**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

FABIANO VIEIRA VILHENA

**Eficácia de um novo dentifrício líquido com baixa concentração de
flúor e pH acidulado na prevenção de lesões cariosas: estudo clínico
randomizado**

**BAURU
2008**

FABIANO VIEIRA VILHENA

Eficácia de um novo dentifrício líquido com baixa concentração de flúor e pH acidulado na prevenção de lesões cariosas: estudo clínico randomizado

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

**BAURU
2008**

Vilhena, Fabiano Vieira

V711e Eficácia de um novo dentifrício líquido com baixa concentração de flúor e pH acidulado na prevenção de lesões cariosas: estudo clínico randomizado / Fabiano Vieira Vilhena. -- Bauru, 2008.
131p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 146/2005

Data: 02 de dezembro de 2005

DADOS CURRICULARES

Fabiano Vieira Vilhena

- Filiação Túlio Parado Vilhena e Maria Luzia Vieira Vilhena
- 06/06/1973 Nascimento – São José dos Campos - SP
- 1992 - 1996 Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL
- 1997 - 1998 Coordenador de saúde bucal do município de General Carneiro – MT
- 1998 - 2005 Coordenador do Programa Oralls de Odontologia Escolar desenvolvida pela empresa Oralls – Saúde Coletiva
- 1999 - 2007 Professor de Odontologia Preventiva dos Cursos de Especialização em Saúde Coletiva das APCDs de Bauru e São José dos Campos, ABO - SP e do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Centrinho - USP
- 2001 - 2003 Curso de Especialização em Saúde Coletiva – APCD – SJC - SP
- 2003 - 2005 Curso de Pós-Graduação em Odontologia em Saúde Coletiva, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
- 2004- 2005 Bolsista de Mestrado Capes sob orientação da Profa. Dra. Magali de Lourdes Caldana
- 2005 - 2008 Desenvolvimento do projeto “KIT ESCOVINHA” dentro da Incubadora de Negócios de São José dos Campos - SP
- 2006- 2008 Bolsista de Doutorado FAPESP (proc.05/04090-8) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
- Associações ABO – Associação Brasileira de Odontologia
- FDI – *World Dental Federation*
- IADR - *International Association for Dental Research*
- SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Túlio e Maria Luzia**,
os quais me concederam o dom da vida, e hoje me proporcionam a oportunidade
deste momento;

Aos meus irmãos, **Lucas e Fabrício**,
pela torcida e incentivo mesmo que distante;

Ao meu avô **João Vilhena**,
pela “semente odontológica” plantada em nossa família, e pelo exemplo de trabalho
e dedicação ao próximo;

A minha querida esposa **Maria Cristina**,
pela cumplicidade, carinho, atenção, compreensão e amor oferecidos em todos os
momentos.

Dedico este Trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À orientadora **Marília**,

Ao longo de nosso trabalho percebi o quanto foste importante para o meu crescimento pessoal e profissional. Nunca tive dúvida que “superação” é a minha palavra, e ao seu lado ela foi sentida e exercida por diversas vezes. Como você mesmo diz, juntos formamos uma grande dupla e obtivemos grandes conquistas. Marília agradeço de coração sua presença em minha vida, me mostrando de forma simples e gentil o quanto sou capaz.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa de sua Reitora, Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FOB-USP.

À Profa. Dra. Silvia Helena de Carvalho Sales Peres e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira pelas sugestões e correções deste trabalho no Exame de Qualificação.

A todos os funcionários da FOB, em especial a secretária Vera pelo auxílio na condução de meu doutorado, e aos funcionários do Laboratório de Bioquímica, Ovídio, Thelma e Larissa, pelo apoio, ensinamento e amizade.

A todos os amigos da FOB, em especial os amigos do departamento de Ciências Biológicas e Odontologia em Saúde Coletiva, meu muito obrigado pelo apoio e amizade no dia – a – dia do trabalho desenvolvido e também nos momentos de descontração.

A todos os meus familiares que me apoiaram e incentivaram Neste caminho.

Aos amigos da Incubadora de Negócios de São José dos Campos pela oportunidade de aprender a empreender, e também pelos momentos de diversão.

À FAPESP, pelo suporte financeiro (proc. 05/04090-8) que viabilizou este estudo científico.

A todas as pessoas que, embora não citadas, de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e concretização desta etapa importante em minha vida.

Eu não quero mais mentir
Usar espinhos que só causam dor
Eu não enxergo mais o inferno que me atraiu
Dos cegos do castelo me despeço e vou
A pé até encontrar
Um caminho, o lugar
Pro que eu sou
Eu não quero mais dormir
De olhos abertos me esquenta o sol
Eu não espero que um revólver venha explodir
Na minha testa se anunciou
A pé a fé devagar
Foge o destino do azar
Que restou
E se você puder me olhar
E se você quiser me achar
E se você trazer o seu lar
Eu vou cuidar, eu cuidarei dele
Eu vou cuidar
Do seu jardim
Eu vou cuidar, eu cuidarei muito bem dele
Eu vou cuidar
Eu cuidarei do seu jantar
Do céu e do mar, e de você e de mim

...

Nando Reis

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o efeito de uma formulação de dentifrício líquido com pH acidulado e baixa concentração de flúor (F) na prevenção de novas lesões cáries e na incorporação de F no biofilme dentário e nas unhas. Foram selecionadas 1.402 crianças com idade inicial de 4 anos e experiência de cárie, as quais foram divididas em 4 grupos que diferiram em relação ao dentifrício utilizado por 20 meses: G1– dentifrício líquido (1100 ppmF, NaF, pH 4,5, n=345), G2 - dentifrício líquido (1100 ppmF, NaF, pH 7,0, n=343), G3 - dentifrício líquido (550 ppmF, NaF, pH 4,5, n=354), G4 – pasta comercial Sorriso Fresh (controle -1100 ppmF, NaF, pH 7,0, n=360). A pasta comercial e os dentifrícios experimentais foram dispensados na escova usando as técnicas transversal” e “da gota” , respectivamente. A progressão de cárie (ceo-s) foi avaliada no início do estudo e após 12 e 20 meses de uso contínuo dos dentifrícios. Uma subamostra de cada grupo participou na segunda etapa do estudo, conduzida 15 meses após o início da primeira etapa. Após as unhas das mãos e dos pés terem sido deixadas crescer por 14 dias, foram coletadas unhas das mãos e dos pés em duas ocasiões separadas (n=15 para cada grupo). Amostras de biofilme dentário foram coletadas 1 h após a última utilização dos respectivos dentifrícios (n=21 por grupo). Biofilme e unhas foram analisados para o F com eletrodo, após difusão facilitada por HMDS. Os dados de ceo-s foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Os dados do biofilme foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, ao passo que os dados das unhas foram analisados por ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Após 20 meses, 1053 escolares (G1=271, G2=262, G3=250 e G4=270) completaram o estudo. As médias ($\pm$ DP) do ceo-s no baseline e após 20 meses, e do respectivo incremento para cada grupo foram, respectivamente: G1) $5,07 \pm 5,11$, $7,13 \pm 6,53$ e 30,8%; G2) $4,80 \pm 5,00$, $6,88 \pm 6,78$ e 31,9%; G3) $5,24 \pm 5,37$, $7,29 \pm 7,27$ e 30,5%; G4) $5,05 \pm 4,89$, $7,13 \pm 6,35$ e 31,1%. Não houve diferença significativa entre os grupos para nenhuma dessas variáveis. A média ($\pm$ EP, unidade mmol / Kg de peso seco) das concentrações de F no biofilme foram $3,091 \pm 0,984a$, $1,667 \pm 0,410a$, $1,448 \pm 0,303a$ e $0,405 \pm 0,103b$ para G1, G2, G3 e G4, respectivamente. As [F]s nas unhas das mãos foram significativamente mais

elevadas quando comparadas às dos pés. As mais altas concentrações de F foram encontradas para a pasta comercial, diferindo significativamente dos dentifrícios líquidos. As menores [F]s foram encontradas para o dentifrício de 550 ppm F, diferindo significativamente dos demais dentifrícios. Os dentifrícios líquidos de 1100 ppm F levaram a [F]s intermediárias nas unhas e não diferiram significativamente um do outro. Os resultados sugerem que o dentifrício de baixa concentração de F (550 ppm) e pH acidulado tem a mesma eficácia anti-cáries que os dentifrícios convencionais (1100 ppm F). A redução do pH do dentifrício aumenta a incorporação de F no biofilme sem afetar a concentração de F nas unhas. Portanto, o uso do dentifrício de baixa concentração de F e pH acidulado parece ser uma boa alternativa para prevenir cárie dentária e reduzir a ingestão de F a partir do dentifrício em crianças pequenas.

Palavras -chave: Marcadores biológicos. Unhas. Dentifrício. Cárie dentária. Fluorose dentária. Biofilme dentário. Odontologia preventiva.

ABSTRACT

Anticaries efficacy of a new low-fluoride liquid acidic dentifrice: a randomized clinical trial

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of a liquid dentifrice with reduced pH and low fluoride concentration for the prevention of new carious lesions and fluoride uptake in dental biofilm and nails. One thousand four hundred and two 4-year-old schoolchildren with caries experience were randomly allocated to 4 groups, differing according to the dentifrice used for 20 months: G1—liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 4.5, n=345), G2—liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 7.0, n=343), G3—liquid dentifrice (550 ppmF, NaF, pH 4.5, n=354), G4—commercial toothpaste (control-1,100 ppmF, NaF, pH 7.0, n=360). The liquid dentifrices and toothpaste were applied to the toothbrush using the “drop” and “transverse techniques, respectively. Caries progression (dmfs) was evaluated at baseline and after 12 and 20 months of continuous use of the dentifrices. A sub-sample of each group participated in the second section. Fingernails and toenails were clipped in two separate occasions, after being allowed to grow for 14 days (n=15 for each group). Plaque samples were collected 1 hr after the last use of the respective dentifrices (n=21 for each group). Plaque and nails [F]s were analyzed with the electrode, after HMDS-facilitated diffusion. dmfs data were analyzed by Kruskal-Wallis test ($p<0.05$). Plaque data were tested by ANOVA and Tukey's test, while nails data were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA and Bonferroni's test ($p<0.05$). Results: 1,053 children were examined after 20 months (271, 262, 250 and 270 children for G1, G2, G3 and G4, respectively). Mean dmfs($\pm$ SD) at baseline, after 20 months and % increment were, respectively: G1) 5.07 ± 5.11 , 7.13 ± 6.53 and 30.8%; G2) 4.80 ± 5.00 , 6.88 ± 6.78 and 31.9%; G3) 5.24 ± 5.37 , 7.29 ± 7.27 and 30.5%; G4) 5.05 ± 4.89 , 7.13 ± 6.35 and 31.1%. No significant differences were found among the groups for all the variables tested. Mean ($\pm$ se, unit mmol/Kg dry weight) plaque [F]s were $3.091\pm 0.984a$, $1.667\pm 0.410a$, $1.448\pm 0.303a$ $0.405\pm 0.103b$ for G1, G2, G3 and G4, respectively. Fingernails [F]s were significantly higher when compared to toenails. The highest [F]s were found for that significantly differed from the experimental liquid dentifrices, except for A (toenails only). The lowest [F]s were found for C, which significantly differed from all the other dentifrices. The experimental 1,100 ppm F dentifrices led to intermediary [F]s in nails and did not significantly differ from

each other. Conclusions: The results suggest that the low-fluoride (550 ppm F) acidic dentifrice has the same anticaries effectiveness as the conventional 1,100 ppm F dentifrices. The reduction of the dentifrice pH increases the F uptake in dental plaque and does not affect nails [F]s. Thus, the use of low-fluoride acidic dentifrices seems to be a good alternative to prevent dental caries and reduce the F intake from dentifrice in small children.

Keywords: Biological markers. Nails. Dental plaque. Dentifrices. Preventive dentistry. Dental Fluorosis. Dental caries.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	DENTIFRÍCIO FLUORETADO	29
2.1.1	Considerações Gerais	29
2.1.2	Mecanismos de ação dos dentifrícios fluoretados no controle da cárie dentária	30
2.1.3	Principais agentes fluoretados presentes nos dentifrícios	32
2.1.4	Uso Racional do dentifrício fluoretado	32
2.2	PRESENÇA DE F NO BIOFILME DENTÁRIO	37
2.3	PRESENÇA DE F NAS UNHAS	42
3	PROPOSIÇÃO	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
4.2	ASPECTOS ÉTICOS	51
4.3	PREVENÇÃO DE NOVAS LESÕES CARIOSAS	52
4.3.1	Obtenção dos materiais para o estudo	52
4.3.1.1	Desenho animado	52
4.3.1.2	Moldes em alumínio	52
4.3.1.3	Dentifrícios	53
4.3.1.4	Escovas dentais	54
4.3.1.5	Kits de Armazenamento Coletivo do Material de Higiene Bucal	54
4.3.1.6	Instrumental para exames clínicos	55
4.3.2	Amostra	55
4.3.2.1	Seleção dos voluntários da cidade de São José dos Campos	55
4.3.2.2	Randomização da amostra e composição dos grupos de estudo	57
4.3.3	Coleta de dados	58
4.3.3.1	CrITÉRIOS para o exame	58
4.3.3.2	Calibração	61
4.3.4	Distribuição do material de higiene bucal	63
4.3.5	Análise do pH dos dentifrícios	65
4.3.6	Análise do F dos dentifrícios	65

4.4	INCORPORAÇÃO DE F NO BIOFILMO DENTÁRIO	66
4.4.1	Material utilizado	66
4.4.2	Coleta do biofilme dentário	66
4.4.3	Análise da concentração de F no biofilme	67
4.5	CONCENTRAÇÃO DE F PRESENTE NAS UNHAS.....	68
4.5.1	Material utilizado	68
4.5.2	Coleta da Unha	68
4.5.3	Análise das Unhas	68
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4.6.1	ceo-s	70
4.6.2	Biofilme Dentário	70
4.6.3	Unhas	70
5	RESULTADOS	71
5.1	ANÁLISE DOS DENTIFRÍCIOS	71
5.1.1	Análise do pH	71
5.1.2	Análise de F	71
5.2	PREVENÇÃO DE NOVAS LESÕES CARIOSAS.....	73
5.3	INCORPORAÇÃO DE F NO BIOFILME DENTÁRIO	74
5.4	INCORPORAÇÃO DE F NAS UNHAS	75
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	97
	ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO

O flúor (F) é sem dúvida um grande colaborador no controle da cárie dentária. Sua utilização em larga escala beneficia milhões de pessoas (PINTO, 2000). Contudo, a continuidade do uso deste agente em ações de saúde pública necessita cada vez mais atenção, pois o risco de ocorrência de fluorose dentária pode chegar a níveis inaceitáveis (NARVAI, 2000).

O último levantamento das condições de saúde bucal da população brasileira, o SB – Brasil 2003 (Ministério da Saúde) mostrou que a prevalência da fluorose foi de 9% em crianças de 12 anos e de 5% nos adolescentes de 15 a 19 anos no Brasil.

A fluorose dentária é um distúrbio dos efeitos decorrentes da intoxicação crônica pelo F, quando ingerido em excesso durante o período de formação dos dentes. De caráter *dose-dependente*, o aspecto clínico da fluorose está diretamente relacionado à quantidade de F absorvido pelo indivíduo, podendo variar desde linhas brancas finas até um esmalte opaco e de aspecto calcáreo, que pode se fraturar após a erupção e/ou se pigmentar. Uma vez que a fluorose ocorre durante a amelogênese, a idade de risco para a dentição permanente é de onze meses a sete anos de idade (BURT, 1992; BUZALAF et al. 2001).

Um dos fatores de risco para a fluorose dentária é o uso precoce de dentifrícios fluoretados, e conseqüentemente a sua ingestão pela população infantil. (WARREN; LEVY, 1999; MASCARENHAS, 2000; BUZALAF et al, 2001). Neste sentido, medidas para a redução de ingestão de F a partir dos dentifrícios devem ser tomadas no sentido de prevenir a fluorose dentária (WARREN; LEVY, 1999; MASCARENHAS, 2000; LIMA; CURY, 2001; De ALMEIDA et al., 2007, DO; SPENCER, 2007), sem que a função cariostática dos dentifrícios seja comprometida.

Uma das estratégias seria a utilização de dentifrícios de baixa concentração de F (250-500 ppm). No entanto, uma revisão sistemática concluiu que enquanto os dentifrícios contendo 250 ppm F não são tão efetivos para a prevenção de cáries nos dentes permanentes quando comparados com aqueles contendo 1000

ppm F ou mais, estudos adicionais ainda são necessários para testar a eficácia de dentifrícios de 500 ppm F quando comparados com os de 1000 ppm F ou mais (AMMARI *et al.*, 2003). Vale ressaltar que nos estudos clínicos randomizados que utilizaram dentifrícios contendo 500 ppm F o pH dos produtos girava em torno de 7,0. Tem sido demonstrado que o pH influencia consideravelmente a difusão de F no esmalte dentário, isto é, em pH baixo existe um aumento da formação de CaF_2 no cristal de apatita. (PETERSSON *et al.*, 1989). Um melhor efeito anticárie dos dentifrícios ácidos com baixa concentração de F foi encontrado em estudos *in vitro* (BRIGHENTI *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007) e *in situ* (NOBRE-DOS-SANTOS *et al.*, 2007). A redução de pH também mostrou um aumento da concentração do F na saliva sem alterar a biodisponibilidade do F (OLYMPIO *et al.*, 2007).

Outra possibilidade para redução da quantidade de F ingerido pelo público infantil é a adoção de uma diminuição da quantidade de dentifrício utilizado para a escovação. Uma pequena quantidade pode ser dispensada na escova através da “técnica transversal” (VILHENA, 2000). Mais recentemente, a “técnica da gota” para a aplicação do dentifrício líquido na escova tem mostrado uma maior facilidade de padronizar o uso de uma pequena quantidade de dentifrício na escovação dos dentes quando comparado ao creme dental (VILHENA *et al.*, 2008).

Combinando as estratégias apresentadas anteriormente, o presente estudo clínico randomizado avaliou a eficácia de um dentifrício líquido acidulado experimental de baixa concentração de F na prevenção da cárie em crianças, bem como na incorporação de F no biofilme dentário e nas unhas, como indicadores de biodisponibilidade do F.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordados aspectos relacionados aos dentifrícios fluoretados, bem como presença de F no biofilme dentário e nas unhas.

2.1 DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS

2.1.1 Considerações Gerais

O dentifrício caracteriza-se por ser um preparado usado para a limpeza dos dentes, composto geralmente por agentes ativos, flavorizantes, abrasivos, detergentes, aglutinantes e conservantes. Apresentam-se na forma líquida, de pasta, gel ou pó, e podem conter também medicamentos (STAMM, 2007; BUZALAF, 2008). Formulações terapêuticas (preventivas) dos dentifrícios ganharam força a partir da metade do século XX, onde até então os dentifrícios tinham a função meramente cosmética. Este efeito terapêutico tem tido um papel importante no controle das doenças bucais (Figura 2.1), particularmente sobre a cárie dentária, através da adição do F (NARVAI, 2000; CURY, 2001; STAMM, 2007; BUZALAF, 2008).

Figura 2.1 – Funções dos dentifrícios atuais

O F dos dentifrícios tem capacidade de interferir na iniciação e progressão da lesão de cárie e assim manter o equilíbrio mineral dos dentes. Ele também é capaz

de repor perdas minerais que já ocorreram no tecido. Quando se escova com dentifrício não fluoretado, um efeito de aproximadamente 50% na mineralização é obtido, o qual nada mais é do que a capacidade da saliva de repor mineral. Contudo, quando se utiliza o dentifrício fluoretado, a capacidade da mineralização da saliva é ativada pelo F, ocorrendo uma reposição de 90%. Dessa maneira, a eficácia dos dentifrícios fluoretados é promovida pelos seguintes fatores: (1) efeito de limpeza, através da escovação e remoção da placa bacteriana, diminuindo seu potencial patogênico permitindo a ação da saliva; (2) efeito do F do dentifrício inibindo a desmineralização e promovendo a remineralização; (3) Inibição do metabolismo bacteriano, embora esta última ação só tenha sido demonstrada *in vitro*. Muitos resultados clínicos observados nos últimos anos têm demonstrado o potencial preventivo dos dentifrícios fluoretados, proporcionando reduções de 25 a 40% na prevalência de cárie dentária. (NARVAI, 2000; CURY, 2001; MARINHO et al., 2003; TWETMAN et al., 2003; LYNCH; TEN CATE, 2005).

Uma evidência da importância dos dentifrícios fluoretados como medida de saúde pública vem sendo relatada ao longo dos anos, beneficiando desde os países menos favorecidos até os de primeiro mundo, confirmando que o declínio da prevalência das cáries coincidiu com o aumento do uso de dentifrícios fluoretados (GOLDMAN et al., 2008).

2.1.2. Mecanismos de ação dos dentifrícios fluoretados no controle da cárie dentária

No meio bucal, podemos dividir a presença de fluoretos em cinco categorias (BUZALAF, 2008):

- F_o – F externo ao esmalte (presente no biofilme e saliva);
- F_s – F incorporado na estrutura do cristal, fase sólida, fortemente ligado ou apatita fluoretada;
- F_L – F presente na fase líquida do esmalte (espaços intercristalinos);
- F_a – F adsorvido à superfície do cristal, também chamado de F fracamente ligado;

- CaF_2 – material “similar ao fluoreto de cálcio” depositado sobre ou no esmalte, também considerado F fracamente ligado.

Diante de um processo de desmineralização provocado pela presença de ácidos bacterianos, o F atua como agente de remineralização transformando os cristais de apatita presentes no esmalte dentário em cristais de apatita fluoretados, estes últimos mais resistentes ao desafio cariogênico (BUZALAF, 2008).

O F incorporado no esmalte dentário tem se mostrado insuficiente para reduzir a dissolução dos cristais. O efeito anti - cariogênico do F está relacionado à presença do mesmo nos fluídos orais, mesmo em concentrações relativamente baixas, que irão se ligar ao esmalte dentário (F_a). Durante o ato de escovar os dentes com dentifrícios fluoretados, o F é oferecido à cavidade bucal. Mesmo que grande parte do F sofra uma diluição, e seja posteriormente deglutido, pequenas quantidades de F podem ficar retidas e serem liberadas posteriormente (TEN CATE, 1997; LYNCH, 2004; LYNCH; TEN CATE, 2005). A eficácia clínica do dentifrício fluoretado pode ser associada à presença de níveis elevados de F no biofilme dentário e saliva devido ao uso regular dos mesmos (LYNCH, 2004; PESSAN et al., 2008) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Representação esquemática do efeito do F_a . A, cobertura total, C, cobertura total após um ataque ácido, B, cobertura parcial, e D, cobertura parcial após um ataque ácido

2.1.3. Principais agentes fluoretados presentes nos dentifrícios

Apesar de trabalhos relatando o uso de diversos compostos fluoretados (STAMM, 2007), de uma forma geral os compostos de F mais comumente incorporados aos dentifrícios são os fluoretos de sódio (NaF) e ou monofluorfosfatos de sódio (MFP) (WARREN; LEVY, 1999; AMMARI et al. 2003).

Segundo Chaves e Vieira – da – Silva (2002), durante um estudo de avaliação da efetividade da escovação com dentifrício fluoretado na redução da cárie dentária, foram comparados dentifrícios com diferentes concentrações de F (250, 1.000, 1.500, 2.500, 2.800 ppm) e com diferentes princípios ativos, sendo que houve uma predominância de investigações comparando dentifrícios à base de fluoreto de sódio e monofluorfosfato de sódio. Esses estudos foram divididos em dois grupos: aqueles com concentrações em torno de 1.000 a 1.500 ppm e um segundo grupo independente das concentrações. Observou-se que não houve diferenças de efeito entre os dois princípios ativos para o grupo 1.000 - 1.500 ppm. A escovação com dentifrício fluoretado foi responsável por uma redução de cárie de 29,1% quando comparada com o dentifrício sem F. Embora o aumento da concentração do F pareça estar associado com o aumento do efeito, com 17% de redução global para o grupo com maiores concentrações, seria pouco recomendável essa indicação, haja vista a grande preocupação com o excesso de ingestão do F por crianças, considerando a sua associação com a fluorose. Dentifrícios fluoretados com concentrações superiores a 1.500 ppm têm sido contra-indicados.

2.1.4 Uso Racional do dentifrício fluoretado

CURY (2001) relata que, os dentifrícios fluoretados são considerados a forma mais racional de uso tópico de F, complementando as deficiências mecânicas da escovação e estabelecendo um controle físico-químico da cárie dentária.

Entretanto, o uso inadvertido do dentifrício fluoretado por crianças está relacionado ao aumento da fluorose dentária. (WARREN; LEVY, 1999; NARVAI, 2000; MASCARENHAS, 2000; CURY, 2001; BUZALAF et al., 2002; CHAVES; VIEIRA – DA – SILVA, 2002; LEVY, 2003, ZERO, 2006).

Dentifrícios com concentrações de F de 1.000 ppm contêm 1,0 mg F/g. Em crianças com menos de seis anos de idade, a quantidade média de dentifrício por

escovação é em torno de 0,55 g (RICHARDS; BANTING, 1996), correspondendo a uma exposição de F de 0,55 mg. Uma média de 48% desta quantidade é ingerida por crianças de 2 a 3 anos de idade, 42% por crianças de 4 anos de idade e 34% por crianças de 5 anos de idade (BARNHART et al, 1974; RICHARDS; BANTING, 1996). Assumindo que as médias dos pesos corporais são de 15, 18 e 20 Kg, respectivamente, a ingestão de dentifrício de uma única escovação é de 0,018, 0,013 e 0,009 mg/Kg/dia, respectivamente. Assim, é evidente que a escovação aumenta substancialmente a exposição ao F, particularmente em crianças de 2 a 3 anos de idade, e de maneira especial, se as crianças escovam os dentes mais do que uma vez por dia.

Em um estudo realizado por Lima; Cury (2001) com crianças brasileiras de 20 - 30 meses de idade residentes em áreas com água fluoretada observou-se que as mesmas ingeriram em média 0,09 mg de F/Kg/dia, tendo a dieta contribuído com 45% e o dentifrício com 55%, deste modo excedendo a dose recomendada que fica entre 0,05 a 0,07 mg de F/Kg/dia (BURT, 1992). Um estudo com crianças brasileiras entre um e três anos, encontrou uma ingestão diária total de F pela dieta e dentifrício de 0,13 mg/Kg peso corporal, sendo que o dentifrício contribuiu com 80% desta dose (ALMEIDA et al., 2007).

Assim, a melhor estratégia em relação ao risco – benefício no uso de dentifrícios fluoretados, deve ser aquela que minimiza a quantidade de F ingerido e maximiza a concentração de F disponível no meio bucal (BENTLEY, ELLWOOD, DAVIES, 1997). Seguindo este conceito duas estratégias têm sido indicadas: - redução da quantidade de dentifrício utilizada na escovação e redução da quantidade de F no dentifrício.

Redução da quantidade de dentifrício usado na escovação

Uma boa alternativa para se reduzir e dosar a quantidade de dentifrício dispensada na escova é a técnica transversal de aplicação do dentifrício (VILLENA, 2000). Esta técnica (Figura 2.3) consiste em posicionar o tubo de dentifrício em posição perpendicular ao longo eixo da escova, passar no centro da ponta ativa do instrumento, uma quantidade de dentifrício correspondente a, no máximo, metade da

largura da ponta ativa. Essa quantidade equivale a um grão de ervilha pequena, que é suficiente para a finalidade.

A “técnica da tampa”, a qual consiste em com a bisnaga fechada pressionar levemente o tubo de modo a que fique retida na parte interna da tampa (seja ela rosqueável ou não) uma pequena quantidade de pasta a ser usada na escovação, tem sido sugerida para crianças abaixo de 4 anos (Figura 2.4) (Secretaria Estadual de Saúde - SP, 2000).

Figura 2.3 – Técnica transversal

Figura 2.4 – Técnica da tampa

Fonte: CURY, 2002.

Bentley e colaboradores (1997) realizaram um estudo para determinar a quantidade de dentifrício fluoretado colocado na escova de crianças por suas mães quando treinadas para usar uma quantidade equivalente a um "grão de ervilha" ou a uma "sujeirinha". Foram utilizados dois dentifrícios contendo diferentes formatos de aberturas do tubo (redondo e estrela) e diferentes consistências do dentifrício (Colgate convencional e Colgate gel). Não houve diferença estatística entre os bicos dos tubos de dentifrício. No entanto, quando a mãe foi orientada a colocar "uma sujeirinha" (0,22 g em média) houve diferença para o "grão de ervilha" (0,30 g em média). Outra diferença estatisticamente significativa ocorreu entre a dispensação de Colgate convencional (0,28 g em média) e o Colgate gel (0,25 g em média). Os resultados sugeriram que a escolha pela instrução de usar "uma sujeirinha" de quantidade de dentifrício em crianças pré-escolares deve ser preferida à sugestão de "grão de ervilha" para redução da quantidade de dentifrício dispensada na escova. Outra solução encontrada para o problema de dosagem do dentifrício foi descrita por Vilhena; Sales Peres; Bastos (2004) que preconizaram o uso de

dentífrico líquido através da “técnica da gota” (Figura 2.5) para as ações de higiene bucal coletiva.

Figura 2.5 – Técnica da gota

Silva e colaboradores (2004) relataram o potencial anti - cariogênico de uma formulação de dentífrico na forma líquida (o termo “dentífrico líquido” não é um líquido como a água, e sim menos viscoso do que os géis tradicionais). Os autores compararam o Colgate Total na forma de pasta e o Colgate Total na forma líquida, e concluíram que o dentífrico líquido estudado previne 13,1% mais lesões de cárie interproximal, do que a pasta de dente tradicional.

Em outro estudo, Vilhena e colaboradores (2008) avaliaram a quantidade de creme dental e dentífrico líquido aplicada por crianças entre 4 a 8 anos para a prática da escovação nos municípios de Bauru e Bariri, ambos no estado de São Paulo. Uma balança portátil de precisão foi utilizada para pesar os dentífricos dispensados. A quantidade de creme dental dispensada pelos escolares foi em média 0,41 g em Bauru e 0,48 g em Bariri. Não houve diferença significativa entre os escolares de Bauru e Bariri em relação ao dentífrico líquido, sendo a média dispensada pela amostra de 0,15 g. Na amostra do creme dental, 28% das crianças dispensaram mais do que 0,50 g de dentífrico (risco de fluorose dentária). Já em relação ao dentífrico líquido, 100% da amostra dispensou na escova uma quantidade menor do que 0,50 g. O estudo concluiu que o dentífrico líquido, através da “técnica da gota”, pode ser facilmente utilizado, dispensando uma pequena quantidade padronizada de dentífrico para a escovação, evitando não só o desperdício, mas também diminuindo o risco à fluorose.

Redução da quantidade de F no dentifrício

Outra ação adotada para se reduzir a ingestão de F a partir do dentifrício é a redução da concentração de F nos mesmos. No entanto, considerando uma relação dose-resposta, é possível que formulações com reduzidas concentrações de F possam levar a uma redução da atividade anti-cárie (WARREN; LEVY, 1999; AMMARI et al., 2003).

Muitos estudos clínicos longitudinais sobre a efetividade de dentifrícios com baixas concentrações de F têm sido realizados. Warren e Levy (1999), Ammari e colaboradores (2003) e Steiner e colaboradores (2004) realizaram revisões a respeito do assunto. Pode-se observar que alguns dos estudos não encontraram diferenças significativas entre o dentifrício padrão (1000-1100 ppm) e os dentifrícios com baixa concentração de F (250-550 ppm F) (AMMARI et al., 2003). Em contraste, outros estudos concluíram que os dentifrícios com baixas concentrações de F podem ser um pouco menos ou até 2/3 menos (STEINER et al., 2004) efetivos do que os dentifrícios de 1000 ppm (AMMARI et al., 2003). À primeira vista, estes resultados podem sugerir que os dentifrícios com baixa concentração de F são menos efetivos em termos de prevenção de cárie que o padrão 1100 ppm. Entretanto, pode ser que a concentração de F de 250 ppm está muito distante do padrão 1100 ppm. Uma formulação mais praticável poderia ter concentrações entre 500-550 ppm (WARREN; LEVY, 1999).

Um dos poucos estudos com dentifrício de baixa concentração no qual a amostra foi formada por crianças pré-escolares e dentifrício de 500-550 ppm, foi relatado por Winter e colaboradores (1989). Esta pesquisa de três anos, com design duplo cego, comparou a efetividade de dentifrícios com 550 e 1.055 ppm F em crianças que tinham dois anos de idade no "baseline" pela medição dos incrementos no índice ceo-s. O incremento de cárie foi levemente mais alto (10%) no grupo que utilizou dentifrício de baixa concentração de F depois de três anos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que "a pasta de dente com baixa concentração de F apresentou uma atividade anti-cárie similar ao da pasta controle e poderia, então, ser recomendada para crianças jovens". Entretanto, esta conclusão foi baseada em um único estudo e experimentos adicionais de tais dentifrícios deveriam ser conduzidos.

Recentemente, Lima et al (2008) avaliaram durante um ano a capacidade anti-cárie de dentifrícios de baixa concentração de F (500 ppm F) comparados à concentração padrão (1.100 ppm F). A amostra foi composta por crianças de 2 a 4 anos de idade com e sem cárie ativa. Os resultados sugeriram que em áreas com baixa concentração de F na água de abastecimento (< 0,3 ppm) o efeito das duas concentrações de F são similares na prevenção da cárie dentária em crianças cárie inativas. Entretanto, o dentifrício com baixa concentração de F não teve a mesma eficácia em crianças cárie ativas quando comparado à concentração de 1100 ppm F. Os autores concluíram ainda que a atividade de cárie de cada criança deve ser levada em consideração no momento de se indicar o dentifrício fluoretado. Um aspecto importante é que este estudo foi conduzido numa área não fluoretada.

Saxegaard; Rolla (1988) encontraram que a formação de CaF_2 pode ser melhorada pelo aumento da concentração de F do agente tópico, aumentando a frequência de exposição e diminuindo o pH do agente tópico. Já que a formação de CaF_2 com pH neutro requer altas concentrações de F ou longo período de exposição, um agente fluoretado com baixo pH induz, imediatamente, a formação de grande quantidade de CaF_2 sobre o mineral do dente (OGAARD et al, 2001). Com base nestas afirmações, formulações dentifrícias de baixa concentração de F e pH acidulado poderiam ter uma melhor reatividade com o esmalte e um menor risco de ocasionarem fluorose dentária.

Estudos *in situ* (NOBRE-DOS-SANTOS et al., 2007) e *in vitro* (BRIGHENTI et al., 2006; ALVES et al. 2007) avaliaram formulações de dentifrícios de baixa concentração de F (550 e 412 ppm F) e pH reduzido (5,5 e 4,5). Os resultados sugeriram que as formulações de baixa concentração de F e pH acidulado tiveram efeito similar ao dentifrício contendo 1.100 ppm F e pH neutro (7,0). No entanto, até o momento, não existem estudos clínicos avaliando estas formulações com pH acidulado.

2.2 PRESENÇA DE F NO BIOFILME DENTÁRIO

Duckworth; Morgan; Murray (1987) monitoraram as concentrações salivares de F duas vezes por semana, quando do uso de bochechos com diversas

concentrações de F, verificando que os níveis de F na saliva levaram cerca de 2 semanas para atingir um estado de equilíbrio, quando um novo tratamento era iniciado, ou para retornar aos níveis basais. Tal estado de equilíbrio foi correlacionado com o armazenamento do F em reservatórios intrabuciais. O mesmo foi demonstrado num estudo semelhante, utilizando dentifrícios fluoretados (DUCKWORTH; MORGAN, 1991). Neste mesmo estudo observou-se que os níveis de F no biofilme dentário eram muitas vezes mais altos que na saliva, havendo, no entanto, uma forte correlação dos níveis de F nestes compartimentos. Isto levou os autores a considerarem o biofilme como um dos principais reservatórios intrabuciais de F.

Muitos relatos publicados desde os anos de 1960, revisados por TATEVOSSIAN (1990), encontraram concentrações de F no biofilme cerca de 100 vezes maiores que na saliva. Através de análises bioquímicas, podem ser identificadas três formas de F no biofilme dentário: F iônico (ou livre), ionizável e fortemente ligado ao biofilme dentário (OPHAUG et al., 1987). O F iônico é a fração presente na fase aquosa extracelular do biofilme, conhecida como fluido do biofilme, quando a mesma está em repouso, ou seja, não metabolizando (pH~7,0). O F ionizável é a fração liberada sob acidificação durante o metabolismo bacteriano ou quando da adição de um ácido exógeno (frio), enquanto que o F fortemente ligado ao biofilme apenas é liberado sob digestão em ácido aquecido ou após calcinação (WHITFORD, 1996; WHITFORD et al., 2002).

A grande importância do fluido do biofilme no mecanismo de ação do F deve-se ao fato de que o mesmo entra em contato direto com o esmalte dentário, com a saliva e com as bactérias do biofilme. Este contato direto permite o estabelecimento de um estado de equilíbrio entre os níveis de F encontrados nestes locais após a aplicação de um agente fluoretado (ROLLA; EKSTRAND, 1996). Vogel; Carey; Ekstrand (1992) demonstraram a existência de uma relação direta entre as concentrações de F no fluido do biofilme e na saliva após a aplicação de uma solução para bochecho fluoretado, embora a saliva seja muito menos concentrada.

Embora os níveis de F no fluido do biofilme (F ionizado) sejam considerados altos em comparação aos da saliva, estes correspondem a menos de 5% do total de F no biofilme, sendo que a maior parte está na forma ionizável (VOGEL et al., 2000c). Como o F ionizável pode se tornar disponível (ionizado) para o meio bucal

em situações de queda de pH (VOGEL et al., 2002), ou seja, durante um desafio cariogênico, esta fração exerce um papel importante na ação do F no controle de cárie dentária. O fluido do biofilme transporta ácidos orgânicos, bem como F, Ca e fosfatos e outros íons para a superfície do esmalte. Portanto, o fluido do biofilme é o sítio no qual o F influencia os processos de des e remineralização (EKSTRAND; SPAK; VOGEL, 1990).

A fração de F fortemente ligado ao biofilme dentário pode ser removida após digestão em ácido aquecido, por calcinação seca ou por técnicas de combustão como a “bomba de oxigênio”. O envolvimento desta fração na cariostase é duvidoso, uma vez que parece improvável que tal fração se torne disponível numa forma iônica no fluido do biofilme. A possibilidade da troca limitada entre o *pool* de F fortemente ligado ao biofilme e as outras formas, entretanto, ainda não foi investigada (WHITFORD et al., 1996).

Vogel et al. (1992, 2000) demonstraram que, após o uso de bochechos fluoretados, os níveis de F na saliva eram semelhantes aos valores basais, enquanto que as concentrações no biofilme e no fluido do biofilme permaneciam elevadas, indicando que algum componente do biofilme tem a propriedade de reter F. WHITFORD et al (2002; 2005) avaliaram as concentrações de F na saliva e no biofilme de indivíduos residentes numa área fluoretada (2002) e não fluoretada (2005) 1 e 12 h após o uso de um dentifrício fluoretado ou dentifrício placebo, e verificaram que as concentrações de F no biofilme estavam diretamente relacionadas com os níveis de Ca. Esta relação ocorreu independentemente do produto utilizado ou do tempo decorrido antes da coleta. A mesma conclusão foi encontrada em um estudo semelhante conduzido por Pessan e colaboradores (2008) avaliando áreas fluoretadas e dentifrícios fluoretados.

Assim como na saliva, o fluido do biofilme é supersaturado com relação a vários sais de Ca, incluindo bruxita, hidroxiapatita, fluoreto de Ca e fosfato de Ca amorfo (SHELLIS; DUCKWORTH, 1994; LARSEN; PEARCE, 2003). Estes sais localizam-se principalmente nos espaços extracelulares do biofilme, sendo que os mesmos podem fazer ligações iônicas com o F, embora com diferentes afinidades. O F pode se adsorver à superfície destes compostos, mas o principal modo de interação é através da conversão em fluoreto de Ca, hidroxifluorapatita e fluorapatia. Entretanto, com base na solubilidade destes compostos, muito provavelmente o sal

formado é o fluoreto de Ca (CaF_2) ou fluoreto de Ca-like (CaF_2 -like) (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1990; VOGEL et al., 2001), além de outros cátions bi e trivalentes (WHITFORD et al., 1996).

Além dos sais de Ca presentes principalmente nos espaços extracelulares, a retenção do F no biofilme pode estar associada à superfície das bactérias (ROSE et al., 1993; 1996; 1997; 1998). Estas superfícies representam uma área de retenção muito grande, com cargas negativas e grupos fosfatos e carboxílicos abundantes. Grande parte do Ca presente no biofilme está fixada à superfície bacteriana por ligações com grupos acídicos, através de ligações bivalentes. Quando há disponibilidade do F na saliva, o mesmo entra no biofilme e rompe uma das ligações do Ca com a superfície bacteriana, fixando-se a esta valência livre do Ca, através da formação de CaF^+ . Assim, na presença do F, existe a liberação de um grupamento acídico na superfície bacteriana, o qual poderá receber mais compostos CaF^+ formados na saliva após a utilização de produtos fluoretados. Este F será liberado posteriormente quando houver uma queda de pH ou por ação do fluxo salivar. Em adição, o F pode se associar as várias moléculas orgânicas produzidas pelas bactérias presentes no biofilme, como o ácido lipoteicoico (ROSE et al., 1994).

No caso dos produtos fluoretados, uma ferramenta muito útil para se estimar sua efetividade é a avaliação das concentrações de F intrabuciais associados ao uso de tais produtos, uma vez a associação entre níveis de cárie e níveis de F intrabuciais foi encontrada em inúmeros trabalhos. Oliveby; Twetman; Ekstrand (1990) demonstraram que existem diferenças significativas entre as concentrações de F na saliva de crianças residentes em comunidades com diferentes níveis de F na água. Esta relação também foi observada em relação ao biofilme dentário. Nobre dos Santos; Cury (1988) encontraram diferenças significativas nos níveis de F no biofilme antes e após a interrupção da fluoretação da água de abastecimento do município de Piracicaba. As implicações clínicas destes achados foram demonstradas num outro estudo, no qual amostras de biofilme foram coletadas no primeiro dia de treinamento de recrutas navais, verificando-se que as concentrações de F no biofilme eram significativamente superiores no grupo de recrutas livres de cárie, quando comparadas às do grupo cárie-ativo (GAUGLER; BRUTON, 1982). Em adição, observou-se que, dentre os recrutas cárie-ativos e livres de cárie, 63 e 80%

eram provenientes de regiões com água fluoretada, respectivamente. Outros trabalhos relatam achados semelhantes (TOUMBA; CURZON, 1993).

Em relação aos dentífrícios fluoretados, Duckworth; Morgan (1991) conduziram um estudo no quais as concentrações de F na saliva e no biofilme dentário foram avaliadas em indivíduos que utilizaram dentífrícios contendo 0, 1000, 1500 e 2500 ppm de F (MFP), tendo sido encontrada uma relação direta entre as concentrações de F no dentífrício e os níveis intraorais de F resultantes do uso destes produtos. Num estudo subsequente (DUCKWORTH; MORGAN; GILBERT, 1992), estes resultados foram comparados com os dados obtidos num estudo clínico, no qual foram avaliados incrementos nos índices de cárie em indivíduos após três anos de uso de dentífrícios contendo as mesmas concentrações de F previamente citadas (STEPHEN et al., 1988). Verificou-se uma relação inversa entre os níveis intrabucais de F e os incrementos de cárie, sugerindo que a monitoração das concentrações de F após o uso de produtos tópicos constitui-se num método *in vivo* muito útil para se estimar a eficácia de produtos fluoretados na redução de cáries.

A alta concentração de F encontrada no biofilme dentário tem o potencial de promover a remineralização do esmalte dentário diante de um baixo pH (LYNCH et al., 2004). Lynch, 2004 conduziu um estudo onde avaliou a influência dos dentífrícios fluoretados nos níveis dos reservatórios de F intrabucais. Foram comparados dentífrícios com e sem F (1.000 ppm e 0 ppm). Os resultados mostraram que a concentração de F iônico após a escovação com dentífrício fluoretado continuava aumentando nos reservatórios intrabucais ao longo do tempo quando comparado aos valores de baseline (Figura 2.6)

Figura 2.6 – Evolução da concentração de F na placa com e sem o uso do dentífrício fluoretado duas vezes ao dia

2.3. PRESENÇA DE F NAS UNHAS

Num simpósio realizado pelo National Institute of Health, em Bethesda, Maryland, EUA, em 1999, foi estabelecida uma agenda internacional de necessidades de pesquisa envolvendo F. Entre os tópicos, estava a avaliação de possíveis biomarcadores, que fossem de fácil coleta e análise, para a exposição ao F em humanos (CLARKSON, 2000). As vantagens e limitações do plasma, saliva dos ductos e urina como biomarcadores para exposições recentes e do osso e dentina como biomarcadores teciduais para exposições crônicas foram discutidos. Também foi discutido o possível uso das unhas como indicadoras de exposições subcrônicas ao F, e possivelmente exposições crônicas se a ingestão permanecesse relativamente constante.

De acordo com o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (1987), os biomarcadores são divididos da seguinte forma:

- Biomarcadores de efeito: as fluoroses dentária e esquelética são efeitos colaterais de uma exposição prévia a níveis de F moderados ou altos. Deste modo, as fluoroses dentárias e esqueléticas são biomarcadores apropriados, uma vez que representam sinais de exposição prévia ao F.
- Biomarcadores de susceptibilidade: vários fatores podem afetar o modo como os indivíduos respondem a uma mesma dose de F. Como biomarcadores de susceptibilidade ao F têm-se desnutrição, metabolismo do cálcio e magnésio, condição renal e genética.
- Biomarcadores de exposição: Os biomarcadores de exposição podem refletir diferentes períodos de exposição a um evento. Ou seja, os marcadores conhecidos de meia-vida curta ou de curto tempo, indicam uma exposição que ocorreu poucos minutos ou horas atrás, enquanto outros refletem dias, semanas ou muitos meses atrás. Como biomarcadores de meia vida-curta têm-se o plasma, soro, saliva e urina, que indicam exposições recentes ao F, enquanto que osso, dentes, cabelo e unhas podem refletir a exposição prévia de semanas ou vários meses, ou seja, indicam a exposição crônica ao F.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os biomarcadores de exposição ao F de acordo com a cronologia de sua marcação são:

- Marcadores históricos: ossos e dentes são ferramentas úteis para o monitoramento da exposição crônica ao F.
- Marcadores contemporâneos: urina, plasma e saliva, podem refletir a exposição aguda ao F.
- Marcadores recentes: cabelo e unhas podem refletir exposições crônicas e subcrônicas ao F.

O número de trabalhos existentes na literatura relacionando-se os níveis de F presente nas unhas como biomarcadores da exposição de F é reduzido. Vários métodos de preparação e análise, bem como várias concentrações de F têm sido descritos na literatura. O uso das unhas como biomarcadores para exposição ao F tem ainda alguns pontos que necessitam ser mais estudados. Não há muitos relatos na literatura, e alguns são contraditórios.

Schamchula et al. (1985) fizeram hidrólise em base forte à alta temperatura e então usaram o eletrodo íon específico para analisar as unhas das mãos de três grupos de crianças húngaras, cuja concentração de F na água de beber variava de 0 a 0,11 mg/L, de 0,5 a 1,1 mg/L ou de 1,6 a 3,1 mg/L. As concentrações médias de F encontradas nas unhas das mãos foram 0,79, 1,31 e 2,31 mg/Kg, respectivamente.

Em 1990, Schimidt e Leuschke realizaram um estudo com o objetivo de determinar o conteúdo de F nas unhas das mãos de indivíduos com e sem exposição crônica ao F. As causas da exposição foram emissões de indústrias como, por exemplo, fábrica de ácido hidrofúorídrico. O conteúdo de F das unhas dos dois grupos foi extremamente baixo. As médias para os grupos sem e com exposição ao F foram 0,8 e 2,78 mg/L, respectivamente. Neste estudo houve uma larga variação dos resultados que segundo os autores poderia ser explicada pela aderência de partículas de sujeira nas amostras de unhas.

Spate et al. (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações de F em unhas dos pés obtidas de mulheres residentes em Holden ou Boston, Massachusetts, nos EUA onde a água continha 0,09 e 1,0 mg/L, respectivamente. As concentrações médias (com as variações) foram de 4,2 (2,4-9,7) e 6,4 (2,7-10,1) mg/Kg.

Whitford et al. (1999) analisaram a concentração de F existente nas unhas com o eletrodo através de difusão facilitada por HMDS. Os autores observaram que

a área de superfície das unhas (intactas, cortadas em pequenos pedaços ou pulverizadas), imersão em água deionizada por 6 horas, imersão em água fluoretada (1 mg/L) por 2 horas ou remoção de matéria orgânica das unhas por incineração não causaram alterações no conteúdo de F analisado. Os autores relataram ainda que o conteúdo de F presente nas unhas dos pés é aproximadamente a metade daquele presente nas unhas das mãos. Um dos autores do trabalho aumentou a ingestão de F durante 1 mês e observou um incremento significativo na concentração de F das unhas das mãos 3,5 meses depois. Foram, ainda, dosadas as concentrações de F presentes nas unhas das mãos de crianças brasileiras que residiam em áreas contendo 0,1, 1,6 ou 2,3 mg/L de F na água, tendo-se encontrado médias de 1,85, 5,28 e 7,52 mg/Kg, respectivamente, o que indica que, à semelhança das concentrações de F na urina, as concentrações de F nas unhas das mãos são boas indicadoras da ingestão de F.

McDonnell e O'Mullane (2001) averiguaram a velocidade de crescimento e o comprimento em que as unhas poderiam ser cortadas para a análise do conteúdo de F, em crianças de 2 a 3 anos de idade. As médias (variação) obtidas foram 0,7 mm/semana (0,5-0,9 mm) e 7,5 mm (6,4-9,2 mm) para velocidade de crescimento e comprimento, respectivamente.

Buzalaf et al. (2002) investigaram as mudanças na concentração de F no plasma e nas unhas de ratos que receberam diferentes concentrações de F na água de beber. Uma relação direta entre a concentração de F nas unhas e no plasma foi identificada ($r=0,67$, $p<0,001$), indicando que as unhas podem ser utilizadas como indicadores de concentração de F no plasma em ratos submetidos à ingestão crônica de F.

Em 2003, Arsati realizou um estudo com o objetivo de avaliar a unha como um possível indicador biológico de exposição ao F para prever o risco de fluorose dentária. O trabalho foi composto por dois estudos distintos, ambos envolvendo crianças de 20 a 30 meses de idade. No primeiro estudo, a autora verificou a relação entre concentração de F nas unhas e na água de abastecimento de três cidades paulistas: Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, que possuem 0,03, 0,64 e 1,53 mg/L de F na água, respectivamente. Os resultados da concentração de F nas unhas das crianças deste estudo foram 1,65, 2,85 e 4,14 $\mu\text{g/g}$ para Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, respectivamente. Estes resultados sugerem que a unha

pode ser um indicador da ingestão de F através da água de abastecimento. O segundo estudo contou com a participação de 23 crianças de Piracicaba, e verificou se a unha poderia ser indicador biológico para diferenciar a somatória da exposição ao F pela dieta e pelo dentífrico fluoretado. Para isto, o estudo foi dividido em duas fases, que duraram cerca de três meses cada. Na primeira (Fase A= dieta-F + dentífrico-F), as crianças estavam expostas normalmente ao F, através da alimentação e da escovação com dentífrico fluoretado. Na segunda (Fase B = dieta-F), as crianças passaram a escovar os dentes com um dentífrico sem F. As concentrações de F ($\pm$ DP) encontradas nas unhas das crianças foram 2,64 ($\pm$ 0,91) e 2,80 ($\pm$ 0,94) μ g/g para as fases A e fase B, respectivamente. Estes resultados indicaram que a concentração de F nas unhas das crianças na faixa etária de risco para a fluorose dentária, expostas à água fluoretada, não parece ser um indicador biológico para diferenciar o efeito somatório da exposição sistêmica ao F do dentífrico.

Levy et al (2004) analisaram [F] em unhas de crianças de 2 a 6 anos de idade em cidade fluoretada (Bauru) e não-fluoretada (Itápolis). As médias das [F] ($\pm$ DP, unidade μ g/g) obtidas para unhas das mãos foram 3,557 ($\pm$ 1,297) e 2,292 ($\pm$ 1,250) sendo para unhas dos pés 2,815 ($\pm$ 1,288) e 1,580 ($\pm$ 0,589), para Bauru e Itápolis, respectivamente. Comparando-se as duas cidades, tanto para unhas das mãos quanto para dos pés, a [F] nas unhas foi maior para a cidade de fluoretada, sendo que as diferenças foram significativas.

Rodrigues, Bastos e Buzalaf (2004) avaliaram a [F] em unhas de crianças de 2-3 anos de idade, residentes de área fluoretada (Bauru, variação 0,217 a 1,147 ppm). As crianças utilizaram dentífrico placebo (sem F), fluoretado (1.570 ppm) e placebo respectivamente, por períodos de 28 dias cada. As unhas foram cortadas a cada 2 semanas, durante o período experimental e por mais 22 semanas. A média de [F] nas 4 primeiras semanas e nas últimas 6 semanas foi 2,709 e 2,698 μ g/g para unhas das mãos e dos pés, respectivamente. Os autores relataram que apesar da [F] média nas unhas das mãos ser ligeiramente maior que a dos pés, na maioria dos períodos experimentais esta diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, Rodrigues, Bastos e Buzalaf mostraram correlação positiva ($r=0,571$) e significativa da [F] presente nas unhas das mãos e dos pés.

Pessan et al. (2005) realizaram um estudo com 20 crianças de 4-6 anos de idade divididas em dois grupos (A e B), que utilizaram o dentifrício da mesma maneira descrita por RODRIGUES, BASTOS e BUZALAF (2004). No entanto, o grupo B também recebeu aplicação tópica de verniz (2,26% F), enquanto utilizava o dentifrício fluoretado. Os autores não encontraram uma variação significativa na concentração de F nas unhas.

Para determinar o tempo necessário para detecção do F em unhas de humanos, Buzalaf, Pessan e Alves (2006), realizaram um estudo que avaliou o crescimento e o comprimento de todas as unhas das mãos e dos pés de voluntários de 20-35 anos de idade, que ingeriram 1,8 mg de F diariamente, durante 30 dias. Amostras de unhas foram coletadas no início do estudo e a cada duas semanas, totalizando 15 coletas. O crescimento foi maior nas unhas das mãos que dos pés. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as unhas do lado direito e esquerdo, tanto das mãos como dos pés. O crescimento foi significativamente maior para o polegar dos pés do que para as outras unhas dos pés, o que não ocorreu para as unhas das mãos. O tempo médio para a detecção do F nas unhas das mãos e dos pés foi de 103 e 123 dias, respectivamente. Para unhas das mãos, o aumento na concentração de F ocorreu 84 dias depois de iniciado o estudo, no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao *baseline*. Por outro lado, para as unhas dos pés, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao *baseline*, e o F foi detectado depois de 112 e 140 após o aumento da ingestão. Em vista dos resultados, os autores concluíram que as unhas dos polegares dos pés parecem ser biomarcadores de ingestão de F mais adequados.

No entanto, quanto se pretende utilizar as unhas como biomarcadores de exposição ao F para estimar o risco de fluorose dentária, a sensibilidade deste biomarcador deve ser considerada. Sampaio et al. (2003), numa tentativa de validar a concentração de F nas unhas das mãos como um biomarcador de exposição ao F, examinaram a severidade da fluorose dentária em crianças residentes em diferentes regiões do Estado da Paraíba, onde os níveis de F natural existentes na água de beber (poços particulares) eram 0,1, 1,6 e 2,3 mg/L. Estas crianças tinham sido previamente examinadas com relação à concentração de F nas unhas das mãos (WHITFORD et al., 1999). A concentração média de F nas unhas das mãos das crianças que apresentaram TF 0 foi significativamente menor que a concentração

média das crianças que apresentaram TF 5. No entanto, esta diferença significativa não foi observada para crianças com TF 1, 2, 3 e 4.

Segundo Whitford (2005) o uso das unhas para o monitoramento de exposição ao F apresenta desvantagens e vantagens que são:

Desvantagens

- Ao contrário da urina que pode ser analisada pelo método direto, a unha necessita que o F seja extraído através de um método que aumenta o tempo e os custos;
- Algumas unhas não são, ou não podem ser adequadas para análise. Como por exemplo, unhas com esmalte não podem ser analisadas, pois o esmalte soma-se ao peso da unha, o qual seria mais baixo para o cálculo da concentração. Além disso, alguns esmaltes podem conter F, sendo necessários mais estudos para se determinar se o esmalte pode ser removido, sem alterar a concentração de F nas unhas;
- Os possíveis efeitos de variáveis na incorporação do F, que incluem doenças nas unhas, o grau de velocidade de crescimento das unhas, idade e gênero do doador.

Vantagens

- As unhas podem ser obtidas facilmente, através de um método não invasivo e sem objeção de virtualmente todos os doadores;
- A concentração de F nas unhas reflete os níveis médios de ingestão e concentração de F no plasma por um período prolongado, geralmente 1-2 semanas, dependendo da frequência de corte das unhas. Já as análises de urina, plasma e saliva do ducto refletem mais a ingestão de F bastante recente, estando sujeitas a variações em função da ingestão de F e variáveis fisiológicas;
- Ao contrário das concentrações de F na urina, as concentrações de F nas unhas não são afetadas por variáveis como ingestão de F recente nas últimas horas, diferenças na filtração glomerular, pH urinário ou fluxo urinário.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar o efeito de uma formulação de dentifrício líquido com pH acidulado e baixa concentração de F na prevenção de novas lesões cariosas;
2. Avaliar a concentração de F no biofilme dentário após o uso de uma formulação de dentifrício líquido com pH acidulado e baixa concentração de F;
3. Avaliar a concentração de F presente nas unhas (biomarcadores de exposição ao F) após o uso de uma formulação de dentifrício líquido com pH acidulado e baixa concentração de F.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo clínico randomizado cego foi realizado com 1.402 voluntários, sendo o fator em estudo o uso de dentifrício líquido na prevenção do aparecimento de novas lesões cariosas, em 4 níveis, a saber:

- grupo 1: dentifrício experimental líquido com 1100 ppm/F pH 4,5
- grupo 2: dentifrício experimental líquido com 1100 ppm/F pH 7,0
- grupo 3: dentifrício experimental líquido com 550 ppm/F pH 4,5
- grupo 4: dentifrício controle Sorriso Fresh 1100 ppm F, pH 7,0 (Colgate do Brasil).

A capacidade preventiva dos dentifrícios foi avaliada após 12 e 20 meses de uso contínuo dos mesmos pelas crianças e suas famílias, através do índice ceo-s (superfícies cariadas, com extração indicada ou obturadas) descrito por PINTO (2000), adaptado do índice CPOS. Em adição, foi avaliada a concentração de F na placa bacteriana 1 h após a utilização dos dentifrícios, bem como aquele presente nas unhas de uma subamostra das crianças que já estavam participando do estudo há um ano.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (Anexos A). Para o início dos trabalhos, houve uma reunião com os diretores, professores e funcionários das escolas envolvidas no projeto, bem como os responsáveis pelos escolares que participaram do estudo, quando os mesmos foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos e à metodologia empregada no estudo, bem como orientados sobre a necessidade de se seguir corretamente o protocolo. Ficou claro que a qualquer momento os voluntários poderiam desistir de participar do experimento em qualquer etapa da pesquisa. Todas estas informações constavam na Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B), que foram preenchidas e assinadas pelos responsáveis dos escolares participantes.

Figura 4.2 – Moldes para confecção do frasco e tampa do gel dental.

4.3.1.3 Dentifrícios

A formulação experimental básica do presente estudo está sendo objeto de pedido de patente razão pela qual não será detalhada. Todos os dentifrícios possuem fluoreto de sódio em suas formulações. A fim de facilitar a randomização do estudo, os diferentes dentifrícios experimentais foram fabricados com colorações distintas (Figura 4.3), que não eram conhecidas pelos encarregados de distribuí-los aos voluntários e nem pelos responsáveis pelos exames clínicos.

Inicialmente, o projeto contava com três formulações experimentais, com as seguintes características: 1100 ppm F pH 7,0, 550 ppm F pH 7,0 e 550 ppm F pH 4,5. Entretanto, como estas formulações se tratam de dentifrícios líquidos, a serem utilizados pela técnica da gota, o que sabidamente reduz a quantidade de dentifrício a ser colocada na escova, optou-se por testar a formulação de baixa concentração de F apenas com o pH reduzido (4,5), pois a redução simultânea da concentração de F e da quantidade de dentifrício colocada na escova poderia levar a uma menor eficácia do produto, o que inclusive poderia não ser seguro para os voluntários devido ao delineamento longitudinal, podendo levar a um maior incremento no ceo-s. De acordo com a literatura, a redução do pH dos dentifrícios aumenta a efetividade dos mesmos, fazendo com que um dentifrício com 550 ppm F tenha a mesma eficácia de um dentifrício com 1100 ppm F, pelo menos *in vitro* (Brighenti et al., 2006; Alves et al., 2007). Em adição, para um melhor controle do ensaio randomizado, foi incluído um quarto grupo na pesquisa, onde seria utilizado um dentifrício convencional (na forma de um gel mais consistente), já que não há estudos clínicos randomizados longitudinais testando a eficácia de dentifrícios líquidos quando comparados a dentifrícios convencionais (com utilização de quantidade maior que a utilizada com o dentifrício líquido). Assim, as formulações utilizadas foram:

- G1 - dentifrício experimental líquido com 1100 ppm/F pH 4,5 (BITUFO – Jundiaí, SP);

- G2 - dentifrício experimental líquido com 1100 ppm/F pH 7,0 (BITUFO – Jundiaí, SP);
- G3 - dentifrício experimental líquido com 550 ppm/F pH 4,5 (BITUFO – Jundiaí, SP);
- G4 - dentifrício controle Sorriso Fresh 1100 ppm F, pH 7,0 (Colgate, São Paulo, SP).

Figura 4.3 – Dentifrícios usados na pesquisa.

4.3.1.4 Escovas dentais

Foram distribuídas escovas dentais da marca MedFio (Figura 4.4) aos voluntários acompanhados do gel dental durante a distribuição dos lotes.

Figura 4.4 – Escovas dentais usadas na pesquisa.

4.3.1.5 Kits de Armazenamento Coletivo do Material de Higiene Bucal

Os Kits coletivos da empresa Oralls (São José dos Campos, SP) foram utilizados para garantir a escovação dentária na escola. De forma organizada e racional, os escolares puderam usar adequadamente o material de higiene bucal, contribuindo de forma positiva para a manutenção da saúde bucal (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Kit de Armazenamento Coletivo do Material de Higiene Bucal.

4.3.1.6 Instrumental para exames clínicos

Para a execução da triagem dos voluntários, foram utilizadas espátulas de madeira fornecidas pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Após a seleção da amostra, foram realizados os exames de ceo-s com os kits de levantamento epidemiológico cedidos pelo Depto. de Ortodontia, Odontopediatria e Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, compostos de espelho clínico e sonda CPI (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Kit para levantamento epidemiológico.

4.3.2 Amostra

4.3.2.1 Seleção dos voluntários da cidade de São José dos Campos

A determinação do tamanho da amostra necessário a fim de se obter uma significância clínica entre os grupos de tratamento de 15% em média de incremento de ceo-s foi feita com base em dados pré-existentes acerca da progressão anual de cáries em crianças de 6-10 anos residentes em Maceió-AL que foi relatada ser 2,12 superfícies cariadas, perdidas ou obturadas (desvio-padrão de 2,46) (SILVA, 2001). O tamanho adequado da amostra foi calculado em pelo menos 350 indivíduos em cada

grupo de tratamento para garantir uma força de 80%, com o nível de significância estabelecido em 5% (KINGMAN, 1977), esperando-se uma perda amostral da ordem de 10% ao ano.

Dentre as 99 escolas municipais de Educação Infantil de São José dos Campos - SP, 57 participaram do estudo. Os critérios para exclusão das demais escolas foram: localização em favelas controladas por tráfico de drogas; escolas pequenas e muito distantes, com pouco número de crianças disponíveis para participação; escolas com alta rotatividade de alunos, o que prejudicaria o *design* longitudinal do estudo; escolas onde alguma outra pesquisa estivesse sendo desenvolvida nos últimos três meses.

A amostra foi selecionada entre 4.300 crianças matriculadas nas 57 escolas mencionadas, através dos seguintes passos: 1-) exibição do desenho animado aos escolares de 4 anos de idade; 2-) exame visual da cavidade bucal realizado com espátula de madeira para seleção da amostra, sendo selecionadas apenas crianças com $\text{ceo-d} > 0$ e que não estivessem utilizando aparelho ortodôntico; 3-) entrega de um desenho em papel para todas as crianças colorirem. Dentre as 4300 crianças examinadas, 1634 tinham $\text{ceo-d} > 0$ e receberam o termo de consentimento livre e esclarecido para que assim o responsável pelo escolar pudesse ler e autorizar a participação. Os critérios para inclusão, portanto, foram os seguintes:

- Apresentar idade de 4 anos ou a completar 4 anos no ano de 2006, segundo a Matriz de Frias (tabela 4.1);
- Assinatura, pelos pais ou responsáveis, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Ter experiência passada de cárie ($\text{ceo-d} > 0$);
- Não estar utilizando aparelhos ortodônticos;
- Não participar de nenhum outro estudo clínico nos 3 meses anteriores à seleção.

Feita a triagem, 1.402 crianças foram eleitas para participarem do estudo.

Tabela 4.1 - Matriz de Frias para cálculo da idade - 2006

Idade	Nascimento			Idade
	Até mês ←	Ano	→ Após mês	
05	6	2001	7	04
04	6	2002	7	03

4.3.2.2 Randomização da amostra e composição dos grupos de estudo

Como a randomização é a base de um ensaio clínico, segue a descrição detalhada de como este procedimento foi realizado na presente pesquisa. Duas características se destacam nesta etapa: (a) o procedimento deve realmente alocar tratamentos aleatoriamente e (b) as alocações devem ser invioláveis, de forma que seja impossível que fatores intencionais ou não-intencionais influenciem na randomização (HULLEY et al., 2003).

A randomização foi feita considerando as salas de aula como unidade de sorteio, uma vez que a operacionalização do estudo exigia que um único dentifrício fosse distribuído dentro da mesma sala. Isto foi assim planejado porque as salas da pré-escola são pouco numerosas e este planejamento facilita o controle da entrega e reposição dos dentifrícios aos participantes da pesquisa pela professora da sala de aula. Assim, sorteada a sala, todos os indivíduos pertencentes àquela sala foram considerados alocados ao grupo ao qual a sala em questão foi alocada. A alocação dos grupos foi realizada aplicando-se um algoritmo previamente estabelecido a um conjunto de números aleatórios, tipicamente gerados no Microsoft Office Excel. O delineamento exige uma probabilidade igual de alocação para cada um dos quatro grupos (A, B, C ou D). Assim, foram gerados números aleatórios de 0 a 1, sendo que a composição dos grupos seguiu a seguinte distribuição: Grupo A $\leq 0,25$; Grupo B $\leq 0,50$, Grupo C $\leq 0,75$; Grupo D ≤ 1 . Nenhum dos membros participantes da pesquisa que possuem algum contato com os voluntários participantes teve acesso à lista aleatória gerada, certificando, desta forma, que não houve influências na alocação dos grupos. Apesar de o presente estudo ter sido iniciado com mais de 1.000 participantes (estudo de grande porte) e a designação ao acaso garantir uma distribuição quase parelha das variáveis basais (HULLEY et al, 2003), optou-se por realizar a randomização dentro de cada classe sócio-econômica (1, 2 ou 3), de maneira que os quatro grupos apresentassem número semelhantes de participantes, caracterizando, assim, uma randomização em blocos e estratificada. A distribuição das 57 escolas municipais envolvidas no estudo está detalhada na Figura 4.8.

Figura 4.8 – Distribuição das escolas no município.

4.3.3 Coleta de dados

4.3.3.1 Critérios para o exame

De posse das fichas de exame (Apêndice C) devidamente identificadas por nome, escola e sala de aula, procedeu-se à coleta dos dados em três momentos distintos: - baseline (início do estudo), 12 e 20 meses após o início do estudo. O ceo-s (índice de superfícies cariadas, com extração indicada ou obturadas), descrito por Pinto (2000), foi utilizado neste estudo, cuja unidade de medida é a superfície (s) e avalia os dentes da seguinte forma: para os molares são consideradas cinco superfícies (oclusal, mesial, distal, vestibular e lingual) e para os incisivos e caninos, quatro superfícies (mesial, distal, vestibular e lingual). No caso de diagnóstico de extração indicada (e) todas as faces são anotadas nesta condição. Este índice foi utilizado por ser mais adequado em regiões onde a prevalência de cárie é baixa, e também por ser mais sensível, com um poder maior de discriminação, quando comparado ao índice ceo-d (índice de dentes cariados, com extração indicada ou obturados). Os códigos e critérios para os exames estão relacionados a seguir:

A - Coroa hígida.

Não há evidência de cárie. Estágios iniciais da doença não são levados em consideração. Os seguintes sinais devem ser codificados como hígidos:

- manchas esbranquiçadas;
- descolorações ou manchas rugosas resistentes à pressão da sonda CPI;
- sulcos e fissuras do esmalte manchados, mas que não apresentam sinais visuais de base amolecida, esmalte socavado, ou amolecimento das paredes, detectáveis com a sonda CPI;
- áreas escuras, brilhantes, duras e fissuradas do esmalte de um dente com fluorose moderada ou severa;
- lesões que, com base na sua distribuição ou história, ou exame tátil/visual, resultem de abrasão.

Nota: Todas as lesões questionáveis devem ser codificadas como dente hígido.

B - Coroa cariada.

Sulco, fissura ou superfície lisa apresenta cavidade evidente, ou tecido amolecido na base ou descoloração do esmalte ou de parede, ou há uma restauração temporária (exceto ionômero de vidro para dentes decíduos). A sonda CPI deve ser empregada para confirmar evidências visuais de cárie nas superfícies oclusal, vestibular e lingual. Na dúvida, considerar o dente hígido.

Nota: Na presença de cavidade originada por cárie, mesmo sem doença no momento do exame, a FSP-USP adota como regra de decisão considerar o dente atacado por cárie, registrando-se cariado. Entretanto, este enfoque epidemiológico não implica admitir que haja necessidade de uma restauração.

C - Coroa restaurada, mas cariada.

Há uma ou mais restaurações e ao mesmo tempo uma ou mais áreas estão cariadas. Não há distinção entre cáries primárias e secundárias, ou seja, se as lesões estão ou não em associação física com a(s) restauração (ões).

D - Coroa restaurada e sem cárie.

Há uma ou mais restaurações definitivas e inexistente cárie primária ou recorrente. Um dente com coroa colocada devido à cárie inclui-se nesta categoria. Se a coroa resulta de outras causas, como suporte de prótese, é codificada como (G).

Nota: Com relação aos códigos C e D, apesar de ainda não ser uma prática consensual, a presença de ionômero de vidro em qualquer elemento dentário foi considerada, neste estudo, como condição para elemento restaurado.

E - Dente perdido devido à cárie.

Um dente permanente ou decíduo foi extraído por causa de cárie e não por outras razões. Essa condição foi registrada na casela correspondente à coroa. Dentes decíduos: aplicou-se apenas quando o indivíduo estava numa faixa etária na qual a esfoliação normal não constitui justificativa suficiente para a ausência.

F - Dente perdido por outra razão.

Ausência se deve a razões ortodônticas, periodontais, traumáticas ou congênitas.

G - Selante.

Há um selante de fissura ou a fissura oclusal foi alargada para receber um compósito. Se o dente possui selante e está cariado, prevalece o código **B** (cárie).

Nota: Embora na padronização da OMS haja referência apenas à superfície *oclusal*, deve-se registrar a presença de selante localizado em qualquer superfície.

H - Apoio de ponte ou coroa.

Indica um dente que é parte de uma prótese fixa. Este código é também utilizado para coroas instaladas por outras razões que não a cárie ou para dentes com facetas estéticas. Dentes extraídos e substituídos por um elemento de ponte fixa são codificados, na casela da condição da coroa, como **4** ou **5**.

K - Coroa não erupcionada.

Quando o dente permanente ou decíduo ainda não foi erupcionado, atendendo à cronologia da erupção. Não inclui dentes perdidos por problemas congênitos, trauma etc.

T - Trauma (Fratura).

Parte da superfície coronária foi perdida em consequência de trauma e não há evidência de cárie.

L - Dente excluído.

Aplicado a qualquer dente permanente que não possa ser examinado (bandas ortodônticas, hipoplasias severas etc.).

Nota: Conforme a recomendação da FSP-USP, quando há 5 ou mais dentes com bandas o portador será excluído da amostra. Braquetes, em qualquer número, não inviabilizam os exames e, assim, não constituem obstáculo para aproveitamento do elemento amostral.

Neste estudo, a extensa variabilidade dos eventos que foram observados exigiu não apenas a padronização dos critérios, mas também treinamento de calibração dos examinadores a fim de se conhecer o grau de confiabilidade alcançado durante a coleta dos dados nas diferentes escolas participantes do estudo.

4.3.3.2 Calibração

Em função do reconhecido grau de subjetividade do qual é revestido o diagnóstico das doenças bucais, é comum que certo percentual dos exames repetidos por um dentista não sejam iguais. Para diminuir os erros de diagnóstico utiliza-se a calibração, método usado para buscar a precisão em estudos epidemiológicos (PINTO, 2000). Durante esta etapa foram realizados exames ceo-s em várias crianças de acordo com os critérios descritos anteriormente. Quando o mesmo examinador avaliou a mesma criança em tempos diferentes, buscou-se a calibração intra-examinador (concordância intra-examinador). Quando os dois examinadores responsáveis pelo estudo realizaram exames em uma mesma criança, buscou-se a calibração inter-examinador (concordância inter-examinador).

Calibração Intra - examinador

A verificação da concordância intra-examinador foi feita antes e durante a coleta dos dados, no sentido de aferir se a consistência obtida no treinamento está sendo mantida em campo.

Antes de cada coleta de dados (levantamento) foram realizados treinamentos. Em cada um deles foram realizados 20 exames com os mesmos voluntários para ambos os examinadores. A concordância intra-examinador antes do levantamento foi feita a partir do exame repetido em quatro indivíduos e a posterior comparação entre cada par de exames. Durante o levantamento, a concordância foi realizada a

partir da prática do exame em duplicata, ou seja, cada examinador reexaminou 10% da amostra (repetiu um indivíduo a cada grupo de 10). No final de cada período de cada dia foi preenchida uma nova ficha e providenciou – se um novo exame. A seleção dos escolares reexaminados obedeceu à seguinte ordem:

- O primeiro reexame correspondeu ao primeiro exame do período;
- O segundo reexame correspondeu ao décimo primeiro exame do período;
- O terceiro reexame correspondeu ao vigésimo primeiro exame do período, e assim sucessivamente.

O grau de concordância intra – examinador durante os treinamentos e durante todos os levantamentos foi acima de 99% para o examinador 1 e também para o examinador 2, considerado excelente de acordo com Frias, (2000) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Parâmetros de confiabilidade segundo a porcentagem de concordância e discordância

% de Concordância	% de Discordância	Parâmetros de confiabilidade
100,0	0,0	Perfeita Concordância
99,9 — 95,0	0,1 — 5,0	Excelente Concordância
94,9 — 90,0	5,1 — 10,0	Ótima Concordância
89,9 — 85,0	10,1 — 15,0	Muito Boa Concordância
84,9 — 80,0	15,1 — 20,0	Boa Concordância
79,9 — 65,0	20,1 — 35,0	Moderada Concordância
64,9 — 50,0	35,1 — 50,0	Fraca Concordância
49,9 — 25,0	50,1 — 75,0	Muito Fraca Concordância
24,9 — 0,1	75,1 — 99,9	Péssima Concordância
0,0	100,0	Nenhuma Concordância

Calibração Inter - examinador

A primeira foi realizada com o intuito de calibrar os examinadores para a triagem. Dois examinadores examinaram 36 crianças (cada examinador examinou a mesma criança), de acordo com os critérios apresentados anteriormente. Para a realização da calibração inter-examinador, foram realizados 20 exames com os mesmos voluntários para ambos os examinadores. O grau de concordância inter-examinador em todas as etapas do estudo também foi acima de 99%.

Coeficiente Kappa

Com o propósito de ajustar o percentual de concordância descontando a concordância do “acaso”, utilizam-se as freqüências para calcular a faixa de

concordância que seria, em média, uma ocorrência do acaso, “corrigindo” assim a estatística de concordância percentual. É o que se chama de coeficiente Kappa.

A vantagem usualmente reconhecida no coeficiente Kappa é sua capacidade de remover da concordância percentual aquelas concordâncias que provavelmente foram devidas ao acaso, trazendo uma distribuição mais global das condições dentro dos indivíduos examinados.

O valor Kappa encontrado durante as calibrações e durante os levantamentos dos dados foram acima de 0,85 considerado uma concordância ótima segundo a representação abaixo (FRIAS 2000):

- < 0,00 - concordância fraca ou leve;
- 0,00 a 0,60 - concordância moderada ou regular;
- 0,61 a 0,80 - concordância boa ou substancial;
- 0,81 a 0,99 - concordância ótima ou excelente;

4.3.4 Distribuição do material de higiene bucal

Para uma estratificação da população, foram utilizados nesta etapa dados do estudo da Secretaria de Planejamento da Prefeitura Municipal de São José dos Campos sobre a situação econômica da população por região - Atlas das Condições de Vida de São José dos Campos – julho de 2004. Segundo este estudo, quase 65% da população joseense pertence à classe média (CSE2), 18% à classe alta (CSE1) e quase 17% à classe baixa (CSE3). Assim através destes dados estabeleceu-se um critério homogêneo para a distribuição dos dentifrícios, estratificando os grupos entre as classes sociais, levando-se em consideração a localização dos bairros (Tabela 4.3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,952$).

Tabela 4.3 - Divisão da amostra por número e classe social e econômica

<i>Número de indivíduos alocados a cada um dos grupos de acordo com a classe social e econômica</i>											
CSE 1				CSE 2				CSE 3			
G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
78	80	82	77	194	189	198	207	73	74	74	76

CSE1 - classe alta

CSE2 - classe média

CSE3 - classe baixa

G1 - dentífrico experimental líquido com 1100 ppm/F pH 4,5

G2 - dentífrico experimental líquido com 1100 ppm/F pH 7,0

G3 - dentífrico experimental líquido com 5500 ppm/F pH 4,5

G4 - dentífrico controle Sorriso Fresh 1100 ppm F, pH 7,0

Convém ressaltar que em cada sala de aulas, as crianças envolvidas no estudo pertenciam ao mesmo grupo, devido à utilização do kit coletivo de higiene bucal. As instruções para o correto uso deste kit foram devidamente dadas às professoras, higienistas e diretoras das escolas.

Os pais foram orientados a escovarem os dentes das crianças, ou a orientar que as crianças escovem os dentes, conforme o hábito, de 2 a 3 vezes por dia, com uma gota (aproximadamente 0,15 g) do dentífrico líquido ou utilizar o dentífrico comercial de acordo com a técnica transversal (aproximadamente 0,50 g) por vez. Estas informações foram passadas aos pais por escrito, através de uma folha de instruções (Apêndice D), parte integrante do kit individual, composto por 2 escovas para adultos, 2 escovas infantis, 6 tubos de 100 g do dentífrico líquido ou 5 tubos de 120 g do dentífrico comercial, conforme o grupo a que a criança pertencia (Figura 4.8). De acordo com o delineamento inicial do estudo, para garantir que os dentífricos experimentais fossem devidamente utilizados pelas crianças, foram fornecidos dentífrico e escova de dente para todos os membros da família (pais e irmão).

Também foram dadas instruções verbais e por escrito para as professoras de cada turma. Como reforço à criança para o correto uso do material, cada escola recebeu uma cópia do desenho animado para livre uso.

Figura 4.8 – Kit individual distribuído à família.

4.3.5 Análises do pH dos dentifrícios

A análise do pH foi realizada através do pHmetro MB10 (Marte), previamente calibrado com padrões de pH 4 e 7. Este equipamento permite análise direta do pH, por imersão nos dentifrícios. A análise do pH foi feita na mesma época da análise de F, logo após a fabricação dos dentifrícios e 6 meses depois. As análises foram feitas em triplicata.

4.3.6 Análise de F nos dentifrícios

A análise de F nos dentifrícios foi feita logo após a fabricação dos mesmos, bem como após 6 meses. Para cada lote de dentifrício produzido, foram analisados 5 tubos diferentes de dentifrício. Cada tubo foi analisado para o F total (FT), F solúvel (FS) e F iônico (FI), de acordo com Bardal et al. (2003). Todas as análises foram feitas em duplicata. A preparação das amostras para análise foi feita da seguinte maneira:

1. 100 mg de dentifrício foram homogeneizados em 10 ml de água deionizada.
2. Para analisar o FT foram utilizados 0,25 mL HCl 2M adicionado a 0,25 mL da suspensão citada acima. Esta nova composição foi mantida a 45°C por 1 hora em “banho maria”. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL NaOH 1 M e 1,0 mL TISAB II (Total ionic strength adjustment buffer). Esta solução foi centrifugada a 5000 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as medições do FS e do FI.
3. Para a análise do FS foi utilizado 0,25 mL do sobrenadante descrito no item 2, ao qual foram adicionados 0,25 mL HCl 2M. Esta solução foi mantida por 1 hora a 45°C em “banho maria”. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL NaOH 1 M, e 1,0 mL TISAB II.
4. Para a análise do FI foram utilizados 0,25 mL do sobrenadante descrito no item 2, adicionando-se 1,0 mL TISAB II. Em seguida, 0,5 mL NaOH 1 M e 0,25 mL HCl 2 M também foram adicionados à solução.

Depois da preparação das amostras, o F foi analisado com eletrodo iônico específico (Orion 96-09). Um conjunto de padrões variando entre 0,5-4,0 ppm F foi preparado em triplicata para calibrar o aparelho, usando diluição seriada de uma solução estoque contendo 100 ppm NaF (Orion#940907). Os valores de milivoltagem encontrados foram convertidos para $\mu\text{g F}$ através de uma curva padrão cujo coeficiente de correlação foi de $r \geq 0.99$.

4.4 INCORPORAÇÃO DE F NO BIOFILMO DENTÁRIO

4.4.1 Material utilizado

Previamente à coleta da placa, foram pesados ($\pm 0,01$ mg) e numerados 84 tubos tipo *ependorf*, os quais foram utilizados para o armazenamento do biofilme. Além disto, foram preparadas 20 espátulas tipo *hollenback* (retirado o corte através de esmeril), a serem utilizadas para a coleta do biofilme. Previamente ao uso e após o uso, os instrumentos foram lavados e esterilizados com glutaraldeído a 2%. Para um correto ambiente de trabalho, foram utilizados papel craft para forrar a mesa clínica e recipientes plásticos para descartar os instrumentos utilizados. Luvas, gorros, máscaras e aventais também foram utilizados, sendo os mesmos descartados em sacolas plásticas identificadas como material contaminado. Estas sacolas foram dispensadas em local designado para lixo contaminado.

4.4.2 Coleta do biofilme dentário

Um ano após o início da utilização dos dentifrícios, foram selecionadas por conveniência 3 escolas dentre as 57 que já participavam do estudo. Dentre os participantes das três escolas selecionadas, foi formada uma amostra com 21 participantes de cada grupo, que já utilizavam os dentifrícios. Após o início das aulas, as diretoras e professoras das escolas selecionadas foram comunicadas e orientadas quanto a esta etapa do estudo. Assim, foram marcadas reuniões com os responsáveis dos escolares participantes do estudo para informar os procedimentos que seriam realizados. Além da reunião, foi também enviado um comunicado aos responsáveis a título de reforçar o que seria desenvolvido (Apêndice E).

Participaram 21 voluntários de cada grupo. Para tanto, os voluntários

escovaram as superfícies oclusais dos dentes por 1 minuto, com o mesmo dentífrico que já vinham usando na pesquisa. Após a escovação, os voluntários fizeram um bochecho com água como de costume. Uma hora depois foi coletado o biofilme dentário de todas as superfícies lisas de cada dente (PESSAN et al., 2008). Apenas foram evitadas as coletas das placas próximas a superfícies com cavidades provocadas por cárie dentária.

4.4.3 Análise da concentração de F no biofilme

Após a coleta, os *ependorfs* com a placa bacteriana foram congelados em câmara fria. Antes da análise, as amostras foram descongeladas e secas em estufa a 190°C durante 2 h e novamente pesados (peso seco).

As amostras de placa foram analisadas quanto ao F usando eletrodo íon-específico, após difusão facilitada com hexametil-disiloxano (HMDS), de acordo com o método de Taves (1968), conforme modificado por Whitford (1996). Para tanto, as amostras de placa foram colocadas em placas de Petri plásticas (Falcon, n° 1007), juntamente com 2 mL de água. Na tampa destas placas, foram colocados 50 µL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 µL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 µL com água deionizada usando uma pipeta. A gota, que continha todo o F da placa foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

Soluções-padrão (contendo de 0,25 a 50 nm F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras analisadas com a finalidade de validação da análise. Foi feita a primeira

leitura antes de se começar a ler as amostras de placa, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira, após o término da leitura das amostras. As leituras obtidas em mV, foram convertidas para μg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões foram aceitas. Os dados foram expressos em mg F/Kg peso seco de placa.

4.5 CONCENTRAÇÃO DE F PRESENTE NAS UNHAS

4.5.1 Material utilizado

Previamente à coleta da unha, foram numerados 240 tubos tipo *ependorf*, os quais foram utilizados para o armazenamento das unhas.

4.5.2. Coleta da Unha

Foram selecionadas por conveniência 3 escolas que já participavam do estudo do dentifrício. Uma subamostra de 60 escolares, ou seja, 15 voluntários de cada grupo fizeram parte desta etapa da pesquisa.

Após reunião com a diretora das escolas, professoras e os responsáveis, foram enviados, através dos voluntários, 4 tubos tipo *ependorf* por escolar. Juntamente com os tubos, foi enviada uma carta de orientação e participação (Apêndice B).

4.5.3. Análise das Unhas

Os fragmentos das unhas das mãos e dos pés de cada voluntário foram analisados isoladamente. Quando o peso das amostras foi superior a 20 mg, as análises foram feitas em duplicata e obteve-se a média das leituras. Os fragmentos foram limpos com água deionizada, usando-se uma escova interdentária, para os fragmentos maiores, sendo que os fragmentos muito pequenos foram limpos por fricção contra um pedaço de tecido umedecido em água deionizada. Foram então colocados em ultra-som por 10 minutos, secos a 60°C e pesados em balança ($\pm 0,01$ mg; AND, Tóquio, Japão) (RODRIGUES et al., 2004).

Para análise, os fragmentos de unha foram colocados em placas de Petri

plásticas (modelo Falcon, nº 1007), juntamente com 2 mL de água. Na tampa destas placas, foram colocados 50 μ L de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μ L com água deionizada usando uma pipeta. Este ajuste do volume total é importante porque volumes variáveis de NaOH são perdidos durante o processo de difusão que ocorre durante a noite. A gota, que continha todo o F das unhas foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa. As Figuras 9 a 12 representam a análise de F nas unhas através deste método.

Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 mg/L, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 μ g, o que é suficiente para amostras de unha pesando mais que 5 mg.

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração, contendo entre 0,005 e 0,95 μ g F, foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de unha analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a analisar as amostras de unhas, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras. A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação

da análise de F na água

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

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 ceo-s

Foi utilizado o *software* GraphPad InStat para Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA). Os dados não passaram no teste de normalidade e foram então analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi 5%.

4.6.2 Biofilme Dentário

Foi utilizado o *software* GraphPad InStat para Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA). Foram checadas a normalidade (teste de Kolmogorov e Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados. Estes passaram no teste de normalidade, mas as diferenças entre os desvios-padrão foram significativas. Foi então feita a transformação logarítmica, sendo os dados transformados analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais. O nível de significância adotado foi 5%.

4.6.3 Unhas

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism para Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA). Foram checadas a normalidade (teste D' Agostino & Pearson) e homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados. Estes passaram no teste de normalidade, mas as diferenças entre os desvios-padrão foram significativas. Foi então feita a transformação logarítmica, sendo os dados transformados analisados por ANOVA a 2 critérios (tipo de dentifrício e sítio de coleta das unhas) de medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações individuais. O nível de significância adotado foi 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados a serem demonstrados seguirão a legenda abaixo:

- G1 - dentifrício experimental líquido com 1100 ppm F e pH 4,5.
- G2 - dentifrício experimental líquido com 1100 ppm F e pH 7,0.
- G3 - dentifrício experimental líquido com 550 ppm F e pH 4,5.
- G4 - dentifrício controle Sorriso Fresh 1100 ppm F e pH 7,0.

5.1 ANÁLISE DOS DENTIFRÍCIOS

5.1.1 - Análise do pH

O pH dos diferentes lotes de dentifrícios, analisado logo após a fabricação e depois de 6 meses, está apresentado na Tabela 5.1. A repetibilidade média das análises em triplicata foi superior a 99%.

Tabela 5.1 – Valores médios do pH ($\pm$ DP) no baseline e após 6 meses em cada lote de dentifrício fabricado

	G1		G2		G3		G4	
LOTE	Baseline	6 meses	Baseline	6 meses	Baseline	6 meses	Baseline	6 meses
1	4,5(0,04)	4,5(0,04)	6,7(0,07)	6,7(0,08)	4,6(0,04)	4,6(0,04)	6,8(0,07)	6,8(0,08)
2	4,6(0,05)	4,6(0,05)	6,7(0,08)	6,8(0,09)	4,5(0,05)	4,4(0,04)	6,8(0,07)	6,8(0,08)
3	4,7(0,05)	4,7(0,06)	6,8(0,07)	6,8(0,08)	4,4(0,04)	4,5(0,05)	6,8(0,07)	6,8(0,08)
4	4,5(0,05)	4,5(0,04)	6,9(0,06)	6,9(0,06)	4,6(0,05)	4,6(0,04)	6,8(0,07)	6,8(0,08)

5.1.2 – Análise de F

A concentração de F total, iônico e solúvel, nos diferentes lotes de dentifrícios, analisada logo após a fabricação e depois de 6 meses, está apresentada na Figura 5.1. A repetibilidade média das análises em triplicata foi superior a 99%.

			LOTE			
GRUPO			1	2	3	4
G1	BASELINE	FI	1038,18(99,79)	1181,02(57,37)	1162,53(27,90)	1059,34(29,37)
		FS	1116,94(88,18)	1269,45(87,54)	1187,90(87,17)	911,02(84,96)
		FT	1119,85(65,87)	1323,21(74,94)	1179,80(29,78)	932,72(54,81)
	6 MESES	FI	1035,10(99,79)	1177,81(44,07)	1153,69(67,17)	1049,40(41,51)
		FS	1109,34(76,13)	1264,35(97,63)	1183,87(43,70)	894,57(65,30)
		FT	1118,49(75,32)	1318,26(74,94)	1157,96(32,56)	928,29(23,04)
G2	BASELINE	FI	1164,01(20,49)	1190,76(31,48)	1258,58(70,68)	1000,65(24,76)
		FS	1101,94(17,54)	1272,42(47,34)	1256,41(67,75)	860,04(40,36)
		FT	1174,64(24,18)	1278,60(98,65)	1275,61(98,42)	868,54(42,21)
	6 MESES	FI	1161,34(23,56)	1186,68(21,48)	1248,97(73,58)	991,50(12,75)
		FS	1096,01(23,72)	1266,42(58,40)	1242,42(82,35)	841,04(39,25)
		FT	1149,65(83,69)	1274,41(96,99)	1274,64(106,1)	850,39(16,13)
G3	BASELINE	FI	558,14(48,32)	585,01(30,39)	625,00(23,52)	504,43(30,39)
		FS	533,50(47,21)	580,89(36,12)	622,62(12,49)	479,91(45,32)
		FT	546,32(34,54)	625,26(15,34)	560,60(41,67)	439,14(32,15)
	6 MESES	FI	551,24(87,65)	580,25(40,98)	623,84(48,62)	484,43(10,69)
		FS	525,98(23,13)	575,71(32,92)	619,10(37,21)	439,98(57,00)
		FT	547,01(66,87)	625,11(20,25)	556,39(24,54)	437,02(08,25)
G4*	BASELINE	FI	1044,39(98,76)			
		FS	976,65(161,67)			
		FT	1054,43(89,73)			
	6 MESES	FI	1039,23(43,71)			
		FS	976,69(138,45)			
		FT	1043,67(54,72)			

*Lote único

Figura 5.1 – Concentração de F total, iônico e solúvel ($\pm$ DP), nos diferentes lotes de dentifrícios no baseline e 6 meses após a fabricação

5.2 PREVENÇÃO DE NOVAS LESÕES CARIOSAS

A amostra contava com 1.402 voluntários (222 salas de aula) no início do estudo, divididos da seguinte forma: G1 - 345 (55 salas de aula), G2 - 343 (52 salas de aula), G3 - 354 (59 salas de aula) e G4 - 360 (56 salas de aula). Decorridos os primeiros 12 meses, as crianças foram reexaminadas e o número de desistências foi de 200 voluntários. Após 20 meses, 1.043 voluntários concluíram o estudo com uma perda amostral de 21,4, 23,6, 29,4 e 25,0% para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente (Figura 5.2).

Figura 5.1 –Delineamento experimental após 20 meses de estudo

A Tabela 5.2 mostra as médias ($\pm$ DP) no baseline e após 12 meses, bem como o incremento de ceo-s para cada grupo. Os valores observados para todas as variáveis testadas foram similares para os grupos, não tendo sido observadas diferenças significativas entre eles ($p=0,718$ e $p=0,617$ para o ceo-s após 12 meses e para o incremento, respectivamente).

Tabela 5.2 - ceo-s médio ($\pm$ DP) no baseline, após 12 meses, incremento médio de ceo-s para cada grupo

	Baseline	12 meses*	Incremento*
G1 (n=281)	5,29 (5,22)	6,38 (5,85)	1,26 (1,84)
G2 (n=305)	4,88 (5,02)	6,10 (5,88)	1,22 (1,99)
G3 (n=312)	5,09 (5,11)	6,42 (5,79)	1,28 (1,69)
G4 (n=304)	5,07 (5,00)	6,36 (5,76)	1,29 (1,66)

*Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis)

A Tabela 5.3 mostra o ceo-s médio inicial ($\pm$ DP) e após 20 meses e o incremento médio de ceo-s. O ceo-s após 20 meses, bem como o incremento de ceo-s, foi muito parecido para todos os grupos, não tendo havido diferenças significativas entre os mesmos ($p=0,686$ e $p=0,371$ para o ceo-s após 20 meses e para o incremento, respectivamente).

Tabela 5.3 - ceo-s médio ($\pm$ DP) no baseline, após 20 meses, incremento médio de ceo- para cada grupo

Grupos (n)	Baseline	20 meses*	Incremento*
G1 (261)	5,02 $\pm$ 5,09	6,99 $\pm$ 6,35	1,97 $\pm$ 2,20
G2 (262)	4,80 $\pm$ 5,00	6,88 $\pm$ 6,78	2,08 $\pm$ 2,87
G3 (250)	5,24 $\pm$ 5,37	7,38 $\pm$ 7,36	2,14 $\pm$ 2,88
G4 (270)	5,05 $\pm$ 4,93	7,20 $\pm$ 6,26	2,15 $\pm$ 2,46

*Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis)

5.3 INCORPORAÇÃO DE FLÚOR NO BIOFILME DENTÁRIO

Os resultados obtidos são mostrados na tabela 5.4 A ANOVA detectou diferenças significativas entre os grupos ($F=7,058$, $p=0,0003$). O teste de Tukey encontrou que o

dentifrício comercial apresentou concentrações de F significativamente menores quando comparadas aos dentifrícios experimentais. A maior concentração média de F no biofilme ($3,091 \pm 0,986$ mg/Kg) foi encontrada quando se utilizou o dentifrício experimental contendo 1.100 ppm F e pH acidulado. Embora o valor médio obtido para este dentifrício tenha sido duas vezes maior que o observado para os dentifrícios experimentais contendo 1.100 ppm F e pH neutro e 550 ppm F e pH acidulado, não houve diferenças significativas entre os dentifrícios experimentais.

Tabela 5.4 – Concentrações médias de F encontradas no biofilme dentário, 1 hora após a última da escovação com cada dentifrício

Grupos			Concentração média ($\pm$ EP) de F no biofilme (IC 95%)
Dentifrício	Concentração de F (mg/Kg)	pH	(mmol/Kg peso seco)
Comercial ^b	1.100	7,0	$0,455 \pm 0,103$ (0,240-0,670)
Experimental ^a	1.100	7,0	$1,667 \pm 0,410$ (0,813-2,521)
Experimental ^a	1.100	4,5	$3,091 \pm 0,984$ (1,038-5,145)
Experimental ^a	550	4,5	$1,448 \pm 0,303$ (0,816-2,079)

n=21. Dentifrícios com as mesmas letras superescritas não são significativamente diferentes (ANOVA após transformação logarítmica e teste de Tukey, $p < 0.05$).

5.4 INCORPORAÇÃO DE FLÚOR NAS UNHAS

A Figura 5.2 mostra os resultados da concentração média de F encontrada nas unhas das mãos e unhas dos pés para cada grupo. Foi possível ver um claro efeito dose-resposta tanto para as unhas das mãos quanto para as unhas dos pés. A ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas detectou uma diferença significativa entre os dentifrícios usados ($F=45,06$ $p < 0,0001$). As concentrações de F nas unhas das mãos foram significativamente mais altas quando comparadas com as unhas dos pés ($F=58,58$, $p < 0,0001$). Não houve interação entre os critérios ($F=0,137$, $p=0,9375$). As concentrações de F mais altas foram encontradas para a pasta, que diferiu significativamente dos dentifrícios líquidos experimentais, exceto para o dentifrício de 1100 ppm F pH 7,0 (para as unhas dos pés apenas). As concentrações de F mais baixas foram encontradas para o dentifrício de 550 ppm F pH 4,5, que diferiu significativamente de todos os outros. Os dentifrícios experimentais de 1100 ppm F levaram a concentrações intermediárias de F nas unhas, não diferindo significativamente entre si.

Figura 5.2 - Concentração média de F nas unhas das mãos e dos pés das crianças, de acordo com os tipos de dentifrícios utilizados. As barras indicam o erro-padrão (n=15). As concentrações de F nas unhas das mãos foram significativamente mais altas quando comparadas com as unhas dos pés. Letras distintas para o mesmo sítio indicam diferenças significativas entre os dentifrícios utilizados (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, após transformação logarítmica dos dados, $p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

A Globalização é um fenômeno muito importante para o conhecimento e trocas de diversos hábitos por todo o mundo, o que gerou o crescimento das economias. Tal fato proporcionou o acesso a outros hábitos alimentares, o que levou à cultura dos carboidratos e açúcar refinado a países que os desconheciam, aumentando assim a prevalência da cárie dentária. Considerada um problema de saúde pública mundial, a cárie dentária é conhecida como um processo de desmineralização das estruturas dentárias através dos ácidos produzidos pela fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta, geralmente a sacarose. O potencial cariogênico da dieta emerge em áreas onde o suplemento de F é inadequado. Neste sentido, estratégias em ações básicas de saúde bucal devem ser adotadas para que o F seja oferecido de forma universal (GOLDMAN et al., 2008). A fluoretação das águas, do sal, do leite são alguns métodos de promover o acesso ao F. Entretanto, o método mais usado é o dentifrício fluoretado. Estima-se que quase 500 milhões de pessoas sejam beneficiadas pelo uso dos dentifrícios fluoretados (Figura 6.1). Baseando-se no fato de que a população mundial foi estimada em 6,6 bilhões (2007), apenas 12,5% deste número têm acesso ao produto (BUZALAF, 2008; GOLDMAN et al., 2008).

Figura 6.1 – Número estimado de pessoas em todo o mundo, que utilizam diferentes tratamentos com fluoretos

Goldman e colaboradores (2008) conduziram um estudo sobre o acesso ao dentifrício fluoretado pelas populações de todo o mundo. Segundo os autores são necessários 0,03 dias para um trabalhador de baixa renda (camada 30% mais pobre) do Reino Unido comprar uma dose anual de dentifrício fluoretado mais barato em seu país. No Quênia este número aumenta para 9,34 dias. Os autores destacaram que, baseado no fato do dentifrício fluoretado ser a forma mais significativa e mais usada no combate à cárie dentária no mundo, esforços devem ser direcionados no sentido de diminuir as desigualdades ao seu acesso. Uma adequação do preço do dentifrício fluoretado no contexto de cada economia seria o primeiro passo para o alcance deste objetivo.

Vilhena e colaboradores (2008) compararam o uso de dentifrícios na forma líquida e na forma de creme por crianças na faixa etária de 4 a 8 anos. Em conclusão, a quantidade de dentifrício na forma de creme foi três vezes maior do que na forma líquida. A realidade no consumo de dentifrícios fluoretados é que a grande maioria das famílias costuma usar dentifrício de adulto para todas as faixas de idade, mesmo existindo no mercado dentifrício segmentados por faixa etária. No presente estudo, a formulação experimental líquida (gel fluído) de baixa concentração de F e pH acidulado foi desenvolvida para atender a este comportamento e contribuir para o acesso ao dentifrício fluoretado. Com sua baixa concentração de F (público infantil) e seu pH acidulado capaz de potencializar o efeito do F, esta formulação pode ser considerada de uso seguro por toda a família, dosando em gotas a quantidade a ser utilizada, evitando o uso em excesso e o desperdício. Dessa maneira, como a cárie dentária é uma doença que atinge todos os continentes, esta nova formulação poderá beneficiar diretamente toda a população mundial.

Os dentifrícios fluoretados desenvolvem um importante papel na manutenção de níveis adequados de F no meio bucal, agindo principalmente no processo de des - remineralização (BUZALAF, 2008). O seu uso regular, duas vezes ao dia, permite a presença de níveis elevados de F na saliva, o que reduz a desmineralização do esmalte dentário. Na placa bacteriana, a presença de níveis elevados de F potencializam o efeito de remineralização, mesmo em valores de pH propícios a desmineralização (LYNCH, 2004). Por outro lado, mesmo que os dentifrícios fluoretados têm contribuído substancialmente para o declínio na

prevalência de cárie dentária, concomitantemente, um aumento na prevalência de fluorose dentária tem sido documentado e os dentifrícios têm sido reconhecidos como um dos contribuintes (MASCARENHAS, 2000; WARREN; LEVY, 1999), devido ao fato de que crianças na primeira infância geralmente ingerem grandes quantidades de dentifrícios durante a escovação (DE ALMEIDA et al., 2007; LIMA e CURY, 2001). Um conjunto de ações articuladas com os diversos setores da sociedade poderia minimizar este problema:

- Campanhas publicitárias poderiam ser mais bem elaboradas no sentido de orientar o uso correto do dentifrício fluoretado, e não apenas os apelos mercadológicos (embalagens, cores, sabores, etc), os quais são responsáveis pelo aumento do consumo indiscriminado;
- As autoridades sanitárias deveriam ser mais prudentes na elaboração de leis mais adequadas a produtos cosméticos;
- A população infantil deveria ser orientada a respeito da importância da dose correta do “medicamento” dentifrício fluoretado, e principalmente a sua não ingestão.

Mesmo com relatos na literatura afirmando que crianças com fluorose dentária têm menos cárie dentária (WARREN; LEVY, 1999), seu efeito é indesejado. De acordo com Cury (2001), a estratégia para um melhor risco/benefício deveria minimizar a quantidade de F ingerida e maximizasse a concentração de F disponível no meio bucal. Uma possível alternativa para se reduzir a ingestão de F por crianças na primeira infância seria o uso de dentifrícios de baixa concentração de F. Entretanto, ainda não é consenso se a eficácia anti-cáries de um dentifrício com 500 ppm F é equivalente àquela de um dentifrício convencional (1.000 ppm F) (AMMARI et al., 2003). Desta maneira, com a utilização de um dentifrício de baixa concentração de F haveria um menor risco de a criança desenvolver fluorose dentária, mas pode ser que a mesma não estivesse tão protegida do desenvolvimento de novas lesões cariosas quanto se utilizasse um dentifrício convencional. Bentley e colaboradores (1997) e Vilhena e colaboradores (2008) encontraram uma correlação positiva entre a consistência do dentifrício e uma maior quantidade do mesmo dispensada na escova. Buscando reunir o melhor das estratégias para o uso racional de dentifrícios

fluoretados, este estudo é o primeiro ensaio clínico no mundo que avaliou a progressão de cáries com o uso de dentifrício líquido de baixa concentração de F e pH acidulado por crianças pré-escolares que tinham experiência passada de cáries e residiam numa área fluoretada. Segundo Zero (2006), a colocação no mercado de produtos como os dentifrícios fluoretados deveriam seguir uma criteriosa metodologia baseada em resultados e não apenas em “receita de bolo”. Para o autor, uma metodologia adequada deve exibir: uma clara dose - resposta (0, 250, 550, 1100 ppm F); um controle interno de todos os testes (0, 250, 550, 1100 ppm F e padrão “gold standard”); um tamanho de amostra suficiente para demonstrar um poder estatístico de equivalência; testes de equivalência com um produto padrão de mercado (gold standard). O presente estudo é formado por uma amostra final em torno de 1100 participantes, sendo que o mesmo demonstrou que ambas as estratégias empregadas para se reduzir à ingestão de F a partir do dentifrício por crianças pequenas, ou seja, a redução da quantidade de dentifrício colocada na escova (técnica da “gota”) e redução da concentração de F no dentifrício (550 ppm), não reduziram sua efetividade anti-cáries, uma vez que não houve diferenças significativas na progressão de cáries entre os dentifrícios testados. Além disso, os testes de estabilidade de pH e concentração de F desenvolvidos em todos os lotes demonstraram a estabilidade da formulação.

A incorporação de diversos agentes ativos (terapêuticos) além do F aos dentifrícios é uma prática bastante comum entre os fabricantes (BUZALAF et al., 2008). Todavia, alguns destes agentes tem sua eficácia clínica comprovada, e outros nem tanto. Pelo menos dois fatores relacionados às características da formulação líquida experimental de baixa concentração de F testada no presente estudo parecem ter agido em conjunto para aumentar a efetividade anti-cáries do dentifrício: a redução do pH e da viscosidade.

O efeito da redução do pH do dentifrício era esperado, uma vez que estudos prévios *in vitro* (BRIGHENTI et al., 2006; ALVES et al., 2007) e *in situ* (NOBRE-DOS-SANTOS et al., 2007) mostraram um aumento da proteção anti-cáries dos dentifrícios acídicos quando comparados aos neutros. Tem sido relatado que o pH influencia consideravelmente a difusão de F no esmalte. A efetividade anti-cáries aumentada dos dentifrícios de baixa concentração de F e pH acidulado pode ser explicada pela sua habilidade aumentada em induzir a formação de fluoreto de

cálcio sobre substratos de apatita (PETERSSON et al., 1989). Em adição, pôde-se observar que a redução do pH do dentifrício (de 7,0 para 4,5) duplicou a incorporação de F na placa coletada uma hora após a escovação (Tabela 5.4). Isto é consistente com dados de um outro estudo mostrando que as concentrações de F na saliva a curto prazo são significativamente maiores após o uso de dentifrícios com pH 5,5, quando comparados a dentifrícios com a mesma concentração de F, mas pH neutro (OLYMPIO et al., 2007). Portanto, é possível que os níveis salivares mais altos presentes após o uso de dentifrícios acidulados tenham refletido em concentrações aumentadas de F na placa. Por outro lado, tem-se relatado que a incorporação de F na placa é fortemente dependente das concentrações de Ca presentes na placa (PESSAN et al., 2008; ROLLA e BOWEN, 1977; WHITFORD et al., 2005; WHITFORD et al., 2002). Existe alguma evidência de que o esmalte pode contribuir com as níveis de Ca da placa durante a exposição à sacarose (TANAKA e MARGOLIS, 1999). Deste modo, é possível que o uso de dentifrícios com pH acidulado promova um aumento do conteúdo de Ca na placa, o que, por sua vez, aumentaria a incorporação de F.

A menor viscosidade da formulação experimental de baixa concentração de F também pode ter tido um papel no seu potencial anti-cáries. Foi observado que os dentifrícios líquidos forneceram concentrações de F no biofilme significativamente maiores quando comparados à pasta comercial. Isto pode ser devido ao fato de que a viscosidade mais baixa do dentifrício líquido pode ter facilitado a difusão do F na placa dentária, o que já foi sugerido previamente (SILVA et al., 2001). Em adição, considerando-se que os episódios de escovação são geralmente curtos, o uso de um dentifrício com viscosidade mais baixa poderia aumentar a incorporação de F pelos reservatórios orais.

Deve-se enfatizar, entretanto, que o presente estudo foi conduzido numa área otimamente fluoretada. Existe a possibilidade de que o dentifrício líquido de baixa concentração de F e pH acidulado não atingisse a mesma eficácia cariostática da pasta controle se o estudo tivesse sido conduzido em áreas não fluoretadas ou em áreas onde houvesse baixa exposição ao F a partir de outras fontes. Recentemente, a progressão de cáries foi avaliada em dois grupos de crianças de 2-4 anos de idade (com e sem lesões de cárie ativa) que tinham usado dentifrícios contendo 550 ou 1.100 ppm F durante um ano. A eficácia anti-cáries do dentifrício

de baixa concentração de F foi similar àquela apresentada pelo dentifrício de 1.100 ppm F, quando o mesmo foi usado por crianças cárie-inativas, mas não por crianças com lesões de cárie ativa (LIMA et al., 2008). Entretanto, estes dentifrícios tinham um pH neutro. Por outro lado, estudos clínicos pioneiros, realizados durante a década de 1960 com dentifrícios acidulados (BRUDEVOLD e CHILTON, 1966; SLACK et al., 1971), não encontraram vantagens no seu uso quando comparados com dentifrícios neutros. Entretanto, estes estudos foram conduzidos numa época em que havia poucas fontes de F disponíveis. Portanto, estudos clínicos adicionais envolvendo dentifrícios de baixa concentração de F e pH acidulado são necessários a fim de fornecer conclusões baseadas em evidências sobre este assunto. Seria de grande importância avaliar se a formulação testada no presente estudo manteria sua eficácia numa região onde a água de abastecimento não é fluoretada, bem como se seria capaz de evitar a progressão de cáries em pacientes cárie-ativos.

Estudos têm demonstrado uma relação positiva quanto à ingestão de dentifrício fluoretado e risco de fluorose dentária (DE ALMEIDA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; LIMA e CURY, 2001). As unhas têm sido sugeridas como biomarcadores de exposição ao F (SCHAMCHULA et al., 1985; MACHOY, 1989; SCHIMIDT e LEUSCHKE, 1990; SPATE et al., 1994; WHITFORD et al., 1999; MCDONNELL e O'MULLANE 2001; BUZALAF et al., 2002; ARSATI, 2003; LEVY et al., 2004; RODRIGUES et al. 2004; PESSAN et al., 2005; BUZALAF et al., 2006; DE ALMEIDA et al., 2007). Apesar de a ingestão de F a partir do dentifrício não ter sido avaliada no presente estudo, devido à idade das crianças envolvidas, o uso do dentifrício líquido experimental de baixa concentração de F e pH acidulado deve ter também reduzido a ingestão de F a partir do dentifrício, e, portanto o risco de ocorrência de fluorose dentária. No presente estudo, as concentrações de F nas unhas foram avaliadas um ano após o início de uso do dentifrício pelas crianças. As concentrações mais baixas de F nas unhas foram encontradas nas crianças que utilizaram o dentifrício líquido de 550 ppm F e pH acidulado, diferindo significativamente de todos os outros dentifrícios. Isto enfatiza que a redução da concentração de F no dentifrício parece ter sido adequada para reduzir a ingestão de F a partir do mesmo. Os dentifrícios experimentais de 1.100 ppm F levaram a concentrações intermediárias de F nas unhas e não diferiram

significativamente um do outro, enquanto que as concentrações mais altas de F nas unhas foram vistas quando a pasta comercial foi usada, e os valores neste caso diferiram significativamente de todos os daqueles observados para as formulações líquidas experimentais. Isto era de certa forma esperado, uma vez que tem sido mostrado que o uso de um dentifrício líquido através da técnica da gota significativamente reduz e torna mais fácil a padronização da quantidade de dentifrício aplicada à escova de dente, quando comparado com pastas dentárias (VILHENA et al., 2008). De acordo com Vilhena et al. (2008), a quantidade média ($\pm$ DP) de dentifrício líquido aplicado à escova por crianças de 4-8 anos de idade quando usam a técnica da “gota” é de $0,15 \pm 0,06$ g, quando comparada a $0,41 \pm 0,20$ g quando as crianças usam uma pasta dentária através da técnica “transversal” (VILHENA et al., 2000). Por esta razão, nós não incluímos um grupo que utilizaria dentifrício líquido com 550 ppm F e pH 7,0 no presente estudo. Uma vez que o mesmo foi conduzido por 20 meses com crianças que tinham história de cárie, havia preocupação que a redução simultânea da concentração de F e da quantidade de dentifrício colocada na escova (técnica da “gota”), na ausência de um fator que poderia aumentar a eficácia anti-cáries do dentifrício, como a redução do pH, poderia levar a uma maior incidência de cáries na população estudada, trazendo problemas éticos. Pode-se ainda sugerir, pelo fato de o dentifrício testado possuir a mesma eficácia anti-cáries que o dentifrício convencional, que o mesmo seja utilizado não só pelas crianças, mas por toda a família, evitando desta forma a existência de outros dentifrícios com concentração maior de F na residência, que poderiam ser utilizados pelas crianças.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite concluir que o dentifrício experimental líquido com baixa concentração de F (550 ppm) e pH acidulado empregado nas condições experimentais do presente estudo:

1. Teve a mesma eficácia anti-cáries da pasta de dentes convencional com 1.100 ppm F e pH neutro;
2. Aumentou a incorporação de F no biofilme dentário quando comparado ao dentifrício convencional controle;
3. Diminuiu a concentração de F encontrada nas unhas das mãos e dos pés, o que sugere que tenha levado a uma menor ingestão de F a partir da escovação.

REFERÊNCIAS

- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MAR, et al. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res.* 2007;41(4):263-7.
- Ammari AB, Bloch-Zupan A, Ashley PF. Systematic review of studies comparing the anti-caries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride or less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. *Caries Res.* 2003;37(2):85-92.
- Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res.* 1990;69(spec):601-5.
- Arneberg P, Giertsen E, Emberland H, Ogaard B. Intra-oral variations in total plaque fluoride related to plaque pH: a study in orthodontic patients. *Caries Res.* 1998;31(6):451-6.
- Arsati YBOL. A unha como indicador biológico de exposição a fluoreto para prever risco de fluorose dental [tese]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas; 2003.
- Bardal PA, Olympio KP, Da Silva Cardoso VE, De Magalhães Bastos JR, Buzalaf MA. Evaluation of total pH and soluble and ionic fluoride concentrations in dentifrices commercially available in Brazil. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1(4):283-9.
- Barnhart WE, Hiller LK, Leonard GJ, Michaels SE. Dentifrice usage and ingestion among four age groups. *J Dent Res.* 1974;53(6):1317-22.
- Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AJR, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res.* 1993;27(4):280-4.
- Bentley EM, Ellwood RP, Davies RM. Factors influencing the amount of fluoride toothpaste applied by the mothers of young children. *Br Dent J.* 1997;183(11/12):412-4.
- Bloch-Zupan A. Is the fluoride concentration limit of 1,500 ppm in cosmetics (EU guideline) still up-to-date? *Caries Res.* 2001;35(1):22-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições bucal da população brasileira 2002-2003 [texto na internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2004 [acesso em 2007 ago. 3]. Disponível em: http://www.apcd.org.br/prevencao/arquivos/projeto_sb_brasil.pdf.

Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sassaki KT. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res.* 2006; 40(3):239-44.

Brudevold F, Chilton NW. Comparative study of a fluoride dentifrice containing soluble fosfates and a calcium-free abrasive: second year report. *J Am Dent Assoc.* 1966;72(4):889-94.

Bruun C, Givskov H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications in vitro. *Caries Res.* 1991;25:96-100.

Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res.* 1992;71(5):1228-37.

Burt BA, Fejerskov O. Water fluoridation. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry*. 2nd ed. Copenhagen: Munsgaard; 1996. p. 275-90.

Buzalaf MAR, Bastos JRM, Lauris JRP, Almeida BS, Aquilante AG. Association between the early use of toothpaste and other variables with dental fluorosis: a transversal retrospective study *Rev Fac Odontol Bauru.* 2002;10(3):196-200.

Buzalaf MAR, Cury JA, Whitford GM. Fluoride expousures and dental fluorosis: a literature review. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2001;9(1/2):1-10.

Buzalaf MAR. Fatores de risco para a fluorose dentária e biomarcadores de exposição ao flúor [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2002.

Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F. Fluctuations in public water fluoride level in Bauru, Brazil. *J Public Health Dent.* 2002; 62(3):173-6.

Buzalaf MAR, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride.* 2002; 35(3):185-92.

Buzalaf MAR. Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. J Dent Res. 2008; 87(5):461-65.

Buzalaf MAR. Fluoretos e saúde bucal. 1. ed. São Paulo: Livraria Santos; 2008.

Clarkson JJ. International collaborative research on fluoride. J Dent Res. 2000;79(4),893-904.

Cury JA. Determination of appropriate exposure of fluoride in non-EME countries in the future. J Dent Res. 2000;79(4):901.

Cury, J. A. O uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN. Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades. São Paulo: Santos; 2001. p. 31-68.

Cury JA. Dentifrícios: como escolher e indicar. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Odontologia 4 : odontopediatria prevenção, São Paulo: Artes Médicas /APCD; 2002. p 281-95.

Chaves SCL, Vieira-da-SILVA LMA. efetividade do dentifrício fluoretado no controle da cárie dental: uma meta-análise. Rev Saúde Pública. 2002;36(5):598-606.

Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. J Dent Res. 1987; 66(12):1730-4.

Duckworth RM, Morgan SN. Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. Caries Res. 1991;25(2):123-9.

Duckworth RM, Knoop DT, Stephen KW. Effect of mouthrinsing with a fluoride dentifrice on human salivary fluoride levels. Caries Res. 1991;25(4):287-91.

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):836-40.

Drummond BK, Curzon MEJ. Urinary excretion of fluoride following ingestion of MFP toothpastes by infants aged two to six years. J Dent Res. 1985;64:1145-8.

Ekstrand, J. Fluoride concentrations in saliva after single oral doses and their relation to plasma fluoride. Scand J Dent Res. 1977;85(1):16-7.

Ekstrand J, Spak CJ, Vogel G. Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. *J Dent Res*. 1990;69(spec):550-5.

Frias AC. Estudo de confiabilidade do levantamento das condições de saúde bucal - Estado de São Paulo, 1998 [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2000 [acesso em 2006 abr. 10]. Disponível em: www.teses.usp.br

Gaugler RW, Bruton WF. Fluoride concentration in dental plaque of naval recruits with and without caries. *Arch Oral Biol*. 1982;27(3):269-72.

Goldman ASG, Yee R, Holmgren CJ, Benzian H. Global affordability of fluoride toothpaste. *Global Health*. 2008 Jun 13;4-7.

Horowitz HR. The effectiveness of community water fluoridation in the United States. *J. Public Health Dent*. 1986;56(5): 53-8.

Kingman JF. The population structure associated with the Ewens sampling formula. *Theor Popul Biol*. 1977;11(2):274-83.

Larsen MJ, Pearce EIF. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol*. 2003;48(4):317-22.

Levy SM. An update on fluorides and fluorosis. *J Can Dent Assoc*. 2003;69(5):286-91.

Levy FM, Bastos JR, Buzalaf MAR. Nails as biomarkers of fluoride in children of fluoridated communities. *J Dent Child*. 2004;71(2):121-5.

Lima YBO, Cury JA. Ingestão de flúor por crianças através da água e dentifrício. *Rev Saude Publ*. 2001;35(6): 576-81.

Lima TJ, Ribeiro CC, Tenuta LM, Cury JA. Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. *Caries Res*. 2008; 42(1):46-50.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2003;(1):002278.

Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent*. 2000;22(4):269-77.

Mcdonnell ST, O'mullane D, Cronin M, Maccormac C, Kirk J. Relevant factors when considering fingernail clippings as a fluoride biomarker. *Community Dent Health*. 2004;21(1):19-24.

Milsom K, Mitropoulos CM. Enamel defects in 8-year-old children in fluoridated and non-fluoridated parts of Cheshire. *Caries Res*. 1990;24(4):286-9.

Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2000;5(2):381- 92.

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

Nobre dos Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel-Cury AA, Cury J. In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. *J Oral Sci*. 2007;49(2):147-54.

Ogaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res*. 2001; 35(suppl1): 40-4.

Oliveby A, Twetman S, Ekstrand J. Diurnal fluoride concentration in whole saliva in children living in a high- and low-fluoride area. *Caries Res*. 1990;24(1):44-7.

Oliveira MJ, Paiva SM, Martins LH, Ramos-Jorge ML, Lima YB, Cury JA. Fluoride intake by children at risk for the development of dental fluorosis: comparison of regular dentifrices and flavoured dentifrices for children. *Caries Res*. 2007; 1(6):460-6.

Olympio KP, Bardal PA, Cardoso VE, Oliveira RC, Bastos JR, Buzalaf MA. Low-fluoride dentifrices with reduced pH: Fluoride concentration in whole saliva and bioavailability. *Caries Res*. 2007;41(5):365-70.

Ophaug RH, Jenkins GN, Singer L, Krebsbach PH. Acid diffusion analysis of different forms of fluoride in human dental plaque. *Arch Oral Biol*. 1987;32(7):459-61.

Pearce E. Therapeutic modifications to the mineral ion composition of dental plaque. *Caries Res*. 1984;18(2):103-10.

Pereira AC, Cunha FL, Meneghim MC, Werner CW. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. *ASDC J Dent Child*. 2000;67(2):132-5.

Peres PEC, Del Bel Cury AA, Cury JA. Avaliação in situ de uma formulação de dentifício com concentração reduzida de flúor. *Pesq Odont Bras*. 2001;15(supl): 83.

Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA. Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *J Dent Res*. 2008;87:461-5.

Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(6):489-93.

Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epidem*. 2003;31(Suppl 1):3-23.

Petersson LG, Lodding A, Hakeberg M, Koch G. Fluorine profiles in human enamel after in vitro treatment with dentifrices of different compositions and acidities. *Swed Dent J*. 1989;13(5):177-183.

Pinto VG. Saúde bucal coletiva. 4. ed. São Paulo: Santos; 2000.

Richards A, Banting DW. Fluoride toothpastes. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt, BA. eds. *Fluoride in dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

Rock, WP, Sabieha AM. The relationship between reported toothpaste usage in infancy and fluorosis of permanent incisors. *Brit Dent J*. 1997;183(5):165-70.

Rodrigues MHC, Bastos JRM, Buzalaf MAR. Fingernails and toenails as biomarkers of subchronic exposure to fluoride from dentifrice in 2- to 3-year-old children. *Caries Res*. 2004;38(2):109-14.

Rolla G, Bowen WH. Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. *Scand J Dent Res*. 1977;85:149-51.

Rolla G, Ekstrand, J. Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry*. 2. ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996. p. 215-29.

Rose RK, Turner SJ. Fluoride-induced enhancement of diffusion in streptococcal model plaque biofilms. *Caries Res.* 1998;32(3):227-32.

Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *J Dent Res.* 1993;72(1):78-84.

Rose RK, Hogg, SD, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding by isolated streptococcal cell walls and lipoteichoic acid: comparison with whole cells. *J Dent Res.* 1994;73(11):1742-7.

Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res.* 1996;30(6):458-64.

Rose RK, Turner SJ, Dibdin GH. Effect of pH and calcium concentration on calcium diffusion in streptococcal model-plaque biofilms. *Arch Oral Biol.* 1997;42(12):795-800.

São José dos Campos (Cidade). Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente. Atlas das condições de vida em São José dos Campos. São José dos Campos: Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente; 2004 [acessp em 2008 set. 11]. Disponível em: <http://www.sjc.sp.gov.br/spu/atlas.asp>.

São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Recomendações sobre o uso de produtos fluorados no âmbito do SUS/SP em função do risco de cárie. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2000 [acesso em 2004 fev. 21]. Disponível em: www.saude.sp.gov.br.

Saxegaard E, Rolla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent. Res.* 1988;96:523-35.

Sampaio FC, Whitford GM, Arneberg P, Von Der Fehr FR. Validation of fingernail fluoride as a biomarker for dental fluorosis. *Caries Res.* 2003;37:291-2 (Abs 72).

Silva MF, Melo EV, Stewart B, De Vizio W, Sintes JL, Petrone ME, et al. The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in Brazil. *Am J Dent.* 2001; 14(spec):19A-23A.

Silva MF, Giniger MS, Zhang YP, DeVizio W. The effect of a triclosan/copolymer/fluoride liquid dentifrice on interproximal enamel remineralization and fluoride uptake. *J Am Dent Assoc.* 2004;135:1023 – 9.

Slack GL, Bulman JS, Osborn JF. Clinical testing of fluoride and non-fluoride containing dentifrices in Hounslow school children. *Br Dent J.* 1971; 130(4):154-8.

Skotowski MC, Hunt RJ, Levy SM. Risk factors for dental fluorosis in pediatric dental patients. *J. Public Health Dent.* 1995;55(3):154-9.

Stamm JW. Multi-function toothpaste for better oral health: a behavioural perspective. *Int Dent J.* 2007;57(suppl1):351-63.

Steiner M, Helfenstein U, Menghini G. Effect of 1000 ppm relative to 250 ppm fluoride toothpaste: A meta-analysis. *Am J Dent.* 2004;17(2):85-8.

Tanaka M, Margolis HC: Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol.* 1999;44:253-258.

Ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5):461-5.

Ten Cate JM, Duijstres PPE. The influence of fluoride in solution on tooth enamel demineralization. I. Chemical data. *Caries Res.* 1983;17:193-9.

Schamschula RG, Sugar E, Un PS, Toth K, Barmes DE, Adkins BL. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1985;13(2):104-7.

Schmidt CW, Leuschke W. Fluoride content in fingernails of individuals with and without chronic fluoride exposure. *Fluoride.* 1990;23(2):79-82.

Shellis RP, Duckworth RM. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *Int Dent J.* 1994; 44(suppl 1):263-73.

Spate VL, Morris JS, Baskett CK, Mason MM, Reams CL, Hunter D, et al. Determination of fluoride in human nails via cyclic instrumental neutron activation analysis. *J Radioanalyt Nucl Chem.* 1994;179:27-33.

Stephen KW, Creanor SL, Russell JI, Burchell CK, Huntington E, Downie CF. A 3-year old oral health dose-response study of sodium monofluorophosphate dentifrices with and without zinc citrate: anti-caries results. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1988;16(6):321-5.

Tatevossian A. Fluoride in dental plaque and its effects. J Dent Res.1990; 69(special issue): 645-52.

Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. Talanta. 1968; 15:969-74.

Toumba KJ, Curzon MEJ. Slow-release fluoride. Caries Res. 1993; 27(suppl 1):43-6.

Twetman S, Axelsson S, Dahlgren S, Holm AK, Källestål C, Lagerlöf F, et al. Caries preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. Acta Odontol Scand. 2003;61(6):347-55.

Vilhena FV, Silva HM, Peres SH, Caldana ML, Buzalaf MA. The drop technique: method to control the amount of fluoride dentifrice used by young children. Oral Health Prev Dent. 2008;6(1):61-65.

Villena RS. An investigation of the transverse technique of dentifrice application to reduce the amount of fluoride dentifrice for young children. Pediatr Dent. 2000; 22(4):312-317.

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(9):1553-7.

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

Vogel GL, Zhang Z, Chow LC, Schumacher GE. Changes in lactate and other ions in plaque and saliva after a fluoride rinse and subsequent sucrose administration. Caries Res. 2002;36(1):44-52.

Wang NJ, Gropen AM, Agaard B. Risk factors associated with fluorosis in a non-fluoridated population in Norway. Comm Dent. Oral Epidemiol.1997; 25(6):396-401.

Warren JJ, Levy SM. A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. Pediatr Dent. 1999;21(4):265-71.

Whelton HP, Ketley CE, McSweeney F, O'Mullane DM. A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. Com Den Oral Epid. 2004;32(1):1-9.

Winter GB, Holt HD, Williams BF. Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. *Int Dent J.* 1989;39(4): 227-35.

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16(2):1-153.

Whitford GM, Thomas JE, Adair SM. Fluoride in whole saliva, parotid ductal saliva and plasma in children. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(10):785-8.

Whitford GM, Sampaio FC, Arneberg P, Von Der Fehr FR. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res.* 1999;33(6):462-7.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res.* 2002;36:256-5.

Whitford GM. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2005;115(8):685-9.

Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, 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.

Winter GB, Holt HD, Williams BF. Clinical trial of a low fluoride toothpaste for young children. *Int dent J.* 1989;39(4):227-35.

Zero D. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment Strategies. *BMC Oral Health* 2006;6(Suppl1):S9.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Carta de informação ao paciente e Termo de consentimento livre e esclarecido

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

Estamos solicitando a participação de seu filho no projeto “**Estudo clínico do efeito de uma nova formulação de dentifrício líquido com pH reduzido e baixa concentração de flúor na prevenção de novas lesões cáries**”. Seu filho deverá escovar os dentes 3 vezes ao dia com o dentifrício (pasta de dente) que será distribuído por nós durante 2 anos. Além da pasta de dente, o participante e toda a família receberão também escovas dentais para a prática da escovação dentária. O material distribuído para toda a família **não terá nenhum custo**. O participante não poderá em hipótese alguma escovar os dentes com outra pasta de dente, a não ser com a pasta de dente recebida.

Durante o período do projeto serão realizados 3 exames de cárie dentária para que dessa forma possamos avaliar a progressão da cárie em seu filho. Este exame não é invasivo, (não usa nenhum aparelho que possa machucar a criança) é indolor e será realizado na escola. A participação neste projeto como citado anteriormente será totalmente gratuita e caso seja diagnosticado algum problema de saúde bucal, será encaminhado ao serviço de saúde bucal da prefeitura.

* Caso o participante da pesquisa queira apresentar reclamação ou tenha alguma dúvida, poderá entrar em contato com o pesquisador Fabiano Vilhena pelos telefones 9129-1020 ou 3941-7780 ou (14) 3235 - 8246 ou ainda entrar em contato com o Comitê de Ética e pesquisa de Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73 (sala no prédio da Biblioteca).

..... TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador do RG número _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar do projeto de pesquisa proposta. Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica ou Art. 29º do Código de Ética do Fonoaudiólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

São José dos Campos, _____ de _____ de 2006

Assinatura do responsável do
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Solicitamos a participação de seu filho no projeto “**Análise de concentração de flúor nas unhas de crianças expostas a diferentes tipos de dentifrício**”. O projeto é simples, a coleta das amostras não é invasiva e não trará risco algum ao seu filho. Como benefício pela participação, sua família está recebendo escova e creme dental. Serão colidas unhas das mãos e dos dedos maiores dos pés em duas datas distintas, separadas por um intervalo entre 15 e 30 dias. Previamente à coleta você será instruído a não cortar as unhas de seu filho por 15 dias. Depois de cortadas, as unhas deverão ser colocadas nos tubinhos plásticos que acompanham esta carta. Cada tubo já vem marcado para ser colocado as unhas das mãos e dos pés. Depois de cortadas e colocadas nos tubinhos, entregar na secretaria da escola. Novamente serão entregues mais 2 tubinhos e deverá esperar mais 15 dias sem cortar as unhas para depois cortá-las e entregá-las na secretaria da escola. Lembramos que você não terá gasto algum com a participação de seu filho nesta pesquisa que é uma extensão da pesquisa que seu filho já participa.

* Caso o participante da pesquisa queira apresentar reclamação ou tenha alguma dúvida, poderá entrar em contato com o pesquisador Fabiano Vilhena pelos telefones 9129-1020 ou 3941-7780 ou (14) 3235 - 8246 para reclamações poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e pesquisa de Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73 (sala no prédio da Biblioteca), fone: (14) 3235-8356 (Sra. Maristela)

.....

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

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica ou Art. 29º do Código de Ética do Fonoaudiólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

São José dos Campos, _____ de _____ de 2007

Assinatura do responsável do
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do pesquisador

Exame N°

Projeto de Pesquisa Doutorado ♦SJC 2006 - 2007

Nome:

Sala:

Período:

NUM FICHA	SEXO	ETNIA	ESCOLA	REGIÃO	DATA
<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; display: inline-block; margin: 2px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 20px; margin: 2px;"></div>

Condição de Saúde Bucal

Arco Superior

Arco Inferior

APÊNDICE D– Folheto de informação sobre o uso do material

Nome do escolar:

Senhores Pais,

Peço à gentileza que leiam atentamente e sigam estas orientações no uso deste material para escovação dos dentes.

- 1. Este material deverá ser usado por toda a família;**
- 2. Não utilizar outra pasta de dente diferente desta fornecida pela pesquisa;**
- 3. Escove os dentes 2 a 3 vezes ao dia (Crianças e Adultos);**
- 4. Os tubos vazios deverão ser devolvidos na escola e serão trocados por tubos cheios;**
- 5. Utilize uma pequena quantidade para a escovação dos dentes das crianças (1 gota).**

***Qualquer dúvida ou caso seu filho(a) mude de escola ou de endereço, favor avisar nos telefones- 3941-7780 ou 91291020.**

Dr. Fabiano Vilhena

APÊNDICE E – Folheto de instrução sobre a coleta do Biofilme dentário

Nome do escolar:

Senhores Pais ou responsáveis,

Peço à gentileza que leiam atentamente e sigam as orientações neste bilhete. **Na próxima terça– feira dia 13 de fevereiro** seu filho(a) irá participar de um novo exame sobre a pesquisa da pasta de dente que sua família está recebendo.

Neste exame **bem simples** iremos coletar com uma espátula a placa bacteriana (bactérias e resto de alimentos) que ficam grudados nos dentes. Para isto precisamos que os pais e ou responsáveis sigam as orientações abaixo:

1- Na segunda - feira dia 12 de fevereiro, após a ultima refeição, os pais ou responsáveis deverão escovar os dentes do seu filho(a) **APENAS NA PARTE DE CIMA DOS DENTES** conforme o desenho abaixo:

OBS. Não pode escovar a parte lateral dos dentes, pois é na lateral que a placa bacteriana está grudada.

2 - Na terça feira dia 13 de fevereiro, dia do exame, seu filho(a) não poderá comer nada de manhã em casa, apenas poderá beber água, pois a pesquisa oferecerá lanche para a criança na escola após o exame.

3 – Na sexta, dia 9 de fevereiro a partir das 11 h., o **Dr. Fabiano** estará na escola para tirar qualquer dúvida, ou ainda os pais poderão ligar para o **tel. 3941- 7780 ou no telefone celular - 9129-1020.**

APÊNDICE F – Artigo submetido ao periódico Journal of Dental Research**Low-Fluoride Acidic Dentifrice: a Randomized Clinical Trial**

F.V. Vilhena¹, K.P.K. Olympio², J.R.P.Lauris³, A.C.B. Delbem⁴, M.A.R. Buzalaf^{1*}

¹Department of Biological Sciences and ³Department of Orthodontics, Pediatric Dentistry and Collective Health, Bauru Dental School, University of São Paulo – Bauru, SP, Brazil; ²Department of Environmental Health, Public Health School, University of São Paulo - São Paulo, Brazil; ⁴Department of Pediatric Dentistry, Araçatuba Dental School, São Paulo State University – Araçatuba, SP, Brazil, *corresponding author: Al. Octávio Pinheiro Brizolla, 9-75, Bauru – SP 17012-901, Brazil; Tel: #55-14-3235-8346; Fax: #55-14-3227-1486; e-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Short title: Low-fluoride acidic dentifrice

Key words: low-fluoride acidic dentifrices, dental fluorosis, dental caries, children

Number of words in the abstract: 150

Number of words in the abstract and the text: 2,535

Number of tables and figures: 2

Number of cited references: 30

This study was based on a thesis to be submitted to Bauru Dental School, University of São Paulo (Brazil), in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Oral Biology.

ABSTRACT

Low-fluoride dentifrices have been suggested as alternative to reduce dental fluorosis risk, but there is no consensus regarding their clinical effectiveness, which has been suggested to be increased when their pH is acidic. This randomized clinical trial evaluated the anticaries effectiveness of a low-fluoride acidic liquid dentifrice (LFALD). Four-year-old children (n=1,402) were randomly allocated to 4 groups differing according to the type of dentifrice used during 20 months: G1) liquid dentifrice (1,100 ppmF, pH 4.5, n=345), G2) liquid dentifrice (1,100 ppmF, pH 7.0, n=343), G3) liquid dentifrice (550 ppmF, pH 4.5, n=354), G4) toothpaste (1,100 ppmF, pH 7.0, n=360). At baseline and after 20 months, clinical examinations were conducted (dmfs-index). No significant differences were found among the groups (ANOVA, $p < 0.05$). The results showed that LFALD presents similar anticaries effectiveness than conventional 1,100 ppmF toothpaste and seems to be a good choice to prevent caries and avoid fluorosis in young children.

INTRODUCTION

Measures to reduce the fluoride (F) intake by children are necessary to prevent dental fluorosis (Guha -Chowdhury *et al.*, 1996, Warren and Levy, 1999, Mascarenhas, 2000, Franzman *et al.*, 2006, Almeida *et al.*, 2007, Do and Spencer, 2007). This effort must be carried out without reducing the anticaries effectiveness of the products used for dental caries control. In order to decrease the F intake by children at the age of risk to dental fluorosis, the use of low-F dentifrices has been suggested. However, there is still no consensus on their anticaries effectiveness (Warren and Levy, 1999; Ammari *et al.*, 2003).

It has been shown that pH considerably influences F diffusion in enamel. Lowering the pH also enhances the tendency for calcium fluoride (CaF₂) formation on apatite substrates (Petersson *et al.*, 1989). Taking this into account, the anticaries effectiveness of acidified dentifrices with low-F content was tested and shown to be improved *in vitro* (Brighenti *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2007) and *in situ* (Nobre-dos-Santos *et al.*, 2007). The pH reduction was also shown to increase whole saliva F concentrations, without altering the F bioavailability (Olympio *et al.*, 2007).

Another possible strategy to reduce the F intake from dentifrices is the reduction of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush. The use of a pea-size amount of dentifrice has been proposed, what can be easily achieved using the “transverse” technique (Villena, 2000). More recently, the use of the “drop” technique to apply a “liquid” dentifrice to the toothbrush has been shown to significantly reduce and at the same time easily standardize the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush, when compared to the use of a toothpaste (Vilhena *et al.*, 2008).

In order to combine the available strategies to reduce the F intake by young children, a low-F acidic liquid experimental dentifrice was developed and shown to be effective

to increase the F uptake in dental plaque, without affecting nails F concentrations (Buzalaf *et al.*, 2008). It must be highlighted that the term “liquid” refers to a product with consistency of gel dentifrices, but with lower viscosity. This product was tested in the present randomized clinical trial, in effort to contribute with the dilemma – to prevent dental fluorosis without reducing the anticaries protection of the dentifrice. To accomplish this aim, the caries increment was measured in 4-year-old children that had been using a low-F acidic liquid dentifrice for 20 months. The effects of reducing the F concentrations and pH on the anticaries effectiveness of the dentifrice were assessed by comparison with dentifrices of regular F content and neutral pH.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the IRB of Bauru Dental School (Protocol 146/2005).

Experimental Design

This randomized, single blind clinical trial involved 4-year-old children that attended all primary schools of São José dos Campos, São Paulo, Brazil (0.6-0.8 ppm F in the drinking water). The inclusion criteria were: to have dmfs>0, signature of the informed consent by the parents or guardians, not to use orthodontic brackets and have not participated in other studies in the previous 3 months. For the random allocation to the groups, the classrooms were considered as units of draw, in order that only one type of dentifrice was distributed in each classroom. This planning would facilitate the control of delivery and reposition of the dentifrices for the volunteers by the classroom's teacher, as well as toothbrushing at school. The assignment of the groups was done with the application of an algorithm previously established. The software Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) generated random numbers ranging from 0 to 1. The volunteers were assigned to the groups as follows:

$G1 \leq 0.25$; $0.25 < G2 \leq 0.50$; $0.5 < G3 \leq 0.75$; $0.75 < G4 \leq 1$. Despite the present study started with more than 1,000 participants and the random allocation guaranteed an almost homogeneous distribution (Cummings *et al.*, 2001), we chose also to balance the treatment groups for socioeconomic status (SES). The Brazil Economic Classification Criterion (BECC) was adopted (ABEP, 2003). The basic concept of this classification is to economically discriminate people attributing weights to goods of comfort such as television, radio, bathroom, car, housekeeper, vacuum cleaner, wash machine, etc. All primary schools were selected and they were located in different socioeconomic sectors of the city, thus allowing the sample to be representative of the socioeconomic reality of the city (Prefeitura Municipal de São José dos Campos, 2004). Thus, four groups were composed differing according to the type of dentifrice used throughout the study: G1—Experimental liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 4.5) G2—Experimental liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 7.0); G3—Experimental liquid dentifrice (550 ppmF, NaF, pH 4.5); G4—Control toothpaste (1,100 ppmF, NaF, pH 7.0; Sorriso Fresh, Colgate Palmolive, São Paulo, Brazil).

The sample size was calculated based on a previous caries-prevention trial, which reported a mean ($\pm$ sd) annual caries increment (dmfs) of 2.12 ± 2.46 for a Brazilian city (Silva *et al.*, 2001). Based on that, the inclusion of 350 subjects per treatment was expected to reach a 15% net increment difference and 80% power ($\alpha=0.05$) (Kingman, 1977). These calculations were carried out expecting a 10% dropout rate per year.

The study was blinded only for the examiner, since the commercial toothpaste was maintained in its original package.

Study Regimen

Schools directors, teachers, oral hygienists and children's parents were instructed

about the study regimen. Familial kits containing 5 toothbrushes, 6 dentifrice tubes (120 g each) and 1 leaflet about oral hygiene care were distributed for all participants every 4 months. The parents were oriented to brush schoolchildren's teeth at least twice a day. The amount of dentifrice to be used varied according to the type of dentifrice. The liquid dentifrices (G1, G2 and G3) were applied to the toothbrushes using the "drop" technique (Vilhena *et al.*, 2008), while the commercial toothpaste (G4) was applied using the transverse technique (Villena *et al.*, 2000). The kits were supplied to be used by the whole family in order to facilitate compliance with the study protocol.

Caries Registration

For the clinical examinations, dmfs index (decayed, missed, filled surface index) was used, following the criteria established by the World Health Organization (WHO) and adopted by the Brazilian Health Ministry (Brazilian Health Ministry, 2003; Do and Spencer, 2007). Two experienced examiners evaluated the children's teeth at baseline and after 20 months of experimental dentifrices use. The intraexaminer and interexaminers reliability was measured using kappa on a surface basis. The intraexaminer agreement was tested by duplication of 107 examinations for the examiner 1 ($k=0.91$) and 127 for the examiner 2 ($k=0.95$). The interexaminer reliability was also evaluated. Twenty children were examined twice by both dentists in each survey. The related Kappa values were 0.85 and 0.87 for the first and second examinations, respectively.

Statistical Methods

For statistical analysis, Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used. Data did not pass normality (Kolmogorov-Smirnov test) and were

then analyzed by Kruskal-Wallis tests. The significance level was set at 5%.

RESULTS

Among the 4,300 children attending primary schools of São José dos Campos (57 schools, 222 classrooms), 1,634 children fulfilled the inclusion criteria and received the informed consent document for their parents or guardians to sign. Signed informed consents were obtained from 1,402 schoolchildren, which were randomly allocated to the groups and started using the respective dentifrices. The number of volunteers examined at baseline (number of classrooms) was 345 (55), 343 (52), 354 (59) and 360 (56) for G1, G2, G3 and G4, respectively (Fig. 1).

Before the beginning of the study and after 20 months, the caries status (dmfs index) was assessed. The dmfs index means ($\pm$ SD) found at baseline examinations was 4.93 ± 5.64 , 4.63 ± 5.37 , 5.10 ± 5.47 and 5.14 ± 5.10 for G1, G2, G3 and G4, respectively. There was no significant difference among the groups ($p=0.952$).

After 20 months, the children who concluded the study (1,053) were examined again. The number of dropouts was 74, 81, 104 and 90, for G1, G2, G3 and G4, respectively. Thus, the number of volunteers examined was 271, 262, 250 and 270 for G1, G2, G3 and G4, respectively (Figure 1). Table 1 shows the dmfs index means ($\pm$ SD) at baseline and after 20 months for the subjects that remained in the whole study. This table also shows the dmfs increment for each group. The values found for all the variables tested were very similar for all the groups and no significant differences were detected among them ($p=0.686$ and $p=0.371$ for the dmfs at 20 months and increment, respectively).

DISCUSSION

This is the first longitudinal clinical trial that evaluated caries progression with the use

of low-F acidic dentifrices by pre-school children that had past caries experience and lived in a fluoridated area. Our study demonstrated that both strategies employed to diminish the F intake from dentifrice by young children, i.e., the reduction of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush (“drop technique”) and the reduction of the F concentration of the dentifrice (550 ppm), did not reduce its anticaries effectiveness, since there were not significant differences in caries progression among the tested dentifrices. At least two factors related to the characteristics of the experimental low-F formulation tested in the present study may have acted in concert to increase its anticaries effectiveness: pH and viscosity reduction.

The effect of the reduction of the dentifrice pH was expected, since previous *in vitro* (Brighenti *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2007) and *in situ* (Nobre-dos-Santos *et al.*, 2007) studies have shown increased anticaries protection of acidic dentifrices compared to their regular counterparts. This may be due to their increased ability to form CaF_2 on apatite substrates (Petersson *et al.*, 1989). Additionally, a recent cross-sectional study conducted with a subsample of the children enrolled in the present clinical trial showed that the reduction of the dentifrice pH (from 7.0 to 4.5) caused a 2-fold increase in plaque F concentrations one hour after toothbrushing (Buzalaf *et al.*, 2008). This is consistent with a report by our group showing that salivary F concentrations in the short-time were twice higher after the use of a dentifrice with pH 5.5 compared to its neutral counterpart (Olympio *et al.*, 2007). Thus, it is possible that the higher salivary F levels present after the use of acidic dentifrices may have reflected in increased plaque F concentrations. On the other hand, F uptake in dental plaque has been reported to be strongly dependent on plaque Ca concentrations (Pessan *et al.*, 2008; Rolla and Bowen, 1977; Whitford *et al.*, 2005; Whitford *et al.*, 2002). There is some evidence that enamel contributes to plaque Ca levels upon

exposure to sucrose ($4.5 < \text{pH} < 5.5$) (Tanaka and Margolis, 1999). Thus, it is possible that the use of acidic dentifrices promotes increased Ca plaque levels, which in turn would allow a higher F retention in plaque.

The lower viscosity of the experimental low-F formulation may have also played a role on its anticaries potential. It was recently observed that the liquid dentifrices provided significantly higher plaque F concentrations when compared to the commercial toothpaste (Buzalaf *et al.*, 2008), since the lower viscosity of the liquid dentifrice may turn easier F diffusion into dental plaque (Silva *et al.*, 2004).

It must be emphasized, however, that the present study was conducted in an optimally fluoridated area. It is possible that the low-F acidic dentifrice would not achieve similar effectiveness as the control toothpaste if the study had been conducted in non-fluoridated areas or areas with low exposure to F from other sources. Recently, caries progression was evaluated in groups of 2- to 4-year-old children with and without active caries lesions which had used 500- or 1,100 ugF/g dentifrices for 1 year. The anticaries effectiveness of the low-F dentifrice was similar to its regular counterpart when used by caries-inactive children, but not when used by children with active caries lesions (Lima *et al.*, 2008). However, these dentifrices had a neutral pH. On the other hand, earlier clinical studies, carried out during the 1960s using acidified toothpastes (Brudevold and Chilton, 1966; Slack *et al.*, 1971) did not show advantages on their use when compared to neutral toothpastes. Nevertheless, these studies were carried out in a time when there were few available F sources. Thus, additional clinical trials of low-F acidic dentifrices in areas with low exposure to F from other sources are necessary to provide an evidence-based conclusion on this matter.

Despite not accessed in the present study, the use of the experimental low-F acidic

dentifrice may have also reduced F intake from dentifrice, thus reducing the risk of dental fluorosis. It was recently shown that the use of the 550 ppm F pH 4.5 liquid dentifrice significantly reduces nails F concentrations of the children when compared to 1,100 ppm F dentifrices. Moreover, the use of liquid dentifrices also led to significantly lower nails F concentrations when compared to commercial toothpaste with the same F concentration (Buzalaf *et al.*, 2008). This may be due to the fact that the use of “liquid” dentifrices through the “drop” technique significantly reduces and makes easier the standardization of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush, when compared to toothpastes (Vilhena *et al.*, 2008). According to Vilhena *et al.* (2008), the mean ($\pm$ SD) amount of liquid dentifrice applied onto the toothbrush by 4-8-year-old children when using the drop technique is 0.15 ± 0.06 g, while it is 0.41 ± 0.20 g when the children apply a toothpaste using the “transverse” technique (Villena *et al.*, 2000). For this reason, we did not include a group with 550 ppm F pH 7.0 liquid dentifrice in the present study. Since it was conducted for 20 months with children having history of caries, there was concern that the simultaneous reduction of F concentration and amount of dentifrice loaded onto the toothbrush (“drop” technique), in the absence of a factor that could increase its anti-caries efficacy, such as the pH reduction, could led to higher caries incidence in the studied population.

In conclusion, our results provide evidence that the low-F (550 ppm F) acidic liquid dentifrice has the same anticaries effectiveness as the conventional 1,100 ppm F neutral toothpaste and seems to be a good choice to prevent dental caries and avoid dental fluorosis in young children.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the valuable collaboration of all directors, teachers, schoolchildren and their families involved in this investigation. This research was supported by FAPESP (Grants 05/03975-6 and 05/04090-8).

REFERENCES

Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa - ABEP (2003). Critério de Classificação Econômica Brasil. [Available at www.abep.org. Accessed in September 2008].

Almeida BS, Cardoso VS, Buzalaf, MAR (2007). Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1-3-year-old Brazilian children. *Comm Dent Oral Epidemiol* 35(1):53-63.

Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC (2007). In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 41(4):263-7.

Ammari AB, Bloch-Zupan A, Ashley PF (2003). Systematic review of studies comparing the anti-caries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride or less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. *Caries Res* 37(2):85-92.

Brazilian Health Ministry (2003). Secretaria de Políticas Especiais de Saúde. Área Técnica de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal. Available in <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/cnsb/vigilancia.php> (23/07/2008).

Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT (2006). In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 40(3):239-44.

Brudevold F, Chilton NW (1966). Comparative study of a fluoride dentifrice containing soluble fosfates and a calcium-free abrasive: second year report. *J Am Dent Assoc* 72(4):889-94.

Buzalaf MAR, Vilhena FV, Iano FG, Grizzo L, Pessan JP (2008). Influence of dentifrice pH on plaque and nails fluoride concentrations. *J Dent Res* 87 (Spec Iss B): Abs 1584.

Cummings SR, Grady D, Hulley SB (2001). Designing an experiment: clinical trials I. In: Designing clinical research. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB, editors. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 148-149.

Do LG, Spencer AJ (2007). Risk-benefit balance in the use of fluoride among young Children. *J Dent Res* 86(8):723-8.

Franzman MR, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B (2006). Fluoride dentifrice ingestion and fluorosis of the permanent incisors. *J Am Dent Assoc* 137(5):645-52.

Guha-Chowdhury N, Drummond BK, Smillie AC (1996). Total Fluoride Intake in Children Aged 3 to 4 years - A Longitudinal Study. *J Dent Res* 75(7):1451-7.

Kingman JF (1977). The population structure associated with the Ewens sampling formula. *Theor Popul Biol* 11(2):274-83.

Lima TJ, Ribeiro CC, Tenuta LM, Cury JA (2008). Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. *Caries Res* 42(1):46-50.

Mascarenhas AK (2000). Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatric Dent* 22(4):269-77.

Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel-Cury AA, Cury JA (2007). In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. *J Oral Sci* 49(2):147-54.

Olympio KP, Bardal PA, Cardoso VE, Oliveira RC, Bastos JR, Buzalaf MA (2007). Low-fluoride dentifrices with reduced pH: Fluoride concentration in whole saliva and bioavailability. *Caries Res* 41(5):365-370.

Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA (2008). Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *J Dent Res* 87(8):461-465.

Petersson LG, Loding A, Hakeberg M, Koch G (1989). Fluorine profiles in human enamel after in vitro treatment with dentifrices of different compositions and acidities. *Swed Dent J* 13(5):177-183.

Prefeitura Municipal de São José dos Campos (2004). Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente. Atlas das Condições de Vida em São José dos Campos. [Available at <http://www.sjc.sp.gov.br/spu/atlas.asp>. Accessed in September 2008].

Rolla G, Bowen WH (1977). Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. *Scand J Dent Res* 85(2):149-151.

Silva MF, Melo EV, Stewart B, De Vizio W, Sintes JL, Petrone ME et al. (2001). The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in Brazil. *Am J Dent* 14(special issue):19A-23A.

SILVA MF, Giniger MS, Zhang YP, DeVizio W (2004). The effect of a triclosan/copolymers/fluoride liquid dentifrice on interproximal enamel remineralization and fluoride uptake. *J Am Dent Assoc* 135, 1023 – 9.

Slack GL, Bulman JS, Osborn JF (1971). Clinical testing of fluoride and non-fluoride

containing dentifrices in Hounslow school children. *Br Dent J* 130(4):154-8.

Tanaka M, Margolis HC (1999). Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol* 44(3):253-258.

Vilhena FV, Silva HM, Peres SH, Caldana Mde L, Buzalaf MA (2008) The drop technique: method to control the amount of fluoride dentifrice used by young children. *Oral Health Prev Dent* 6(1):61-65.

Villena RS (2000). An investigation of the transverse technique of dentifrice application to reduce the amount of fluoride dentifrice for young children. *Pediatr Dent* 22(4):312-317.

Warren JJ, Levy SM (1999). A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. *Pediatr Dent* 21(4):265-71.

Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL (2005). Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: Effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res* 39(2):100-107.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM (2002). Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* 36(4):256-265.

Figure 1. Experimental design of the study

Table 1. dmfs index means ($\pm$ SD) at baseline, after 20 months and increment for each group for the children that completed the study

Groups* (n)	dmfs at baseline	dmfs after 20 months	dmfs increment
G1 (271)	5.07 ($\pm$ 5.11)	7.13 ($\pm$ 6.53)	2.06 ($\pm$ 2.38)
G2 (262)	4.80 ($\pm$ 5.00)	6.88 ($\pm$ 6.78)	2.08 ($\pm$ 2.87)
G3 (250)	5.24 ($\pm$ 5.37)	7.29 ($\pm$ 7.27)	2.05 ($\pm$ 2.79)
G4 (270)	5.05 ($\pm$ 4.89)	7.13 ($\pm$ 6.35)	2.08 ($\pm$ 2.34)

*G1–Experimental liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 4.5); G2–Experimental liquid dentifrice (1,100 ppmF, NaF, pH 7.0); G3–Experimental liquid dentifrice (550 ppmF, NaF, pH 4.5); G4–Control toothpaste (1,100 ppmF, NaF, pH 7.0; Sorriso Fresh, Colgate™). No significant differences were detected among the groups (Kruskall Wallis, $p > 0.05$)

APÊNDICE G – Artigo submetido ao periódico Caries Research

Plaque and nails fluoride concentrations after the use of low fluoride acidic dentifrices by young children

M.A.R. Buzalaf¹

F. V. Vilhena¹

F. G. Iano¹

L. Grizzo¹

J. P. Pessan²

F.C. Sampaio¹

R.C. Oliveira¹

¹ Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Brazil.

² Department of Pediatric Dentistry and Public Health, Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Brazil.

Short Title: Low Fluoride Acidic Dentifrices: Plaque and nails Fluoride

Key words: fluoride, dentifrices, plaque, nails.

Corresponding author

Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Department of Biological Sciences

Bauru Dental School

University of São Paulo

Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru-SP, Brazil, 17012-901

Phone: 55-14-32358346

Email: mbuzalaf@fob.usp.br

Declaration of interests

The authors declare that there are no conflicts of interests that could impair the publication of the present manuscript.

Abstract

Aims: This study evaluated the influence of dentifrice pH and fluoride concentration ([F]) on fluoride (F) uptake in dental plaque and nails. **Methods:** Eighty-four 5-6-year-old children were randomly allocated into four groups, according to the type of dentifrice they had been using for one year: A, experimental liquid dentifrice (ELD), 1,100 ppmF, pH 7.0; B, ELD, 1,100 ppmF, pH 4.5; C, ELD, 550 ppmF, pH 4.5; D, commercial toothpaste, 1,100 ppmF, pH 7.0. The ELD and toothpaste were loaded onto the toothbrush using the “drop” and “transverse” techniques, respectively. Nails were clipped in two separate occasions. Plaque samples were collected 1hr after the last use of the respective dentifrices. Plaque and nails [F]s were analyzed with the electrode, after HMDS-facilitated diffusion. Plaque data were tested by ANOVA and Tukey's test, while nails data were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA and Bonferroni's test ($p < 0.05$). **Results:** Mean ($\pm$ se, unit mmol/Kg dry weight) plaque [F]s were $1.667 \pm 0.410a$, $3.091 \pm 0.984a$, $1.448 \pm 0.303a$ and $0.455 \pm 0.103b$ for A, B, C and D, respectively. The highest [F]s were found for D that significantly differed from the ELDs, except for A (toenails only). The lowest [F]s were found for C, which significantly differed from all the other dentifrices. **Conclusion:** The reduction of the dentifrice pH increases the F uptake in dental plaque, does not affect nails [F]s and seems to be a good alternative to caries control in young children.

Fluoride (F) dentifrices are the most widely used delivery method of F in the world [Rolla et al., 1991] and have substantially contributed to the decline in the prevalence of dental caries observed in the developed countries over the last decades [Bratthall et al., 1996]. Concomitantly, an increase in dental fluorosis prevalence has been documented, to which F dentifrices have been regarded as contributors [Mascarenhas, 2000; Warren and Levy, 1999]. This is due to the fact that young children usually ingest high amounts of dentifrice during toothbrushing [de Almeida et al., 2007; Lima and Cury, 2001].

One possible alternative to reduce the amount of F intake from dentifrice by young children would be the use of low F dentifrices. However, it is still not known if the anti-caries efficacy of the 500 ppm F dentifrices is equivalent to that presented by the regular 1,000 ppm F ones [Ammari et al., 2003]. It has been shown that pH considerably influences F diffusion in enamel. Lowering the pH probably enhances the tendency for calcium fluoride (CaF_2) formation on apatite substrates [Petersson et al., 1989]. Following this rationale, the reduction of the dentifrice pH to 5.5 [Brighenti et al., 2006] or 4.5 [Alves et al., 2007] has been reported to significantly increase the effectiveness of low F (500 ppm) dentifrices with respect to the inhibition of mineral loss of enamel blocks *in vitro*. In addition, the reduction of the dentifrice pH has also led to increased salivary F concentrations after toothbrushing, without altering the bioavailability of F [Olympio et al., 2007].

Another strategy that has been proposed to diminish the F intake from dentifrice is the reduction of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush [Lima and Cury, 2001; Warren and Levy, 1999]. The use of a pea-size amount of dentifrice has been proposed, what can be easily achieved using the “transverse” technique [Villena, 2000]. More recently, the use of the “drop” technique to apply a “liquid” dentifrice to the toothbrush has been shown to significantly reduce and at the same time easily standardize the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush, when compared to the use of a toothpaste [Vilhena et al., 2008].

In order to combine the available strategies to reduce the F intake by young children, a low F acidic liquid experimental dentifrice was developed and its anticaries efficacy is currently under evaluation by a randomized clinical trial. It must be highlighted that the term “liquid” refers to a product with consistency of gel, like the traditional gel dentifrices, but with lower viscosity. The present study takes advantage of the mentioned undergoing study to evaluate the F concentrations in dental plaque and nails of a subsample of the children enrolled in the clinical trial, in order to provide new insights on the mechanism of action of low F dentifrices, as well as on the F bioavailability from these formulations.

Materials and Methods

Part I: Fluoride concentrations in dental plaque

The protocol of the present study was fully approved by the Institutional Review Board of Bauru Dental School, University of São Paulo (Proc. 146/2005 and 126/2006). Volunteers that participated were at the moment taking part of a randomized clinical trial to evaluate the anti-caries efficacy of a low F acidic liquid dentifrice. They were chosen among 1,401 5-6-year-old children previously selected among 4,300 children (PODERIA DELETAR) attending 57 public primary schools in São José dos Campos, state of São Paulo, Brazil. The inclusion criteria to participate in the randomized clinical trial were: age ≥ 4 years; ceo-d > 0 ; do not use orthodontic appliances; signature of the informed consent by the parents. From the children participating in the randomized clinical trial, a convenience sample of 84 children who attended 3 schools were randomly elected to participate in the present study. They were randomly divided (block allocation) divided into 4 groups (n=21 per group) [Pessan et al., 2008], according to the type of dentifrice they had been using for 1 year:

- a) experimental liquid dentifrice, 1,100 ppm F (as NaF), pH 7.0;
- b) experimental liquid dentifrice, 1,100 ppm F (as NaF), pH 4.5;
- c) experimental liquid dentifrice, 550 ppm F, pH 4.5;
- d) commercial toothpaste, 1,100 ppm F, pH 7.0 (Sorriso Fresh, Colgate Palmolive, São Paulo, Brazil).

According to the experimental design of the randomized clinical trial, the above-mentioned dentifrices as well as toothbrushes were freely provided to be used by the children and their families 3 times per day throughout the study. Children enrolled in the commercial toothpaste group were instructed to apply the commercial toothpaste onto the toothbrush using the transverse technique [Villena, 2000], while those participating in the experimental groups were instructed to use the “drop” technique [Vilhena et al., 2008]. It must be emphasized that the formulations of the experimental dentifrices were identical, except for the F concentrations and pH values.

The volunteers were instructed to, on the night before plaque collection, brush only the occlusal surfaces of the teeth to allow plaque accumulation. On the next morning, they refrained from eating or drinking anything except water. They then brushed the occlusal surfaces with the respective dentifrices for 1.0 min and rinsed as usual. Plaque was then collected from the whole mouth in pre-weighed “eppendorf” tubes using a curette. Immediately before plaque collections, children were asked to swallow and keep their mouths open until plaque from all sites had been collected.

The plaque samples were dried for 2 hr at 95°C and weighed to the nearest 1 μ g. Plaque fluoride concentrations were determined after overnight hexamethyldisiloxane (HMDS)-facilitated diffusion [Taves, 1968] as modified by [Whitford, 1996] using a model

9409 F electrode (Orion) and a miniature calomel reference electrode (Accumet, #13-620-79), coupled to a potentiometer (model EA 940; Orion). During diffusion, which was conducted at room temperature, the solutions in the non-wettable Petri dishes (Falcon No. 1007) were gently swirled on a rotatory shaker. F standards (0.00475, 0.0095, 0.019, 0.095, 0.190 and 0.95 $\mu\text{g F}$) were prepared by serial dilution of a stock solution of 0.1 M F (Orion) in triplicate and diffused in the same manner as the samples. All samples were analyzed in duplicates. The standard curve had a coefficient of determination ≥ 0.98 .

For analysis, the software GraphPad InStat for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA) was used. The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked. Data passed the normality test but the differences among the SDs were significant. After log transformation, ANOVA and Tukey *post hoc* tests were used. The significance level was set at 5%.

Part II: Fluoride concentrations in nails

Among the children participating in the randomized clinical trial, a convenience sample of 60 children was selected and divided into 4 groups according to the type of dentifrice used ($n=15$ per group) [Levy et al., 2004], as described in Part I.

The parents were instructed to let the children's nails grow for 15 days before clipping. Samples were collected from all fingernails and from big toenails [Buzalaf et al., 2006]. Samples from fingernails were pooled and stored in a labeled vial. Samples from both big toenails were pooled and stored in another labeled vial. This procedure was repeated after 15 days. Thus, 4 samples (2 from fingernails and 2 from toenails) for each child were collected. Each nail clipping was cleaned with deionized water using an interdental brush, sonicated in deionized water for 10 minutes, dried at $60\pm 5^\circ\text{C}$ and weighed. Fluoride analysis in nails was conducted as described in Part I. Whenever the weight of the pooled samples was higher than 20 mg, analysis were conducted in duplicates.

For statistical analysis, Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used. Data passed normality, but the differences among the SDs were significant. Thus, data were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA after logarithmic transformation. The criteria used were type of dentifrice and site of nails collection (fingernails or toenails). Bonferroni's test was used as the *post-hoc* test for ANOVA. The significance level was set as 5%.

Results

Part I: Fluoride concentrations in dental plaque

Table shows mean plaque fluoride concentrations and 95% confidence intervals ($\pm\text{se}$, unit mmol/Kg dry weight) found 1 hr after brushing with the different dentifrices. ANOVA

detected significant differences among the groups ($F=7.058$, $p=0.0003$). Tukey's test revealed that the commercial dentifrice had plaque F concentrations significantly lower when compared to the experimental dentifrices. The highest mean plaque F concentration (3.091 ± 0.986 mg/Kg) was found when the experimental 1,100 ppm F/pH 4.5 dentifrice was used ($p<0.01$). Despite the mean value obtained for this dentifrice was twice as high as that observed for the experimental 1,100 ppm F/pH 7.0 and 550 ppm F/pH 4.5 dentifrices, no significant differences were detected among the experimental dentifrices. Mean plaque fluoride concentrations 1 hr after brushing with the 1,100 ppm F/pH 7.0 and 550 ppm F/pH 4.5 experimental dentifrices were quite similar.

Part II: Fluoride concentrations in nails

It was possible to see a clear dose response effect of the dentifrices both on fingernails and toenails F concentrations (Figure). The two-way repeated-measures ANOVA detected a significant difference among the dentifrices used ($F=45.06$ $p<0.0001$). Fingernail F concentrations were significantly higher when compared to toenails F concentrations ($F=58.58$, $p<0.0001$). There was no interaction between the two criteria ($F=0.137$, $p=0.9375$). The profile observed for fingernails was very similar to that seen for toenails. The highest F concentrations were found for the toothpaste that significantly differed from the experimental liquid dentifrices, except for the 1,100 ppm F dentifrice pH 7.0 (for toenails only). The lowest F concentrations in nails were found for the 550 ppm F pH 4.5 liquid dentifrice, which significantly differed from all the other dentifrices. The experimental 1,100 ppm F dentifrices led to intermediary F concentrations in nails and did not significantly differ from each other.

Discussion

A combination of dentifrices with different F concentrations, distinct pH values and consistencies was employed in the present study, in order to provide new insights on the anti-caries effectiveness and safety of low F acidic dentifrices. Since the volunteers involved are taking part of a longitudinal study and had been using the dentifrices for 1 year, as well as the fact that the dentifrices were provided for use by the whole family, compliance problems related to our study were minimized.

F uptake in dental plaque, as assessed by our design, seems to have been influenced by 3 factors: dentifrice F concentration, pH and consistency. For F concentration, this influence becomes clear when the 550 ppm F liquid acidic dentifrice is compared to the 1,100 ppm F liquid acidic dentifrice. A dose-response relationship was clearly seen, i.e., plaque F concentrations were approximately twice higher when the 1,100 ppm F dentifrice was used when compared to its low F counterpart (Table), which is an expected finding [Duckworth and Morgan, 1991].

The effect of pH on plaque F levels is easily seen when the 1,100 ppm F neutral liquid dentifrice is compared to its 1,100 ppm F liquid acidic counterpart. The reduction of the pH (from 7.0 to 4.5) caused a 2-fold increase in plaque F concentrations. This is consistent with a recent report by our group showing that salivary F concentrations in the short-time were twice higher after the use of a dentifrice with pH 5.5 when compared to its neutral counterpart. In addition, they were similar to those promoted by the use of a gold standard dentifrice (Crest, 1,100 ppm F, pH 6.8) [Olympio et al., 2007]. Thus, it is possible that the higher salivary F levels present after the use of acidic dentifrices may have reflected in increased plaque F concentrations. On the other hand, F uptake in dental plaque has been strongly dependent on plaque Ca concentrations [Pessan et al., 2008; Rolla and Bowen, 1977; Whitford et al., 2005; Whitford et al., 2002]. There is some evidence that enamel contributes to plaque Ca levels upon exposure to sucrose ($4.5 < \text{pH} < 5.5$) [Tanaka and Margolis, 1999] and the same rationale could be applied for what happened in our study after the use of the acidic dentifrices, which had a pH of 4.5. Increased Ca plaque levels would allow a higher F retention in plaque. Thus, another source of increased plaque F levels after the use of acidic dentifrices seems to be enamel.

As for the effect of the dentifrice consistency on plaque F levels, it was observed that the liquid dentifrices provided significantly higher plaque F concentrations when compared to the commercial toothpaste. This may be due to the fact that the lower viscosity of the liquid dentifrice may have turned easier the F diffusion into dental plaque, which has been suggested before [Silva et al., 2001]. In addition, considering that brushing episodes are usually short, the use of a dentifrice with a lower viscosity could increase F uptake by oral reservoirs.

On the other hand, gastric F absorption is a pH-dependent event, with greater absorption at lower stomach pH [Whitford and Pashley, 1984], because F crosses the gastric mucosa predominantly as the undissociated weak acid HF rather than as the F^- ion. It is also suggested that the rate and magnitude of the increase in plasma F concentration following an oral dose are functions of gastric acidity, resulting in greater potential toxicity at low pH. Due to this, concern has been raised regarding the possible increased bioavailability of F when ingested from acidic dentifrices. A recent study where the F bioavailability after ingesting F from acidic or neutral dentifrices was assessed by measuring urinary F excretion rates and the area under the curve of ductal saliva F concentration versus time, has shown that this is not the case [Olympio et al., 2007]. In the present study, the results obtained by [Olympio et al., 2007] were confirmed using nails F concentrations as response variables, since nails have been used as biomarkers of chronic [Levy et al., 2004; Whitford et al., 1999] and subchronic [Buzalaf et al., 2006; Correa Rodrigues et al., 2004; Whitford et al., 1999] F intake. Our results confirm that the dentifrice pH does not seem to influence the

bioavailability of F, since the nails F concentrations when the experimental liquid 1,100 ppm F dentifrices with pH values of 4.5 or 7.0 were used were nearly identical (Figure).

Fingernails were found to have higher F concentrations when compared to toenails, but the profiles found for both sites of collection were quite similar (Figure), which is consistent with prior reports [Levy et al., 2004; Whitford et al., 1999]. The analysis of nails F concentrations data (Figure) suggests that the combination of strategies to reduce F intake from dentifrice, i.e., (a) the reduction of the F concentration of the dentifrice and (b) of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush through the “drop” technique [Vilhena et al., 2008], was effective. The effect of the first strategy can be easily recognized when the data found for the acidic 1,100 ppm F and 550 ppm F liquid dentifrices are compared. There was a significant reduction in nails F concentrations when the latter was used. The use of the liquid dentifrices through the “drop technique” also led to lower nails F concentrations, as can be seen when the experimental “liquid” dentifrices are compared to the commercial toothpaste. It must be highlighted that this happened regardless the F concentrations in the liquid dentifrices. This was expected, since it has been shown that the use of a “liquid” dentifrice through the “drop” technique significantly reduces and makes easier the standardization of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush, when compared to toothpastes [Vilhena et al., 2008]. For this reason, we did not include a group with 550 ppm F pH 7.0 liquid dentifrice in the present study. Since it is part of a longitudinal randomized clinical trial conducted with children having history of caries, there was a concern that the simultaneous reduction of the F concentration and amount of dentifrice loaded onto the toothbrush (“drop” technique), in the absence of a factor that could increase the anti-caries efficacy of the dentifrice, such as the pH reduction, could lead to a higher incidence of caries in the studied population.

The results of this study indicate that the reduction of the dentifrice pH increases the F uptake in dental plaque and does not affect the F bioavailability. In addition, the use of liquid dentifrices contributes to reducing the F intake from dentifrice. Thus, the low F liquid acidic dentifrice might be suitable for controlling dental caries in young children without increasing the risk of dental fluorosis.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (Grant 05/03975-6).

References

- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC: In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
- Ammari AB, Bloch-Zupan A, Ashley PF: Systematic review of studies comparing the anti-caries efficacy of children's toothpaste containing 600 ppm of fluoride or less with high fluoride toothpastes of 1,000 ppm or above. *Caries Res* 2003;37:85-92.
- Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H: Reasons for the caries decline: What do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 1996;104:416-422; discussion 423-415, 430-412.
- Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT: In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 2006;40:239-244.
- Buzalaf MA, Pessan JP, Alves KM: Influence of growth rate and length on fluoride detection in human nails. *Caries Res* 2006;40:231-238.
- Correa Rodrigues MH, de Magalhaes Bastos JR, Rabelo Buzalaf MA: Fingernails and toenails as biomarkers of subchronic exposure to fluoride from dentifrice in 2- to 3-year-old children. *Caries Res* 2004;38:109-114.
- de Almeida BS, da Silva Cardoso VE, Buzalaf MA: Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1- to 3-year-old brazilian children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007;35:53-63.
- Duckworth RM, Morgan SN: Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Res* 1991;25:123-129.
- Levy FM, Bastos JR, Buzalaf MA: Nails as biomarkers of fluoride in children of fluoridated communities. *J Dent Child (Chic)* 2004;71:121-125.
- Lima YB, Cury JA: [fluoride intake by children from water and dentifrice]. *Rev Saude Publica* 2001;35:576-581.
- Mascarenhas AK: Risk factors for dental fluorosis: A review of the recent literature. *Pediatr Dent* 2000;22:269-277.
- Olympio KP, Bardal PA, Cardoso VE, Oliveira RC, Bastos JR, Buzalaf MA: Low-fluoride dentifrices with reduced pH: Fluoride concentration in whole saliva and bioavailability. *Caries Res* 2007;41:365-370.
- Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA: Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *J Dent Res* 2008;87:461-465.
- Petersson LG, Lodding A, Hakeberg M, Koch G: Fluorine profiles in human enamel after in vitro treatment with dentifrices of different compositions and acidities. *Swed Dent J* 1989;13:177-183.
- Rolla G, Bowen WH: Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. *Scand J Dent Res* 1977;85:149-151.
- Rolla G, Ogaard B, Cruz Rde A: Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: A review. *Int Dent J* 1991;41:171-174.

- Silva MF, Melo EV, Stewart B, De Vizio W, Sintes JL, Petrone ME, Volpe AR, Zhang Y, McCool JJ, Proskin HM: The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in Brazil. *Am J Dent* 2001;14 Spec No:19A-23A.
- Tanaka M, Margolis HC: Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol* 1999;44:253-258.
- Taves DR: Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968;15:6.
- Vilhena FV, Silva HM, Peres SH, Caldana Mde L, Buzalaf MA: The drop technique: A method to control the amount of fluoride dentifrice used by young children. *Oral Health Prev Dent* 2008;6:61-65.
- Villena RS: An investigation of the transverse technique of dentifrice application to reduce the amount of fluoride dentifrice for young children. *Pediatr Dent* 2000;22:312-317.
- Warren JJ, Levy SM: A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. *Pediatr Dent* 1999;21:265-271.
- Whitford GM: The metabolism and toxicity of fluoride, ed 2nd. Basel, Karger, 1996.
- Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, 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.
- Whitford GM, Pashley DH: Fluoride absorption: The influence of gastric acidity. *Calcif Tissue Int* 1984;36:302-307.
- Whitford GM, Sampaio FC, Arneberg P, von der Fehr FR: Fingernail fluoride: A method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res* 1999;33:462-467.
- Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM: Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* 2002;36:256-265.

Table. Fluoride concentrations and 95% confidence intervals in dental plaque at 1 h after the last use of the experimental dentifrices and commercial toothpaste

Groups			Mean plaque F concentrations and 95% confidence intervals
Dentifrice	F concentration (ppm)	pH	(mmol/Kg dry weight)
Commercial ^b	1,100	7.0	0.455 ± 0.103 (0.240-0.670)
Experimental ^a	1,100	7.0	1.667 ± 0.410 (0.813-2.521)
Experimental ^a	1,100	4.5	3.091 ± 0.984 (1.038-5.145)
Experimental ^a	550	4.5	1.448 ± 0.303 (0.816-2.079)

Mean ± se (n=21). Dentifrices with the same superscript letter are not significantly different (ANOVA after log transform and Tukey, p<0.05).

Figure. Mean fingernails and toenails F concentrations according to the types of dentifrices used. Bars indicate se (n=15). Fingernails F concentrations were significantly higher when compared to toenails F concentrations. Distinct letters for the same site indicate significant differences among the dentifrices used (two-way repeated-measures ANOVA after logarithmic transformation, p<0.05).