

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - CARIOLOGIA**

**EFEITOS DE AGENTES TÓPICOS DE
FLÚOR DE BAIXA CONCENTRAÇÃO
SOBRE A SALIVA, BIOFILME E
ESMALTE DENTAL**

Daniela Correia Cavalcante Souza

**Porto Alegre
Dezembro, 2007.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - CARIOLOGIA**

Linha de Pesquisa:

Diagnóstico e tratamento da doença cárie

**EFEITOS DE AGENTES TÓPICOS DE FLÚOR DE BAIXA
CONCENTRAÇÃO SOBRE A SALIVA, BIOFILME E
ESMALTE DENTAL**

Daniela Correia Cavalcante Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lina Naomi Hashizume

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Maltz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica - Cariologia.

Porto Alegre, dezembro de 2007.

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas,
ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo
de dissimulado, interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos
amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas
podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém
pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem
sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido
amanhã.
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso
pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é entre
você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

À *Deus*, por ser a luz que ilumina meu caminho. Obrigada por todas as graças que me dá diariamente.

Aos meus pais, *Eliane e Jader*, meus grandes amores, que sempre me cercaram de carinho e atenção, sempre estiveram presentes mesmo distantes, dando apoio e incentivo às minhas decisões. Com vocês aprendi a ser acima de tudo humana, a ir em busca das minhas realizações com entusiasmo e humildade, a saber enfrentar as dificuldades não deixando que elas endureçam meu coração e sim o fortaleçam. Deus foi muito generoso comigo quando me colocou na vida de vocês. Minha eterna gratidão pelo suporte e exemplo que são para a minha vida!

Ao meu marido *Chris*, grande incentivador que despertou em mim o interesse pela ciência, por acreditar no meu potencial, e por me ensinar todos os dias a ser uma pessoa melhor. És exemplo de perseverança, determinação e caráter! Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelo companheirismo, compreensão e paciência.

Dedico esse trabalho

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. *Lina Naomi Hashizume*, minha orientadora e amiga, por todas as oportunidades concedidas, pela confiança que sempre depositou em mim e por auxiliar de forma valiosa no meu desenvolvimento intelectual. Minha eterna gratidão pelo incentivo, dedicação e por se preocupar com a minha formação e o meu futuro.

À co-orientadora, Prof^ª. Dra. *Marisa Maltz*, por me receber de portas abertas, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Obrigada pela brilhante contribuição e ajuda neste trabalho.

Aos meus queridos amigos e colegas de mestrado, especialmente à *Márcia Gomes, Renata Franzon, Letícia W. Bento, Sheila N. Salle, Cinthya A. D. Guarienti, Juliana Travessas, Renata Licks, Marcius C. Wagner, Fabrício Mezzomo*, obrigada pelos bons momentos compartilhados durante o curso, pela amizade e pelo carinho.

À minha amiga *Luciana Malheiros*, pela pessoa simplesmente incrível que é e que admiro muito. Obrigada pela amizade sincera, minha anjinha e conselheira, por todos os momentos compartilhados durante esta caminhada, pela força e incentivo. Amo muito você!

À querida amiga *Karina P. Rodriguez*, pela amizade que construímos e por todos os bons momentos, sempre nos apoiando nos momentos difíceis. Obrigada por ter tornado esta caminhada mais leve. Nunca te esquecerei, estarás sempre no meu coração!

À amiga *Fernanda Giongo*, por ser tão zelosa comigo e por tornar meus dias muito mais alegres. Agradeço pela tua amizade e presença constante, és a amiga de todas as horas, de todos os dias e que, com certeza, será a amiga de todos os anos da minha vida.

À querida amiga Prof^ª. *Grasiela de Carli*, pela amizade e carinho que tens por mim. Obrigada por estar ao meu lado quando precisei, e por saber que posso contar contigo. És muito especial para mim!

À Prof^a. *Clarissa C. F. Parolo*, pela amizade e ensinamentos compartilhados. Cacá, tenho um profundo carinho e admiração por ti, és um exemplo de dedicação e competência. Obrigada pelo incentivo e pela torcida para que tudo desse certo.

À Prof^a. *Juliana J. Jardim* pela ajuda e incentivo. Obrigada pela tua disponibilidade em discutir a metodologia do trabalho e por tantas dúvidas resolvidas.

Às Prof^{as}. *Berenice Barbachan e Silva e Débora Heller* pela agradável e alegre convivência, pelos inúmeros momentos de risadas e descontração.

À Prof^a. *Carla Pitoni* pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À colega *Adriela Mariath* pela presteza e disponibilidade em me ajudar.

À amiga e aluna de iniciação científica *Morjana Eidelwein*, pelo carinho, ajuda e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos ex-alunos de iniciação científica *Larissa Hermann e Luiz Makito*, por toda ajuda e dedicação durante o tempo em que participaram no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga e aluna de iniciação científica *Camila Blanco*, pela amizade, por estar sempre pronta a ajudar, pelas conversas e risadas.

Aos queridos amigos e alunos de iniciação científica *Maurício Moura, Juliana Rosa, Caroline Weber, Alessandra Damo*, pelo carinho e por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre.

Aos meus *voluntários*, pela disposição, boa vontade e dedicação. Vocês foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Muito obrigada por toda a colaboração!

Ao colega *Anderson Graziani Mantovani*, pela atenção e disponibilização dos dentes bovinos.

À amiga *Caroline Goulart* pela carinho, pelo apoio e por estar sempre pronta a ajudar.

Às funcionárias *Marilda e Marlei*, pelo carinho, bom humor e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos funcionários da portaria da FO *Pedro, Carlos, Antônio e Rodrigo*, pelo carinho, cuidado e apoio nos feriados e fins de semana que passei no laboratório.

Aos *professores e funcionários* do Departamento de odontologia Preventiva e Social da FO-UFRGS.

À *coordenação, professores e funcionários* do Programa de Pós-graduação da FO-UFRGS.

Ao Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) da Faculdade de Engenharia da UFRGS e ao Prof. Dr. *Carlos Pérez Bergmann*, pela disponibilização do uso do microdurômetro.

Ao amigo *Antônio Takimi*, pelo incentivo e por toda a confiança em mim depositada no período das análises de microdureza. Obrigada por ser tão prestativo e estar sempre disposto a ajudar!

Ao colega *Frederico*, pela atenção e auxílio durante o uso do microdurômetro no LACER.

Ao Laboratório de metalurgia Física - LAMEF, pela disponibilização do uso da câmera fotográfica digital, especialmente ao Prof. Dr. *Afonso Reguly* e ao Prof. Dr. *Carlos Eduardo Fortis*.

Ao técnico do LAMEF *Anderson K. Pelufa*, pelo carinho e disponibilidade de seu tempo em ensinar a utilização dos equipamentos.

À *DentalPrev*, pela presteza e doação de produtos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À *Universidade Federal de Alagoas – UFAL*, pela minha formação acadêmica.

À *PROPESQ/UFRGS*, pelo auxílio ao projeto de pesquisa.

À *CAPES*, pela bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. PROPOSIÇÃO.....	20
3. ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	21
4. ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CaF₂ – fluoreto de cálcio

CSMH - cross-sectional microhardness

F - flúor

FA - fluorapatita

HA - hidroxiapatita

H₂O - água

HCl - ácido clorídrico

KHN - knoop hardness number

NaF - fluoreto de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

P₂O₅ - pentóxido de fósforo

rpm - rotações por minuto

SMH - microhardness surface

TISAB - total ionic strength adjustment buffer

%SMC - percentage of surface microhardness change

µm - micrometro

ΔZ - subsurface mineral loss

RESUMO

Esta dissertação é constituída de dois artigos e teve como objetivo avaliar se o uso adicional de solução fluoretada para bochecho (SF) ao uso de dentifrício fluoretado (DF) é equivalente ao aumento da frequência de aplicação do DF em relação (1) às mudanças clínicas na superfície do esmalte, na sua desmineralização e no seu conteúdo de flúor; (2) à concentração de flúor na saliva e no biofilme dental 8 horas após os tratamentos. No primeiro artigo, quinze voluntários participaram de um estudo *in situ*, onde utilizaram dispositivos mandibulares contendo blocos de esmalte dental bovino. Durante os 3 períodos experimentais, de 14 dias cada, os espécimes foram expostos a um alto desafio cariogênico pelo gotejamento de solução de sacarose 20%, 8 vezes ao dia. O estudo teve um delineamento cruzado e os voluntários foram submetidos aos seguintes tratamentos: (T I) escovação com DF (1100 ppm F na forma de NaF) 2x/dia + H₂O; (T II) DF 2x/dia + H₂O + SF (225 ppm F na forma de NaF) 1x/dia; (T III) DF 3x/dia + H₂O. Ao final deste período, os blocos foram removidos e avaliados em relação às mudanças nas características clínicas de superfície e submetidos às análises de microdureza superficial e transversal e do conteúdo de flúor no esmalte. De acordo com os resultados, o uso do DF 3x/dia foi o único tratamento que diferiu do uso do DF 2x/dia em relação às mudanças na superfície do esmalte e na sua desmineralização ($p < 0,05$). Em relação ao conteúdo de flúor no esmalte, as diferenças entre os tratamentos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). No segundo artigo, através de um estudo *in vivo* foram avaliadas as concentrações de flúor na saliva e no biofilme dental 8 horas após o uso dos tratamentos. Quarenta voluntários foram submetidos a diferentes frequências de uso de DF ou dentifrício placebo (DP) por 1 semana, seguido de enxágüe com água ou água e SF, de acordo com o delineamento cruzado, em 4 grupos de tratamento: (T I) DP 2x/dia + H₂O; (T II) DF 2x/dia + H₂O; (T III) DF 2x/dia + H₂O + SF 1x/dia; (T IV) DF 3x/dia + H₂O. Após cada período experimental, as amostras de saliva e biofilme dental foram coletadas para análise dos níveis de flúor. As concentrações de flúor nas amostras de saliva e biofilme dental não diferiram significativamente entre os tratamentos, assim como não diferiram do período livre de flúor ($p > 0,05$). Podemos concluir em relação ao primeiro artigo que o aumento da

freqüência de uso do DF pode substituir o uso adicional de SF aos procedimentos convencionais de escovação com DF. Em relação ao segundo artigo, os resultados sugerem que o uso do DF 2x/dia seguido por SF ou escovação extra com DF não aumenta a retenção de flúor na saliva e no biofilme dental após 8 horas.

Palavras-chave: Flúor, Dentifrício, Bochecho, Saliva, Biofilme dentário, Esmalte dentário

ABSTRACT

This master thesis presents two articles aiming to assess whether the additional daily use of fluoride mouthrinse (FR) (225 ppm F as NaF) to the use of fluoride dentifrice (FD) (1100 ppm F as NaF) is equivalent to increase the FD application frequency (1) on enamel surface changes, demineralization and fluoride content; and (2) on the fluoride levels in saliva and dental biofilm samples 8 hours after treatments. In the first article, the subjects (15) used a mandibular appliance containing blocks of bovine enamel with microhardness determined previously. During the three experimental phases, 14 days each, the specimens were exposed to a high cariogenic challenge from dripping 20% sucrose solution 8 times/day. The volunteers were submitted, under a crossover design, to 3 treatment groups: (T I) 2x/day FD + H₂O; (T II) 2x/day FD + H₂O + 1x/day FR; (T III) 3x/day FD + H₂O. At the end of each experimental phase, the enamel blocks were assessed with respect to surface clinical changes, surface and cross-sectional microhardness and total fluoride content. The 3x/day FD usage was the only treatment tested that differed from the conventional twice daily toothbrushing procedures on reducing enamel surface changes and demineralization ($p < 0.05$). Regarding to the enamel fluoride content, the differences among treatments were not statistically significant ($p > 0.05$). In the second article, the fluoride concentrations in saliva and dental biofilm 8 hours were analyzed after the use of treatments. The subjects (40) were submitted to different frequencies of use of FD or placebo dentifrice (PD) for 1 week to 4 treatment group: (T I) 2x/day PD + H₂O; (T II) 2x/day FD + H₂O; (T III) 2x/day FD + H₂O + 1x/day FR; (T IV) 3x/day FD + H₂O. After each experimental period, samples of saliva and dental biofilm were collected for fluoride levels analysis. Fluoride concentrations in saliva and dental biofilm did not differ statistically among treatments, as well as they did not differ from the F-free period ($p > 0.05$).

Key-words: Fluoride, Dentifrice, Mouthwashes, Saliva, Dental biofilm, Dental enamel

1. INTRODUÇÃO

A redução na prevalência de cárie dentária observada mundialmente nas últimas décadas tem sido relacionada ao uso disseminado de fluoretos, principalmente na forma de dentifrícios (BRATTHALL et al., 1996; CLARKSON e MCLOUGHLIN, 2000; BAMBRILLA, 2001; CURY, 2001; MARINHO et al., 2003). Apesar do declínio da prevalência de cárie na maioria dos países, a doença ainda é um grande problema para adultos e crianças (KASTE et al., 1996).

A doença cárie é consequência do desequilíbrio entre o processo de desmineralização (DES) e remineralização (RE). O desenvolvimento da cárie é um processo dinâmico que depende das condições prevalentes na interface biofilme dental/esmalte-dentina. A concentração de íons hidrogênio (pH) e a composição inorgânica do biofilme dental estabelecerá as condições de subsaturação ou supersaturação que favorecerá a DES ou a RE (CURY, 2001).

O esmalte dentário embora seja um sólido microporoso composto por cristais firmemente unidos, não é uma estrutura inerte, permitindo a liberação de íons minerais do tecido dentário bem como a sua aquisição, de acordo com as variações do pH do meio ambiente. Em condições de equilíbrio, essa liberação e aquisição de minerais ocorre de forma compensatória, não causando prejuízos à estrutura dentária (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

As estruturas mineralizadas do dente realizam constantemente trocas iônicas com os fluidos orais numa relação de equilíbrio entre perda e ganho de minerais. Um desequilíbrio no processo de DES e RE acarreta desde pequenas perdas (lesões subclínicas), até perdas minerais observadas clinicamente (manchas brancas e formação de cavidades) (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995). O flúor proveniente dos dentifrícios é importante pela sua capacidade de interferir com a iniciação e progressão da lesão de cárie, além de repor perdas minerais no tecido dental. Estas propriedades terapêuticas do flúor, explicam as vantagens obtidas pelo uso freqüente de dentifrícios fluoretados, no que se refere ao controle e à prevenção de cáries (DJIKMAN et al., 1990).

O flúor tem um importante papel (CLARKSON e MCLOUGHLIN, 2000; BRAMBILLA, 2001) na redução da prevalência de cárie por meio de três mecanismos: inibição da DES, ativação da RE (TEN CATE, 1999) e inibição da

formação do biofilme bacteriano (FEATHERSTONE, 1999). O flúor dinamicamente importante é aquele presente na cavidade bucal, participando diretamente nos processos de DES e RE, durante o processo cariioso, e não pela sua incorporação em baixa concentração no esmalte (ARENDS e CHRISTOFFERSEN, 1986; SEPPÄ, 1989; TEN CATE, 1990; CURY, 2001).

Quando um dente irrompe na cavidade bucal, fica sujeito às alterações do meio ambiente, e a saliva, por apresentar cálcio e fosfato, protege naturalmente a estrutura dentária. Porém, essa propriedade biológica da saliva é pH dependente, e fica limitada pelas variações do pH do meio, quer seja pelos produtos da dieta, quer seja pela conversão de açúcar em ácido pela placa. Assim, o conceito de pH crítico, que é de 5,5, define o limite da capacidade da saliva em proteger a estrutura mineral dos dentes. Porém, a presença constante do flúor na saliva altera suas propriedades físico-químicas com relação ao pH crítico da dissolução do esmalte. Dessa forma, durante os períodos de queda de pH para valores críticos, na presença de flúor, o dente perde cálcio e fosfato para o meio bucal em função da subsaturação em relação ao produto de solubilidade da hidroxiapatita (HA), e ganha cálcio, fosfato e flúor do meio, em função deste se manter ainda supersaturado ($4,5 < \text{pH} < 5,5$) em relação ao produto de solubilidade da fluorapatita (FA). Então, haverá uma troca da HA pela FA, que é um cristal mais resistente aos ataques ácidos (CURY, 2001).

A presença de flúor na saliva e no biofilme dental parece ser a forma predominante pela qual o flúor exerce seu efeito anticárie, pela redução do padrão de dissolução mineral do dente sob condições ácidas e pelo aumento da RE na superfície cristalina em níveis de pH acima do valor crítico (FEATHERSTONE, 1999; TEN CATE, 1999). O efeito cariostático do flúor ocorre de diversas maneiras. Uma delas é a incorporação do flúor no látice do cristal de hidroxiapatita formando fluorhidroxiapatita. Um segundo modo de ação é a formação de uma camada rica em um composto fluoretado, semelhante ao fluoreto de cálcio (CaF_2), adsorvido à superfície dentária (TEN CATE, 1999).

Para que o flúor seja efetivo por períodos mais prolongados, após a escovação e a subsequente remoção salivar, é necessário que seja depositado e lentamente liberado (TEN CATE, 1999). Acima de 100 ppm F forma-se CaF_2 , sendo o principal ou provavelmente o único produto da reação dos tecidos duros do dente provenientes de tratamentos com agentes tópicos fluoretados relativamente concentrados (ÖGAARD, 2001). O CaF_2 permanece aderido à superfície do esmalte

agindo como um reservatório que libera flúor quando o pH cai para níveis muito baixos, durante o processo cariioso (CRUZ e RÖLLA, 1991). Abaixo de 100 ppm F forma-se fluorapatita (flúor incorporado ao cristal do esmalte), aumentando a resistência a DES e interferindo na velocidade de progressão da lesão, uma vez que as lesões formadas na presença deste íon apresentam menor profundidade e extensão (TAKAGI; LIAO e CHOW, 2000).

Existem diversos métodos para aplicação tópica de flúor e estes podem ser classificados em agentes de aplicação profissional (géis, vernizes, soluções e espumas) ou de alta concentração de flúor, e agentes de auto-aplicação (dentifrícios e soluções para bochecho) ou de baixa concentração de flúor (MELLBERG, 1990).

A princípio, há pouca evidência de que um determinado método de aplicação tópica de flúor seja superior a outro em termos de eficiência (MARINHO et al., 2006). Dentre as opções disponíveis para o controle da cárie, os dentifrícios fluoretados são veículos efetivos para distribuir flúor para a população sendo que os mesmos são considerados indispensáveis no controle da doença (SCHEIE, 1992). O flúor proveniente dos dentifrícios é tão abrangente quanto da água fluoretada em termos de saúde pública, e em relação ao seu efeito cariostático (CURY, 2001). Os dentifrícios e as soluções para bochecho fluoretados são os métodos de uso caseiros mais utilizados para prevenção ou inibição da cárie (MELLBERG, 1990; TATEVOSSIAN, 1990). Através da aplicação diária de dentifrício fluoretado, os dentes são continuamente expostos a concentrações salivares de flúor significativamente elevadas (DUCKWORTH, MORGAN e MURRAY, 1987; DUCKWORTH et al., 1992).

Maia, Souza e Cury (2003), em um estudo *in vitro*, mostraram que o F melhora o potencial de RE da saliva. Nesse estudo, blocos de esmalte dental humano foram submetidos ou não a um alto desafio cariogênico e tratados ou não com dentifrício fluoretado. Pela análise de microdureza superficial Knoop foi verificado que os blocos submetidos a um alto desafio cariogênico apresentaram uma perda mineral menor quando tratados com dentifrício fluoretado. Os autores concluíram que o flúor é eficiente para interferir na progressão da doença, mas não impede seu desenvolvimento.

Estudos *in situ* e *in vivo* demonstram que a escovação com dentifrício fluoretado é eficaz na remineralização de lesões de cárie incipientes, provocando uma maior redução na profundidade das lesões e na perda mineral quando

comparada à escovação com dentifrício sem flúor. O dentifrício fluoretado também se mostra eficaz na deposição de flúor na superfície do esmalte. Os resultados destes estudos mostram que há um aumento no conteúdo mineral em torno de 30 a 35 % quando a escovação é realizada 2 ou 3 vezes ao dia com dentifrício fluoretado (1000 – 1250 ppm F), e que a escovação com dentifrício sem flúor apresenta metade do benefício da escovação com flúor na remineralização de lesões em esmalte. Concluem que esta eficácia deve-se ao efeito associado do flúor à regularidade da escovação (MELLBERG et al., 1985; DOS SANTOS; KOO e CURY, 1998).

A efetividade dos dentifrícios fluoretados na redução da incidência de cárie foi demonstrada através de estudos epidemiológicos. Estes estudos foram analisados em revisões da literatura mostrando que a freqüência de escovação (2 vezes ou mais) associada ao uso de dentifrício fluoretado (1000, 1500 ou 2500 ppm F) promove redução significativa da experiência de cárie, variando de 21 a 40 % (MELLBERG, 1991; ÖGAARD, SEPPÄ e RÖLLA, 1994; ASHLEY, 2001; NEWBRUN, 2001).

Os resultados de estudos clínicos e laboratoriais não se mostram consensuais em relação à concentração de flúor que deve ser utilizada em dentifrícios com objetivo de atingir um efeito cariostático seguro e ótimo (NEGRI e CURY, 2002). Em uma revisão da literatura sobre o efeito cariostático de dentifrícios fluoretados, Zupan (2001) observa uma grande variedade de resultados com uma tendência a um efeito dose-resposta, favorecendo o uso de dentifrícios com concentrações acima de 1000 ppm F.

As soluções fluoretadas para bochecho também são métodos simples de auto-aplicação de flúor. Atualmente, com a redução na incidência de cárie observada em locais onde existem outros meios de acesso ao flúor, a indicação deste método limita-se a auxiliar no tratamento de pacientes com atividade da doença (MARINHO et al., 2006). As formulações de bochechos mais utilizadas são as soluções de fluoreto de sódio (NaF) a 0,2% ou a 0,05%. A freqüência (quinzenal, semanal ou diária) depende da atividade de cárie de cada paciente. Em termos coletivos tem sido recomendado o uso semanal ou quinzenal de bochechos de NaF a 0,2%. A indicação, em termos individuais, tem sido bochechos diários de NaF a 0,05% (CURY, 2001) ou a 0,2% (MALTZ, PAROLO e JARDIM, 2005).

Muitos estudos *in vivo* (ASHLEY et al., 1977; RINGELBERG et al., 1979; TRIOL et al., 1980; BLINKHORN et al., 1983; AXELSSON et al., 1987; KARJALAINEN et al., 1994) e *in situ* (MEYEROWITZ et al., 1991; VAN STRIJP et al., 1999; CURY et al., 2001; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al. 2007) mostraram que a frequência de aplicações tópicas de flúor em baixas concentrações é importante para o controle da atividade cariogênica.

Estudos clínicos que analisaram o efeito adicional do uso diário de solução fluoretada para bochecho ao dentifrício fluoretado são controversos. Alguns estudos mostram benefício do uso combinado da solução para bochecho e dentifrício fluoretados na redução da cárie dentária (RINGELBERG et al., 1979; TRIOL et al., 1980; KARJALAINEN et al., 1994), enquanto outros estudos não apresentam diferença do uso combinado destes agentes fluoretados em relação ao uso apenas do dentifrício fluoretados (ASHLEY et al., 1977; BLINKHORN et al., 1983; AXELSSON et al., 1987). Uma meta-análise sobre o efeito da solução fluoretada usada em associação ao dentifrício fluoretado apresentou dados favoráveis ao uso do regime combinado, mas as diferenças em relação ao uso isolado do dentifrício fluoretado não foram estatisticamente significativas (MARINHO et al., 2006). Entretanto, estudos *in situ* mostraram que o uso combinado de métodos tópicos de flúor em baixa concentração comparado ao uso de dentifrício fluoretado diminui a perda mineral (MEYEROWITZ et al., 1991) e aumenta o conteúdo de flúor do esmalte (VAN STRIJP et al., 1999).

Estudos de flúor no biofilme dental e na saliva têm mostrado que o uso regular de agentes fluoretados de baixa concentração, dentifrícios e soluções para bochechos, resultam em concentrações de flúor substancialmente elevadas nos fluidos orais (DUCKWORTH e MORGAN, 1991).

Duckworth, Morgan e Burchell (1989) encontraram uma associação entre o alto conteúdo de flúor no biofilme dental e o baixo incremento de cáries, destacando a importância do flúor retido adjacente ao sítio de ação. Acredita-se que o flúor acumulado no biofilme dental é liberado durante uma queda de pH e interage com os tecidos duros do dente, suprimindo a DES e aumentando a RE (TATEVOSSIAN, 1990).

Os níveis de flúor na saliva após aplicações tópicas de flúor dependem da concentração do agente fluoretado e do intervalo de tempo desde a última exposição (AASENDEN et al., 1968). Após a aplicação, o flúor é rapidamente removido da

cavidade bucal por forças físicas, entretanto o principal fator associado à remoção (clearance) do flúor é o efeito da diluição e lavagem salivar seguida pela deglutição periódica (AASENDEN et al., 1968).

Duckworth e Morgan (1991) testaram dentifrícios contendo 1000, 1500 e 2500 mgF/g, e observaram que o uso regular e contínuo destes agentes manteve aumentada às concentrações de flúor, tanto na saliva quanto no biofilme dental entre uma aplicação e outra, comparadas as obtidas com o dentifrício placebo. Duckworth, Morgan e Burchell (1989) sugerem que a frequência de escovação pode influenciar, a longo prazo, a elevação da concentração de flúor no biofilme dental. Neste estudo, os resultados têm sido associados aos dados clínicos em relação à cárie dentária e suportam o conceito de que a elevação dos níveis de flúor na cavidade bucal, entre aplicações tópicas, pode ser um importante mecanismo do flúor no efeito cariostático.

Zero et al. (1988) observaram os níveis de flúor retidos na saliva, por um período de 24 horas, após o uso de dentifrício fluoretado associado ou não a uma solução fluoretada para bochecho. Os resultados deste estudo mostraram uma diferença significativa entre o grupo que utilizou dentifrício e soluções fluoretadas para bochecho àquele que fez uso somente do dentifrício fluoretado. As concentrações salivares de flúor foram > 1 ppm acima de 4 horas após o uso combinado de dentifrício fluoretado e solução fluoretada para bochecho, enquanto concentrações de flúor > 1 ppm persistiram apenas nas primeiras horas após o uso apenas de dentifrício fluoretado.

Concentrações salivares de flúor foram avaliadas *in vivo* após a utilização de dentifrício fluoretado (1.250 ou 1.500 ppm F) associado ou não a solução fluoretada para bochecho (225 ou 250 ppm F). Serra e Cury (1992) observaram que a concentração de flúor na saliva foi maior após bochecho com solução fluoretada do que após uso de dentifrício fluoretado, entretanto a retenção do flúor na saliva não aumentou após associação de bochecho e dentifrício fluoretados. Campus, Lallai e Carboni (2003), apesar de observarem maiores níveis de flúor após o uso combinado de bochecho e dentifrício fluoretados, não constataram diferença na curva de remoção (clearance) do flúor quando comparado ao uso apenas do dentifrício fluoretado.

O tempo em que às concentrações de flúor permanecem elevadas pode influenciar a eficácia da absorção de flúor em um biofilme dental recém formado

(DUCKWORTH e MORGAN, 1991). Sidi e Wilson (1991) concluíram que o efeito benéfico do aumento da concentração de flúor no biofilme interproximal observado após 1 hora, é perdido nas 24 horas seguintes. Na maioria dos estudos, as amostras de biofilme dental analisadas foram coletadas, entre 30 e 180 minutos, após o uso dos agentes fluoretados (DUCKWORTH e MORGAN, 1991; SJÖGREN et al., 1996; CAMPUS, LALLAI e CARBONI, 2003).

A maior parte dos estudos que avaliam os níveis de flúor na saliva são estudos de remoção (clearance) do flúor, os quais monitoram a diminuição das concentrações de flúor nas primeiras horas após uma única aplicação de flúor (OLIVEBY et al., 1990; DUCKWORTH et al., 1991; AFFLITO et al., 1992; VOGEL et al., 1992; SJÖGREN e BIRKHED, 1993, 1994; SJÖGREN et al., 1996; SEPPÄ et al., 1997; FUKUSHIMA et al., 2000; SJÖGREN e MELIN, 2001; ISSA e TOUMBA, 2004).

Poucos estudos avaliaram os níveis de flúor na saliva e no biofilme dental por períodos mais prolongados, correspondentes a intervalos entre escovações diárias (ZERO et al., 1992; HEIJNSBROEK et al., 2006). Os resultados destes estudos mostraram que a manutenção de níveis benéficos de flúor, desde o último procedimento de higiene bucal (6-7 horas) com dentifrício fluoretado associado ou não a solução fluoretada, não foi refletido no biofilme dental recém formado, apenas na saliva. Entretanto, deveria existir uma relação positiva entre as concentrações de flúor na saliva e no biofilme dental após os procedimentos de higiene (DUCKWORTH et al., 1987; WHITFORD et al., 2002). Uma vez que os estudos mostram que a frequência de escovação influencia na retenção de flúor, e frente a uma não concordância da literatura em relação ao uso combinado de agentes tópicos fluoretados de baixa concentração, esta dissertação teve como objetivo avaliar *in situ* e *in vivo* se o uso de solução fluoretada para bochecho em adição ao uso diário de dentifrício fluoretado é equivalente ao aumento da frequência de uso de dentifrício fluoretado, na prevenção da desmineralização do esmalte e na manutenção de níveis elevados de flúor na saliva e no biofilme dental.

2. PROPOSIÇÃO

Esta dissertação será apresentada na forma de dois artigos, tendo como objetivos avaliar se o uso adicional de uma solução fluoretada para bochecho ao dentífrico fluoretado é equivalente ao aumento da frequência de aplicação do dentífrico fluoretado em relação:

Artigo Científico 1: Às mudanças clínicas na superfície do esmalte, na sua desmineralização e no seu conteúdo de flúor.

Artigo Científico 2: Às concentrações de flúor na saliva e no biofilme dental 8 horas após os procedimentos de higiene bucal.

3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Effects of low concentration fluoride agents on enamel demineralization: an *in situ* study

Souza DCC, Hashizume LN, Maltz M

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Key words: Fluoride, Dentifrice, Mouthwashes, Dental enamel, Demineralization

Address: Marisa Maltz

Faculdade de Odontologia - UFRGS

Departamento de Odontologia Preventiva e Social

Ramiro Barcelos, 2492

Bom Fim, Porto Alegre, RS

Brazil

CEP: 90035-003

Telephone: +55 51 33085247

Fax: +55 51 33085189

E-mail: mmaltz@ufrgs.br

Abstract

The effect of the combination of fluoride methods in low concentration on the inhibition of enamel demineralization under a high cariogenic challenge is not clearly established. Upon that, this *in situ* crossover study aimed to assess whether the additional daily use of fluoride mouthrinse (FR) to fluoride dentifrice (FD) is equivalent to increase FD application frequency on enamel surface changes, demineralization and fluoride content. During 3 phases of 14 days each, 15 volunteers wore mandibular appliances, containing bovine enamel blocks which were exposed to 20% sucrose solution 8 times/day and were submitted to 3 treatments groups: (T I) 2x/day FD + H₂O; (T II) 2x/day FD + H₂O + 1x/day FR; (T III) 3x/day FD + H₂O. Each treatment was followed by a 1 week washout period. At the end of each experimental phase, the enamel blocks were removed from appliances and were assessed with respect to surface clinical changes, microhardness and fluoride content. The 3x/day FD usage was the only treatment tested that differed from the conventional twice daily toothbrush procedures on reducing enamel surface changes and demineralization ($p < 0.05$). All treatments showed a statistically significant increase in enamel fluoride content compared to control blocks ($p < 0.05$), but the differences among them were not significant ($p > 0.05$). These findings indicate that the increase of FD application frequency can replace the additional use of FR to the conventional toothbrushing procedures with FD in the therapy of caries active lesions.

Key words: Fluoride, Dentifrice, Mouthwashes, Dental enamel, Demineralization

Introduction

Fluoride dentifrices are effective vehicles on delivering fluoride to the population, which is considered to be indispensable on controlling dental caries [Scheie, 1992]. Regular use of fluoride dentifrices may be a beneficial preventive measure for all countries, independently of caries experience and oral health care [Delbem et al., 2004]. Fluoride dentifrices greatest advantage compared to alternative forms of topical application is the regular exposure to low fluoride concentration, providing fluoride concentration increase in the enamel surface [Mellberg and Chomicki, 1983]. Mouthrinses are also simple methods of fluoride self-application, which show a 20 to 30% reduction when used for caries prevention [Petersson, 1993].

Studies to assess the additional effect of fluoride mouthrinse usage in association to fluoride dentifrice are controversial. Some of them show benefit in the reduction of dental caries [Karjalainen et al., 1994; Ringelberg et al., 1979; Triol et al., 1980], while others do not [Ashley et al., 1977; Axelsson et al., 1987; Blinkhorn et al., 1983]. A meta-analysis on the effect of fluoride mouthrinses used in combination with fluoride dentifrice provided data in favour of the combined regimen, but differences were not statistically significant [Marinho et al., 2006]. Based on these results, currently the indication of this procedure is limited to supplement active-caries patient treatments [Marinho et al., 2006].

Many *in vivo* [Ashley et al., 1977; Axelsson et al., 1987; Blinkhorn et al., 1983; Karjalainen et al., 1994; Ringelberg et al., 1979; Triol et al., 1980] and *in situ* [Ccahuana-Vásquez et al. 2007; Cury et al., 2001; Meyerowitz et al., 1991; van Strijp et al., 1999] studies showed that the frequency of fluoride topical applications in low concentration is important to the cariogenic activity control.

In situ studies which used fluoride mouthrinse in association with fluoride dentifrice showed that the combined use of fluoride topical methods in low concentration compared to fluoride dentifrice use as the single fluoride source decreases the mineral loss and increases the enamel fluoride content [Meyerowitz et al., 1991; van Strijp et al., 1999].

Once that the dose *per use* of dentifrices is similar to the mouthrinses, the present study aimed to assess whether the additional daily use of fluoride mouthrinse to fluoride dentifrice is equivalent to increase fluoride dentifrice application frequency on enamel surface changes, demineralization and fluoride content.

Materials and Methods

Experimental Design

This longitudinal *in situ* study was performed with a randomized single-blind crossover design in three phases of 14 days each. Fifteen subjects [11 female, 4 male, mean age 23.6 (\pm 2.8) years], residents in a fluoridated water supply area (0.7 ppmF), participate in this study. Inclusion criteria were: good general and dental health, normal salivary flow (\geq 0.7 ml/min), no antibiotics treatment or professional topical fluoride applications for the last 2 months before starting the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of Federal University of Rio Grande do Sul (Protocol N^o 35/06) and all participants signed an informed consent. Sample size calculation was based on previous findings using similar experimental protocol to estimate the data variability from enamel mineral loss [Paes Leme et al., 2004]. Considering a statistic power of 0.8, it was found a number of 15 subjects. A removable mandibular appliance containing 2 bovine dental enamel blocks was used and for each phase, a set of new enamel blocks was placed in the appliance's acrylic buccal flange.

Volunteers were randomly assigned, into three groups of treatments: T1 – use of a fluoride dentifrice twice a day (2x/day FD); T2 - use of a fluoride dentifrice twice a day followed by rinsing with fluoride solution once a day (2x/day FD plus 1x/day FR); T3 - use of a fluoride dentifrice three times a day (3x/day FD).

During 7 days of lead-in and wash-out periods, the volunteers brushed their natural teeth with a nonfluoride dentifrice to eliminate possible residual effects of previous treatments. Fluoride dentifrice (1100 ppm F as NaF, silica-based) and nonfluoride dentifrice (free-fluoride, silica-based), as well as fluoride mouthrinse (225 ppm F as NaF) were used (Dentics[®], Dentalprev Ind. e Com. Ltd., Brazil). The volunteers received instruction to wear the appliances day and night and to remove them only during meals or oral care. During volunteers' habitual oral hygiene with the experimental dentifrice for 1 minute, the appliances were removed and fluoride

dentifrice slurry (1:3 w/w) was dripped onto the specimens while the volunteers brushed their natural teeth [Paes Leme et al., 2004]. After brushing and before devices were put back again into mouth, the volunteers rinsed their mouths with 10 ml of tap water for 10 s [Hara et al., 2003]. This procedure was performed after toothbrushing for all treatments. When fluoride mouthrinse was used additionally (T2), the volunteers were instructed to rinse their mouths for 1 minute with 10 ml of the solution immediately after nocturne toothbrushing procedures after the devices replacement. To provide a high cariogenic challenge, the volunteers were instructed to drip a 20% sucrose solution onto the blocks 8 times/day.

Considering that the study followed a crossover design, the volunteers did not receive any advice with respect their daily diet. At the end of each experimental phase, the enamel blocks were removed from appliances and were assessed with respect to surface clinical changes, microhardness and total fluoride content.

Enamel Blocks and Mandibular Appliance Preparation

Enamel blocks (3 x 3 x 2 mm) were prepared from bovine incisors, being sterilized through storage a 2% formaldehyde solution, pH 7.0, for at least 1 month [White, 1987]. Enamel surfaces were ground and polished with wet sandpaper and a diamond paste in order to allow surface microhardness (SMH) determination [Arends and ten Bosh, 1992]. Ten specimens were stored (humid atmosphere at 4° C), to be used latter as positive control in fluoride analysis.

Specimens were fixed leaving a 1 mm recess from the external surface of the enamel to the appliance. A plastic mesh was placed over the enamel blocks in order to retain dental biofilm.

Clinical Observations

The enamel blocks were clinically assessed for determination of the presence of active white-spot lesions. A calibrated examiner (D.C.C.S.) performed the clinical diagnosis and the intra-examiner reliability was assessed after experimental periods from duplicate recordings (1 week interval) in 30% of the samples ($k=0.9$).

Microhardness Analysis

Surface microhardness (SMH) was evaluated using a microhardness tester (Micrometer[®] 2001, Buehler, Illinois, USA) with a Knoop diamond indenter under a 50 g load for 10 s. Prior to the treatments applications, the average of five indentations were taken for SMH determination. After this, enamel blocks were selected with a Knoop hardness number units (KHN) ranging from 295.21 to 360.81. After the treatments, the enamel surface microhardness (SMH) of every enamel blocks was again measured. Ten indentations spaced 100 µm from baseline indentations (five on each side) were taken and the mean values of all 10 measurements were then averaged. The percentage of surface microhardness change (%SMC) were calculated [$\%SMC = (SMH \text{ after treatments} - \text{baseline SMH}) \times 100 / \text{baseline SMH}$]. An average %SMC per volunteer was obtained from 2 blocks submitted to each of the 3 treatments.

After SMH analysis, every enamel blocks (submitted or not to the treatments) was longitudinally sectioned and one half was submitted to cross-sectional microhardness (CSMH) and the other half to posterior fluoride analysis. For CSMH determination, the specimens were embedded in epoxy resin (Araldite[®], Brazil) and the cut surfaces were exposed and polished. Three lanes of indentations were made: one in the enamel block's central region and the others 100 µm bellow and above this. Indentations were made at 10, 20, 30, 50, 70 µm from the outer enamel surface. Mean values at each distance from the surface were converted to mineral content (vol. % min.) according to Featherstone et al. [1983]. The extent of mineral loss (vol. % min. x µm) was described by subsurface mineral loss parameters (ΔZ) calculated by numerical integration using the trapezoidal rule.

Fluoride Analysis

All the surfaces of the blocks were covered with an acid-resistant nail varnish, except the polished surface. Three layers of enamel were sequentially removed from each dental block by immersion in 0.25 ml of an aqueous solution of 0.5 M HCl for 15, 30 and 60 s under agitation [Paes Leme et al., 2007]. An equal volume of TISAB II, pH 5.0, modified with 20 g NaOH/l, was added to each solution containing the dissolved enamel layer. Fluoride measurement was performed using a combination of a fluoride-sensitive electrode (Orion 9609, Orion Research Inc., USA)

connected to an ion analyzer (Procyon SA-720, Brazil). Fluoride quantities found in each layer were summed and expressed as $\mu\text{g F/cm}^2$ enamel surface.

Statistical Analysis

For statistical analysis, the volunteer was considered an experimental unit. Analysis of variances (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used to %SCM, CSMH and fluoride analysis. Student's t-test was applied to compare fluoride values between the test and control groups. The software used was SPSS 8.0. The significant level used was 5%.

Results

Two subjects were excluded due to antibiotic treatments and one subject failed to accomplish one experimental phase. These subjects were not included in the data analyses.

Clinical Observations

The clinical appearance of the demineralized specimens after treatment T1 showed a whitish surface characteristic of a typical active white-spot lesion. Clinical observations showed that the enamel blocks presenting white-spot lesions were diagnosed in 5, 1 and 2 subjects out of 12, after treatments T1, T2 and T3, respectively.

Microhardness Analysis

The data of surface microhardness after experimental periods are shown in table 1. The initial SMH were similar between the groups ($p>0.05$). Group T3 presented a lower %SMC compared to group T1 ($p<0.05$). The %SMC of groups T2 and T3 were similar ($p>0.05$).

Tab. 1. Mean (\pm SD) of surface microhardness (Kg/mm²) of the enamel blocks before and after the intraoral periods (SMH_I and SMH_F) and %SMC

Treatments	Surface Microhardness			
	n	SMH _I	SMH _F	% SMC
T1 (2x/day FD)	12	327.7 \pm 11.7	245.8 \pm 69.0	- 25.3 \pm 20.8 ^a
T2 (2x/day FD + 1x/day FR)	12	330.7 \pm 15.0	251.2 \pm 53.2	- 24.0 \pm 16.2 ^{ab}
T3 (3x/day FD)	12	333.6 \pm 14.6	296.4 \pm 30.4	- 11.0 \pm 8.9 ^b

FD = fluoride dentifrice

FR = fluoride rinse

SMH_I = initial superficial microhardness

SMH_F = final superficial microhardness

% SMC = surface microhardness change

Means followed by different letters are statistically significant ($p < 0.05$, ANOVA test, followed by Tukey's multiple comparison test)

Table 2 shows the CSMH analysis of treated enamel blocks. The treatments were not capable of eliminating enamel demineralization completely. They showed a similar mineral loss area ($p > 0.05$). When the depths were fixed, the group T1 statistically differed from the group T2 and T3 in the 10 μ m depth ($p < 0.05$), but did not differ statistically among them at other distance from the outer enamel surface ($p > 0.05$).

Tab. 2. Mineral content (vol. % min.) at each distance from the outer surface (μ m) and mineral loss (DZ) (mean \pm SD) according to each treatment

Treatments	Depth (μ m)					DZ (vol. % min. x μ m)
	10	20	30	50	70	
T1 (2x/day FD)	67.3 \pm 8.8 ^{Bc}	73.7 \pm 8.4 ^{Ab}	77.5 \pm 8.5 ^{Ab}	83.1 \pm 7.1 ^{Aa}	85.0 \pm 6.7 ^{Aa}	395.5 \pm 184.4 ^A
T2 (2x/day FD + 1x/day FR)	72.4 \pm 7.3 ^{Ad}	76.8 \pm 5.8 ^{Ac}	80.9 \pm 5.8 ^{Ab}	86.4 \pm 5.8 ^{Aa}	87.6 \pm 6.6 ^{Aa}	354.6 \pm 172.0 ^A
T3 (3x/day FD)	71.4 \pm 8.6 ^{Ac}	76.7 \pm 9.4 ^{Ab}	79.2 \pm 9.6 ^{Ab}	83.9 \pm 8.4 ^{Aa}	85.6 \pm 7.7 ^{Aa}	331.2 \pm 156.8 ^A

FD = fluoride dentifrice

FR = fluoride rinse

Means followed by different capital letters in the columns and different lower case letters in the rows are statistically significant ($p < 0.05$)

Fluoride Analysis

Table 3 shows fluoride content analysis of sound and treated specimens. The enamel blocks exposed to treatments showed a significant increase in the total fluoride content when compared to the control group ($p < 0.001$), but no significant differences could be observed among them ($p > 0.05$).

Tab. 3. Mean (\pm SD) of total fluoride content ($\mu\text{g F/cm}^2$) according to each treatment

Treatments	n	Total Fluoride ($\mu\text{g F/cm}^2$)
Control*	10	1.5 ± 0.5^a
T1 (2x/day FD)	12	8.2 ± 6.2^b
T2 (2x/day FD + 1x/day FR)	12	11.2 ± 5.3^b
T3 (3x/day FD)	12	9.8 ± 2.8^b

FD = fluoride dentifrice

FR = fluoride rinse

Means followed by different letters are statistically significant ($p < 0.001$, Student's t-test)

* Non-submitted to any treatment

Discussion

Topical fluoride therapy with a high frequency of fluoride dentifrice usage (3x/day) could increase the reduction of mineral loss if compared to routine brushing performed 2x/day FD, and it was similar to the combined use of 2x/day FD plus 1x/day FR. There is a trend to lessen the detection of visible white spot lesions by the use of 2x/day FD plus 1x/day FR and 3x/day FD compared to 2x/day FD usage. Despite the data above mentioned, the enamel blocks showed similar fluoride content after intra-oral periods for all treatments.

Holmen et al. [1985] showed that, under macroscopic examination after 2 weeks of exposure to an *in vivo* cariogenic environment, specimens displayed varying degrees of whitish surface changes. When a high cariogenic challenge exists, residual fluoride in saliva after fluoridated dentifrice daily use is able to reduce the enamel mineral loss but not to eliminate it [Paes Leme et al., 2004]. In the present study, there was a trend to a higher detection of white-spot lesions after 2x/day FD usage than after higher frequency of fluoride application (2x/day FD plus 1x/day FR and 3x/day FD). Ionic fluoride delivered by fluoride agents daily usage may diffuse into the dental biofilm, which become saturated by them. In this way, the presence of fluoride ions in the oral environment may interfere in the carious process by reducing or inhibiting demineralization [Issa et al., 2003]. It seems that specimens treated with a greater frequency of fluoride application had a preventive effect on the presence of enamel surface changes although a mineral loss might be present in

ultra-structural level [Holmen et al., 1985], since a decrease in microhardness was observed.

The greatest reduction in the % SMC was found after the use of 3x/day FD compared to 2x/day FD. The use of 3x/day FD did not differ from the combined use of 2x/day FD plus 1x/day FR. Although frequent fluoride topical application has reduced the % SMC, despite of the fluoride methods used in this study, they lacked efficiency to completely eliminating the enamel changes through induced cariogenic challenge. Similar % SMC was observed by Paes Leme et al. [2004] in an *in situ* study using 3x/day FD.

The present study showed that, despite the high cariogenic challenge, the fluoride content increased after topical fluoride application. Similar finding was observed by Paes Leme et al. [2007]. The treatments promoted similar increase regarding to enamel fluoride content. van Strijp et al. [1999] assessed *in situ* the effect of fluoride mouthrinse used in addition to fluoride dentifrice on the amount of acquired fluoride in demineralized enamel and dentine. The results showed that the combined use of fluoride agents on the enamel and dentin specimens showed a higher amount of adsorbed fluoride compared to fluoride dentifrice use. In the present study no additional effect could be observed by the combined use of fluoride dentifrice and mouthrinse compared with the fluoride dentifrice use. Since the fluoride content is dependent to the frequency of the topical application [Jardim, 2003; Lagerweij and ten Cate, 2002; van Strip et al., 1999], one possible explanation to the differences observed between these studies is the higher fluoride application frequency used by van Strijp et al. [1999].

Probably, this topical effect of fluoride agents on enamel were provided by indirect action of fluoride ions present in saliva and directly by the fluoride ions from topical application. A higher amount of fluoride content after intra-oral periods results from fluoride adsorption or/and increased incorporation of fluoride in the crystal lattice of hydroxyapatite or from a CaF_2 dissolution in periods of low pH, which induces the fluorhydroxyapatite precipitation. This might be favored by frequent periods of low pH provoked by the accumulated dental biofilm [van Strijp et al., 1999].

Considering the outcomes of all variables analyzed, it is concluded that the 3x/day FD usage was the only treatment tested that differed from the conventional twice a day toothbrushing procedures. These findings indicate that the increase of frequency of fluoride dentifrice application can substitute the additional use of fluoride

mouthrinse to the conventional toothbrushing procedures in the therapy of caries active lesions.

Acknowledgements

The authors thank the volunteers from the Faculty of Dentistry (UFRGS) for their valuable participation in this study; Laboratory of Ceramic Materials (LACER-UFRGS) for the use of the microhardness tester; DentalPrev Ind. e Com. Ltd., Brazil, for dentifrice and mouthrinse preparation and donation; and CAPES and PROPESQ/UFRGS for the financial support. The manuscript is part of a thesis submitted by the first author to the Faculty of Dentistry (UFRGS), as a partial fulfillment of the requirements for the Master's Degree in Clinical Dentistry, concentration area in Cariology.

References

- Arends J, ten Bosh JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71(Spec Iss):924-928.
- Ashley FP, Mainwaring PJ, Emslie RD, Naylor MN. Clinical testing of a mouthrinse and a dentifrice containing fluoride. A two-year supervised study in school children. *British Dental Journal* 1977;143:333-338.
- Axelsson P, Paulander J, Nordkvist K, Karlsson R: Effect of fluoride containing dentifrice, mouthrinsing, and varnish on approximal dental caries in a 3-year clinical trial. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1987;15:177-180.
- Blinkhorn AS, Holloway PJ, Davies TGH: Combined effects of a fluoride dentifrice and mouthrinse on the incidence of dental caries. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1983;11:7-11.
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA: Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 2007;41:9-15.
- Cury JA, Hashizume LN, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM: Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. *Caries Res* 2001;35:106-110.

- Delbem ACB, Carvalho LPR, Morihisa RKU, Cury JA: In vitro comparison of the cariostatic effect between topical application of fluoride gels and fluoride toothpaste. *J Appl Oral Sci* 2004;12:121-126.
- Featherstone JDB, 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.
- 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.
- Holmen L, Thylstrup A, Øgaard B, Kragh F: A scanning electron microscopy study of progressive stages of enamel caries in vivo. *Caries Res* 1985;19:355-367.
- Issa AI, Preston KP, Preston AJ, Toumba Kj, Duggal Ms: A study investigating the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. *Arch Oral Biol* 2003;48:567-571.
- Jardim JJ: Enamel caries lesions submitted to different treatments with topical fluoride in situ. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2003 (*in Portuguese*).
- Karjalainen S, Eriksson A-L, Ruokola M, Toivonen A: Caries development after substitution of supervised fluoride rinses and toothbrushings by unsupervised use of fluoride toothpaste. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994;22:421-424.
- Lagerweij MD, ten Cate JM: Remineralization of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. *Caries Res* 2002;36:270-274.
- Marinho VCC, Higgins JPT, Sheiham A, Logan S: Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1, CD002781.
- Mellberg JR, Chomicki WG: Effect of soluble calcium on fluoride uptake by artificial caries lesions in vivo. *Caries Res* 1983;19:122-125.
- Meyerowitz C, Featherstone JDB, Billings RJ, Eisenber AD, Fu J, Shariati M: Use of an intra-oral model to evaluated 0.05% sodium fluoride mouthrinse in radiation-induced hiposalivation. *J Dent Res* 1991;70:894-898.

- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, 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;83:71-75.
- Paes Leme AF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury COM, Cury JA: Effect of association of professional fluoride application and dentifrice use in the dental enamel RGO, Porto Alegre 2007;55:35-40 (*in Portuguese*).
- Petersson LG: Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. *Caries Res* 1993;27 (Suppl. 1):35-42.
- Ringelberg ML, Webster DB, Dixon DO, LeZotte DC: The caries-preventive effect of amine fluorides and inorganic fluorides in a mouthrinse or dentifrice after 30 months of use. *J Am Dent Assoc* 1979;98:202-208.
- Scheie AA: Dentifrices in the control of dental caries. In: EMBERRY, G.; ROLLA, G. *Clinical and biological aspects of dentifrices*. Oxford: Oxford University Press, 1992. Chap.5, p.29-40.
- Triol CW, Kranz SM, Volpe AR, Frankl SN, Alman JE, Allard RL: Anticaries effect of a sodium fluoride rinse and a MFP dentifrice in a nonfluoridated water area: a thirty-month study. *Journal of Clinical Preventive Dentistry* 1980;2:13-15.
- van Strijp AA, Buijs MJ, ten Cate JM: In situ fluoride retention in enamel and dentine after the use of an amine fluoride dentifrice and amine fluoride/sodium fluoride mouthrinse. *Caries Res* 1999;33:61-65.
- White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987;21:126-140.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

Fluoride levels in saliva and dental biofilm after different frequencies of application with low concentration fluoride agents

Souza DCC, Rodriguez KP, Maltz M, Hashizume LN

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Key words: Fluoride, Dentifrice, Mouthwashes, Dental enamel, Demineralization

Address: Lina Naomi Hashizume

Faculdade de Odontologia - UFRGS

Departamento de Odontologia Preventiva e Social

Ramiro Barcelos, 2492

Bom Fim, Porto Alegre, RS

Brazil

CEP: 90035-003

Telephone: +55 51 33085193

Fax: +55 51 33085189

E-mail: lhashizume@yahoo.com

Abstract

The aim of this *in vivo* single-blind randomized crossover study was to assess whether the additional daily use of fluoride mouthrinse (FR) to fluoride dentifrice (FD) is equivalent to increase the FD application frequency regarding to the F levels in saliva and dental biofilm samples 8 hours (h) after the treatments. The volunteers (40) were submitted to different FD use frequency (1100 ppm F as NaF) or non-fluoride dentifrice for 1 week followed by post-brush rinsing with 10 ml of tap water or water and F mouthrinse (FR) (225 ppm F as NaF), which consisted of 4 treatments groups: (T I) 2x/day placebo dentifrice + H₂O; (T II) 2x/day FD + H₂O; (T III) 2x/day FD + H₂O + 1x/day FR; (T IV) 3x/day FD + H₂O. Each treatment was followed by a 1 week washout period. After each experimental period, samples of unstimulated saliva and dental biofilm were collected 8 hours after the last oral hygiene procedure and the fluoride levels were measured using an ion specific electrode. Fluoride concentrations in saliva and dental biofilm were not significantly different among the treatments, as well as they did not differ from the F-free period ($p>0.05$). It was observed that the use of a 2x/day FD followed by FR or extra-brushing with FD did not increase the F retention in saliva and dental biofilm for 8 hours followed by the application of treatments. These findings suggest that the brushing frequency should be performed within intervals smaller than 8 hours to maintain fluoride concentrations at an optimal therapeutic level in oral environment in caries active patients, with regular use of low concentration fluoride agents.

Key words: Fluoride, Dentifrice, Mouthrinse, Saliva, Dental biofilm

Introduction

Elevated salivary and dental biofilm fluoride concentrations are supposed to be predominant ways by which fluoride exerts anti-caries effects. The fluoride inhibits acid dissolution of tooth mineral and also promotes remineralization of the crystal surface at pH levels above the critical value [Featherstone, 1999; ten Cate, 1999]. The fluoride content of saliva and dental biofilm and fluoride uptake by incipient caries lesions *in situ* have been used to assess fluoride bioavailability from topical treatments such as dentifrices and mouthrinses [Duckworth and Gilbert, 1992].

It was suggested that the daily, regular home use of topical fluoride products, such as mouthrinses and dentifrices, results in exposure of the teeth to constant, low but significantly elevated fluoride concentrations in the oral fluids [Duckworth et al., 1992]. An elevation of the fluoride level in saliva from 0.01 to 0.1 ppm F, i.e. 5-10 times, for prolonged periods may be very efficacious for caries control [Featherstone and Zero, 1992].

The fluoride levels in the biofilm increased with the use of F-containing dentifrices [Duckworth et al., 1989], mouthrinses [Duckworth et al., 1987] and drinking water [Whitford et al., 2002]. The concentration of fluoride present in oral fluids at any given time following fluoride applications is influenced by (a) the initial concentration of fluoride applied; (b) the elapsed time since the last exposure [Aasenden et al., 1968]; (c) the method of delivery, and; (d) a complex interaction of factors which influence fluoride clearance and retention [Zero et al., 1988]. Duckworth and Morgan [1991] stated that after a single brushing with fluoride dentifrice, salivary fluoride decrease in two distinct phases: an initial rapid phase which lasting for 40-80 minutes, depending on the individual, and a second slower phase lasting for several hours, due to fluoride released from an oral fluoride reservoir.

The majority of the studies that evaluate fluoride levels in saliva are oral clearance ones, which monitored the fluoride concentrations decreasing shortly after the single fluoride application [Oliveby et al., 1990; Duckworth et al., 1991; Afflito et al., 1992; Vogel et al., 1992; Sjögren and Birkhed, 1993, 1994; Sjögren et al., 1996; Seppä et al., 1997; Fukushima et al., 2000; Sjögren and Melin, 2001; Issa and Toumba, 2004]. Few studies assessed the fluoride levels in saliva and dental biofilm for prolonged periods, corresponding to intervals between daily brushings [Zero et

al., 1992; Heijnsbroek et al., 2006]. These studies' results showed that the benefit of maintaining elevated fluoride levels, since the last oral hygiene procedure (6-7 hours) with fluoride dentifrice combined or not with fluoride mouthrinse, were not reflected in newly formed biofilm, but only in saliva. Therefore, a positive relationship should be observed between fluoride concentrations in saliva and biofilm samples after the oral hygiene procedures [Duckworth et al., 1987; Whitford et al., 2002].

Duckworth et al. [1992] suggested that the levels of fluoride in saliva and biofilm and the anti-caries efficacy of the dentifrices are associated. It is not possible from the literature to establish whether the combination of fluoride dentifrice followed by fluoride mouthrinse provides an additive benefit on fluoride retention in oral fluids. Once that the dose *per* use of dentifrices is similar to the mouthrinses, the aim of this study was to assess whether the additional daily use of fluoride mouthrinse to fluoride dentifrice (FD) is equivalent to increase of FD application frequency regarding to the fluoride levels in saliva and dental biofilm after 8 hours.

Material and Methods

Study Design

An *in vivo* single-blind randomized crossover study was designed. The sample size calculation was done with dental biofilm fluoride concentrations data based on previous findings by Heijnsbroek et al. [2006]. Using a similar experimental protocol, which considers 20% beta and 5% alpha errors and a statistic power of 0.8, it was estimated a sample size of 31 subjects. Estimating a dropout of 30% along the study, 40 subjects were enrolled. The subjects were assigned to four groups using a computer-generated randomization list. Before the trial begin, the subjects were asked to use F-free dentifrice (silica-based, Dentics[®], DentalPrev Ind. e Com. Ltd., Brazil) for one week prior to and during the washout periods between the study phases. Subsequently, the subjects followed four different treatments using or not fluoride dentifrice (1100 ppm F as NaF, silica-based, Dentics[®], DentalPrev Ind. e Com. Ltd., Brazil) followed by water rinsing or water rinsing plus fluoride solution rinsing (225 ppm F as NaF, Dentics[®], DentalPrev Ind. e Com. Ltd., Brazil). Subjects were asked to brush twice or three times daily with a dentifrice for 1 week followed by post-brush rinsing procedures in the treatments: (I) brushing twice a day with a nonfluoride dentifrice followed by tap water rinsing (2x/day PD + H₂O; negative

control); (II) brushing twice a day with a fluoride dentifrice followed by tap water rinsing (2x/day FD + H₂O); (III) brushing twice a day with a fluoride dentifrice followed by tap water rinsing and fluoride solution rinsing once a day (2x/day FD + H₂O + 1x/day FR); (IV) brushing three times a day with a fluoride dentifrice followed by tap water rinsing (3x/day FD + H₂O). Each treatment was followed by a 1 week washout period (fig. 1). During the experiment the subjects performed the toothbrushing with the dentifrice for 1 minute (min) in their usual manner, rinsing with 10 ml of tap water for 10 seconds, and rinsing with 10 ml of fluoride mouthrinse for 1 min. The subjects received oral and written information about the procedure for the subsequent period and to refrain from using any antibacterial or fluoridated agents during the experimental period. Considering that the study followed a crossover design the subjects did not receive any instructions regarding their daily diet. In an attempt to optimize compliance, all subjects received phone calls two days previously to the sample collects to remind them of their scheduled time of brushing. This study was blind only with respect to the researchers.

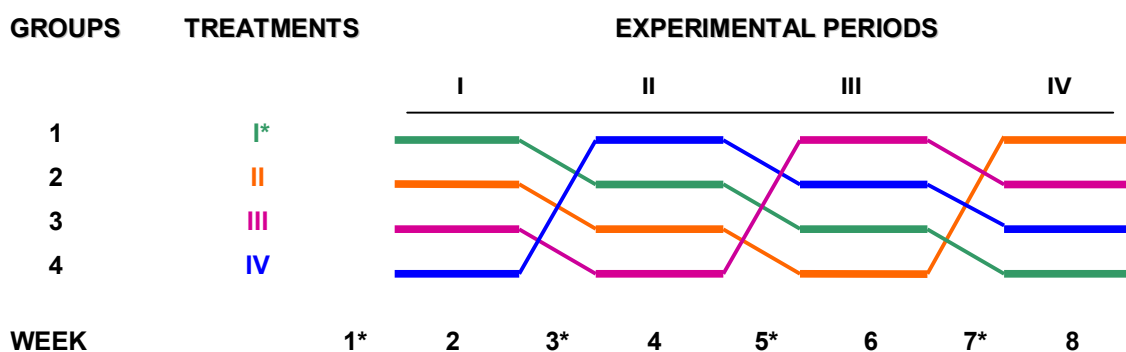


Fig. 1. Study design: an asterisk (*) indicates F-free periods (T I and washout - 2x/day PD + H₂O) and the fluoride dentifrice/mouthwash periods (T II - 2x/day FD + H₂O; T III - 2x/day FD + H₂O + 1x/day FR and T IV - 3x/day FD + H₂O) in randomized order for 1-week periods.

Subjects

Forty dental students [28 female, 12 male, averaging 23.4 (± 3.6) years] were recruited at the Faculty of Dentistry of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. The subjects were resident in a fluoridated water supply area (0.7 ppm F). The inclusion criteria were: good general and dental health, no antibiotics treatments or professional topical fluoride applications during the last two months, and at least 24 natural teeth. The study was approved by the Ethics Committee of the

Faculty of Dentistry (UFRGS) (protocol number 53/06) and all the subjects signed an informed consent.

Sampling Procedures

Prior to sampling, subjects were advised to have neither breakfast nor toothbrushing. At the beginning of each appointment (8 hours after the last oral hygiene procedure), dental biofilm samples were collected with sterile curette from supragingival margins of the teeth (pre-) molars buccal surfaces and were placed in eppendorfs tubes codified and pre-weighted. The tubes with the dental biofilm samples were stored on ice until they were weighted (wet weight), on an analytical balance (± 0.01 mg, Sartorius BP 210D, Germany). The collected samples were centrifuged for 2 min at 14000 rpm (Centrifuge 5410, Eppendorf, Germany) and frozen until the fluoride analysis. The subjects were asked to drool for 5 min in a plastic cup to collect a non-stimulated whole saliva sample. The saliva samples were placed in eppendorfs tubes which were centrifuged for 15 min, followed by the supernatants withdrawn and frozen to the fluoride analysis [Heijnsbroek et al., 2006].

Fluoride Analysis

In order to evaluate the fluoride content, fluoride calibration curves in saliva and dental biofilm were graphed from standardized solutions containing known amounts of fluoride ranging 0.02 – 0.4 ppm F and 0.1 – 16 ppm F, respectively. All samples were analyzed using a combination of an ion specific electrode (Orion 9609, Orion Research Inc., USA) connected to an ion analyzer (Procyon SA-720, Brazil). The sample readings were captured in milivolts (mV) and transformed by linear regression of the calibration curve in $\mu\text{mol F/l}$ and mmol F/kg (saliva and dental biofilm, respectively).

Dental Biofilm

Before analyses, the dental biofilm samples were dehydrated for 24 hours in a vacuum dryer over P_2O_5 [Pearce et al., 1984] in order to obtain the dry weight. For fluoride extraction, 0.5 M HCl was added to the microtube in the proportion of 0.1 ml/mg dry weight biofilm. After extraction for 3 hours at room temperature under constant agitation an equal volume of TISAB II, pH 5.0, modified with 20 g NaOH/l was added to the microtube [Cury et al., 1997, 2000]. The samples were centrifuged

for 10 min and the supernatant retained for determination of the fluoride concentration [Pearce et al., 1984; Tatevossian, 1990].

Saliva

The saliva samples are thawed and mixed with a TISAB III (Total Ionic Strength Adjustment Buffer, Thermo Electron Corporation, Beverly, MA, USA) in 10:1 ratio for determination of fluoride content [Duckworth et al., 1987].

Statistical analyses

Non-parametric Friedman' test was used to compare the fluoride values in the saliva and dental biofilm in the different treatments. As the trial had a cross-over design, the volunteer was considered as an experimental unit. All the statistical analyses were performed using SAS, version 9.1. The level of significance was set at 5%.

Results

Two subjects were excluded for failing to attend one or more of the appointments and their saliva and dental biofilm samples were not included in the data analyses. The mean fluoride values in the saliva and dental biofilm samples 8 hours after the end of the fluoride dentifrice/mouthrinse periods (T II, T III and T IV) were not significantly different among themselves, as well as, they were not statistically different from F-free period (T I - negative control). Figure 2 and Table 1 show the fluoride data from saliva and dental biofilm samples for each treatment.

Table 1. Fluoride concentrations (mean \pm SD) in saliva and dental biofilm after to each treatment

Treatments	n	Saliva ($\mu\text{mol F/l}$)*	Biofilm (mmol F/kg)*
T I (2x/day PD + H ₂ O)	38	1.02 (0.53)	13.88 (15.65)
T II (2x/day FD + H ₂ O)	38	0.99 (0.27)	16.81 (27.70)
T III (2x/day FD + H ₂ O + 1x/day FR)	38	1.08 (0.43)	18.53 (21.42)
T IV (3x/day FD + H ₂ O)	38	1.11 (0.53)	18.80 (18.88)

PD = Placebo dentifrice

FD = fluoride dentifrice

FR = fluoride rinse

* Nonsignificative difference (Non-parametric Friedman's Test; $p > 0.05$)

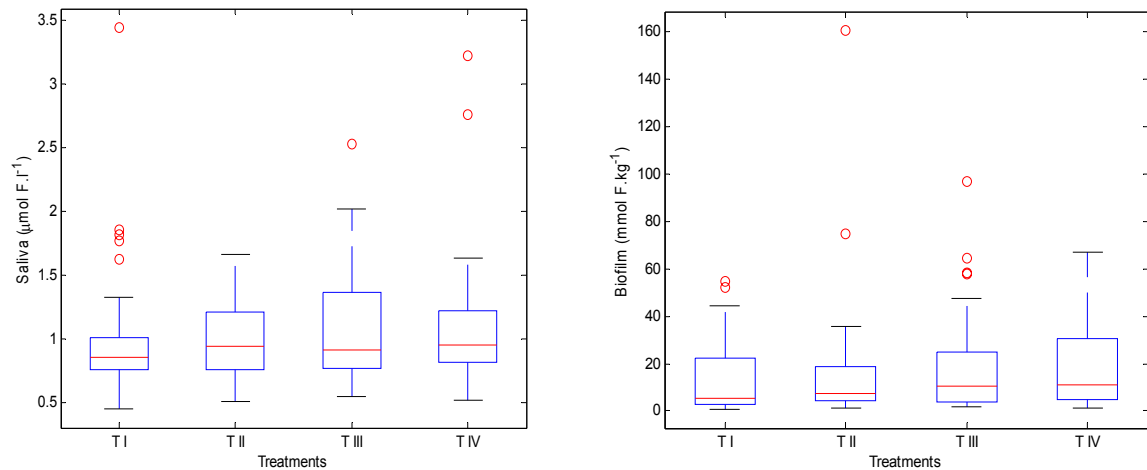


Fig. 2. Fluoride concentrations in saliva and dental biofilm after the F-free dentifrice periods (T I - 2x/day PD + H₂O rinse) and the fluoride dentifrice/mouthwash periods (T II - 2x/day FD + H₂O rinse; T III - 2x/day FD + H₂O rinse + 1x/day FR; T IV - 3x/day FD + H₂O rinse). The circle indicates the outliers of 1.5 box lengths from the upper edge.

Discussion

Towards contributing to the knowledge over saliva and dental biofilm fluoride retention, this experiment evaluated whether fluoride levels remained significantly elevated 8 hours after the oral hygiene procedures as a midway assessment between habitual nocturne and morning brushings. The fluoride retention measurements were performed 8 hours after brushing with NaF dentifrice twice or three times a day followed by water rinse or water and fluoride mouthrinse. The treatments' salivary fluoride concentrations were compared among themselves resulting in no significant difference. It was observed that the combination of fluoride dentifrice followed by fluoride mouthrinse has not contributed to maintaining high fluoride levels. An interesting outcome was that the average fluoride values after treatments with fluoride agents (T II - 2x/day FD + H₂O rinse; T III - 2x/day FD + H₂O rinse + 1x/day FR; T IV - 3x/day FD + H₂O rinse) did not result in significantly elevated salivary fluoride concentrations compared to the treatment with placebo dentifrice (T I - 2x/day PD + H₂O rinse). A potential explanation for the absence of difference could be the long interval between the last oral hygiene procedure and sampling time.

In the literature, most of the fluoride concentration studies assessed the clearance up to 3 hours after oral hygiene procedures, showing high fluoride level for

this time interval [Oliveby et al., 1990; Duckworth et al., 1991; Afflito et al., 1992; Vogel et al., 1992; Sjögren and Birkhed, 1993, 1994; Sjögren et al., 1996; Seppä et al., 1997; Fukushima et al., 2000; Sjögren and Melin, 2001; Issa and Toumba, 2004]. Thus, it would be interesting to know whether fluoride concentrations remain increased in long-term periods after oral hygiene procedures. Few studies have assessed whether the oral fluoride retention, after fluoride agents use, has been relevant between daily brushings [Zero et al., 1988, 1992; Heijnsbroek et al., 2006].

In the current study, the dental biofilm formed after the last exposure to treatments was analyzed and no significant difference was observed for the fluoride concentrations among treatments (tests and negative control). If there was any difference immediately after oral hygiene procedures, they were not detected at the sampling time. This outcome agrees with previous studies where the fluoride dentifrice showed no difference from placebo or baseline with respect to the fluoride concentrations after long-term periods (> 6 hours) [Sidi and Wilson, 1991; Zero et al., 1992; Whitford et al., 2002; Heijnsbroek et al., 2006]. Biofilm samples collected after fluoride dentifrice use indicated that the elevated fluoride concentration found after brushing were not observed in the samples collected after prolonged time periods. The potential beneficial effect of a raised fluoride ions concentration found right after toothbrushing is lost during the following periods of time [Sidi and Wilson, 1991; Zero et al., 1992; Whitford et al., 2002]. However, high fluoride concentrations were detected in some studies after use of fluoride mouthrinse in association or not with fluoride dentifrice [Duckworth et al., 1989; Campus et al., 2003; Duckworth and Morgan, 1991].

Differently from this study results, some papers [Zero et al., 1988, 1992; Heijnsbroek et al., 2006] showed significantly high salivary fluoride concentrations for a long-term after the exposure to fluoride dentifrice associated or not with fluoride mouthrinse. Thus, the interval of exposure to fluoride treatments appeared to influence the detection of differences in the salivary fluoride levels. It is remarkable that those studies did not show fluoride concentrations increased in dental biofilm. Our samples of dental biofilm collected 8 hours after the night-time fluoride application followed the same pattern found by Zero et al. [1992] and Heijnsbroek et al. [2006], where no significant difference was found in fluoride levels after 6-7 h. Based on fluoride retention data described above and obtained by our study, it is

suggested that the biofilm fluoride clearance is not affected by decreasing salivary flow rate during sleep.

The current experiment did not show an increase in the salivary fluoride concentrations after treatments with fluoride agents, neither this was not observed in the dental biofilm. Duckworth et al. [1992] suggested that there exists an association among the levels of fluoride in saliva and biofilm and the anti-caries efficacy of the dentifrices. By Duckworth et al. [1987] and Whitford et al. [2002] findings, a positive relationship might be observed between fluoride concentrations in saliva and biofilm samples collected 12 or 18 hours after the last use of a fluoride agent.

Duckworth and Morgan [1991] showed that the residual concentration of salivary fluoride is about 0.014 ppm approximately 18 hours after brushing with a fluoride dentifrice containing 1.000 ppm F, which is similar to the salivary fluoride concentrations found in fluoridated water areas [Page, 1991]. Low intraoral levels of fluoride continually present showed a beneficial effect on preventing the demineralization of enamel [Brunn and Thylstrup, 1984].

The fluoride concentrations, in the present study, measured in dental biofilm and saliva after fluoride or non-fluoride agents application were similar and, probably, the presence of fluoride ions in these samples were not provided from treatments but from other fluoride source. The subjects in this experiment lived in a fluoridated water supply area (0.7 ppm F). The fluoride concentration provides the driving force for fluoride to pass into the deeper biofilm layers adjacent to the tooth surface and to determine the initial concentrations in oral retention sites (oral soft tissues, teeth, biofilm, and hard- and soft-tissues spaces) [Zero et al., 1992]. In the present study the fluoride concentrations in biofilm were much higher than those found in saliva, which agrees with data found in the literature [Bowen, 1973]. Due to the biofilm closeness to the enamel surface, the biofilm should be considered an important fluoride retention site [Zero et al., 1992]. The water supply fluoridation may have hidden the long-term effects of fluoride treatments, once the salivary fluoride levels have been reported to be higher in subjects living in communities with fluoridated water supply [Oliveby et al., 1990; Whitford et al.; 2005]. In communities supplied with low fluoride levels in the water, the treatment effects on oral fluids fluoride concentration is more sensible, declining slowly to baseline levels [Whitford et al.; 2005].

In our study, it was observed a high degree of inter-subject variation in dental biofilm fluoride concentrations, and this variability has been reported in previous studies [Tatevosian, 1990; Duckworth et al., 1992]. Part of this variation may be attributed to differences in the fluoride-binding characteristics of an individual subject's biofilm. The average biofilm fluoride values obtained in the present experiment were similar to those observed in two *in vivo* studies which analyzed fluoride concentration after toothbrushing with fluoride or non-fluoride dentifrice [Nobre dos Santos et al., 2002; Whitford et al., 2002].

In conclusion, it was observed that the use of a twice a day FD followed by fluoride mouthrinsing or extra-brushing with fluoride dentifrice did not increase fluoride retention in saliva and dental biofilm for 8 hours. It is known that people who consume fluoridated water presenting basal fluoride levels more elevated, however this study showed that for these subjects no difference could be observed with respect to the fluoride concentrations in saliva or dental biofilm for long-term periods after exposure to treatments with fluoride agents. Upon these findings, we suggest that the toothbrush frequency should be performed within intervals smaller than 8 hours to maintain fluoride levels at an optimal therapeutic level in oral environment in caries active patients, with regular home use of fluoride oral hygiene agents.

Acknowledgements

The authors thank the volunteers at the Faculty of Dentistry (UFRGS) for their valuable participation in this study; DentalPrev Ind. e Com. Ltd., Brazil, for dentifrice and mouthrinse preparation and donation; and CAPES and PROPESQ/UFRGS for the financial support. The manuscript is part of a thesis submitted by the first author to the Faculty of Dentistry (UFRGS), as a partial fulfillment of the requirements for the Master's Degree in Clinical Dentistry, concentration area in Cariology.

References

- Aasenden R, Brudevold F, Richardson B: Clearance of fluoride from the mouth after topical treatment or the use of a fluoride mouthrinse. *Arch Oral Biol* 1968;13:625-636.
- Afflitto J, Schmid R, Esposito A, Toddywala R, Gaffar A: Fluoride availability in human saliva after dentifrice use: correlation with anticaries effects in rats. *J Dent Res* 1992;71 (Spec Iss):841-845.
- Bowen WH: The effect of fluoride and molybdate on caries activity in monkeys (*macaca fascicularis*). *Br Dent J* 1973;135:489-493.
- Brunn C, Thylstrup A: Fluoride in whole saliva and dental caries experience in areas with high or low concentrations of fluoride in the drinking water. *Caries Res* 1984;18:450-456.
- Campus G, Lallai MR, Carboni R: Fluoride Concentration in saliva after use of oral hygiene products. *Caries Res* 2003;37:66-70.
- Cury JA, Rebelo MAB, 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.
- Duckworth RM, Gilbert, RJ: Intra-oral models to assess cariogenicity: evaluation of oral fluoride and pH. *J Dent Res* 1992;71 (Spec Iss):934-944.
- Duckworth RM, Knoop DT, Stephen KW: Effect of mouthrinsing after toothbrushing with a fluoride dentifrice on human salivary fluoride levels. *Caries Res* 1991 b;25:287-291.
- Duckworth RM, Morgan SN: Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Res* 1991 a;25: 123-129.
- Duckworth RM, Morgan SN, Burchell CK: Fluoride in plaque following use of dentifrice containing sodium monofluorophosphate. *J Dent Res* 1989;68:130-133.
- Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM: Fluoride in saliva and biofilm following use of fluoride-containing mouthrinses. *J Dent Res* 1987;66:1730-1734.

- Duckworth RM, Morgan SN, Gilbert RJ: Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments. *J Dent Res* 1992;71 (Spec Iss): 836-840.
- Featherstone JDB: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1999;27:31-40.
- 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 Iss): 804-810.
- Fukushima R, Granjeiro JM, Taga EM, Buzalaf, MAR: Cinética do flúor na saliva de adultos e crianças após o uso de dentifrícios fluoretados. *Rev FOB* 2000;8:45-50.
- Heijnsbroek M, Gerardu VAM, Buijs MJ, van Loreven C, ten Cate JM, Timmerman MF, van der Weijden GA: Increased salivary fluoride concentrations after post-brush fluoride rinsing not reflected in dental biofilm. *Caries Res* 2006;40:444-448.
- Issa AI, Toumba KJ: Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. *Caries Res* 2004;38:15-19.
- 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.
- Oliveby A, Weetman DA, Geddes DAM, Lagerlöf F: The effect of salivary clearance of sucrose and fluoride on human dental plaque acidogenicity. *Archs Oral Biol* 1990;35:907-911.
- Page DJ: A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. *Caries Res* 1991;25:251-255.
- Pearce EIF, Hancock EM, Gallagher IHC: The effect of fluorhydroxyapatite in experimental human dental plaque on its pH, acid production and soluble calcium, phosphate and fluoride levels following glucose challenge. *Archs Oral Biol* 1984;29:521-527.
- Seppä L, Salmenkivi S, Hausen H: Salivary fluoride concentration in adults after different fluoride procedures. *Acta Odontol Scand* 1997;55:84-87.
- Sidi AD, Wilson RF: Fluoride, calcium and inorganic phosphorus concentrations in approximal plaque collected from young adults 1 and 24 h after toothbrushing with fluoride toothpastes. *Caries Res* 1991;25:330-334.

- Sjögren K, Birkhed D: Factors related to fluoride retention after toothbrushing and possible connection to caries activity. *Caries Res* 1993;27:474-477.
- Sjögren K, Birkhed D: Effect of various post-brushing activities on salivary fluoride concentration after toothbrushing with a sodium fluoride dentifrice. *Caries Res* 1994;28:127-131.
- Sjögren K, Birkhed D, Ragmar S, Reinhold AC: Fluoride in the interdental area after two different post-brushing water rinsing procedures. *Caries Res* 1996;30:194-199.
- Sjögren K, Melin NH: The influence of rinsing routines on fluoride retention after toothbrushing. *Gerodontology* 2001;18:15-22.
- Tatevossian A: Fluoride in dental plaque and its effects. *J Dent Res* 1990;69 (Spec Iss):645-652.
- ten Cate JM: Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand* 1999;57:325-329.
- Vogel GL, Carey CM, Ekstrand J: Distribution of fluoride in saliva and plaque fluid after a 0.048 mol/L NaF rinse. *J Dent Res* 1992;71:1553-1557.
- Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* 2002;36:256-265.
- Whitford GM, Buzalaf MAR, Bijella MFB, Waller JL: Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res* 2005;39:100-107.
- Zero DT, Fu J, Espeland MA, Featherstone JDB: Comparison of fluoride concentrations in unstimulated whole saliva following the use of a fluoride dentifrice and a fluoride rinse. *J Dent Res* 1988;67:1257-1262.
- Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JDB: Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J Dent Res* 1992;71:1768-1775.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A aplicação do dentifrício fluoretado em uma maior frequência diferiu dos procedimentos convencionais de escovação (2x/dia), entretanto mostrou a mesma eficácia da utilização adicional de uma solução fluoretada para bochecho ao uso do dentifrício fluoretado, em relação às modificações clínicas da superfície do esmalte e na sua perda mineral, em condições de alto desafio cariogênico. Sendo assim, o aumento da frequência de aplicação do dentifrício fluoretado pode substituir o uso associado de agentes tópicos de flúor de baixa concentração no tratamento de lesões de cárie ativas.
- Independente do(s) veículo(s) utilizado(s) ou da frequência de aplicação do(s) mesmo(s), observa-se que em um período de 8 horas após os tratamentos fluoretados os níveis de flúor na saliva e no biofilme dental encontram-se em níveis basais, semelhantes àqueles observados após o uso de dentifrício não fluoretado. Sugere-se, de acordo com os achados, que a frequência de aplicação de agentes fluoretados de baixa concentração seja realizada em intervalos menores que 8 horas para manter os níveis de flúor elevados no meio bucal em pacientes com atividade cariogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASENDEN, R.; BRUDEVOLD, F.; RICHARDSON, B. Clearance of fluoride from the mouth after topical treatment or the use of a fluoride mouthrinse. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.13, n.6, p.625-636, Jun. 1968.

AFFLITTO, J. et al. Fluoride availability in human saliva after dentifrice use: correlation with anticaries effects in rats. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71 (Spec N°), p.841-845, Apr. 1992.

ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The nature of early lesions in enamel. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.65, n.1, p. 2-11, Jan. 1986.

ARENDS, J.; TEN BOSH, J.J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71(Spec N°), p.924-928, Apr. 1992.

ASHLEY, P. Toothbrushing: Why, When and How? **Dent. Update**, Guilford, v.28, n.1, p.36-40, Jan./Feb. 2001.

ASHLEY, F.P. et al. Clinical testing of a mouthrinse and a dentifrice containing fluoride. A two-year supervised study in school children. **Br. Dent. J.**, London, v.143, n.10, p.333-338, Nov. 1977.

AXELSSON, P. et al. Effect of fluoride containing dentifrice, mouthrinsing, and varnish on approximal dental caries in a 3-year clinical trial. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.15, n.4, p.177-180, Aug. 1987.

BLINKHORN, A.S.P.J.; HOLLOWAY, P.J.; DAVIES, T.G.H. Combined effects of a fluoride dentifrice and mouthrinse on the incidence of dental caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.11, n.1, p.7-11, Feb. 1983.

BOWEN, W.H. The effect of fluoride and molybdate on caries activity in monkeys (macaca fascicularis). **Br. Dent. J.**, London, v.135, n.11, p.489-493, Dec. 1973.

BRAMBILLA, E. Fluoride – is it capable of fighting old and new dental disease? An overview of existing fluoride compounds and their clinical applications. **Caries Res.**, Basel, v.35, (Suppl. 1), p.6-9, 2001.

BRATTHALL, D.; HANSEL-PETERSSON, G.; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: What do the experts believe? **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.104, p. 416-422, Aug. 1996.

BRUUN, C.; THYLSTRUP, A. Fluoride in whole saliva and dental caries experience in areas with high or low concentrations of fluoride in the drinking water. **Caries Res.**, Basel, v.18, n.5, p.450-456, 1984.

CAMPUS, G.; LALLAI, M.R.; CARBONI, R. Fluoride Concentration in saliva after use of oral hygiene products. **Caries Res.**, Basel, v.37, n.1, p.66-70, Jan./Feb. 2003.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A. et al. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, Basel, v.41, n.1, p.9-15, Jan. 2007.

CLARKSON, J.J.; MCLOUGHLIN, J. Role of fluoride in oral health promotion. **Int. Dent. J.**, London, v.50, n.3, p.119-28, Jun. 2000.

CRUZ, R.; RÖLLA, G.A. A importância do fluoreto de cálcio como reservatório de flúor na superfície do esmalte dentário. **Rev. Odont. USP**, Bauru, v.5, n.2, p.134-139, Jul./Dez. 1991.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades**, 2 ed. São Paulo: Santos, 2001. Cap. 2, p.33-68.

CURY, J.A.; REBELO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.31, n.5, p.356-360, Sep./Oct. 1997.

CURY, J.A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, Basel, v.34, n.6, p. 491-497, Nov./Dec. 2000.

CURY, J.A. et al. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. **Caries Res.**, Basel, v.35, n.2, p.106-110, Mar./Apr. 2001.

DELBEM, A.C.B. et al. In vitro comparison of the cariostatic effect between topical application of fluoride gels and fluoride toothpaste. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v.12, n.2, p.121-126, 2004.

DIJKMAN, A. et al. Remineralization of human enamel in situ after 3 months: The effect of not brushing versus the effect of na F dentifrice and na F-free dentifrice. **Caries Res.**, Basel, v. 24, n.4, p. 263-266, 1990.

DUCKWORTH, R.M.; GILBERT, R.J. Intra-oral models to assess cariogenicity: evaluation of oral fluoride and pH. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71 (Spec N°), p.934-944, Apr.1992.

DUCKWORTH, R.M.; KNOOP, D.T.; STEPHEN, K.W. Effect of mouthrinsing after toothbrushing with a fluoride dentifrice on human salivary fluoride levels. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n.4, p. 287-291, Jul./Aug. 1991.

DUCKWORTH, R.M.; MORGAN, S.N. Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n.2, p. 123-129, 1991.

DUCKWORTH, R.M.; MORGAN, S.N.; BURCHELL, C.K. Fluoride in plaque following use of dentifrice containing sodium monofluorophosphate. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.68, n.2, p. 130-133, Feb. 1989.

DUCKWORTH, R.M.; MORGAN, S.N.; GILBERT, R.J. Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71 (Spec N°), p. 836-840, Apr. 1992.

DUCKWORTH, R.M.; MORGAN, S.N.; MURRAY, A.M. Fluoride in saliva and biofilm following use of fluoride-containing mouthwashes. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.66, n.12, p. 1730-1734, Dec.1987.

FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.27, n.1, p.31-40, Feb. 1999.

FEATHERSTONE, J.D.B. et al. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, Basel, v.17, n.5, p.385-391, 1983.

FEATHERSTONE, J.D.B., ZERO, D.T. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71 (Spec N°), p. 804-810, Apr. 1992.

FUKUSHIMA, R. et al. Cinética do flúor na saliva de adultos e crianças após o uso de dentifrícios fluoretados. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v.8, n.1/2, p.45-50, Jan./Jun. 2000.

HARA, A.T. et al. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Res.**, Basel, v.37, n.5, p.339-344, Sep./Oct. 2003.

HEIJNSBROEK, M. et al Increased salivary fluoride concentrations after post-brush fluoride rinsing not reflected in dental biofilm. **Caries Res.**, Basel, v.40, n.5, p.444-448, Aug. 2006.

HOLMEN, L. et al. A scanning electron microscopy study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Res.**, Basel, v. 19, n.4, p. 355-367, 1985.

ISSA, A.I., et al. A study investigating the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.48, n.8, p.567-571, Aug. 2003.

ISSA, A.I.; TOUMBA, K.J. Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. **Caries Res.**, Basel, v.38, n.1, p. 15-19, Jan./Feb. 2004.

JARDIM, J.J. **Lesões de cárie em esmalte submetidas a diferentes tratamentos com flúor tópico *in situ***. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas - Cariologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KARJALAINEN, S. et al. Caries development after substitution of supervised fluoride rinses and toothbrushings by unsupervised use of fluoride toothpaste. **Community Dent. Oral Epidem.**, Copenhagen, v.22, n.6, p.421-424, Dec. 1994.

KASTE L.M. et al. Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age. United States, 1988-1991. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.75 (Spec N°), p.631-641, Feb. 1996.

LAGERWEIJ, M.D; TEN CATE, J.M. Remineralization of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. **Caries Res.**, Basel, v.36, n.4, p.270-274, Jul./Aug. 2002.

MAIA, L. C.; DE SOUZA, I. P. R.; CURY, J. A. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 111, n. 1, p. 68-72, Feb. 2003.

MALTZ, M.; PAROLO, C.F.C.; JARDIM, J.J. Cariologia Clínica In:TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Editora Santos 2005, Cap.6, p.140-142.

MARINHO, V.C. et al. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Chichester, v.1, 2004.

MARINHO, V.C.C. et al. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Chichester, v.1, 2004.

MELLBERG, J. R. Evaluation of topical fluoride preparations. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 69 (Special N°), p.771-779, Feb. 1990.

MELLBERG, J.R. Fluoride dentifrices: current status and prospects. **Int. Dent. J.**, London, v.41, n.1, p.9-16, Feb. 1991.

MELLBERG, J.R.; CHOMICKI, W.G. Effect of soluble calcium on fluoride uptake by artificial caries lesions in vivo. **Caries Res.**, Basel, v.19, n.2, p.122-125, 1983.

MELLBERG, J.R. et al. Remineralization in vivo of artificial caries lesion by monoflorophosphate dentifrice. **Caries Res.**, Basel, v.19, n.2, p.126-135, 1985.

MEYEROWITZ, C. et al. Use of an intra-oral model to evaluated 0.05% sodium fluoride mouthrinse in radiation-induced hiposalivation. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.70, n.5, p.894-898, May. 1991.

NEGRI, H.M.D.; CURY, J.A. Efeito dose-resposta de uma formulação de dentifricio com concentração reduzida de fluoreto – estudo in vitro. **Pesq. odontol. bras.**, São Paulo, v.16, n.4, p.361-365, Out./Dez. 2002.

NEWBRUN, E. Topical fluorides in caries prevention and management: a North American perspective. **J. Dent. Educ.**, Washington, v.65, n.10, p.1078-1083, Oct. 2001.

NOBRE DOS SANTOS, M. et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res.**, Basel, v.36, n.5, p.347-352, Sep./Oct. 2002.

ØGAARD, B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res.**, Basel, v. 35 (Suppl. 1), p.40-44, May. 2001.

ØGAARD, B.; SEPPÄ, L.; RØLLA, G. Professional topical fluoride applications – clinical efficacy and mechanism of action. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.8, n.2, p.190-201, Jul. 1994.

OLIVEBY, A. et al. The effect of salivary clearance of sucrose and fluoride on human dental plaque acidogenicity. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.35, n.11, p.907-911, 1990.

PAES LEME, A.F. et al. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.83, n.1, p.71-75, Jan. 2004.

PAES LEME, A.F. et al. Efeito da associação da aplicação de fluoreto profissional e uso de dentifrício no esmalte dental. **RGO**, Porto Alegre, v.55, n.1, p.35-40, Jan./Mar. 2007.

PAGE, D.J. A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.4, p.251-255, Jan. 1991.

PEARCE, E.I.F.; HANCOCK, E.M.; GALLAGHER, I.H.C. The effect of fluorhydroxyapatite in experimental human dental plaque on its pH, acid production and soluble calcium, phosphate and fluoride levels following glucose challenge. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.29, n.7, p.521-527, 1984.

PETERSSON, L.G. Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. **Caries Res.**, Basel, v.27 (Suppl. 1), p.35-42, 1993.

RINGELBERG, M.L. et al. The caries-preventive effect of amine fluorides and inorganic fluorides in a mouthrinse or dentifrice after 30 months of use. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.98, n.2, p.202-208, 1979.

SANTOS, M.N.; KOO, H.; CURY, J.A. Evaluación in situ de la incorporación de flúor y remineralización del esmalte dental con un dentífrico brasileiro fluorado comercializado para niños. **Rev. Fola/Oral**, v.4, n.12, p.110-114, Jun. 1998.

SCHEIE, A.A. Dentifrices in the control of dental caries. In: EMBERRY, G.; ROLLA, G. **Clinical and biological aspects of dentifrices**. Oxford: Oxford University Press, Chap.5, p.29-40, 1992.

SEPPÄ, L.; SALMENKIVI, S.; HAUSEN, H. Salivary fluoride concentration in adults after different fluoride procedures. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.55, n.2, p.84-87, Apr. 1997.

SEPPÄ, L. Topical fluoride. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v.85, n.6, p.445-456, Nov./Dec. 1989.

SERRA, M.C.; CURY, J.A. Cinética do flúor na saliva após o uso de dentífrico e bochecho fluoretados. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.46, n.5, p.875-878, Set./Out. 1992.

SIDI, A.D.; WILSON, R.F. Fluoride, calcium and inorganic phosphorus concentrations in approximal plaque collected from young adults 1 and 24 h after toothbrushing with fluoride toothpastes. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.5, p.330-334, 1991.

SJÖGREN, K.; BIRKHED, D. Factors related to fluoride retention after toothbrushing and possible connection to caries activity. **Caries Res.**, Basel, v.27, n.6, p.474-477, 1993.

SJÖGREN, K.; BIRKHED, D. Effect of various post-brushing activities on salivary fluoride concentration after toothbrushing with a sodium fluoride dentifrice. **Caries Res.**, Basel, v.28, n.2, p.127-131, 1994.

SJÖGREN, K.; MELIN, N.H. The influence of rinsing routines on fluoride retention after toothbrushing. **Gerodontology**, Oxford, v.18, n.1, p.15-20, Jul. 2001.

SJÖGREN, K. et al. Fluoride in the interdental area after two different post-brushing water rinsing procedures. **Caries Res.**, Basel, v.30, n.3, p.194-199, 1996.

TAKAGI, S.; LIAO, H.; CHOW, L.C. Effect of tooth-bound fluoride on enamel

demineralization/remineralization in vitro. **Caries Res.**, Basel, v.34, n.4, p.281-288, Jul./Aug. 2000.

TATEVOSSIAN, A. Fluoride in dental plaque and its effects. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.69 (Special N°), p.645-652, Feb. 1990.

TEN CATE, J.M. In vitro studies on the effects of fluoride on de-remineralization. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.69 (Special N°), p.614-9, Feb. 1990.

TEN CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.57, n.6, p.325-9, Dec. 1999.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O.. **Cariologia Clínica.**, 2ed. São Paulo: Santos, 421p., Cap. 06, p. 111-157, 1995.

TRIOL, C.W. et al. Anticaries effect of a sodium fluoride rinse and a MFP dentifrice in a nonfluoridated water area: a thirty-month study. **J. Clin. Prevent. Dent.**, v.2, p.13-15, 1980.

VAN STRIJP, A.A.; BUIJS, M.J.; TEN CATE, J.M. In situ fluoride retention in enamel and dentine after the use of an amine fluoride dentifrice and amine fluoride/sodium fluoride mouthrinse. **Caries Res.**, Basel, v.33, n.1, p.61-65, Jan./Feb. 1999.

VOGEL, G.L.; CAREY, C.M.; EKSTRAND, J. Distribution of fluoride in saliva and plaque fluid after a 0.048 mol/L NaF rinse. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71, n.9, p.1553-1557, Sep. 1992.

WHITE, D. J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, Basel, v.21, n.2, p.126-140, 1987.

WHITFORD, G.M. et al. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. **Caries Res.**, Basel, v.36, n.4, p.256-265, Jul./Aug. 2002.

WHITFORD, G.M. et al. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. **Caries Res.**, Basel, v.39, n.2, p. 100-107, Mar./Apr. 2005.

ZERO, D.T. et al. Comparison of fluoride concentrations in unstimulated whole saliva

following the use of a fluoride dentifrice and a fluoride rinse. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.67, n.10, p.1257-1262, Oct. 1988.

ZERO, D.T. et al. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.71, n.11, p.1768-1775, Nov. 1992.

ZUPAN A.B. Is the fluoride concentration limit of 1500 ppm in cosmetics (EU guideline) up to date? **Caries Res.**, Basel, v.35 (Suppl1), p.22-25, May. 2001.

ANEXOS

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**RESOLUÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

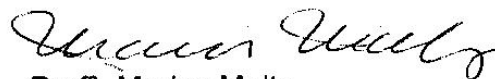
Número: 35/06

Título: COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE AGENTES TÓPICOS DE FLÚOR EM BAIXA CONCENTRAÇÃO NA DES-REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE BOVINO – ESTUDO *IN SITU*

Investigador(es) principal(ais): Professoras Lina N. Hashizume, Marisa Maltz e C.D. Daniela C. C. Souza

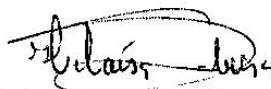
O Projeto foi aprovado na reunião do dia 13/06/2006, Ata nº 06/06 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 14 de junho de 2006.



Prof^a. Marisa Maltz

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas



Prof^a. Heloisa Emília Dias da Silveira

Coordenadora da Comissão de Pesquisas

ANEXO B

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

Termo de Consentimento Informado

Título do estudo: Comparação da capacidade de agentes tópicos de flúor em baixa concentração na desmineralização do esmalte bovino: estudo *in situ*.

Pesquisadores responsáveis: Prof^a. Dr^a. Lina N. Hashizume, Prof^a. Dr^a. Marisa Maltz e C.D. Daniela Correia C. Souza.

Objetivo do estudo: Comparar *in situ* a capacidade de agentes tópicos de flúor em baixa concentração na desmineralização do esmalte bovino.

Procedimentos da fase experimental: O participante fará uso de um dispositivo intra-oral removível mandibular, confeccionado em acrílico, com 2 sítios onde serão colocados blocos de esmalte bovino hígidos. O estudo será desenvolvido em 3 períodos de 14 dias cada, onde os participantes serão distribuídos aleatoriamente aos tratamentos: Tratamento 1: Dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 2x/dia; Tratamento 2: Dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 2x/dia associado ao uso de uma solução fluoretada (225 ppm F, NaF) 1x/dia; Tratamento 3: Dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 3x/dia. Os participantes serão orientados a proceder à higiene oral de acordo com o período experimental. Para simular exposições ao flúor, o dispositivo intra-oral será removido e uma solução de dentifrício será gotejado sobre os blocos de esmalte, e permanecerão sobre eles enquanto os participantes realizam a escovação de seus dentes com o mesmo dentifrício. Uma solução de sacarose 20% deverá ser gotejada sobre os blocos hígidos 8 vezes ao dia. Os participantes do Grupo 2 serão orientados a bochechar 10 ml da solução fluoretada por 1 minuto antes de dormir e imediatamente após a escovação. Após cada fase experimental, os blocos dentais serão recuperados para análise clínica, de microdureza e conteúdo de flúor.

Direito de desistência: O participante tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer ônus para si.

Sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Entretanto, todas as informações obtidas neste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, sem divulgação dos nomes das pessoas envolvidas.

Consentimento: Declaro ter lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este formulário, não restando dúvidas quanto ao conteúdo

deste termo. Assim, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, aceito participar deste estudo.

Nome do Participante: _____ Assinatura: _____

Telefone para contato: _____ Data: _____

Nome do Pesquisador: _____ Assinatura: _____

Telefone do pesquisador para contato: _____

Este consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa, e outra de propriedade dos pesquisadores responsáveis.

ANEXO C

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

Instruções aos Participantes

O estudo será constituído de 3 fases experimentais de 14 dias, com intervalos de 1 semana entre as fases. Antes do início de cada fase experimental, o participante receberá o dentífrico a ser usado, um frasco com conta-gotas contendo solução de sacarose, um estojo de aparelho ortodôntico e o dispositivo intra-oral. Durante o período do estudo, favor seguir as seguintes instruções:

- Não realizar bochechos com nenhum produto químico e não receber aplicações profissionais tópicas de flúor. Utilizar somente os produtos fornecidos pelos pesquisadores;
- Escovar os dentes com o dentífrico fornecido de acordo com o protocolo estabelecido para o período experimental. Caso precise escovar mais vezes, realizar a escovação sem o dentífrico;
- O dispositivo deverá ser removido apenas para a higienização e alimentação.
- A limpeza do aparelho deve ser feita com a escova dental, e em hipótese alguma deve tocar as telas;
- Ao remover o aparelho durante as refeições mantenha-o envolvido em uma gaze umedecida;
- A solução de sacarose deve ser gotejada sobre os blocos 8 vezes ao dia. Deve-se esperar 5 minutos para a recolocação do dispositivo na cavidade bucal;
- Caso seja necessário o uso de algum tipo de medicação durante o período experimental, comunicar imediatamente o pesquisador responsável;
- Em caso de dúvidas, entre em contato: 3316-5193 / 9726-6848 (Daniela).

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

ANEXO D

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

Número: 53/06

Título: EFEITO DO BOCHECHO COM SOLUÇÃO FLUORETADA APÓS ESCOVAÇÃO COM DENTIFRÍCIO FLUORETADO SOBRE OS NÍVEIS DE FLÚOR NA SALIVA E BIOFILME DENTÁRIO

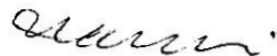
Investigador(es) principal(ais): Professor Lina N. Hashizume e Cs.Ds. Daniela C.C. Souza, Karina P. Rodriguez

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 14/11/2006, Ata nº 11/06 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 17 de novembro de 2006.



Prof^a. Marisa Maltz
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas



Prof^a. Marisa Maltz
Coordenadora Substituta da Comissão de Pesquisas

ANEXO E

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

Termo de Consentimento Informado

Título do Estudo: Efeito do bochecho com solução fluoretada após escovação com dentifrício fluoretado sobre os níveis de flúor na saliva e biofilme dentário.

Pesquisadores Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Lina N. Hashizume, Prof^a. Dr^a. Marisa Maltz, C.D. Daniela Correia C. Souza.

Objetivo do Estudo: Analisar a concentração de flúor na saliva e no biofilme após uso dentifrício fluoretado associado ou não à solução fluoretada.

Procedimentos da Fase Experimental: O estudo será desenvolvido em 4 períodos de 1 semana cada, onde os indivíduos serão alocados aleatoriamente para os tratamentos: Tratamento I: escovação com dentifrício placebo 2x/dia durante tempo mínimo de um minuto; Tratamento II: escovação com dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 2x/dia; Tratamento III: escovação com dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 2x/dia associado ao uso de uma solução fluoretada (225 ppm F, NaF) 1x/dia; Tratamento IV: escovação com dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF) 3x/dia. Os indivíduos serão orientados a proceder à higiene oral de acordo com o período experimental. Nos Tratamentos I, II, IV os indivíduos serão orientados a realizar um rápido enxágüe pós-escovação com 10 ml de água por 10 segundos. No tratamento III os indivíduos serão orientados a realizar o mesmo procedimento descrito para os tratamentos I e II, quanto à escovação e o enxágüe com água, e em adição deverão realizar um bochecho com solução fluoretada por 1 minuto, antes de dormir e imediatamente após o procedimento de higiene bucal. A solução não deverá ser ingerida. Não será realizado nenhum enxágüe com água após este procedimento. Após cada fase experimental amostras de saliva não estimulada e biofilme dentário serão coletadas 6 horas após o último procedimento de higiene bucal realizado de acordo com o tratamento. Todos os indivíduos farão parte de todos os grupos de tratamento, porém em diferentes períodos de tempo. A duração de todo o período experimental será de 8 semanas.

Riscos e Benefícios: O experimento não oferece riscos aos voluntários, uma vez que os períodos experimentais são curtos, não havendo prejuízos pela utilização do dentifrício não fluoretado. Além disso, não haverá interrupção de higiene bucal em nenhum período experimental. Os produtos utilizados neste estudo serão fornecidos pelos pesquisadores e o voluntário terá acesso ao flúor proveniente destes produtos nos demais períodos experimentais.

Acompanhamento e Assistência: O participante do estudo receberá atendimento odontológico durante o período do experimento, caso seja necessário.

Direito de Desistência: O indivíduo tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer ônus para si.

Sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Entretanto, todas as informações obtidas neste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, sem divulgação dos nomes das pessoas envolvidas.

Consentimento: Declaro ter lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este formulário, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste termo. Assim, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, aceito participar deste estudo.

Nome do Participante: _____ Assinatura: _____

Telefone para contato: _____ Data: _____

Nome do Pesquisador: _____ Assinatura: _____

Telefone do Pesquisador para contato: 3316.5193

Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS

Telefone para contato: 3316.5187

Este consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa, e outra de propriedade dos pesquisadores responsáveis.

ANEXO F

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

Instruções aos Participantes

O estudo será constituído de 4 fases experimentais de 7 dias, com intervalos de 1 semana entre as fases. Antes do início de cada fase experimental, cada participante receberá o(s) produto(s) estabelecido(s) e um frasco-medida de 10 ml. Durante o período do estudo, favor seguir as seguintes instruções:

- Não realizar bochechos com nenhum produto químico e não receber aplicações profissionais tópicas de flúor. Utilizar somente os produtos fornecidos pelos pesquisadores;
- Escovar os dentes, de modo habitual, com o dentifrício fornecido. Caso precise escovar mais vezes do que a frequência estabelecida, realizar a escovação sem o dentifrício;
- Comparecer ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM - sala 402) nas datas e horários marcados para coleta de saliva e biofilme dentário;
- No dia de coleta das amostras de saliva e biofilme dentário, o participante não deverá realizar o procedimento de higiene bucal pela manhã, como também não poderá ingerir alimentos ou líquidos uma hora e meia antes da coleta;
- Caso seja necessário o uso de algum tipo de medicação durante o período experimental, comunicar imediatamente o pesquisador responsável;
- Semanalmente o participante deverá comparecer ao LABIM para devolver os produtos em uso e trocá-los por outros, evitando confusões na sua utilização durante as fases experimentais seguintes;
- Em caso de dúvidas, entre em contato: 3316-5193 / 9726-6848 (Daniela).

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