.4 ± 1.3	$310.8 \pm 455.8^{\# \uparrow}$	0.8 ± 1.3	$1.4 \pm 1.7^{\# \uparrow}$
	6x/day	$5.1 \pm 2.3^{\text{¥}}$	$229.8 \pm 202.2^{\# \uparrow}$	$0.7 \pm 1.2^{\#}$	$1.2 \pm 1.8^{\# \uparrow}$
	8x/day	6.9 ± 7.2	$227.5 \pm 203.3^{\uparrow}$	0.8 ± 1.7	$1.1 \pm 1.4^{\uparrow}$
1100 ppm F	2x/day	$7.3 \pm 5.1^{\#}$	$466.4 \pm 505.3^{\uparrow}$	$2.2 \pm 1.8^{\text{¥}}$	2.5 ± 1.7
	4x/day	$10.6 \pm 13.2^{\#}$	$475.5 \pm 368.0^{\uparrow}$	$1.5 \pm 1.8^{\#}$	$1.5 \pm 1.8^{\#}$
	6x/day	$8.2 \pm 6.2^{\text{¥}, *}$	$503.5 \pm 398.0^{\# \uparrow}$	$1.1 \pm 1.5^{\#}$	$2.0 \pm 2.4^{\# \uparrow}$
	8x/day	$8.4 \pm 6.8^{\text{¥}}$	$558.7 \pm 307.3^{\uparrow}$	$0.9 \pm 1.5^{\#}$	$1.2 \pm 1.5^{\uparrow}$

$^{\text{£}}$ Transformed to the inverse and $^{\text{§}}$ to the $\log_{10}$, respectively, to fit the assumptions of ANOVA

*one outlier removed, value= 145.4 μM .

$^{\uparrow}$ Significantly higher from the value 10 h after brushing (paired test, $p<0.05$)

Dentifrices differ from each other for both variables and at both collection times ($p<0.05$). The effect of frequency of sucrose exposure was significant for the biofilm fluid collected 15 min after brushing and for biofilm solids for both collection times ($p<0.05$). This was further studied using regression analysis.

The effect of frequency of sucrose exposure was significant for the biofilm fluid 15 min after brushing and for the biofilm solids at both collection times ($p<0.05$). When these data were studied by regression analysis, significance was only found for the biofilm solids, with a linear fit for the 500 ppm F dentifrice 10 h after brushing and for the 1,100 ppm F dentifrice at both collection times ($p<0.05$, Figure 1).

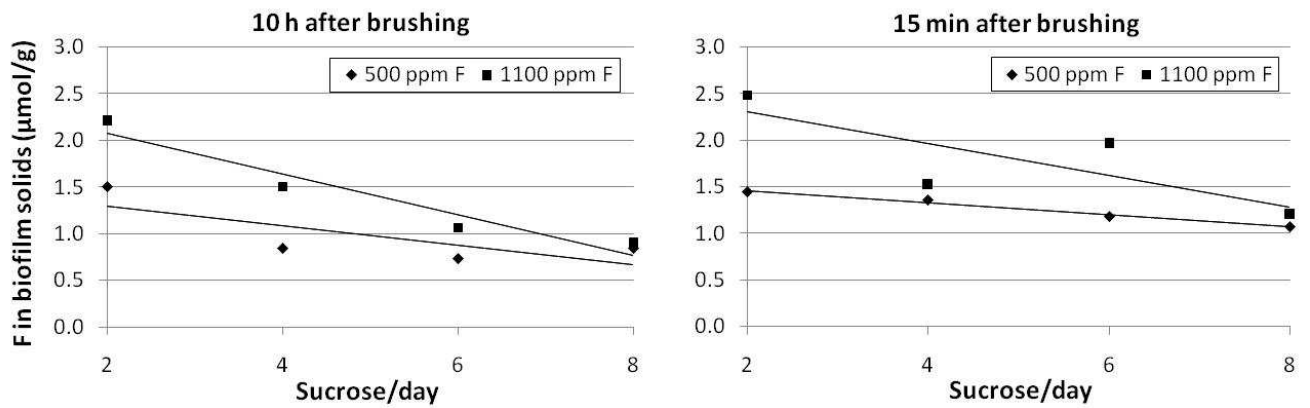


Figure 1: Linear regression fits of the F concentration in biofilm solids as a function of frequency of sucrose use for both dentifrices. All fits were statistically significant ($p < 0.05$), except for 15 min after brushing with the 500 ppm F dentifrice ($p > 0.05$).

ANOVA of the data of enamel demineralization evaluated either by percentage of surface hardness loss (%SHL) or area of hardness loss (ΔS) showed statistically significant effect for frequency of sucrose exposure ($p < 0.05$) but did not for the dentifrices ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2. Percentage of surface hardness loss (%SHL) and area of hardness loss (ΔS , $\text{kg/mm}^2 \times \mu\text{m}$) according to the frequency of sucrose exposure and dentifrices used (mean $\pm$ SD, n=14; [#]n=13 and [¥]n=12).

Dentifrice	Sucrose frequency	%SHL	ΔS
500 ppm F	2x/day	16.1 $\pm$ 9.1	2048.0 $\pm$ 1181.9 [¥]
	4x/day	23.4 $\pm$ 14.5	3456.0 $\pm$ 3165.5 [#]
	6x/day	32.9 $\pm$ 17.8	4833.9 $\pm$ 3333.7
	8x/day	42.4 $\pm$ 23.4	5529.2 $\pm$ 4766.4 [#]
1100 ppm F	2x/day	14.8 $\pm$ 9.2	2172.8 $\pm$ 2021.1
	4x/day	23.6 $\pm$ 20.2	2795.2 $\pm$ 2109.6
	6x/day	30.9 $\pm$ 17.4	3342.0 $\pm$ 2934.9
	8x/day	40.5 $\pm$ 22.0	3705.1 $\pm$ 2254.6

Data of both variables were transformed to the square root to fit the assumptions of ANOVA.

Dentifrices did not differ from each other ($p > 0.05$). The effect of frequency of sucrose exposure was significant for both variables ($p < 0.05$), and was further studied using regression analysis.

Regression analysis found a significant linear fit for both dentifrices regarding the %SHL ($p < 0.05$), but for the ΔS , the regression of the 1,100 ppm F dentifrice as a function of frequency of sucrose was not significant ($p > 0.05$) (Figure 2).

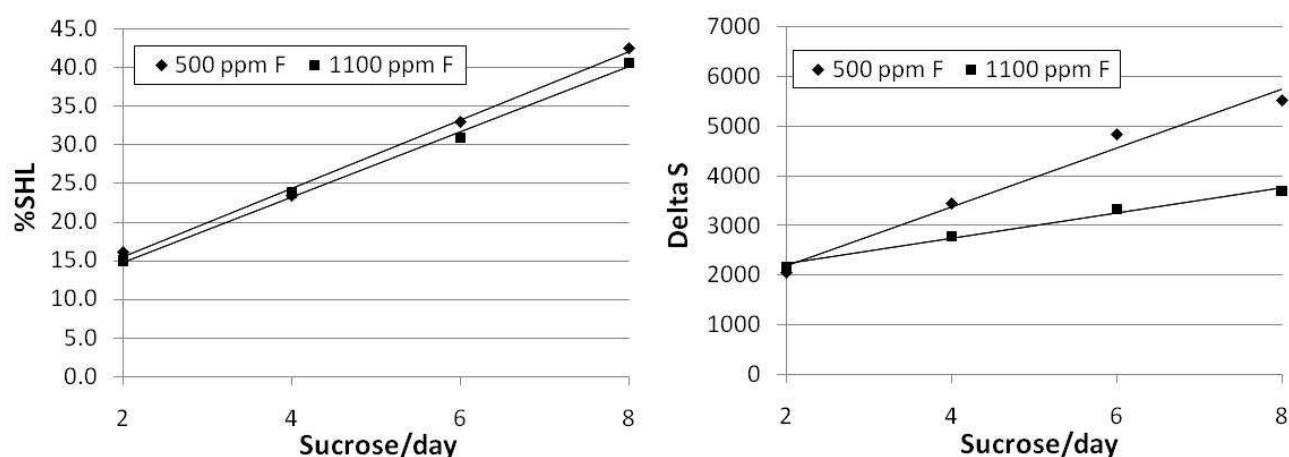


Figure 2: Linear regression fits of % SHL and ΔS as a function of frequency of sucrose use for both dentifrices. The fits were significant ($p < 0.05$), except for ΔS under the use of the 1,100 ppm F dentifrice ($p > 0.05$).

For F concentration in enamel, ANOVA showed statistically significant effect for frequency of sucrose exposure ($p < 0.05$) but not for dentifrices ($p > 0.05$) (Table 3).

Table 3. Fluoride concentration in enamel ($\mu\text{g F/cm}^2$) according to dentifrices used and frequency of sucrose exposure (mean $\pm$ SD; $n=14$).

Dentifrice	Sucrose frequency	F in enamel ($\mu\text{g/cm}^2$)
500 ppm F	2x/day	2.03 ± 0.50
	4x/day	2.44 ± 1.12
	6x/day	2.76 ± 1.13
	8x/day	3.34 ± 1.60
1100 ppm F	2x/day	2.59 ± 1.70
	4x/day	2.29 ± 1.51
	6x/day	3.21 ± 1.78
	8x/day	4.12 ± 2.87

Data transformed to the $\log_{10}$ to fit the assumptions of ANOVA. Dentifrices did not differ from each other ($p > 0.05$). The effect of frequency of sucrose exposure was significant ($p < 0.05$), and was further studied using regression analysis.

Figure 3 shows the linear regression fit for the increasing frequencies of sucrose exposure for each dentifrice. Both regressions were significant ($p < 0.05$).

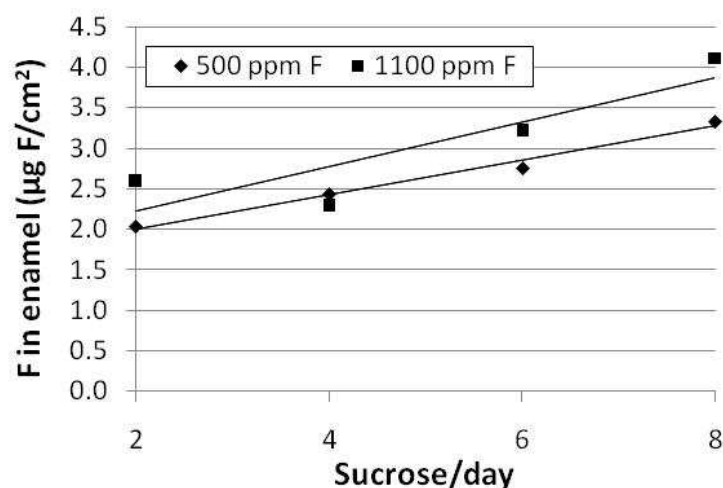


Figure 3: Linear regression fit of F concentration in enamel as a function of frequency of sucrose use for both dentifrices. Both fits were statistically significant ($p < 0.05$).

DISCUSSION

There is sound evidence on the effectiveness of conventional (1,100-1,500 ppm F) F dentifrices in caries control (23) and the indiscriminate recommendation that young children should use low fluoride dentifrices may jeopardize the anticaries benefits of this method of F use, since the effect of F dentifrice on caries is concentration dependent (7).

The findings of the present experimental study suggest that depending on the cariogenic challenge induced by increased frequency of sucrose exposure, low F dentifrice may not have the same anticaries effect as a dentifrice containing 1,100 ppm F. The data are in accordance with a clinical trial showing that 500 ppm F dentifrice does not have the same effectiveness to control caries as the 1,100 ppm F dentifrice for children presenting active caries lesions (9), who may be considered a high caries risk group.

In fact, F concentration in dental biofilm fluid and solids was higher when the 1,100 dentifrice was used when compared to the 500 ppm F dentifrice (Table 1). This higher concentration was found either soon after (15 min) toothbrushing or 10 h after the last use of dentifrice. These results confirm data observed in the fluid and solids of an *S. mutans* test plaque after the use of conventional and low-F concentration dentifrices using a short-term model (24). Interestingly, the twice-concentration difference between both dentifrices, clearly observed in the values of F concentration in the fluid 15 min after brushing (Table 1), is still maintained at about 1.6 times 10 h after brushing. Thus, although the concentration gradient in the fluid probably levels off with time, a significant difference between both dentifrices is still observed a prolonged period after brushing. Also, as shown previously, biofilm fluid F concentration does not change as a function of sucrose exposure (13), irrespective of F concentration in the solids (13,25).

Indeed, the clear kinetics of F in dental biofilm fluid according to F dentifrice use was not reflected in the biofilm solids. Although F concentration in biofilm solids 10 h after toothbrushing was about 1.4 times higher for the 1,100 ppm F dentifrice, brushing with the dentifrices only increased F concentration in the solids of biofilm formed under higher sucrose exposure (Table 1). This could be explained by the lower F concentration found when the biofilm was formed under increasing frequencies of sucrose exposure, which agrees with previous publications (13,16), and suggests that distinct types of F reservoirs are present in the solids of biofilm formed under exposure to carbohydrates at increasing frequencies, as previously discussed (25). Given that the high F concentration found in the biofilm formed under exposure to sucrose 2 times/day did not decrease even 10 h after brushing, the F reservoirs accumulated under low exposure to carbohydrates may not function as a source of F to the plaque fluid, as suggested previously (25).

Therefore, based on the higher F concentration in the fluid and solids of biofilm treated with the 1,100 ppm F dentifrice, either residual or soon after brushing, it should be expected that it performed better than the 500 ppm F dentifrice on the reduction of enamel demineralization. In fact, the area of hardness loss as a function of enamel depth (ΔS), an indicator of the area of mineral loss in caries lesion (19,26,27) only increased significantly with the higher frequencies of sucrose exposure for the 500 ppm F dentifrice (Figure 2). From calculations using the linear regression equations (data not shown), ΔS would increase 4.5 times per each unit of sucrose frequency for 500 ppm F dentifrice ($p=0.0097$) and 2.4 times for the 1,100 ppm F dentifrice ($p=0.0825$), suggesting that the 500 ppm F dentifrice has a lower effect to control caries than 1,100 ppm F when the cariogenic

challenge increases. Conversely, when the cariogenic challenge is low (plaque accumulation but exposure to sucrose only 2x/day) the low F dentifrice would have the same anticaries effect than the 1,100 ppm F. These results agree with a clinical trial showing that there is no difference between conventional and low F dentifrices used for children without active caries lesions, but in caries-active children their effect on the inhibition of lesion progression is clearly distinct (9).

On the other hand, enamel demineralization evaluated by %SHL increased with higher frequencies of sucrose exposure, but did not show a difference between both dentifrices (Table 2, Figure 2). This lack of difference is intriguing, and cannot be explained in simple terms. It is recognized that the presence of F is able to hinder enamel demineralization, since fluoride-containing minerals precipitate in enamel surface as the more soluble, carbonate-containing hydroxyapatite dissolves (28). The formation of a fluoride-rich surface layer may explain why F concentration in enamel increased as the cariogenic challenges became more frequent in the present study (Table 3, Figure 3). Although the F availability in the fluid of biofilm treated with the 1,100 ppm F dentifrice was 1.6 to 2 times higher than that treated with the 500 ppm F dentifrice, the driving force for F precipitation on enamel was probably high for both. Based on in vitro simulations of the kinetics of tooth minerals precipitation and dissolution, F concentrations as low as 5 μM were proposed to cause decreased enamel demineralization by this mechanism (29). Under in vivo-like situations, there is only one publication (30) evaluating the effect of F concentrations available in plaque fluid by F dentifrice use on tooth demineralization. The authors found, under the use of 1,100 ppm F dentifrice, which is able to significantly inhibit enamel and dentine demineralization, a residual plaque fluid concentration of about 3 μM ,

lower than the values found in the present study. Thus, it seems that the availability of F in biofilm fluid found for both dentifrices in the present study was able to consistently induce the precipitation of fluoridated minerals on the surface of enamel, impeding the detection of differences between them when the surface is analyzed either by %SHL or by F concentration. This may have been enhanced considering that deciduous enamel is richer in carbonate than permanent enamel (31), which would be exchanged to fluorapatite during the caries process. However, when the lesion progression deeper into enamel is considered, the higher effect of the 1,100 ppm F dentifrice becomes more evident. The findings suggest that the main effect of F retarding the rate of lesion progression (32) may be dose-dependent.

In summary, the findings of present study suggest that the high F availability in plaque, especially in the fluid, resulting from the use of 1,110 ppm F compared to 500 ppm F dentifrice is important to reduce caries lesion progression under a high frequency of sucrose exposure, and may help explain why the conventional concentration dentifrice is more effective to inhibit caries lesion progression in caries-active children.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the volunteers for their valuable participation, Waldomiro Vieira Filho for his technical assistance and Colgate-Palmolive (São Bernardo do Campo, SP, Brazil) for the dentifrices formulation. The manuscript was based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, SP, Brazil, in partial fulfillment of the requirements of the Master Program in Dentistry, concentration in Public

Health in Dentistry. The study was supported by FAPESP (2007/05994-3) and partial data were presented at the 56th ORCA Congress and the 39th AADR meeting.

REFERENCES

1. BRATTHALL D, HANSEL-PETERSSON G, SUNDBERG H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 1996; **104**: 416-22.
2. 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.
3. CLARK DC, HANN HJ, WILLIAMSON MF, BERKOWITZ J. Influence of exposure to various fluoride technologies on the prevalence of dental. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; **22**: 461-464.
4. MASCARENHAS AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; **22**: 269-277.
5. HOROWITZ HS. Commentary on and recommendations for the proper uses of fluoride. *J Public Health Dent* 1995; **55**: 57-62.
6. AMMARI AB, BLOCH-ZUPAN A, ASHLEY PF. Systematic review of studies comparing the anticaries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride or less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. *Caries Res* 2003; **37**: 85-92.
7. ELWOOD R, FEJERSKOV O, CURY JA, CLARKSON B. Fluoride in caries control. In: FEJERSKOV O, KIDD E, eds. *Dental caries: The disease and its clinical management*. 2nd. Oxford:Blackwell & Munksgaard, 2008; 287-323.

8. SONJU CLASEN AB, OGAARD B, DUSCHNER H, RUBEN J, ARENDS J, SONJU T. Caries development in fluoridated and non-fluoridated deciduous and permanent enamel in situ examined by microradiography and confocal laser scanning microscopy. *Adv Dent Res* 1997; **11**: 442-447.
9. LIMA TJ, RIBEIRO CC, TENUTA LMA, CURY JA. Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. *Caries Res* 2008; **42**: 46-50.
10. RODRIGUES CS, SHEIHAM A. The relationships between dietary guidelines, sugar intake and caries in primary teeth in low income Brazilian 3-year-olds: a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2000; **10**: 47-55.
11. NOBRE DOS SANTOS M, MELO DOS SANTOS L, FRANCISCO SB, CURY JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 2002; **36**: 347-352.
12. DUGGAL MS, TOUMBA KJ, AMAECHI BT, KOWASH MB, HOGHAM SM. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *J Dent Res* 2001; **80**:1721-1724.
13. CCAHUANA-VASQUEZ 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**: 9-15.

14. FEATHERSTONE JDB, ZERO DT. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; **71** (Spec issue): 804-810.
15. 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**: 339-344.
16. CURY JA, REBELLO MAB, DEL BEL CURY AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997; **31**: 356-360.
17. 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.
18. 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; **73**: 761-767.
19. SOUSA RP, ZANIN IC, LIMA JP, VASCONCELOS SM, MELO MA, BELTRÃO HC, RODRIGUES LK. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent* 2009; **37**: 44-51.
20. KOO H, CURY JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent* 1998; **11**: 173-176.

21. DELBEM AC, CARVALHO LPR, MORIHISA LKU, CURY JA. Effect of rinsing with water immediately after APG gel application on enamel demineralization *in situ*. *Caries Res* 2005; **39**: 258-260.
22. BOX GEP, HUNTER WG, HUNTER JS. *Statistics for experimenters*. New York: Wiley, 1978.
23. MARINHO VC, HIGGINS JP, SHEIHAM A, LOGAN S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (1): CD002278.
24. TENUTA LMA, CEREZETTI RV, DEL BEL CURY AA, TABCHOURY CPM, CURY JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res* 2009; **87**: 1032-1036.
25. TENUTA LMA, DEL BEL CURY AA, BORTOLIN MC, VOGEL GL, CURY JA. Ca, P_i, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 2006; **85**: 834-838.
26. 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**: 385-391.
27. KIELBASSA AM, WRBAS KT, SCHULTE-MONTING J, HELLWIG E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1999; **44**: 243-251.
28. TEN CATE, LARSEN MJ, PEARCE EIF, FEJERSKOV O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: FEJERSKOV O, KIDD E,

eds. *Dental caries: The disease and its clinical management*. 2nd. Oxford:Blackwell & Munksgaard, 2008; 209-231.

29. TEN CATE JM, DUIJSTERS PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res* 1983; **17**: 193-199.
30. 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**:369-79
31. SØNJU CLASEN AB, RUYTER IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res*. 1997;**11**:523-7.
32. FEJERSKOV O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; **38**: 182-191.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentifrício de baixa concentração de fluoreto tem sido recomendado tendo em vista o risco de fluorose devido à ingestão de dentifrício por crianças. Tanto essa recomendação como a de uso de dentifrício não fluoretado não tem sido feita com base em evidência, quer seja em relação ao benefício anticárie (Walsh *et al.*, 2009) como a do risco da fluorose decorrente (Wong *et al.*, 2010; Chankanka *et al.*, 2010).

Essa recomendação indiscriminada pode comprometer o benefício anticárie do uso de dentifrício fluoretado, particularmente em situação de risco aumentado de cárie, como a simulada no presente trabalho.

CONCLUSÃO GERAL

- 1- Dentifrício de 500 ppm F pode não garantir o mesmo benefício anticárie que o de 1.100 ppm F quando de risco aumentado de cárie.
- 2- Dentifrício de 500 ppm F não deve ser recomendado em termos de saúde pública tanto pela falta de evidência do seu benefício anticárie como do impacto da fluorose decorrente do uso de dentifrício de concentração convencional
- 3- Dentifrício de 500 ppm F poderia ser indicado individualmente desde que a criança tenha baixa atividade ou risco de cárie, entretanto seu uso não assegura a diminuição do risco de fluorose.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRATTHALL D, HANSEL-PETERSSON G, SUNDBERG H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 416-22.

BURT BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res*. 1992; 71 (Spec. Issue): 1228-37.

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; 20:13-16.

CHANKANKA O, LEVY SM, WARREN JJ, CHALMERS JM. A literature review o aesthetic perceptions of dental fluorosis and relationships with psychosocialaspects / oral health-related quality of life. *Community Dent Oral Epidemiol* 2010 *in press*.

DEAN HT, ELVOVE E. Some Epidemiological Aspects of Chronic Endemic Dental Fluorosis. *Am J Public Health Nations Health*. 1936; 26(6):567-75.

ELLWOOD RP, CURY JA. How much toothpaste should a child under the age of 6 year use? *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):168-74.

ELLWOOD R, FEJERSKOV O, CURY JA, CLARKSON B. Fluoride in caries control. In: FEJERSKOV O, KIDD E, eds. *Dental caries: The disease and its clinical management*. 2nd. Oxford:Blackwell & Munksgaard, 2008; 287-323.

FEJERSKOV O, THYLSTRUP A, LARSEN MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. *Acta Odontol. Scand* 1981; 39:241-9.

HOROWITZ HS. Commentary on and recommendations for the proper uses of fluoride. *J Public Health Dent* 1995; 55: 57-62.

KÖNIG KG. Role of fluoride toothpastes in caries-preventive strategy. *Caries Res* 1993; 27 (Suppl 1): 23-28.

MARINHO VC, HIGGINS JP, SHEIHAM A, LOGAN S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (1): CD002278.

MARTINS CC, PAIVA SM, LIMA-ARSATI YB, RAMOS-JORGE ML, CURY JA. Prospective study of the association between fluoride intake and dental fluorosis in permanent teeth. *Caries Res*. 2008; 42(2):125-33.

MASCARENHAS AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000; 22: 269-277.

PAIVA SM, LIMA YBO, CURY JA. Fluoride intake by Brazilian children from two communities with fluoridated water. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31: 184–191.

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

WALSH T, GLENNY A, WORTHINGTON HV, MARINHO VCC, APPELBE P. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents (Protocol for a Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 3, 2009.

WONG MC, GLENNY AM, TSANG BW, LO EC, WORTHINGTON HV, MARINHO VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 20(1):CD007693.

APÊNDICE 1 – Importância do F no fluido do biofilme na dinâmica do processo de cárie.

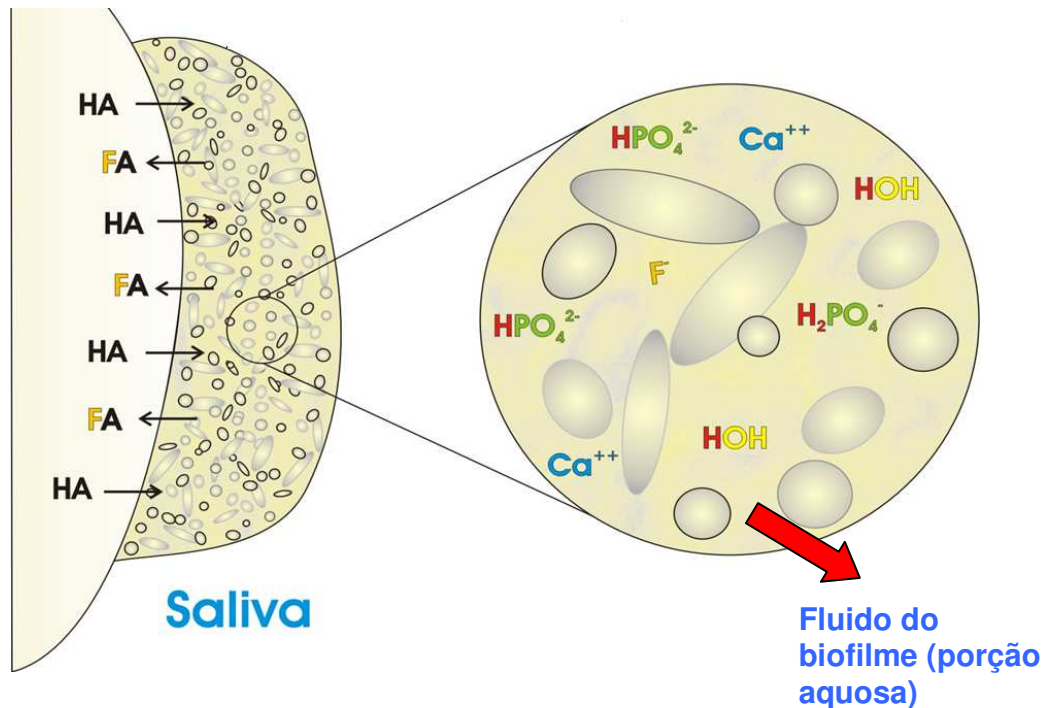


Ilustração – cortesia de Tenuta LMA.

A figura acima ilustra o processo físico-químico da desmineralização do esmalte quando da presença de F no fluido do biofilme. Assim, quando da ingestão de açúcares e pH menor que 5,5 há dissolução de hidroxiapatita (HA), porém até que o pH não seja menor que 4,5, havendo F no fluido do biofilme, parte do Ca e P liberados são reprecipitados no esmalte na forma de fluorapatita (FA). Como consequência, haverá redução da desmineralização do esmalte (Cury e Tenuta, 2008).

APÊNDICE 2– Ilustração da coleta do biofilme dental

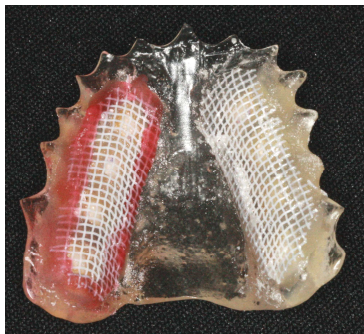


Figura A

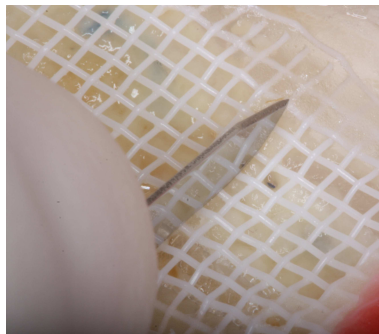


Figura B

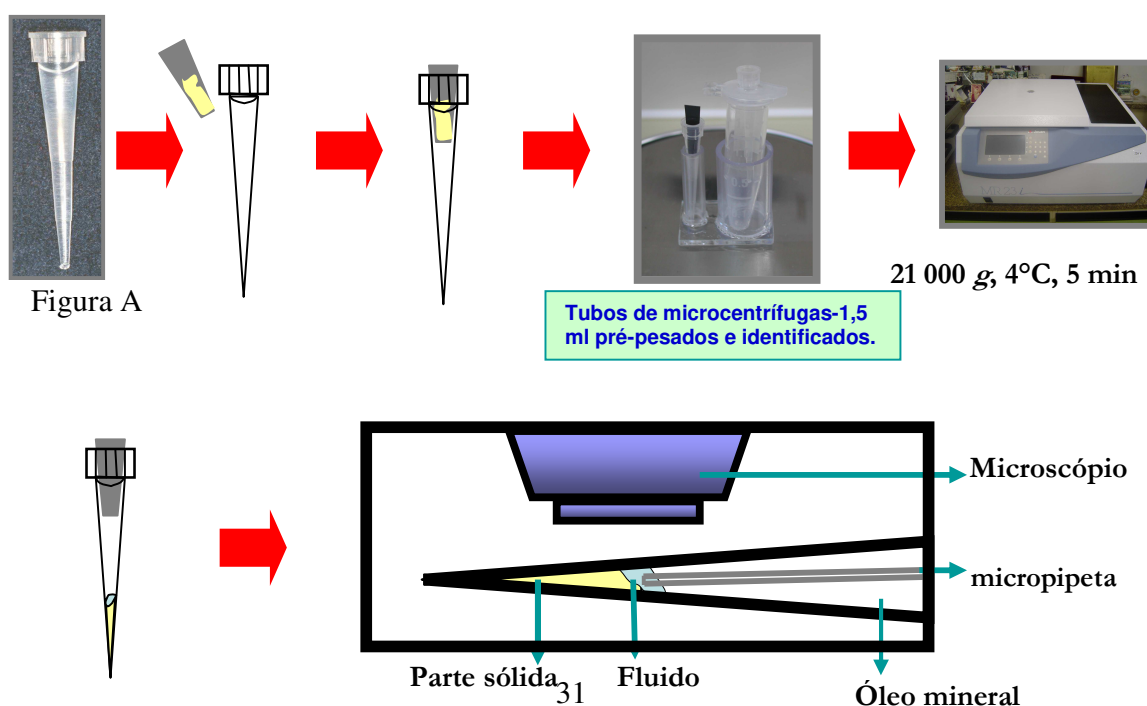


Figura C

No 14º dia de cada fase do experimento os voluntários compareceram ao laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 10 a 12 horas após o uso do dentifrício e da última exposição à sacarose. O biofilme dental formado sobre 2 blocos do dispositivo foi coletado (Figuras B e C).

Após a coleta, os voluntários escovaram seus dentes e o dispositivo acrílico (Figura A) e o colocaram novamente na cavidade bucal. Após 15 minutos, o biofilme dental foi coletado dos 2 blocos restantes.

Fluxograma da coleta do biofilme e extração do fluido (cortesia de Ccahuana-Vasques RA)



O biofilme foi imerso em óleo mineral, em um tubo preparado para este fim (Figura A).

O biofilme foi centrifugado sendo possível verificar após esse procedimento, através de um microscópio, a presença de 3 fases dentro da ponteira, a parte sólida do biofilme, o fluido (parte líquida do biofilme) e o óleo mineral que estava presente na ponteira.

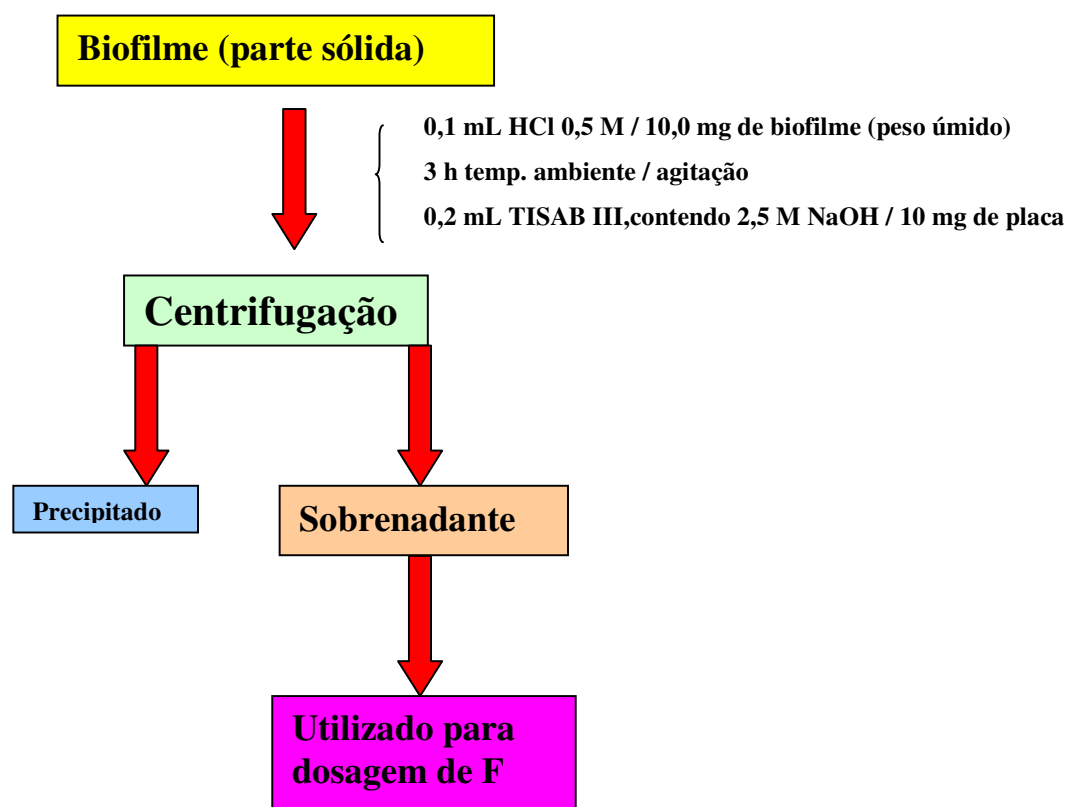
Com uma micropipeta, o fluido do biofilme foi então extraído para análise do F presente no mesmo.



Ilustração do aparelho utilizado para micro- análise de fluoreto.

As amostras de fluido do biofilme foram aplicadas na superfície do eletrodo sensível ao fluoreto sob óleo mineral, sendo diluídas com TISAB III (10:1), sob microscópio. Com o auxílio do microscópio, um micro eletrodo de referência foi posicionado em contato com as amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto através de um potenciômetro (cortesia de Tenuta, LMA).

APÊNDICE 3 – Fluxograma representando o tratamento da parte sólida do biofilme após retirar a parte líquida (fluido) para extração e dosagem de fluoreto



As análises de fluoreto foram realizadas no sobrenadante (Cury et al., 1997; Tenuta et al., 2006), utilizando a mesma metodologia descrita para o fluido.

APÊNDICE 4 – Ilustração do delineamento experimental.

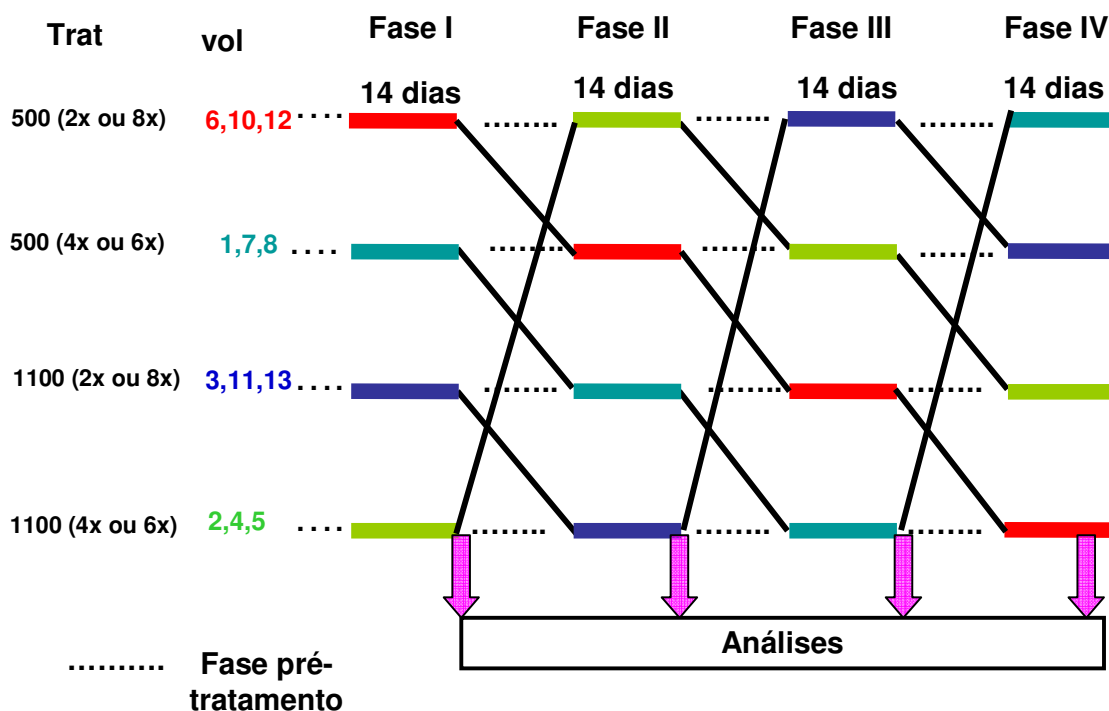
O estudo *in situ* foi conduzido em 4 fases de 14 dias cada fase, nas quais 14 voluntários utilizaram um dispositivo acrílico palatal contendo 8 blocos de esmalte decíduo, sendo 4 blocos para cada grupo de tratamento, totalizando 8 grupos de tratamento.

Os grupos de tratamento foram:

- 1 - gotear solução de sacarose 20%, 2x/dia e uso de dentifrício contendo 500 ppm F;
- 2 - gotear solução de sacarose 20%, 4x/dia e uso de dentifrício contendo 500 ppm F;
- 3 - gotear solução de sacarose 20%, 6x/dia e uso de dentifrício contendo 500 ppm F;
- 4 - gotear solução de sacarose 20%, 8x/dia e uso de dentifrício contendo 500 ppm F;
- 5 - gotear solução de sacarose 20%, 2x/dia e uso de dentifrício contendo 1100 ppm F;
- 6 - gotear solução de sacarose 20%, 4x/dia e uso de dentifrício contendo 1100 ppm F;
- 7 - gotear solução de sacarose 20%, 6x/dia e uso de dentifrício contendo 1100 ppm F;
- 8 - gotear solução de sacarose 20%, 8x/dia e uso de dentifrício contendo 1100 ppm F.

O delineamento do estudo foi cruzado em relação aos dentifrícios, boca dividida em relação à frequência de exposição à sacarose e duplo cego em relação ao uso do dentifrício.

Estudo cruzado:



Num estudo cruzado, todos os voluntários passam por todos os tratamentos, sendo os tratamentos aleatorizados por voluntário. Antes de começar o experimento e após cada fase do mesmo, os voluntários passaram por um período de fase pré-tratamento.

A fase pré-tratamento consistia de um período de 1 semana em que o voluntário não utilizava o dispositivo acrílico palatal e utilizava o dentífrico com concentração de fluoreto que seria utilizado na fase seguinte ao estudo.

Boca dividida:



No estudo boca dividida utiliza-se duas frequências de exposição à sacarose num mesmo dispositivo. Os dispositivos foram confeccionados com resina acrílica, sendo ao redor da tela (para acúmulo de biofilme dental) confeccionado em resina colorida para que o voluntário realizasse o gotejamento da solução de sacarose em horários determinados de acordo com a indicação.

Gotejar nos horários:	
—	08:00
—	09:30
11:00	11:00
—	14:00
—	15:30
—	17:00
—	19:00
21:00	21:00
Goteje solução de sacarose 20% - 2 ou 8x/dia Escove seus dentes 3 x ao dia	

Gotejar nos horários:	
08:00	08:00
11:00	11:00
14:00	—
15:30	15:30
19:00	—
21:00	21:00
Goteje solução de sacarose 20% - 4 ou 6x/dia Escove seus dentes 3 x ao dia	

Os horários do gotejamento foram fixados na capa da caixa onde o dispositivo acrílico palatal era entregue. O voluntário deixava o dispositivo na caixa somente quando estivesse alimentando-se e este era deixado em gaze úmida, ou no momento do gotejamento da solução, em que permanecia na caixa por 5 minutos.

APÊNDICE 5 – Ilustração do modo de escovação do dispositivo acrílico palatal.



Figura A



Figura B



Figura C



Figura D

O dispositivo acrílico era escovado em horários determinados (7:30, 12:30 e 20:00 h- 3x/dia) geralmente após as refeições dos voluntários, onde os voluntários escovavam seus dentes de modo habitual e escovavam o dispositivo conforme indicação:

- A parte acrílica em contato com o palato era escovada inicialmente (Figura B);
- Em seguida, a região central do dispositivo, entre as telas plásticas, era escovada (Figura C);
- Na região da tela, apenas a espuma proveniente da escovação era colocada sobre os blocos (Figura D);
- O enxágüe do dispositivo era realizado de tal forma que não fossem jatos de água sobre os blocos (tela plástica), apenas água suficiente para retirar a espuma, para que desta forma o biofilme não fosse perturbado.

Assim, após limpar o dispositivo, o voluntário era instruído a colocar novamente o dispositivo na cavidade oral. O dispositivo somente poderia ser retirado da cavidade oral para realizar as refeições e gotejar a solução de sacarose.

ANEXO 1: Comprovante de submissão do artigo

European Journal of Oral Sciences



Low fluoride dentifrice and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure

Journal:	European Journal of Oral Sciences
Manuscript ID:	EOS-4423-MAN-10
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	29-Jan-2010
Complete List of Authors:	Cury, Jaime; Piracicaba Dental School, UNICAMP, Department of Physiological Sciences Amaral, Regiane; Piracicaba Dental School, Physiological Sciences Tenuta, Livia; Piracicaba Dental School, Physiological Sciences Del-Bel-Cury, Altair; Piracicaba Dental School, Prosthodontics and Periodontology Tabchoury, Cinthia; Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Physiological Sciences
Research Area:	Cariology
Keywords (Please write 3 to 5 keywords according to Index Medicus):	fluoride, dentifrice, enamel, deciduous, biofilm



ANEXO 2: Instruções aos voluntários

1. O dispositivo intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, sendo removido da boca **apenas** durante as refeições ou quando você for comer ou beber alguma coisa.
2. Quando estiver fora da boca, **em nenhum momento o dispositivo deve ser deixado a seco**. Guarde-o no porta-aparelho, com uma gaze umedecida em água.
3. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação.
4. Utilize apenas o dentífrico fornecido.
5. Realize a higiene bucal normalmente, **3 vezes ao dia** (veja abaixo – Escovação).
6. **Não** utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza na cavidade bucal durante a fase experimental.
7. **Não** beba chá preto e chá verde durante o experimento, pois eles contêm grande quantidade de flúor.
8. Quando a pasta estiver acabando, entre em contato com a pesquisadora responsável para que seja repostada.

Gotejamento da solução de sacarose a 20%

1. Seu aparelho possui 8 blocos, 4 de cada lado.
2. Uma gota da solução de sacarose deverá ser aplicada sobre cada bloco, como seu aparelho possui 8 blocos, você gotejará 8 gotas.
3. O gotejamento da sacarose nos blocos deve ser realizado nos horários fixados na caixa do aparelho.

4. Para gotejar a solução, remova o dispositivo da boca, seque com gaze a região da tela e goteje uma gota da solução sobre cada bloco, evitando tocar a ponta do conta-gotas no dispositivo para não contaminar a solução. Aguarde 5 minutos e então recoloque o aparelho na boca.
5. Quando o gotejamento for realizado em apenas um dos lados do dispositivo, remova o excesso de sacarose que escorre pelo aparelho com uma gaze seca para evitar contaminar o lado que não foi gotejado.
6. Se o primeiro gotejamento do dia não puder ser realizado às 8 horas, goteje no horário possível e mantenha todos os outros gotejamentos. **É importante manter o total de gotejamento prescrito na caixa do aparelho!**
7. Sempre que gotejar a glicose, aguarde 5 min., nem mais, nem menos, e retorne o aparelho para a boca. **Não goteje a solução e deixe por mais de 5 minutos sem colocar o dispositivo na boca.**
8. O objetivo é que ocorra a formação de grande quantidade de placa sob a tela plástica; **não** tente remover a placa!

ESCOVAÇÃO:

1. Utilize somente a pasta de dente fornecida pelo pesquisador.
2. Realize a escovação dos seus dentes **3 vezes ao dia** (nem mais, nem menos) após as principais refeições, preferencialmente nos horários: 7:30, 12:30, e 20:00 h.

Modo de escovação:

1. Retire o aparelho da boca.
2. Escove seus dentes e enxágüe a boca do modo como está habituado.
3. Coloque mais creme dental na escova e escove o dispositivo, iniciando pela parte que entra em contato com o palato.
4. Na parte onde está a tela plástica, não escove a região da tela, para não remover o biofilme que está se formando. Escove na região entre as telas e passe a espuma do creme dental sobre a tela, com a lateral da escova de dente.

5. Enxágüe o dispositivo, tomando cuidado para que os jatos de água da torneira não atinjam a tela plástica de forma direta.

As soluções deverão ser trocadas toda segunda, quarta e sexta-feira. Solicitamos que você venha ao laboratório buscar a nova solução nesses dias.

Qualquer dúvida ou problema entre em contato pelos telefones:

2106-5303 – Laboratório de Bioquímica

Não deixe de ligar!!

ANEXO 3: Certificado do comitê de ética.



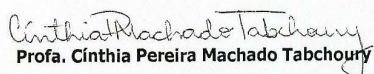
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



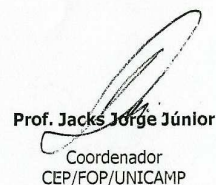
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Dentifrício de baixa concentração de fluoreto e redução da desmineralização do esmalte decíduo frente a alto desafio cariogênico**", protocolo nº **074/2007**, dos pesquisadores **JAIME APARECIDO CURY e REGIANE CRISTINA DO AMARAL**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/10/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Low fluoride dentifrice and deciduous enamel demineralization under high cariogenic challenge**", register number **074/2007**, of **JAIME APARECIDO CURY and REGIANE CRISTINA DO AMARAL**, 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 17/10/2007.


Profa. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
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.