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

CRISTIANE DE ALMEIDA BALDINI CARDOSO

**Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em
dentifrícios líquidos no controle de cárie em área fluoretada:
estudo clínico randomizado**

**BAURU
2013**

CRISTIANE DE ALMEIDA BALDINI CARDOSO

**Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios
líquidos no controle de cárie em área fluoretada: estudo clínico
randomizado**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão Corrigida

BAURU
2013

C179e De Almeida Baldini Cardoso, Cristiane
Efeito do pH e da concentração de fluoreto
presente em dentifrícios líquidos no controle de
cárie em área fluoretada: estudo clínico
randomizado/ Cristiane de Almeida Baldini Cardoso.
– Bauru, 2013.
152 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 016/2009
Data: 18 de agosto de 2009

DADOS CURRICULARES

Filiação	Márcio José Baldini Cardoso Rogéria Maria Alves de Almeida
02/08/1983	Nascimento – Botucatu-SP
2005-2005	Curso de Atualização em Cirurgia Bucal pelo Instituto de Odontologia Cirúrgica de Alfenas (IOA)
2005-2005	Curso de Atualização em Prótese Fixa pelo Instituto Mineiro de Pós-Graduação
2006-2006	Curso de Atualização em Periodontia pela Escola Profissional da ABO/MG/Regional de alfenas
2005-2006	Iniciação Científica voluntária sob orientação do Prof. João Adolfo Costa Hanemann (Estomatologia)
2002-2006	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL MG
2006-2009	Curso de pós-graduação em Odontopediatria, nível Mestrado, pela Faculdade de odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
2008-2010	Cirurgiã Dentista do Programa de Saúde da Família – Bauru - SP
2009-2013	Curso de pós-graduação em Biologia Oral, nível Doutorado, pela Faculdade de odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
2010-2013	Bolsista de Doutorado FAPESP (processo nº 2010/01944-4) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Associações	CRO-SP- Conselho Regional de odontologia do Estado de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR – International Association for Dental Research

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me iluminar e dar forças todos os dias, proporcionando a celebração de mais esta etapa.

Dedico este trabalho aos meus pais, Márcio e Rogéria, que são meu exemplo de vida, de amor, de honestidade, esforço e dedicação; sem vocês eu nada seria! Tenho orgulho de ser filha de vocês e privilégio de ser única, espero sempre poder retribuir toda esta dedicação que vocês depositaram em mim. Amo vocês !!!

“Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Marília Afonso Rabelo Buzalaf. Quando eu digo “orientadora querida” muitos podem pensar “que puxa-saco” mas eu nunca fui tão sincera nas minhas palavras. Com você (não digo “a senhora” não por falta de respeito, mas porque sei que nunca gostou do “senhora”) eu despertei ainda mais o amor que eu tinha pela minha profissão e pela carreira acadêmica. Não pensei duas vezes em largar o meu emprego quando tive a oportunidade de fazer meu Doutorado sendo sua orientada pois eu sabia que meu crescimento profissional seria inquestionável. Apesar dos muitos títulos e do prestígio que você tem no mundo científico, é incrível como consegue ser uma pessoa acessível e receptiva. Com certeza eu fiz a escolha certa, aprendi muito mais do que imaginava durante estes quatro anos, a tomar decisões, a superar minhas expectativas solucionando os problemas inerentes a qualquer estudo desta proporção, tentando atingir ao máximo não só as minhas mas também as suas expectativas. E eu espero ter conseguido. Obrigada por me mostrar o caminho para que eu pudesse andar com as minhas próprias pernas. Crescer profissionalmente e ganhar prêmios como os que os seus alunos ganham é só um reflexo da orientadora que você é. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários desta pesquisa e seus familiares, às professoras, diretoras e funcionários das EMEIs, por cederem seus horários e oferecerem ajuda, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo indispensável auxílio financeiro fornecido, proporcionando não apenas a realização deste trabalho através do processo nº 2010/01944-4, como também a participação em congressos nacionais e internacionais, estágio no exterior, importantíssimos para o meu aprimoramento científico e pessoal.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira e Vice-Diretora Profª Drª Maria Aparecida Moreira Machado. Obrigada pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta instituição modelo no nosso país.

Aos meus colegas do laboratório de Bioquímica, que me ajudaram na realização desta pesquisa. À minha querida amiga Kelly Polido Kaneshiro Olympio, por sua participação indispensável em muitas etapas deste estudo, ajudando a carregar o equipamento (QLF) pelas 5 EMEIs de Bauru, ajudando na organização e escovação das crianças, coleta de biofilme e até no corte das unhas. Nossa amizade vai ficar pra sempre guardada no meu coração!

Ao meu amigo **Fabiano Vieira Vilhena**, pela orientação e ajuda em muitas etapas desta pesquisa, desde o delíneamento do estudo e escolha das escolas, ajuda nos exames clínicos até a organização e entrega dos kits de escovação e que, pela experiência de já ter realizado um estudo clínico, sabendo das dificuldades e limitações, sempre me incentivava dizendo “dá tempo Cris, dá certo”.

Ao meu amigo e agora professor **Juliano Pelím Pessan**, exemplo de organização e dedicação, muito obrigada pela importante participação em etapas importantíssimas desta pesquisa. Além da ajuda na logística de organização das crianças, horários em que deveria ser feita a coleta de biofilme etc, seu espírito brincalhão ajudava até a segurar a fome das crianças, inventando brincadeiras que nos faziam rir mais do que as próprias crianças. Muito obrigada!

À minha amiga **Dayane Franco Barros Manguiera**, por me ajudar em todas as etapas desta pesquisa, uma vez que a sua tese de Doutorado foi praticamente a mesma em uma área não fluoretada, passando juntas pelas dificuldades de um estudo clínico que só quem faz sabe quais são. Até apelidamos nosso estudo de “As aventuras de um Doutorado”.

Ao professor **Dr. Fábio Correia Sampaio**, por me receber na Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, pelo precioso auxílio e orientação nas etapas do estudo na Paraíba e por ceder o seu laboratório para a realização de outras pesquisas durante o Doutorado.

Às minhas amigas de Mestrado e Doutorado que também ajudaram nas escolas, **Senda Charone**, **Kellen Gasque**, **Flávia Zaidan** e **Cíntia Maria de Souza-e-Silva**, muito obrigada pela indispensável participação. Sem o trabalho em equipe nada é possível! Em especial obrigada a minha amiga **Senda**, que, mesmo passando mal foi comigo nas escolas quase na véspera do Natal.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica: **Larissa**, **Thelma**, **Aline** e **Ovidio**. Muito obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar! Em especial muito obrigada à **Larissa Grizzo** pelas análises de fluoreto das amostras de biofilme e unhas e pelos ensinamentos e treinamentos para uma “marinheira de primeira viagem” na Bioquímica.

Agradeço aos professores do departamento de Ciências Biológicas, disciplina de Bioquímica da FOB-USP, **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso** e **Profª Drª Ana Carolina Magalhães**, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pelo auxílio e críticas construtivas durante o curso de Doutorado. Obrigada à **Profª Drª Ana Carolina Magalhães** pela importante contribuição durante o exame de qualificação, na discussão dos resultados e redação dos

artigos desta tese, além da oportunidade de participação em outras pesquisas no laboratório de Bioquímica e por ter me incentivado durante a defesa do mestrado a continuar na carreira acadêmica. Seus conselhos, mais do que como professora, mas como amiga, foram sempre importantes na minha vida. Sua dedicação, perseverança e competência inspiram os seus alunos a seguir os mesmos passos.

À Meg, Letícia, Fátima e Leila, pelo auxílio e orientação na secretaria de pós-graduação.

Às funcionárias Dalva e Vera, por serem sempre solícitas e dispostas a ajudar.

À Profª Drª Daniela Rios, pela importante contribuição durante o exame de qualificação, discussão do delinearmento do estudo e resultados, além da oportunidade de continuar tendo contato com a Odontopediatria, me auxiliando na redação de artigos e dando conselhos sobre os concursos. Espero que este contato se mantenha por muito tempo ainda. Obrigada pela valiosa contribuição para o meu aprimoramento profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório, pela valiosa ajuda e esclarecimentos sobre a análise estatística. Obrigada pela oportunidade de participar da disciplina de Bioestatística, tornando fácil e prazeroso o aprendizado nessa área. Serei eternamente grata pelos conhecimentos tão importantes adquiridos nesta disciplina.

Aos demais amigos do laboratório: Livia Comar, Luiza de Paula, Flávia Levy, Thiemí Kato, Aline Leite, Aline Dionízio, Aline Castilho, Camila Buzalaf, Milení Fernandes, Bruno Zarella, Flávia Iano, Priscila Salomão, Flávia Amadeu, Heloísa Pereira, Taísa Delecrode, Isabela Tomazini, Fernanda Zucki, Janete, Lucas Fedamede, Mel Rodrigues, Priscila Munoz, Alessandra Cury e Beatriz Souza. O meu muito obrigada pela amizade e oportunidade de participar em outras pesquisas e aprender com vocês! Alguns, além de colegas de trabalho se tornaram verdadeiros amigos e confidentes, deixando mais leve a caminhada da vida.

As minhas amigas Tatiana Kobayashi, Michelle Cassis e Leslie Casas que desde o mestrado estiveram sempre presentes na minha vida, mostrando que a amizade é realmente valiosa na vida das pessoas.

“Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendermos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.” William Shakespeare

Aos meus familiares, tia Márcia Baldini, tio Mauri e Dulce, às minhas primas e aos meus avós, por sempre estarem na torcida desde pequena, me dando conselhos valiosos. Não menos importante à minha cachorrinha Tulipa, por ser a companheira mais fiel.

Ao professor Dr. Gerald Lee Vogel, por me receber em seu laboratório no Paffenbarger Research Center (PRC) em Washington DC/EUA, oferecendo treinamento em Ultra Chemical Techniques for the Analysis of Plaque Fluid. Além dos valiosos conhecimentos adquiridos, adorei conhecer a capital dos EUA.

Ao IADR e Colgate, por ter nos concedido o prêmio IADR/Colgate Research in Prevention Travel Awards no IADR em Foz do Iguaçu/Brasil - junho de 2012, fazendo valer ainda mais todo o esforço dedicado a este trabalho.

Cerimônia de Entrega do Prêmio IADR/Colgate Research in Prevention Travel Awards.

Entrega da placa do Prêmio IADR/Colgate Research in Prevention Travel Awards.

“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas”

Victor Hugo

RESUMO

Efeito do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios líquidos no controle de cárie em área fluoretada: estudo clínico randomizado

Os dentifrícios de baixa concentração de fluoreto têm sido sugeridos como alternativa para reduzir o risco de fluorose dentária, embora não haja consenso quanto a sua eficácia clínica, a qual pode ser aumentada quando o pH é ácido. Este estudo clínico randomizado teve como objetivo avaliar o efeito anti-cárie do pH e da concentração de fluoreto presente em dentifrícios líquidos, em crianças com diferentes status de atividade cariosa. Crianças de 2-4 anos de idade residentes em uma área fluoretada (0,6-0,8 ppm F), com (A) e sem (I) lesões de cárie ativa foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de acordo com o tipo de dentifrício utilizado: Grupo 1 (n=48-A/56-I): 550 ppm F – pH 4,5, Grupo 2 (n=56-A/48-I) 1100 ppm F – pH 7,0, Grupo 3 (n=52-A/55-I): 550 ppm F – pH 7,0. O número de lesões tornando-se ativas/cavidades ou inativas, respectivamente, foi avaliado clinicamente após 12 meses, podendo-se determinar se as lesões progrediram ou regrediram. Além disso, as lesões de mancha branca foram avaliadas através da técnica de quantificação de fluorescência induzida por luz (*Quantitative Light-Induced Fluorescence - QLF*) em uma subamostra de 75 crianças. A concentração de fluoreto nas unhas dos pés e no biofilme dentário também foi avaliada após 6 meses de uso dos dentifrícios. A progressão de cárie seguiu um padrão decrescente de acordo com o dentifrício utilizado ($G3 > G2 > G1$), independentemente da atividade de cárie da criança, mas diferenças significativas foram detectadas apenas para a progressão e o incremento de cárie ($G1 < G3$) no grupo de crianças cárie-ativas, quando avaliadas por inspeção visual. Para a regressão de cárie, os valores encontrados para os 3 grupos foram mais parecidos entre si, não havendo diferenças significativas entre os grupos. Por outro lado, a análise com o QLF não detectou diferença significativa entre os Grupos 1 e 2, mas eles tiveram um desempenho significativamente melhor que o Grupo 3. Concentrações de fluoreto nas unhas significativamente mais baixas foram observadas quando as crianças usaram os dentifrícios fluoretados de baixa concentração de F, independente do pH. A concentração de F no biofilme foi significativamente maior para o grupo 2 quando

comparado ao grupo 3 independente do tempo de coleta, enquanto o grupo 1 não diferiu significativamente do grupo 2, mas foi significativamente maior que o grupo 3, 60 minutos após a coleta. Os resultados reforçam os dados anteriores que mostraram um bom potencial do dentifrício líquido ácido de baixa concentração de F para prevenir lesões cáries e ao mesmo tempo reduzir a ingestão de fluoreto. Assim, este dentifrício parece ser uma boa opção para as crianças na idade de risco para fluorose dentária, residentes em uma região fluoretada, independente da atividade de cárie.

Palavras-chave: Dentifrícios. Cárie dentária. Pré-escolares. Dente decíduo. Estudo clínico randomizado. Unhas. Biofilme dentário.

ABSTRACT

Effect of liquid dentifrices' pH and fluoride concentration on caries control in a region with fluoridated water: randomized clinical trial

Low-F dentifrices have been suggested as an alternative to reduce the risk of dental fluorosis, although there is no consensus on their clinical efficacy, which may be increased when the pH is acidic. The present randomized clinical trial evaluated the anticaries effect of low-F acidic liquid dentifrice in children at different caries activity status. Two-to-four-year-old schoolchildren living in a fluoridated area (0.6–0.8 ppm F), with (A) or without (I) active caries lesions were randomly allocated into 3 groups differing according to the type of dentifrice used over 12 months: Group 1 (n=48-A/56-I): 550 ppm F – pH 4.5, Group 2 (n=56-A/48-I) 1100 ppm F – pH 7.0, Group 3 (n=52-A/55-I): 550 ppm F – pH 7.0. The number of lesions becoming active/cavities or inactive was clinically evaluated determining progression or regression. Additionally, the white spot lesions were evaluated by the quantitative light-induced fluorescence (QLF) method in a subsample of 75 children. Toenail and plaque fluoride concentration were also evaluated 6 months after the use of the dentifrices. Plaque samples were collected 5 and 60 minutes after the last use of the dentifrices. Caries net increment followed a decreasing pattern according to the dentifrice used ($G3 > G2 > G1$) regardless caries activity, but significant differences were detected only for caries progression and net increment ($G1 < G3$) for the caries-active group when evaluated through visual inspection. For the regression, the values found for the three groups were more similar, without significant differences. QLF analysis detected no significant difference between Groups 1 and 2, but they performed significantly better than Group 3. Toenail fluoride concentration significantly lower was observed when children used the low-fluoride dentifrices. Plaque F concentration was significantly higher for Group 2 compared to group 3, regardless the time, while Group 1 did not significantly differ Group 2, but was significantly higher when compared to Group 3, 60 minutes after plaque collection. The results reinforce previous data that showed a good potential of the low-fluoride acidic LD to prevent caries and reduce fluoride intake. Thus, it seems to be a good option for children at the age of risk for dental fluorosis, living in a fluoridated area, regardless the risk for dental caries.

Key words: Dentifrices. Dental caries. Preschool children. Deciduous tooth. Randomized, clinical trials. Nails. Plaque.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	cárie ativo
ANC	<i>active noncavitated</i> : mancha branca ativa
ANCOVA	análise de covariância
ANOVA	análise de variância
ceos	superfícies cariadas, com extração indicada ou obturadas
CPO-S	superfícies cariadas, perdidas ou obturadas
CSM	microdureza longitudinal
ECR	estudos controlados randomizados
EFU	incorporação de F no esmalte
DES	desmineralização
DP	desvio padrão
et al.	e colaborador(es)
F	fluoreto
FA	F adsorvido à superfície do cristal
FAP	fluorapatita
FL	F presente no fluido do esmalte (espaços intercrystalinos)
FO	F externo ao esmalte (presente no biofilme e saliva)
FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo
FP	fração prevenida
FS	F incorporado na estrutura do cristal, presente na fase sólida
fTCP	fosfato tricálcico
HMDS	<i>hexamethyldisiloxane</i>
I	cárie inativo
IC	intervalo de confiança
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i> : razão de possibilidades
ppm	partes por milhão
RE	remineralização
RR	<i>Risk Ratio</i> : riscos relativos
SE	erro padrão
SMH	microdureza superficial
TFI	índice de Thylstrup e Fejerskov
TMR	técnica da microrradiografia transversal

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	concentração
°C	grau Celsius
%	porcentagem
>	maior
<	menor
±	mais ou menos
~	equivalente
nº	número
ΔZ	perda mineral integrada
ΔF	variação de fluorescência
ΔQ	área multiplicada pela variação de fluorescência
γ	comprimento de onda
μg	micrograma
μL	microlitro
CaF_2	fluoreto de cálcio
g	grama
h	hora
HF	ácido fluorídrico
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$	fosfato primário
HPO_4^{-2}	fosfato secundário
kg	quilograma
mg	miligrama
ml	mililitro
MFP	monofluorofosfato de sódio
n	número de elementos amostrais
NaF	fluoreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
M	molar
mm^2	milímetro quadrado
mV	milivoltagem
nM	nanomolar
nm	nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
pK	constante de dissociação
s	segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Fluoretos na primeira infância: considerações sobre cárie e fluorose dentária.....	25
2.2	Biomarcadores recentes para o F	29
2.3	Mecanismos de ação do F no controle da cárie	35
2.3.1	Inibição do processo de desmineralização (DES)	36
2.3.2	Aceleração do processo de remineralização (RE).....	37
2.3.3	Efeitos nas bactérias orais	38
2.4	Dentifrício fluoretado no controle da cárie	38
2.5	Alternativas para a diminuição da ingestão excessiva de F a partir dos dentifrícios	40
2.5.1	Diminuição da quantidade de dentifrício usado na escovação	40
2.5.2	Diminuição da concentração de F presente nos dentifrícios	43
2.6	Quantificação de fluorescência induzida por luz (QLF)	54
3	PROPOSIÇÃO	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	Delineamento experimental.....	63
4.1.1	Seleção e randomização da amostra	63
4.2	Regime do estudo	65
4.3	Exames clínicos.....	66
4.3.1	Coleta de dados	66
4.3.2	Calibração	68
4.4	Avaliação da fluorescência induzida por luz das lesões de cárie	73

4.5	Avaliação da concentração de flúor incorporado no biofilme dentário	76
4.5.1	Material utilizado para coleta de biofilme.....	76
4.5.2	Coleta do biofilme.....	76
4.5.3	Análise da concentração de F no biofilme.....	77
4.5.4	Validação da análise	79
4.6	Avaliação da concentração de F presente nas unhas.....	79
4.6.1	Coleta das unhas.....	79
4.6.2	Análise da concentração de F presente nas unhas.....	80
4.6.3	Validação da análise	81
4.7	Análise estatística.....	82
5	RESULTADOS.....	85
5.1	Progressão, Regressão e Incremento líquido das lesões de cárie.....	87
5.2	Variação da área e fluorescência das lesões de mancha branca (QLF)	89
5.3	Incorporação de F no biofilme dentário	97
5.4	Incorporação de F nas unhas dos pés	99
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS.....	115
	APÊNDICES.....	131

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A redução da ingestão de fluoreto (F) por crianças é importante para evitar o risco da ocorrência de fluorose dentária e (BUZALAF; LEVY, 2011; DE ALMEIDA; DA SILVA CARDOSO; BUZALAF, 2007; DO; SPENCER, 2007; FRANZMAN et al., 2006; MASCARENHAS, 2000; WONG et al., 2011; WONG et al., 2010). O dentifrício fluoretado é uma importante fonte de ingestão de F na primeira infância, uma vez que as crianças nesta faixa etária não têm um controle adequado sobre a deglutição (DE ALMEIDA; DA SILVA CARDOSO; BUZALAF, 2007; KOBAYASHI et al., 2011; LIMA, Y.B.; CURY, 2001; WARREN; LEVY, 1999). Alternativas têm sido propostas para reduzir a ingestão de F por crianças na primeira infância através do dentifrício, como a redução da quantidade de dentifrício colocado na escova através. Outra alternativa seria o uso de dentifrícios com baixa concentração de F. No entanto, existem poucos estudos que avaliam a dentição decídua e, neste caso ainda há incerteza sobre a eficácia anti-cárie de dentifrícios com baixa concentração de F (500 ppm) comparada a do dentifrício convencional (1100 ppm F) (WALSH et al., 2010; WONG et al., 2010). É precisamente nesta idade que a ingestão excessiva de F pode levar à fluorose dentária em incisivos centrais superiores permanentes (BUZALAF; LEVY, 2011). Visando a manter a eficácia anticárie do dentifrício de baixa concentração de F, dentre as estratégias disponíveis, a redução do pH do dentifrício tem ganhado especial atenção.

Dentifrícios ácidos de baixa concentração de F são tão eficazes quanto dentifrícios convencionais neutros *in vitro* (ALVES et al., 2007; BRIGHENTI et al., 2006) e *in situ* (NOBRE-DOS-SANTOS et al., 2007). Mais recentemente, uma formulação dentifrícia líquida de baixa concentração de F (550 ppm) e pH reduzido (4,5) foi desenvolvida visando a combinar as estratégias para redução da ingestão de F através do dentifrício. A consistência líquida permite a aplicação do dentifrício através da técnica “da gota” (VILHENA et al., 2008), padronizando e reduzindo a quantidade dispensada na escova (VILHENA et al., 2008). Esta formulação demonstrou ser eficaz para aumentar a captação de F no biofilme dentário, sem afetar a concentração de F nas unhas (BUZALAF et al., 2009). Além disso, levou a valores semelhantes de progressão de cárie quando comparada ao creme dental convencional (1100 ppm F) em um estudo clínico randomizado conduzido por 20

meses com crianças de 4 anos de idade, vivendo em uma área fluoretada (VILHENA et al., 2010).

Tem sido sugerido que é importante considerar o estado da atividade de cárie quando da indicação de dentifrícios de baixa concentração de F. O dentifrício com baixa concentração de F (500 ppm) teve eficácia anticárie semelhante à de um dentifrício convencional (1100 ppm F) quando foram consideradas crianças cárie-inativas (2-4 anos), mas para as crianças cárie-ativas, o dentifrício convencional reduziu significativamente a progressão e o incremento líquido das lesões de cárie iniciais quando comparado ao dentifrício com baixa concentração de F (LIMA et al., 2008). É importante notar que essas formulações tinham pH neutro e as crianças viviam em uma comunidade não-fluoretada. Foi então hipotetizado que, em uma área fluoretada, o dentifrício ácido de baixa concentração de F poderia ter a mesma eficácia anti-cárie que o dentifrício convencional neutro, mesmo para crianças cárie-ativas. Para testar esta hipótese, o presente estudo clínico comparou o efeito anticárie dos dentifrícios líquidos de baixa concentração de F (550 ppm) ácido e neutro e dentifrício convencional (1100 ppm F) neutro em crianças de 2-4 anos de idade, cárie-ativas e cárie-inativas, residentes em uma comunidade fluoretada.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordados os seguintes tópicos: fluoretos na primeira infância, biomarcadores atuais para o F, mecanismos de ação dos dentifrícios fluoretados no controle da cárie, alternativas para diminuir a ingestão excessiva de F e métodos de diagnóstico de lesões cariosas.

2.1 FLUORETOS NA PRIMEIRA INFÂNCIA: CONSIDERAÇÕES SOBRE FLUOROSE DENTÁRIA

O uso dos fluoretos tem sido o mais importante método de prevenção e controle da cárie, desde a introdução da fluoretação da água por volta dos anos 40 (KARGUL; CAGLAR; TANBOGA, 2003). Na metade do século passado, acreditava-se que o F precisava ser incorporado à estrutura do esmalte durante o desenvolvimento, para que o seu efeito máximo de proteção fosse atingido. Portanto, se considerava inevitável que a população tivesse certa prevalência e severidade de fluorose, tendo como objetivo diminuir a prevalência de cárie entre as crianças (BUZALAF; LEVY, 2011). A fluorose é uma hipomineralização do esmalte devido à ingestão excessiva de fluoretos durante o período crítico do desenvolvimento dentário (DENBESTEN; LI, 2011).

Nos anos 80, foi proposta uma mudança de paradigma em relação ao mecanismo cariostático dos fluoretos (FEJERSKOV; THYLSTRUP; LARSEN, 1981). Esta mudança considerou que o mecanismo de controle do desenvolvimento da cárie pelos fluoretos seria através da sua ação tópica nos processos de des e remineralização que ocorrem na interface esmalte-biofilme dentário. Este conceito foi amplamente aceito (OGAARD et al., 1991; ÖGAARD et al., 1988; TEN CATE; DUIJSTERS, 1983; TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991) e tornou possível a prevenção da cárie sem a ingestão excessiva de fluoretos. Com esta nova concepção e as evidências do aumento da prevalência de fluorose em áreas fluoretadas e não fluoretadas (JACKSON et al., 1999; KHAN; MOOLA; CLEATON-JONES, 2005; PEREIRA et al., 2000; TABARI et al., 2000; TSUTSUI; YAGI;

HOROWITZ, 2000), os pesquisadores voltaram a sua atenção ao estudo de outras fontes de ingestão de F, como os dentifrícios fluoretados (BUZALAF; LEVY, 2011).

O F pode ser ingerido a partir de várias fontes, incluindo vários tipos de alimentos e bebidas. A ingestão de F varia bastante entre as pessoas e é dependente de componentes alimentares e do uso de produtos fluoretados. Apesar de a ingestão tóxica de F ser rara, a prevalência de fluorose dentária tem aumentado na América do Norte, sugerindo o monitoramento dos níveis de ingestão de F. Cuidados devem ser tomados para se evitar a ingestão excessiva de dentifrício fluoretado por crianças pré-escolares, o que pode ser conseguido através da colocação de uma pequena quantidade na escova de dentes. A prescrição de suplementos fluoretados deve ser feita com cautela, avaliando-se a exposição a outras fontes de F, incluindo a água utilizada para beber tanto em casa quanto na escola, além de alimentos e bebidas (WARREN; LEVY, 1999).

O risco de desenvolvimento da fluorose depende da quantidade e duração de exposição ao fluoreto, fase de desenvolvimento do dente no momento da exposição e da suscetibilidade de cada indivíduo (DE ALMEIDA; DA SILVA CARDOSO; BUZALAF, 2007). HONG et al. (2006a) demonstraram que apesar de os dois primeiros anos de vida serem os mais críticos comparados aos anos posteriores, a quantidade de ingestão de F a cada ano (até os 4 anos de idade) tem uma importância significativa para o desenvolvimento da fluorose; além disso, indivíduos com altos níveis de ingestão de F (média diária de 0,059 mg/kg) durante os três primeiros anos de vida tiveram um risco aumentado de desenvolver a doença. Pode-se sugerir, portanto, que o risco à fluorose depende não somente do momento crítico de exposição ao F, mas também do efeito cumulativo desta exposição (BARDSEN, 1999; HONG et al., 2006a; HONG et al., 2006b).

Moraes et al. (2007) avaliaram a ingestão de F a partir de dentifrícios com diferentes concentrações de F, por crianças de 2-3 anos de idade. Observou-se que 70% das crianças ingeriram mais do que 50% do dentifrício durante a escovação e algumas ingeriram quase todo o dentifrício colocado na escova. Estes achados foram similares aos achados de Almeida, Cardoso e Buzalaf (2007), que estimaram a ingestão diária total de F por crianças de 1 a 3 anos a partir da dieta e do dentifrício, separando os constituintes da dieta em sólidos, água mais leite e outras bebidas, os quais foram analisados para o F separadamente. O dentifrício sozinho

foi responsável por, em média, 81,5% da ingestão diária de F, enquanto que entre os constituintes da dieta, a água e o leite foram responsáveis por cerca de 60% da contribuição total da dieta. Os resultados de estudos conduzidos em diversas localidades, os quais estimaram a ingestão de F por crianças na faixa etária de risco para fluorose dentária, foram compilados numa revisão de literatura (CLARKSON et al., 2010). Foi observado que para crianças na primeira infância (até 3 anos), a maior fonte de ingestão de F é o dentifrício. Além disso, o estudo de Kobayashi et al. (2011) demonstrou uma relação inversa entre a idade da criança e a porcentagem de ingestão de dentifrício.

De acordo com estas evidências, parece ser essencial o monitoramento da ingestão de F por crianças nos 3 primeiros anos de vida, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento da fluorose nos incisivos permanentes centrais superiores, dentes de maior importância estética no arco dentário.

Uma revisão sistemática recente com meta-análise compilou os resultados de 25 estudos publicados entre 1988 e 2006, que avaliaram a relação entre o uso de dentifrício fluoretado e fluorose dentária. Entre estes estudos, foram inclusos 2 estudos controlados randomizados (ECR) (HOLT et al., 1994; TAVENER et al., 2006), 1 estudo de coorte (FRANZMAN et al., 2006), 6 estudos de caso-controle (OSUJI et al., 1988; PENDRYS; KATZ, 1989, 1998; PENDRYS; KATZ; MORSE, 1994, 1996; SKOTOWSKI; HUNT; LEVY, 1995) e 16 estudos transversais (BELTRAN-VALLADARES et al., 2005; BOTTENBERG et al., 2004; BROTHWELL; LIMEBACK, 1999; CONWAY et al., 2005; DO; SPENCER, 2007; MASCARENHAS; BURT, 1998; MAUPOMÉ et al., 2003; MORGAN et al., 1998; PEREIRA et al., 2000; RIORDAN, 1993; ROCK; SABIEHA, 1997; SAGHERI; MCLOUGHLIN; CLARKSON, 2007; SZPUNAR; BURT, 1988; TABARI et al., 2000; WANG; GROPER; OGAARD, 1997). Nenhum estudo observacional foi considerado livre de vieses, sendo estes inerentes a este tipo de estudo. Com relação aos 2 ECR, um dos estudos gerou adequadamente a sequência de alocação dos voluntários (TAVENER et al., 2006) enquanto o outro não descreveu claramente este dado (HOLT et al., 1994). Em um dos estudos apenas o pesquisador foi cego para os resultados (TAVENER et al., 2006), enquanto no outro os participantes eram cegos, mas esta informação não ficou clara para o avaliador dos resultados (HOLT et al., 1994). Assim, apenas um ECR foi considerado de baixo risco de vieses (TAVENER et al., 2006).

Os dois ECRs compararam o efeito de dentifrícios com diferentes concentrações de F no risco de desenvolvimento da fluorose. O primeiro estudo comparou dentifrícios contendo 550 e 1000 ppm F (HOLT et al., 1994) e o segundo dentifrícios contendo 440 e 1450 ppm F (TAVENER et al., 2006), ambos em áreas não fluoretadas. O índice de Thylstrup e Fejerskov (TFI) (1978) foi utilizado. Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para os dois estudos [RR 0,75 (95% IC 0,57 a 0,99) e RR 0,59 (95% IC 0,44 a 0,79)], indicando um risco aumentado para a ocorrência de fluorose dentária quanto maior é a concentração de F do dentifrício. No estudo de Tavener et al. (2006), as crianças foram recrutadas aos 12 meses de idade e usaram os dentifrícios fluoretados até os 5 a 6 anos de idade. Foi demonstrado um maior risco de desenvolvimento da fluorose neste estudo em comparação ao estudo de Holt et al. (1994), em que as crianças foram recrutadas aos 2 anos de idade e os dentifrícios fluoretados foram usados durante um período de 3 anos. No entanto, além das concentrações de F nos dentifrícios terem sido diferentes nos dois estudos (550/1000 e 440/1450 ppm F), o aumento do risco de fluorose no estudo de Tavener et al. (2006) pode ter sido consequência de um maior período de exposição aos dentifrícios e não devido somente à concentração de F presente nos mesmos.

A evidência a partir dos estudos transversais foi inconsistente, não detectando diferença estatisticamente significativa entre dentifrícios com uma concentração de 250/550 ppm F e aqueles com uma concentração de 1000 ppm F ou maior [OR 0,79 (95% IC 0,61 a 1,02)].

Dois estudos caso-controle e 9 estudos transversais demonstraram relação entre a idade em que a criança iniciou a escovação e o risco de fluorose. Uma redução significativa no risco de fluorose dentária foi observada quando a escovação com dentifrício fluoretado não começou antes dos 12 meses de vida [OR 0,70 (95% IC 0,57 a 0,88)], mas a evidência para início da escovação aos 24 meses foi inconsistente. Não foi observada uma associação significativa entre a frequência de escovação (dados de 4 estudos transversais) ou a quantidade de dentifrício utilizada (dados de 3 estudos transversais) e a ocorrência de fluorose dentária.

Apesar desta revisão ter avaliado o efeito preventivo de dentifrícios com diferentes concentrações de F, a análise é dominada por estudos comparando dentifrícios com concentrações de 1000/1055/1100/1250 ppm com dentifrício

placebo. Mesmo com uma análise em rede para estimar os efeitos relativos, existem muito poucos estudos analisando determinadas concentrações, incluindo a faixa entre 400/550 ppm, para se ter uma precisão adequada para essas estimativas (WONG et al., 2011).

Os autores desta revisão sistemática concluíram que, a partir dos estudos disponíveis, decisões envolvendo o uso de fluoretos tópicos devem levar em conta tanto os benefícios para a prevenção de cáries, quanto os riscos de ocorrência de fluorose dentária. Foi relatado que “se existe preocupação com o risco à fluorose, deve-se recomendar que a concentração de fluoreto no dentifrício utilizado por crianças pequenas seja inferior a 1000 ppm” (WONG et al., 2010).

2.2 BIOMARCADORES RECENTES PARA O F

Mensurar a ingestão de F é uma importante medida quando se tem como objetivo o controle dos fatores de risco para fluorose. A determinação dos níveis de ingestão de F, no entanto, se torna cada vez mais difícil, uma vez que existem diversas fontes deste íon. Considerando que apenas o F absorvido implica no desenvolvimento da fluorose, o controle da absorção de F, ao invés da sua ingestão, parece ser prioritário (PESSAN; BUZALAF, 2011).

O monitoramento da exposição ao F pode ser realizado através da análise de vários tecidos ou fluidos, com diferentes graus de precisão. Enquanto os estudos que avaliam a cinética das concentrações de F nos fluidos após a ingestão de um composto fluoretado envolvem a coleta cronometrada de plasma ou saliva do ducto da parótida, a análise da concentração de F na urina também pode fornecer informações úteis, embora os dados sejam menos precisos e mais difíceis de serem interpretados do que aqueles derivados da análise do plasma. Para se ter indicadores mais precisos dos níveis de F no organismo e consequentemente prever o risco à fluorose, a busca por biomarcadores de exposição ao F tem se intensificado nos últimos anos. Marcadores biológicos ou biomarcadores são indicadores que sinalizam eventos ocorrendo nos sistemas biológicos ou amostras. De acordo com Grandjean (1995) os biomarcadores não são usados como testes

para diagnóstico, mas sim como indicadores de mudanças que podem levar a um quadro de doença (PESSAN; BUZALAF, 2011).

Os biomarcadores podem ser classificados de duas maneiras. De acordo com o Comitê de Biomarcadores do Conselho Nacional de Pesquisa eles podem ser divididos em: (1) biomarcadores de efeito (2) susceptibilidade e (3) exposição. A Organização Mundial de Saúde (OMS) propõe uma divisão temporal, em que os biomarcadores são divididos em: (1) históricos (ossos e dentes - exposição crônica ao F), (2) contemporâneos (urina, plasma e saliva - exposição aguda ao F) e (3) biomarcadores recentes (cabelo e unhas - exposições crônicas e subcrônicas ao F). Este texto seguirá a divisão da Organização Mundial de Saúde (OMS) e irá focar, dentre os biomarcadores recentes (unhas e cabelo) de exposição ao F, nas unhas.

Dentre os biomarcadores estudados, as unhas parecem ser promissoras como biomarcadores de exposição aguda (BUZALAF et al., 2004), subcrônica (BUZALAF; PESSAN; ALVES, 2006; CORREA RODRIGUES; DE MAGALHAES BASTOS; RABELO BUZALAF, 2004; WHITFORD et al., 1999) e crônica (BUZALAF et al., 2011b; BUZALAF et al., 2009; CZARNOWSKI; KRECHNIAK, 1990; FESKANICH et al., 1998; FUKUSHIMA et al., 2009; LEVY; BASTOS; BUZALAF, 2004; WHITFORD et al., 1999) ao F.

As unhas como biomarcadores possuem algumas vantagens, uma vez que o método para a coleta não é invasivo, sendo facilmente aceito pelos voluntários de uma pesquisa, além da possibilidade de armazenamento por longos períodos sem que ocorra a sua degradação. Além disso, a concentração de F nas amostras de unha está diretamente relacionada com a exposição média ao fluoreto e concentração de F no plasma referentes a um período anterior à coleta, contrariamente às concentrações de F presentes em amostras de urina, plasma ou saliva que estão relacionadas a exposições recentes e possivelmente sujeitas a variações que ocorrem durante o dia. Estas variações são momentâneas devido a ingestões recentes de F, dependendo ainda de variáveis fisiológicas (WHITFORD, 2005).

As unhas como biomarcadores para a exposição ao F vêm sendo estudadas por muitos anos. No estudo de Schamschula et al. (1985) foram coletadas amostras de urina, unhas, cabelo, saliva, biofilme e esmalte de três grupos de crianças húngaras de 14 anos de idade, que foram expostas a níveis contrastantes de F na

água (menor ou igual a 0,11 ppm; 0,5-1,1 ppm; 1,6-3,1 ppm). A concentração média de F das amostras aumentou de forma consistente e significativa de acordo com o nível crescente de F na água. Com exceção do biofilme dentário, os materiais examinados foram considerados indicadores adequados de exposição sistêmica ao F para grupos de populações. De acordo com o estudo, a experiência de cárie diminuiu com o aumento da exposição ao F e a fluorose dentária não constituiu em problemas clínicos ou estéticos.

Em 1999, Whitford et al. realizaram o primeiro trabalho descrevendo as unhas como possíveis biomarcadores para a exposição subcrônica ao F. A ingestão de F por um dos autores foi aumentada por um período de 1 mês e resultou em aumentos significativos na concentração de F nas unhas 3,5 meses depois. As concentrações de F nas unhas das mãos foram aproximadamente 50% maiores do que nas unhas dos pés. Os autores verificaram também que as concentrações de F nas unhas obtidas a partir de três grupos de crianças brasileiras (1,85, 5,28 e 7,52 µg/g) estavam diretamente relacionadas às concentrações de F na água de beber (0,1, 1,6 e 2,3 ppm). Os resultados do estudo esclareceram como o F é incorporado às unhas. Apesar da incorporação de F proveniente do meio ser possível, ficou claro que o F presente nas unhas provém da concentração média de F presente no plasma, que é incorporado no momento de formação das unhas e penetra nas unhas via sua porção final de crescimento.

Um estudo conduzido com crianças de 2-3 anos de idade avaliou o uso das unhas das mãos e dos pés como biomarcadores de exposição subcrônica ao F através de dentifrício fluoretado. As crianças utilizaram um dentifrício placebo (sem F) durante 28 dias, um dentifrício fluoretado (1570 ppm F como monofluorofosfato) nos 28 dias seguintes, e então um dentifrício placebo durante um período adicional de 28 dias. As unhas das mãos e pés foram cortadas a cada 2 semanas, durante o período experimental e por 22 semanas adicionais. Apesar do maior pico de concentração de F nas unhas ter ocorrido 16 semanas após o início da utilização do dentifrício fluoretado, um pico menor foi observado 12 semanas antes, o que poderia sugerir que o F pode ser incorporado às unhas também através do seu leite, pelo fato do mesmo ser imaturo em crianças pequenas e permitir a passagem de F, porém de maneira menos expressiva (CORREA RODRIGUES; DE MAGALHAES BASTOS; RABELO BUZALAF, 2004).

O estudo de Buzalaf, Pessan e Alves (2006) teve como objetivo determinar o tempo entre a ingestão aumentada de F e a sua detecção nas unhas. Para isso, avaliou a taxa de crescimento e comprimento das unhas dos pés e mãos de adultos de 20 a 35 anos de idade que receberam 1,8 mg F diariamente, durante 30 dias. A coleta das amostras de unha foi feita ao início do estudo e a cada 2 semanas posteriores (15 coletas no total). A taxa de crescimento foi significativamente maior nas unhas das mãos do que nas unhas dos pés e significativamente maior para os polegares dos pés do que para as outras unhas, o que não ocorreu para as unhas das mãos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os lados direito e esquerdo. A estimativa média de tempo para a detecção de F nas unhas das mãos e dos pés foram 101 e 123 dias, respectivamente. Um aumento aparente nas concentrações de F das unhas das mãos foi observado 84 dias após o início do estudo, embora este aumento não diferiu significativamente em relação ao baseline. Para as unhas dos pés, aumentos estatisticamente significativos em relação ao baseline foram observados 112 e 140 dias após o aumento da ingestão de F. Os aumentos observados nas unhas ocorreram dentro dos limites do IC de 95% para o tempo médio de detecção de F nas unhas. Levando em conta a quantidade de amostra fornecida pelas unhas dos dedos maiores dos pés, juntamente com a sua taxa de crescimento mais rápida, bem como o fato das unhas dos pés serem menos propensas a contaminação ambiental, os autores consideraram que elas são os biomarcadores mais apropriados para se avaliar a ingestão de F.

O método utilizado para a preparação e análise das unhas também deve ser considerado. Todos os trabalhos posteriores ao trabalho de Whitford et al. (1999) utilizaram a difusão facilitada por HMDS (hexamethyldisiloxane) (método de Taves (1968) conforme modificado por Whitford (1996)). Whitford (2005) comparou seus resultados prévios (WHITFORD et al., 1999) com os de outros autores que utilizaram técnicas de preparo e análise diferentes. Apesar do efeito dose-resposta ter sido observado nestes estudos entre a exposição ao F e a sua concentração nas unhas, valores significativamente maiores ou menores foram observados, devendo-se ter cautela quando se comparam estudos com metodologias diferentes. O método por HMDS possui algumas vantagens como não ser necessário incinerar as unhas para avaliar a concentração de F, a limpeza com escova e água deionizada não afeta o F

incorporado às unhas, reforçando o conceito de que o F incorporado é proveniente do plasma sanguíneo (WHITFORD et al., 1999).

O trabalho de Fukushima et al. (2009) avaliou a influência da concentração de F na água, idade, sexo, taxa de crescimento das unhas e área geográfica na concentração de F nas unhas das mãos e dos pés. Trezentos voluntários distribuídos em 4 grupos de idade (3-7, 14-20, 30-40, 50-60 anos), residentes em cinco regiões brasileiras (A-E) participaram do estudo. A média das concentrações de F na água ($\pm$ SE, mg/l) foram $0,09 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,01$; $0,66 \pm 0,01$; $0,72 \pm 0,02$ e $1,68 \pm 0,08$ de A-E, respectivamente. A média das concentrações de F ($\pm$ SE, μ g/g) variou entre $1,38 \pm 0,14$ (A, 14-20 anos) e $10,20 \pm 2,35$ (D, 50-60 anos) para as unhas das mãos e entre $0,92 \pm 0,08$ (A, 14-20 anos) e $7,35 \pm 0,80$ (E, 50-60 anos) para as unhas dos pés. Entre os fatores testados, a área geográfica e concentração de F na água foram os que mais exerceram influência sobre as concentrações de F nas unhas, tanto das mãos quanto dos pés. Os indivíduos dos grupos etários mais velhos (30-40 e 50-60 anos) apresentaram os níveis de F mais altos. As mulheres também tiveram concentrações de F mais altas do que os homens. Os autores concluíram que estes fatores devem ser levados em conta quando as unhas são usadas como biomarcadores de exposição ao F na predição ao risco de fluorose dentária.

Almeida, Cardoso e Buzalaf (2007) estimaram a ingestão diária total de F por crianças de 1 a 3 anos de idade a partir da dieta e do dentifrício. De acordo com os resultados do estudo, não houve correlação significativa entre a concentração de F nas unhas dos pés e a ingestão total de fluoreto. Isto demonstra que pequenas variações na ingestão diária de F não podem ser detectadas nas unhas, sugerindo que as unhas são bons indicadores a longo prazo e não suficientemente sensíveis para detectar pequenas variações do dia-a-dia.

Vale salientar que quase nenhum estudo até hoje correlacionou a severidade da fluorose com a concentração de F presente nas unhas de crianças na idade de formação dos dentes permanentes. Até o presente momento, apenas um estudo feito com crianças brasileiras correlacionou as amostras de unhas de crianças no momento de formação dos dentes permanentes e a prevalência de fluorose posteriormente na dentição permanente. O objetivo deste estudo foi validar o uso das concentrações de F presente nas unhas em idades de 2-7 anos como preditoras

do risco de desenvolvimento de fluorose dentária na dentição permanente. Cinquenta e seis crianças (33 de uma área artificialmente fluoretada e 23 de uma área naturalmente fluoretada) de ambos os gêneros (10-15 anos de idade) tiveram os incisivos e pré-molares examinados para fluorose dentária usando o índice de Thylstrup-Fejerskov (TFI) (1978). As concentrações de F das unhas das mãos foram obtidas a partir de estudos anteriores, quando as crianças tinham de 2-7 anos de idade. Uma relação dose-resposta foi observada para as concentrações de F presentes nas unhas em relação à concentração de F na água de abastecimento. As concentrações médias de F (DP) nas unhas, encontradas para os voluntários residentes nas áreas contendo 0,1, 0,6-0,8 e 2,3 mg de F/L na água de abastecimento foram de 1,75 (0,46), 3,01 (1,36) e 6,28 (2,69) $\mu\text{g/g}$ respectivamente, sendo estas diferenças significativas. A prevalência de fluorose dentária foi de 66,1%. Nenhum dos voluntários residentes na área de baixa concentração de F (0,1 mgF/L) apresentou fluorose. As crianças com fluorose dentária tiveram concentrações de F nas unhas significativamente mais elevadas do que aquelas sem fluorose, e as concentrações aumentaram de acordo com a gravidade da fluorose ($r^2 = 0,47$, $p < 0,0001$). Usando uma concentração de F nas unhas de 2 $\mu\text{g/g}$ como limiar, em idades 2-7 anos, este biomarcador teve uma elevada sensibilidade (0,84) e moderada especificidade (0,53) como preditor de fluorose dentária. O alto valor preditivo positivo indica que as concentrações de F nas unhas podem ser úteis nas pesquisas em saúde pública, uma vez que têm o potencial para identificar cerca de 80% de crianças em risco de fluorose dentária (BUZALAF et al., 2012).

É preciso destacar algumas desvantagens quando as unhas são usadas como biomarcadores como: (1) As unhas podem estar sujeitas a contaminações externas de F como demonstrado por Fukushima, Sampaio e Buzalaf (2008), levando a interpretações errôneas sobre a ingestão excessiva de F; (2) é necessário realizar a extração de F das unhas, o que aumenta o tempo e o custo da análise; (3) algumas unhas não podem ser avaliadas, como aquelas em que é usado esmalte cosmético, pois algumas destas substâncias contém F; (4) o efeito de algumas variáveis pode afetar a taxa de incorporação de F às unhas, o que merece ser estudado (como no caso de algumas doenças de unha) (PESSAN; BUZALAF, 2011).

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO F NO CONTROLE DA CÁRIE

Didaticamente, podemos dividir os tipos de F presentes no ambiente oral em cinco categorias:

- FO: F externo ao esmalte (presente no biofilme e saliva);
- FS: F incorporado na estrutura do cristal, presente na fase sólida; também conhecido como fluorhidroxiapatita.
- FL: F presente no fluido do esmalte (espaços intercristalinos);
- FA: F adsorvido à superfície do cristal, também chamado de F fracamente ligado.
- CaF_2 : material “similar ao fluoreto de cálcio (CaF_2)”; glóbulos depositados sobre o esmalte e biofilme após a aplicação de um produto fluoretado altamente concentrado; atua como um “regulador” do pH e reservatório de cálcio.

Os mecanismos de ação do F no controle da cárie acontecem através da inibição da desmineralização, aceleração da remineralização, podendo ainda o F ter efeito inibitório sobre bactérias orais.

2.3.1 Inibição do processo de Desmineralização (DES)

Se o F está presente no fluido do esmalte (FL), quando ocorre a produção de ácidos pelas bactérias, este F penetra juntamente ao ácido na subsuperfície do esmalte, adsorvendo-se aos cristais e protegendo-os. Quando toda a superfície do cristal está recoberta por FA (100% de cobertura), ela não se dissolve durante uma queda de pH produzida por ácidos de origem bacteriana ($\text{pH} > 4,5$), pois, nesse momento, a composição do cristal se aproxima à da FAP (fluorapatita). Por outro lado, quando o recobrimento é parcial, as superfícies não protegidas podem ser dissolvidas durante o ataque ácido. Apesar do F adsorvido à superfície do cristal (FA) ser o mais importante para prevenir a dissolução ácida, o F presente no fluido do esmalte (FL) tem igual importância, uma vez que quanto maior é a sua concentração, maior é a probabilidade de adsorção (FA) e proteção dos cristais de esmalte. Experimentos laboratoriais utilizando uma concentração pequena de F (1 ppm) em soluções ácidas mostraram redução da dissolução da apatita. Aumentos na concentração de F na solução ácida em contato com a superfície diminuíram a solubilidade logaritmicamente (FEATHERSTONE et al., 1990).

O CaF_2 é uma fonte importante de F para os fluidos orais (FL). Este composto é formado quando a solução fluoretada apresenta valores maiores do que 100 ppm. A formação do CaF_2 é uma reação que ocorre em dois estágios, ou seja, inicialmente é necessária uma leve dissolução da superfície do esmalte, liberando cálcio, o qual num segundo momento reage com o F do agente tópico, formando glóbulos de CaF_2 . Estes glóbulos precipitam não somente em esmalte sadio, mas também no biofilme dentário, película adquirida e porosidades do esmalte (BUZALAF et al., 2011a).

Um aspecto de extrema importância em relação ao CaF_2 é que tais partículas são mantidas sobre a superfície dentária por longo período (semanas ou até meses), provendo F livre durante as quedas de pH no biofilme dentário. Esse F livre passa a fazer parte do “pool” de FL podendo então se adsorver aos cristalitos do esmalte (FA), protegendo-os da dissolução. A durabilidade do CaF_2 sobre a superfície dentária é causada pela adsorção de proteínas e fosfato secundário (HPO_4^{2-}), o que inibe a dissolução do CaF_2 em pH neutro. O fosfato confere a aparência globular vista em microscopia; por isso, esse material é descrito mais frequentemente como

CaF₂-like (*calcium fluoride-like*). Entretanto, quando o pH cai (pH < 5,5), esse fosfato é convertido em fosfato primário (H₂PO₄⁻¹) o qual não é hábil em prevenir a dissolução de CaF₂. Assim, o CaF₂ é dissolvido, liberando-se cálcio e F, o qual passa a fazer parte do “pool” de FL (BUZALAF et al., 2011a).

2.3.2 Aceleração do processo de Remineralização (RE)

Após um desafio ácido, o fluxo salivar com seus componentes tampão (bicarbonato, fosfato e peptídeos) neutraliza os ácidos produzidos pelas bactérias e o pH retorna próximo à neutralidade. Quando o pH é maior que 5,5, a remineralização ocorre naturalmente, uma vez que a saliva é supersaturada em relação ao esmalte dentário. Se a química está correta (supersaturação) na superfície dos cristais parcialmente dissolvidos no interior da lesão, então, uma nova superfície cresce sobre os cristais. O cristal parcialmente dissolvido atua como um "nucleador" para a remineralização. O F age aumentando a velocidade desse processo de remineralização, por se adsorver à superfície (FA) e atrair íons cálcio. Essa cobertura terá uma composição entre hidroxiapatita e fluorapatita, sendo comumente descrita como fluorhidroxiapatita (FS). Por ser menos solúvel do que a apatita contendo carbonato, a fluorhidroxiapatita prevalecerá sobre a primeira, de forma que o cristal será menos solúvel perante um novo desafio ácido do que na sua conformação original.

Em pHs fisiológicos (quando a saliva e o fluido do biofilme estão "em repouso"), a força que dirige a deposição mineral é significativamente maior para a FAP que para a HAP. Isto significa que a proporção de formação de FAP é maior que a de HAP, mesmo em níveis de F tão baixos quanto 0,01 µg/mL. Esta nova camada formada é menos solúvel, devido à exclusão do carbonato e incorporação do F, deixando o esmalte mais resistente frente a novos desafios ácidos. A remineralização ocorre nas camadas mais superficiais, o que também diminui a porosidade do esmalte, prevenindo a saída de mais mineral dissolvido para o meio externo e ao mesmo tempo impedindo a entrada de ácido no tecido. Porém, dependendo da extensão da lesão, não há completa reestruturação (interna) do tecido cariado. Por esse motivo, muitas vezes se observa uma superfície com aspecto brilhante, mas com lesão de mancha branca clinicamente visível. Após

vários ciclos de dissolução e precipitação, os cristais de esmalte podem se tornar totalmente diferentes do seu estado original (BUZALAF et al., 2011a).

2.2.3 Efeitos nas bactérias orais

Além dos mecanismos mencionados, tem sido sugerido que o F atua modificando a fisiologia de células bacterianas, incluindo os *Streptococcus mutans*, o que pode afetar indiretamente o processo de desmineralização (KOO, 2008; MARQUIS, 1995). Lynch, Navada e Walia (2004) concluíram que níveis baixos de F presentes no biofilme e saliva, resultantes do uso de dentifrícios contendo 1500 ppm F são insuficientes para ter um efeito significativo no metabolismo e crescimento bacteriano. No entanto, uma revisão recente concluiu que concentrações de F como as encontradas no biofilme dentário têm atividade biológica sobre fatores críticos de virulência dos *S. mutans in vitro*, como alterações na produção de ácidos e síntese de glucanos, apesar dos achados clínicos ainda não estarem bem esclarecidos (KOO, 2008).

Além disso, numerosos estudos *in vitro* mostraram que os níveis baixos de F, tipicamente encontrados após muitas horas na saliva e no biofilme dentário em “repouso”, e que resultam da utilização regular de dentífricos fluoretados, podem ter um efeito profundo sobre o processo de desmineralização e remineralização do esmalte. Estudos clínicos confirmam o conceito de que a quantidade de F constantemente presente nos reservatórios bucais é de extrema importância no seu efeito cariostático, uma vez que a incidência e atividade de cárie está inversamente relacionada às concentrações de F na saliva e biofilme dentário (GAUGLER; BRUTON, 1982; NOBRE DOS SANTOS et al., 2002).

2.4 DENTIFRÍCIO FLUORETADO NO CONTROLE DA CÁRIE

Os dentifrícios fluoretados são o método de utilização do F mais usado no mundo (ROLLA; OGAARD; CRUZ, 1991) e têm contribuído substancialmente para o declínio na prevalência de cárie dentária observada nos países desenvolvidos nas últimas décadas. Bratthall, Hansel-Petersson e Sundberg (1996) reuniram as

opiniões de um certo número de *experts* internacionais, tentando responder à pergunta específica "Quais são as principais razões pelas quais as pessoas de 20-25 anos têm menos cárie hoje em dia, em comparação a 30 anos atrás?". Um questionário foi enviado a 55 especialistas com uma série de explicações possíveis para serem pontuadas de acordo com uma escala predeterminada. Vinte e cinco itens foram divididos em grupos principais sob o título de dieta, F, biofilme dentário, saliva, dentista/materiais odontológicos dentre outros fatores. Os especialistas foram convidados a responder sobre um país específico ou região, e também a especificar se a área escolhida era fluoretada ou não. O principal resultado do estudo, com uma taxa de resposta de 95%, foi que existe uma variação muito grande no modo como os especialistas pontuam o impacto dos vários fatores possíveis. No entanto, com relação à utilização da pasta de dentes com F, houve um consenso geral do efeito positivo para a diminuição na prevalência de cárie. Escovar os dentes com um dentífrício fluoretado é uma importante medida de saúde pública para o controle da cárie dentária, combinando a remoção ou desorganização do biofilme dentário com o efeito cariostático do F (PESSAN et al., 2006).

O F presente nos dentífrícios apresenta-se mais comumente sob a forma de fluoreto de sódio (NaF) e monofluorofosfato de sódio (MFP) (AMMARI; BLOCH-ZUPAN; ASHLEY, 2003; WARREN; LEVY, 1999). Os dentífrícios podem variar em sua composição, dependendo dos benefícios que cada formulação pretende proporcionar (efeito anti-placa, anti-cálculo, branqueamento etc). Os abrasivos presentes nos dentífrícios são componentes importantes que podem alterar a efetividade clínica do F, por afetar a sua biodisponibilidade. As primeiras formulações de dentífrícios falharam na eficácia anticárie por apresentar sistemas abrasivos incompatíveis com os compostos fluoretados (STEPHEN et al., 1988). No entanto, hoje em dia os sistemas abrasivos são compatíveis com as formulações, contendo F nas formas de MFP e NaF (PESSAN; TOUMBA; BUZALAF, 2011).

Marinho et al. (2003) em uma revisão sistemática com meta-análise avaliaram o efeito dos dentífrícios fluoretados no incremento de cárie, envolvendo 42.300 crianças e adolescentes. Esta revisão demonstrou que crianças de 5 a 16 anos que usaram o F na forma de dentífrícios, enxaguatórios bucais, géis ou vernizes tinham menos dentes cariados, perdidos ou obturados, independentemente da condição de fluoretação da água potável. Devido ao grande número de estudos de alta qualidade

envolvidos nesta revisão sistemática (n= 70), pode-se afirmar que existe uma forte evidência da eficácia clínica dos dentifrícios no controle da cárie para esta faixa etária (a fração prevenida de CPO-S agrupando-se os estudos foi de 24%). Contrariamente aos enxaguatórios bucais, géis ou vernizes, o efeito dos dentifrícios fluoretados no controle da cárie aumentou de acordo com valores maiores de CPO-S no *baseline*, concentração de F presente nos dentifrícios, frequência de escovação e supervisão do uso. Apesar do grande número de estudos avaliados, não foram fornecidas informações suficientes em relação à dentição decídua e possíveis efeitos adversos como a fluorose. Twetman (2009) examinou na literatura recente o efeito preventivo dos dentifrícios fluoretados em crianças e os resultados foram semelhantes aos de Marinho et al. (2003) (fração prevenida de 25%), reforçando o papel proeminente do dentifrício fluoretado como uma medida eficaz de prevenção da cárie em crianças.

No entanto, o uso inadvertido dos dentifrícios fluoretados tem sido fortemente relacionado ao aumento na prevalência de fluorose dentária (MASCARENHAS, 2000; WARREN; LEVY, 1999), devido ao fato de que crianças na primeira infância geralmente ingerem grandes quantidades de dentifrícios durante a escovação, como descrito anteriormente (DE ALMEIDA; DA SILVA CARDOSO; BUZALAF, 2007; LIMA, Y.B.; CURY, 2001). Algumas alternativas têm sido propostas para reduzir a ingestão excessiva de F por crianças na primeira infância através do dentifrício, como descrito no próximo capítulo.

2.5 ALTERNATIVAS PARA A DIMINUIÇÃO DA INGESTÃO EXCESSIVA DE F A PARTIR DOS DENTIFRÍCIOS

2.5.1 Diminuição da quantidade de dentifrício usado na escovação

Wong et al. (2010), em sua revisão sistemática, não encontraram associação significativa entre a frequência de escovação ou a quantidade de dentifrício utilizada e a ocorrência de fluorose dentária. No entanto, o estudo de Paiva e Cury (2001) demonstrou que há forte correlação entre a quantidade de dentifrício usada por crianças brasileiras e a dose de F a que elas são submetidas. No estudo de Lima e

Cury (2001) foi relatado que se as crianças utilizassem 0,3 g de dentifrício por escovação, os dentifrícios em conjunto com a dieta as submeteriam a uma dose segura para fluorose dentária, considerando o limiar de 0,05 a 0,07 mg F/kg/dia (BURT, 1992).

Uma possível alternativa para diminuir a quantidade de dentifrício colocado na escova seria a utilização da técnica "transversal", em que o dentifrício em forma de pasta é colocado posicionando-se o tubo perpendicularmente ao longo eixo da escova, obtendo-se uma quantidade de dentifrício correspondente a um grão de ervilha (VILLENA, 2000). A Associação Européia de Odontopediatria recomenda a utilização de uma quantidade mínima de dentifrício de baixa concentração de F a partir dos 6 meses aos 2 anos de idade e a utilização de uma quantidade de dentifrício contendo 550 ppm F correspondente ao tamanho de uma ervilha para crianças de 2-6 anos de idade, duas vezes ao dia (OULIS; RAADAL; MARTENS et al., 2000).

Alguns estudos têm sido realizados para avaliar as diferentes formas de utilização dos dentifrícios (HAMILTON, 2001; HOLT et al., 1994; HOROWITZ, 1992; LIMA, Y.B.; CURY, 2001; BUZALAF et al., 2002). Dentre eles, o uso de um dentifrício líquido tem sido sugerido como uma formulação potencialmente melhorada, prevenindo o desenvolvimento de lesões de cárie interproximais. Deve-se destacar que o termo "dentifrício líquido" se refere a um produto com uma consistência de gel, tal como os dentifrícios em forma de gel tradicionais, mas com uma viscosidade mais baixa (SILVA et al., 2004). Vilhena et al. (2008) avaliaram a quantidade de creme dental e dentifrício líquido colocada na escova por escolares de 4 a 8 anos, residentes nas cidades de Bauru e Bariri, ambas no estado de São Paulo. A quantidade média de creme dental dispensada pelos participantes foi de 0,41 g em Bauru e 0,48 g em Bariri. Já a quantidade média de dentifrício líquido dispensado pelos participantes da amostra tanto em Bauru quanto em Bariri foi de 0,15 g. Segundo Villena (2000) uma quantidade maior do que 0,50 g pode levar ao risco de fluorose. De acordo com os resultados do estudo, 28% dos participantes aplicaram uma quantidade de creme dental maior do que deveria (mais do que 0,50 g). No entanto, nenhuma das crianças em idade escolar excedeu a quantidade recomendada quando o dentifrício líquido foi utilizado. Este dentifrício foi dispensado através da técnica da "gota", em que uma gota de dentifrício é colocada na escova

de dentes, possibilitando uma significativa redução e ao mesmo padronização da quantidade de dentifrício dispensada, quando comparado com o uso do creme dental. Deve-se destacar que neste estudo foram usados produtos comerciais (creme dental e dentifrício líquido). Assim, o pequeno orifício do tubo do dentifrício líquido pode ter contribuído para uma menor quantidade de dentifrício utilizado quando comparado com a pasta de dentes. O tamanho do orifício é muito importante para assegurar uma menor dosagem do dentifrício, o que deve ser responsabilidade dos fabricantes produzir embalagens com abertura de dispensamento pequena ou com uma quantidade fixa, no caso de dentifícios voltados ao público infantil (WARREN; LEVY, 1999). Também é importante que a escovação seja realizada por um adulto até que a criança desenvolva habilidade motora para realizá-la sozinha, ocasião em que a mesma deve ser supervisionada por um adulto, até que a criança complete 6 anos de idade. Outra medida necessária é instruir as crianças a expelirem o máximo possível a espuma que resta na cavidade bucal após a escovação. A frequência de escovação recomendada é de duas vezes ao dia, sendo uma delas preferencialmente antes de dormir. Também se deve evitar o enxágue da cavidade bucal com grande volume de água após a escovação (DAVIES, R.M.; ELLWOOD; DAVIES, 2003) e evitar que crianças utilizem dentifícios com sabor infantil, já que o sabor agradável aumenta a porcentagem de ingestão de dentifrício (KOBAYASHI et al., 2011). Ressalte-se que o dentifrício deve ser sempre mantido fora do alcance das crianças.

Adicionalmente, os órgãos de saúde oficiais deveriam rever as normas para rotulagem dos dentifícios, deixando a concentração de F mais evidente, além de reformular as normas para instruções relacionadas ao uso prudente do dentifrício por crianças na primeira infância.

2.5.2 Diminuição da concentração de F presente nos dentifrícios

Reed (1973) avaliou a eficácia anticárie de três dentifrícios contendo fluoreto de sódio, em diferentes concentrações (250, 500, 1000 ppm F) comparados a um grupo controle, que usou dentifrício placebo contendo apenas pirofosfato de cálcio como abrasivo (presente em todas as formulações). Foram avaliadas 2104 crianças de 5 a 14 anos de idade, através de inspeções visual-tátil e radiográfica no início do estudo e após 12 e 24 meses de utilização dos dentifrícios. Após 12 meses de estudo, os dentifrícios contendo 250, 500 e 1000 ppm F apresentaram reduções no índice CPO-D de 20%, 24% e 34%, respectivamente, e, aos 24 meses de 16%, 15% e 24%, sendo significativamente melhores quando comparados ao grupo controle. A redução do índice CPO-S aos 12 meses foi de 14%, 15% e 21%, respectivamente e aos 24 meses de 8%, 8% e 20%. Tanto o dentifrício de 550 ppm F quanto o de 1000 ppm F tiveram uma redução no índice CPO-S significativamente maior em relação ao grupo controle aos 12 meses, no entanto, apenas o dentifrício de 1000 ppm F teve redução do índice CPO-S significativamente melhor que o controle aos 24 meses de estudo.

Gerdin (1974) realizou um estudo clínico de dois anos, no qual um grupo de 115 crianças pré-escolares usou um dentifrício contendo fluoreto de sódio (1000 ppm F) e outro grupo de 115 crianças um dentifrício contendo fluoreto de potássio e magnésio, com baixa concentração de F (250 ppm) e pH ácido (5,5). As crianças tinham 3,5 anos de idade no início do estudo. A escovação foi feita em casa, sob supervisão e ajuda dos pais, pelo menos duas vezes ao dia. Os dois grupos foram comparados quanto ao incremento de cárie a cada seis meses, até o final do estudo. O incremento de cárie tanto um ano após quanto ao final do estudo foi maior para o grupo que usou o dentifrício contendo 1000 ppm F quando considerado o cpo(s) excluindo-se as superfícies oclusais, e não diferiu significativamente do grupo que usou o dentifrício de baixa concentração de F e pH ácido quando foram consideradas as superfícies oclusais. Os resultados indicaram que a eficácia anticárie do dentifrício de baixa concentração de F e pH ácido é similar à do dentifrício contendo 1000 ppm F.

Koch et al. (1982) compararam em um estudo clínico, o efeito de dois dentifrícios contendo 1000 ppm F e um dentifrício contendo 250 ppm F, usados por

541 crianças de 12 e 13 anos de idade, que foram aleatoriamente divididas entre os três grupos. As crianças foram examinadas para cárie no início do estudo e ao final de 12 meses de uso dos dentifrícios. O incremento de cárie não diferiu significativamente entre os grupos, mostrando que o uso regular de dentifrícios contendo 250 ppm F é tão efetivo no controle da cárie quanto o uso de dentifrícios convencionais, o que está de acordo com os estudos de Reed (1973) e Gerdin (1974).

Beltrán e Szpunar (1988) avaliaram a evidência clínica e epidemiológica da relação entre o dentifrício ingerido durante a escovação e a fluorose. Eles concluíram que as crianças na primeira infância (menores de 3 anos de idade) podem estar acidentalmente ingerindo quantidades de F suficientemente necessárias para se atingir o nível de F considerado ótimo para o desenvolvimento da fluorose. Os autores recomendam duas medidas para a redução da ingestão de F através do dentifrício: 1- desenvolvimento de dentifrícios com baixa concentração de F para serem usados por crianças pequenas; 2- supervisão da escovação pelos pais para que a criança use uma pequena quantidade de dentifrício. Horowitz (1992) concorda que com a diminuição da prevalência da cárie pela fluoretação da água e disseminação do uso do dentifrício fluoretado, deve-se considerar o uso de dentifrícios contendo 400-500 ppm F por crianças pré-escolares, em idade de risco para o desenvolvimento de fluorose.

Na revisão de Warren e Levy (1999) vários estudos demonstram uma reduzida eficácia anticárie dos dentifrícios de baixa concentração de F em comparação ao dentifrício contendo 1000 ppm de F. No entanto, dentre os estudos, apenas um foi conduzido com crianças pré-escolares (GERDIN, 1974), o qual não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o dentifrício contendo 250 e 1000 ppm F. Deve ser ressaltado, entretanto, que no estudo de Gerdin (1974) o dentifrício contendo 250 ppm F tinha pH acidulado (5,5). Além disso, a maioria dos estudos compara dentifrícios com uma concentração de F muito baixa (250 ppm F) em relação aos convencionais, sendo necessário a realização de mais estudos com dentifrícios de concentração intermediária, contendo 500-550 ppm F. O único estudo desta revisão que utilizou dentifrícios contendo 500-550 ppm F e crianças pré-escolares foi o de Winter, Holt e Williams (1989). Após 3 anos de uso dos dentifrícios, foi observado um pequeno incremento de cárie (10%) para o grupo que

usou o dentifrício de baixa concentração de F, quando comparado ao grupo que usou o dentifrício convencional (1055 ppm F). No entanto, esta diferença não foi significativa. Os autores desta revisão concordam que mais estudos clínicos controlados randomizados envolvendo dentifrícios de baixa concentração de F e crianças pré-escolares deveriam ser feitos, com suficiente duração e acompanhamento para que esta questão possa ser solucionada.

Uma revisão sistemática de estudos clínicos randomizados comparando dentifrícios fluoretados de baixa concentração de F (600 ppm F ou menos) com dentifrícios contendo 1000 ppm de F ou mais usados por crianças ou adultos foi realizada por Ammari, Bloch-Zupan e Ashley (2003). Sete estudos clínicos randomizados foram incluídos e divididos em dois grupos, de acordo com a concentração de flúor do grupo de baixa concentração (250 ou 500 ppm) e analisados separadamente. Resultados da meta-análise para o grupo contendo dentifrícios com 250 ppm F foram estatisticamente significantes ($p = 0,002$ e $0,0005$) e favoráveis ao grupo controle (1000 ppm). O incremento de cárie (CPO-S) para o grupo com dentifrícios contendo 250 ppm F foi 0,6-0,7 vezes maior do que para o grupo com 1000 ppm F. Apenas dois estudos foram incluídos na categoria dos dentifrícios contendo 500 ppm F, e um deles não apresentou os valores de cárie no baseline, portanto a meta-análise não foi realizada. Os autores concluíram que os dentifrícios contendo 250 ppm F não foram tão eficazes no controle da cárie na dentição permanente quando comparados ao dentifrício contendo 1000 ppm F ou mais. No entanto, mais estudos deveriam ser realizados para testar a eficácia anticárie de dentifrícios contendo 500 ppm F quando comparados aos dentifrícios convencionais (1000 ppm F ou mais).

Steiner, Helfenstein e Menghini (2004) estimaram o efeito do dentifrício contendo 1000 ppm F em relação ao dentifrício de 250 ppm de F, através de estudos experimentais que analisaram o incremento de cárie comparando estes dentifrícios, e que foram resumidos por meio de uma meta-análise. Através da meta-análise, foram encontrados incrementos ligeiramente mais baixos de cárie (14%, 13%) para as crianças que usaram dentifrícios contendo 1000 F ppm em comparação àquelas que usaram dentifrícios contendo 250 ppm F. Por outro lado, a utilização de pastas de 1000 ppm de F estava associada ao o risco de fluorose dentária. Considerando

esses resultados, os autores consideraram justificável manter o uso de pastas de 250 ppm F para crianças pré-escolares na Suíça.

Uma revisão sistemática com meta-análise em rede foi publicada recentemente, tendo como foco a avaliação da evidência disponível em relação à concentração de fluoreto em dentifrícios e a prevenção de cáries em crianças e adolescentes. Esta revisão compilou os resultados de 83 estudos clínicos independentes. A duração mínima do estudo para a inclusão na revisão foi de 12 meses, e o mais longo acompanhamento relatado teve um período de 7 anos. Os autores relataram que as frações prevenidas aumentam conforme as concentrações de F nos dentifrícios aumentam. Quando comparados ao dentifrício placebo, apenas os dentifrícios contendo 1000 ppm F ou mais previnem significativamente mais cáries na dentição permanente em crianças e adolescentes (WALSH et al., 2010). Entretanto, os autores reconhecem que há um grande número de estudos comparando dentifrícios com concentrações de fluoreto entre 1000 e 1250 ppm F com dentifrício placebo (67 estudos), sendo que foram inclusos apenas 2 estudos que comparavam dentifrícios com concentrações de fluoreto entre 440 e 550 ppm F com dentifrício placebo, o que é uma importante limitação para a interpretação dos dados. Além disso, existem poucos estudos que avaliam a dentição decídua e, neste caso, ainda há incerteza sobre a eficácia anticárie de dentifrícios com baixa concentração de flúor (cerca de 500 ppm F) comparado à eficácia do dentifrício convencional (cerca de 1100 ppm F) (WALSH et al., 2010; WONG et al., 2010). É precisamente nesta idade que a ingestão excessiva de F pode levar à fluorose dentária em incisivos centrais superiores permanentes (BARDESEN, 1999; BUZALAF; LEVY, 2011; HONG et al., 2006a; HONG et al., 2006b).

Um dos estudos que comparou dentifrícios com concentrações de fluoreto entre 440 e 550 ppm F com dentifrício placebo foi o de Davies et al. (2002). Os autores avaliaram o impacto do fornecimento regular de dentifrícios fluoretados para crianças inicialmente com 12 meses de idade, que viviam em áreas de alto risco à cárie em nove distritos do noroeste da Inglaterra, sobre o nível de cárie na dentição decídua aos 5-6 anos de idade. Além disso os autores compararam a eficácia na redução de cárie entre um dentifrício contendo 440 ppm F (Colgate Gel 0-6 anos) e outro contendo 1450 ppm F (Colgate Sabor Regular Adulto). Participaram do estudo 7422 crianças que foram aleatoriamente alocadas para os grupos teste ou controle

dentro de cada distrito. Os dados clínicos foram coletados quando as crianças tinham de 5-6 anos de idade. Foram avaliados o índice ceo-d, dentes perdidos e a prevalência de cárie. Das 3731 crianças que permaneceram no estudo, o índice ceo-d foi de 2,15 para o grupo que usou o dentifrício contendo 1.450 ppm F e de 2,49 para o grupo que usou o dentifrício contendo 440 ppm F. O ceo-d médio para o grupo controle foi de 2,57. Esta redução de 16% entre o grupo que utilizou o dentifrício contendo 1450 ppm F e o grupo controle foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A diferença entre o grupo que utilizou o dentifrício contendo 440 ppm F e o grupo controle não foi significativa. No entanto, os resultados devem ser analisados com cautela, uma vez que as crianças participantes do estudo viviam em regiões não fluoretadas e eram de alto risco à cárie.

Outra revisão sistemática com meta-análise publicada recentemente (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2012) compara o efeito anticárie de dentifrícios com diversas concentrações de F em crianças pré-escolares. As frações prevenidas (FP) e os riscos relativos (RR) foram estimados separadamente para os estudos testando dentifrícios de baixa concentração de F (<600 ppm) e dentifrícios convencionais (1000-1500 ppm F). Oito estudos clínicos preencheram os critérios de inclusão e a maioria deles comparou a ação de dentifrícios fluoretados associados à educação em saúde bucal em relação a nenhuma intervenção. No entanto, apenas três estudos compararam dentifrícios de baixa concentração de F e apenas um deles comparou este dentifrício em relação ao convencional (DAVIES et al., 2002). Quando os dentifrícios fluoretados convencionais foram comparados ao placebo ou nenhum tratamento, foi observada a redução de cárie na superfície dentária (FP = 31%, 95% IC 18-43; 2644 participantes em cinco estudos), dente (FP = 16%; IC 95% 8-25; 2555 participantes em um estudo) e indivíduos (RR = 0,86, 95% IC 0,81-0,93; 2806 participantes em dois estudos). Os dentifrícios de baixa concentração de F foram eficazes apenas quando se considerou a superfície dentária (PF = 40%, 95% IC 5-75; 561 participantes em dois estudos). Os autores concluíram que os dentifrícios convencionais são eficazes na redução da cárie dentária em dentes decíduos de crianças pré-escolares e, portanto, o seu uso deve ser recomendado para essa faixa etária.

Diante da incerteza em relação ao potencial de prevenção de cáries de dentifrícios com baixa concentração de F, têm-se buscado estratégias para tornar

seu potencial preventivo similar ao de um dentifrício convencional (1000 ppm de fluoreto). Uma delas é a redução do pH dos dentifrícios, uma vez que a taxa de formação de CaF_2 aumenta com a diminuição do pH, concentrações crescentes de F do agente fluoretado e longos períodos de contato com a superfície dentária (OGAARD, 2001; BUZALAF et al., 2011a). Estes depósitos têm sido reconhecidos como as fontes lábeis de F mais importantes na superfície dental, provendo F livre durante as quedas de pH no biofilme dentário (VOGEL, 2011). Esse F livre passa a fazer parte do “pool” de FL podendo então se adsorver aos cristalitos do esmalte (FA), protegendo-os da dissolução como descrito anteriormente. Negri e Cury (2002) demonstraram que a quantidade de CaF_2 formado após o tratamento com um dentifrício ácido com baixa concentração de F (NaF, 550 ppm F, pH 5,5) é equivalente àquela obtida após o uso de um dentifrício comercial contendo 1100 ppm F.

Além disso, a eficácia clínica de produtos tópicos fluoretados está diretamente relacionada com os níveis intraorais de F (DUCKWORTH; MORGAN; GILBERT, 1992). Pessan et al. (2010) determinaram os efeitos de dentifrícios placebo, com baixa concentração de F (500 ppm) e convencional (1100 ppm) sobre as concentrações de flúor ([F]) no biofilme dentário de crianças que viviam em comunidades contendo 0,04, 0,72 e 3,36 ppmF na água de abastecimento. As crianças utilizaram os dentifrícios duas vezes por dia, durante 1 semana. Amostras de biofilme dentário foram coletadas 1 e 12 horas após a última utilização dos dentifrícios, sendo analisadas para o F e para o cálcio. Aumentos semelhantes foram encontrados 1 hora após a escovação para as crianças que usaram dentifrícios com baixa [F] (ca. 1,9 mmolF/kg) e convencionais (ca. 2,4 mmolF/kg) nas comunidades contendo 0,04 e 0,72 $\mu\text{gF/mL}$ na água. Apesar dos aumentos terem sido menos pronunciados na comunidade contendo 3,36 $\mu\text{gF/mL}$ na água, os resultados indicam que o dentifrício de baixa concentração de F parece promover um incremento de F no biofilme dentário após a escovação proporcionalmente maior em relação àquele causado pelo dentifrício convencional, quando ambos são comparados ao placebo. Em um estudo anterior foi observada uma incorporação aumentada de F no biofilme dentário quando dentifrícios ácidos foram utilizados em uma comunidade fluoretada (BUZALAF et al., 2009). Sendo assim, outra hipótese

plausível para explicar a eficácia aumentada dos dentífrícios ácidos seria o seu potencial para melhorar a incorporação de F no biofilme dentário.

A retenção de F no biofilme dentário após a escovação é importante, considerando que a maioria dos indivíduos não remove completamente o biofilme dentário durante a escovação. Neste sentido, as estratégias para aumentar a eficácia cariostática do F devem incluir métodos para promover o aumento de F no biofilme dentário, como o aumento da quantidade de cálcio disponível para reagir com o F. Esta medida é particularmente relevante para os indivíduos cárie-ativos, os quais removem biofilme dentário com menos eficiência durante a escovação.

O estudo de Olympio et al. (2007) avaliou a concentração de F na saliva total e a biodisponibilidade do F após o uso de dentífrícios com baixa concentração de F e pH reduzido. A saliva total foi coletada de 10 voluntários após a escovação com dentífrícios experimentais contendo 275, 550 e 1.100 ppm F (pH 5,5), dentífrício comercial com 500 ppm F (pH 6,9) e um dentífrício 'padrão ouro', contendo 1100 ppm F (pH 6,5). Para analisar a biodisponibilidade do F, 9 voluntários ingeriram quantidades de quatro dentífrícios equivalentes a 2 mg F. A saliva do ducto e urina foram coletadas. O F foi analisado com o eletrodo e os resultados mostraram que o dentífrício contendo 550 ppm F (pH 5,5) teve efeito semelhante ao "padrão ouro" sobre a concentração de F na saliva total. A área sob a curva de concentração de F da saliva ductal x tempo e as taxas de excreção urinária de F não diferiram entre os dentífrícios. Os resultados mostraram que a redução do pH do dentífrício leva a um aumento na concentração de F na saliva após a escovação, sem alterar a biodisponibilidade do F.

Brighenti et al. (2006) compararam *in vitro* o efeito de dois dentífrícios acidulados com baixa concentração de F (412 e 550 ppm F) com dentífrícios neutros. Blocos de esmalte bovino foram selecionados através da microdureza superficial (SMH) e alocados aleatoriamente em doze grupos de 13 blocos, de acordo com a concentração de F (placebo, 275, 412, 550 ou 1.100 ppm F) e pH dos dentífrícios (7,0 ou 5,5). Dois dentífrícios comerciais foram também estudados, sendo um contendo 1.100 ppm F, pH 7,0 (CrestTM, controle positivo) e um dentífrício infantil (Colgate BabyTM, 500 ppm F, pH 7,0). Os blocos foram submetidos à ciclagem de pH durante 7 dias e o tratamento com os dentífrícios foi realizado duas

vezes ao dia. As microdurezas superficial e longitudinal foram avaliadas para calcular a variação percentual da dureza (%SMH) e a perda mineral (ΔZ). A quantidade de F, cálcio e fósforo nas soluções após a ciclagem de pH também foi analisada. Em comparação aos dentífricos neutros, os dentífricos acidulados apresentaram redução da variação percentual da dureza (%SMH) em todas as concentrações de F. Maiores concentrações de F e menores concentrações de Ca e P foram encontradas para os dentífricos ácidos. Com relação à perda mineral (ΔZ), apenas os grupos controle positivo (1.100 ppm F, ácido e neutro) não foram estatisticamente diferentes. Os dentífricos ácidos mostraram uma relação dose-resposta em todas as variáveis. Para os dentífricos de baixa concentração de F, apenas o de 500 ppm F ácido teve a mesma ação anticariogênica do dentífrico contendo 1.100 ppm F neutro.

Alves et al. (2007) avaliaram a eficácia de dentífricos ácidos de baixa concentração de F em relação aos dentífricos convencionais neutros. Blocos de esmalte foram submetidos à ciclagem de pH e tratados com *slurries* de dentífricos contendo 0, 275, 412, 550 e 1100 ppm F (pH 4,5 ou 7,0) e também por um dentífrico comercial convencional (CrestTM, 1100 ppm F, pH 7,0) e outro comercial infantil (Colgate BabyTM, 500 ppm F, pH 7,0). Foram analisadas as variações na dureza de superfície e no conteúdo mineral do esmalte após a ciclagem de pH. Menor perda mineral foi observada para os blocos de esmalte tratados com dentífricos ácidos, quando comparados aos blocos tratados com dentífricos neutros (ANOVA; $p < 0,05$). Os dentífricos ácidos contendo 412 e 550 ppm F demonstraram eficácia equivalente a do dentífrico contendo 1100 ppm F e pH neutro e a do dentífrico comercial (1100 ppm F).

Nobre-dos-Santos et al. (2007) avaliaram a eficácia do dentífrico de baixa concentração de F e pH ácido em um estudo *in situ* cruzado duplo-cego, realizado em 3 fases de 45 dias. Seis voluntários adultos usaram dispositivos palatinos contendo 6 blocos de esmalte humano previamente desmineralizados, os quais foram submetidos 3 vezes ao dia a um dos seguintes tratamentos: dentífrico não fluoretado (controle negativo); dentífrico contendo 1100 ppm F, pH 7,0 (controle positivo); dentífrico contendo 550 ppm F, pH 5,5 (experimental). Ao final de cada fase, a remineralização do esmalte foi avaliada através da microdureza longitudinal e a formação de F tanto fracamente quanto fortemente ligado foi avaliada sobre a

superfície do esmalte. Os dentifrícios fluoretados foram mais eficazes que o controle negativo na formação de F fracamente e fortemente ligado no esmalte ($p < 0,05$). No entanto, o controle positivo teve maior formação de F fracamente ligado do que os demais tratamentos ($p < 0,05$). A análise de microdureza demonstrou que os dentifrícios fluoretados foram mais eficazes na remineralização do esmalte quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$); no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, comprovando a eficácia do dentifrício de baixa concentração de F e pH ácido em relação ao convencional.

Tentativas para melhorar a eficácia de dentifrícios contendo menos do que 1000 ppm F têm incluído combinações de F e outros agentes mineralizantes, com a hipótese de que agentes mineralizantes, tais como cálcio, fosfato, estrôncio, etc, podem funcionar sinergicamente com F (FEAGIN et al., 1971; KARLINSEY et al., 2011; PFARRER; KARLINSEY, 2009). Karlinsey et al. (2011) testaram *in vitro* o potencial remineralizador de lesões de mancha branca em esmalte bovino e humano usando um modelo de 10 dias de ciclagem de pH. O estudo envolveu os seguintes dentifrícios NaF à base de sílica: 1) placebo (0 ppm F), 2) 500 ppm F, 3) 1150 ppm F, e 4) 500 ppm F mais fosfato tricálcico (fTCP). Após a ciclagem, foram analisadas a microdureza de superfície (SMH), a incorporação de F no esmalte (EFU) e a microdureza longitudinal (CSM). Análises estatísticas revelaram diferenças significativas (ANOVA, LSD, $p < 0,05$) entre os quatro grupos, em que o dentifrício placebo e o de 500 ppm F apresentaram potencial remineralizador significativamente menor em relação aos dentifrícios contendo 1150 ppm F e 500 ppm F mais fTCP. Takeshita et al. (2009), Takeshita et al. (2010) e Delbem et al. (2012) avaliaram *in situ* e *in vitro* o efeito de dentifrícios de baixa concentração de F contendo trimetafosfato de sódio (TMP), adicionado ou não de citrato de cálcio (Cacit) na desmineralização do esmalte. Os autores verificaram que a adição de TMP ao dentifrício de 550 ppm F permitiu um efeito remineralizador semelhante ou maior, em comparação a um dentifrício convencional (1100 ppm F) e que a adição de Cacit proporcionou efeito semelhante com relação à redução de perda mineral quando comparado a um dentifrício contendo 1100 ppm F. Também tem sido relatado que dentifrícios contendo TMP e F podem promover uma maior remineralização quando comparados com dentifrícios contendo apenas F, em protocolo *in vitro* empregando

esmalte bovino previamente desmineralizado (TAKESHITA et al., 2011). No entanto, até o momento não existem estudos clínicos avaliando estas formulações.

Um estudo clínico randomizado envolvendo 1402 crianças de 4 anos de idade com experiência de cárie foi realizado para avaliar a eficácia clínica do dentifrício ácido. Estas crianças foram aleatoriamente alocadas a 4 grupos que diferiram em relação ao tipo de dentifrício utilizado durante 20 meses, a saber: G1 – dentifrício líquido (1.100 ppm F, NaF, pH 4,5, n=345), G2 – dentifrício líquido (1.100 ppm F, NaF, pH 7,0, n=343), G3 – dentifrício líquido (550 ppm F, NaF, pH 4,5, n=354), G4 – creme dental comercial (controle -1.100 ppm F, NaF, pH 7,0, n=360). Os dentifrícios líquidos e o creme dental foram aplicados na escova usando as técnicas “da gota” (VILHENA et al., 2008) e transversal (VILHENA, 2000), respectivamente. A progressão de cárie (ceo-s) foi avaliada no baseline e após 20 meses do uso contínuo dos respectivos dentifrícios, nas 1.053 crianças que permaneceram no estudo. Não houve diferenças significativas entre os grupos no ceos e na porcentagem de incremento de ceo-s. Em adição, foi conduzido um estudo com uma subamostra das crianças envolvidas no estudo randomizado, a fim de se avaliar a concentração de F presente no biofilme dentário dentário (n=21) uma hora após a escovação, bem como nas unhas das mãos e dos pés (n=15). Após estarem utilizando os dentifrícios por 12 meses, solicitou-se a estas crianças que escovassem apenas a oclusal dos dentes na noite anterior à coleta de biofilme. Na manhã seguinte, as crianças escovaram a oclusal dos dentes com os respectivos dentifrícios e então foi coletado o biofilme dentário da boca toda. Foram obtidas também amostras de unhas das mãos e dos pés das crianças para análise de F. Os dentifrícios líquidos levaram a concentrações de F significativamente maiores no biofilme e significativamente menores nas unhas (reduzida biodisponibilidade do F) quando comparados ao creme dental, levantando-se a hipótese de que a consistência do dentifrício desempenha um papel importante na sua capacidade de incorporar F no biofilme dentário. O uso do dentifrício acidulado a longo prazo, resultou em concentrações de F nas unhas mais baixas, sugerindo ingestão de menor quantidade de F a partir do dentifrício (BUZALAF et al., 2009). A redução do pH de 7,0 para 4,5 no dentifrício de 1100 ppm F praticamente dobrou a incorporação de F no biofilme, sendo que a concentração de F no biofilme após o uso do dentifrício de 550 ppm F pH 4,5 foi praticamente a mesma daquela observada no

caso do dentifrício de 1.100 ppm F e pH 7,0. Estes resultados indicam que a eficácia cariostática dos dentifrícios com baixa concentração de F (550 ppm F) e pH reduzido é similar àquela apresentada pelos dentifrícios convencionais (1100 ppm F) com pH neutro (VILHENA et al., 2010). Os estudos acima descritos foram conduzidos numa área otimamente fluoretada (0,6-0,8 µgF/mL).

Um ponto que merece destaque quando se pensa no tipo ideal de dentifrício a ser indicado para se obter a melhor relação benefício-risco é que a recomendação não pode ser universal, ou seja, devem-se respeitar as particularidades do indivíduo/população em questão. Tem sido relatado que, em áreas não fluoretadas, o dentifrício de baixa concentração de fluoreto (500 ppm) tem eficácia similar à do dentifrício convencional (1100 ppm) na prevenção de cáries em crianças (2-4 anos) cárie inativas, mas em crianças cárie ativas o dentifrício convencional reduz significativamente a progressão e o incremento líquido de lesões iniciais de cárie quando comparado ao de baixa concentração de fluoreto (LIMA et al., 2008).

O fato de não terem sido observadas diferenças significativas entre os dentifrícios testados no estudo de Vilhena et al. (2010) pode ser devido à variável de resposta empregada para avaliar a progressão de cáries (ceo-s). O índice de Nyvad, Machiulskiene e Baelum (1999) constitui um sistema combinado tátil-visual de diagnóstico de cárie, envolvendo 9 categorias/escores, que levam em consideração a atividade da lesão cariosa. Os critérios são baseados nas alterações anátomo-patológicas que ocorrem durante o processo carioso, como descrito por Nyvad e Fejerskov (1997). O critério de classificação de Nyvad, Machiulskiene e Baelum (1999) permite a realização do prognóstico futuro das lesões cariosas, de acordo com a sua atividade no momento do exame, ou seja, lesões ativas não cavitadas apresentam maior risco de se tornarem cavidades do que lesões inativas não cavitadas (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003). Estabelecendo-se um limiar de diagnóstico fixado em lesões ativas contra inativas, o critério demonstrou ser confiável, com valores do Kappa intra-examinador variando entre 0,68 e 0,80 e entre 0,74 e 0,78 para a concordância interexaminadores em dentes permanentes (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999), o que pôde ser confirmado para a dentição decídua (SELLOS; SOVIERO, 2011). Estudos clínicos têm confirmado que o critério Nyvad é um método válido e confiável, uma vez que a avaliação da atividade da lesão reflete os efeitos esperados do fluoreto nas lesões cariosas (LIMA

et al., 2008; NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003). Assim seria interessante empregar este índice em estudos para avaliação da eficácia anticárie de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto e pH acidulado, como foi feito por Lima et al. (2008) para dentifrícios com pH neutro.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LUZ (QLF)

Vale notar que os estudos clínicos descritos acima utilizaram apenas a inspeção visual para detectar lesões não cavitadas de cárie, bem como a progressão ou regressão destas lesões. No entanto, todo sistema de inspeção visual tem limitações consideráveis: as lesões são comumente detectadas apenas em estágio avançado, a perda mineral de lesões em esmalte não é quantificável e a perda ou ganho mineral, devido ao processo de des/remineralização não pode ser mensurada. O método da fluorescência quantitativa (QLF) é uma ferramenta valiosa para a detecção precoce, quantificação e monitoramento de lesões não cavitadas em esmalte (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002). Métodos objetivos como o QLF aumentam a acurácia do exame visual convencional e aumentam o potencial de um diagnóstico correto (KUHNISCH et al., 2007). A repetibilidade e reprodutibilidade *in vivo* do QLF têm demonstrado serem excelentes e, por ser um método sensível, é adequado para a quantificação longitudinal de lesões de cárie incipientes em superfícies lisas (TRANAEUS et al., 2001; TRANAEUS et al., 2002). O método da fluorescência quantitativa é especialmente adequado para as crianças, pois é livre de dor e a natureza não ameaçadora da câmera, junto ao fato de que a criança pode ver seus próprios dentes no monitor do computador, facilitam este processo (PRETTY; EDGAR; HIGHAM, 2002).

Pretty, Edgar e Higham (2002) realizaram um estudo *in vitro* combinado a um estudo piloto *in vivo* para determinar a habilidade do método da fluorescência quantitativa em detectar e monitorar a desmineralização do esmalte de dentes decíduos *in vitro*. Para isso foram preparados 12 primeiros molares decíduos hígidos, previamente extraídos, sendo dois destes aleatoriamente selecionados como controle. As imagens com o QLF foram tomadas no *baseline* e os dentes expostos a uma solução desmineralizadora. Os dentes foram removidos em

intervalos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h, secos com seringa tríplice e as imagens com o QLF foram tomadas a cada intervalo. As imagens foram analisadas por um examinador cego tanto para o grupo controle quanto para os tempos de exposição à solução desmineralizadora e a perda mineral foi mensurada pelo ΔQ [área da lesão multiplicada pela variação de fluorescência (ΔF)]. Foi observada desmineralização em todos os grupos experimentais após 48 h e em seis dentes após 24 h. O QLF monitorou com eficácia o aumento da perda mineral de acordo com o tempo de exposição e as lesões não foram clinicamente visíveis até 144 h de exposição, ficando visíveis apenas as mais severas após este período. Não foi detectada desmineralização no grupo controle. Além disso, o QLF foi capaz de detectar lesões subclínicas *in vivo*. Os autores concluíram que o dispositivo é eficaz para a detecção e o monitoramento de lesões subclínicas em dentes decíduos, sendo uma ótima ferramenta para uso clínico e em pesquisas, possibilitando ainda a constatação da atividade da lesão pela análise das imagens nos retornos periódicos. O QLF combina a especificidade e sensibilidade de técnicas destrutivas *in vitro* (como a técnica da microrradiografia transversal - TMR) com a possibilidade do uso *in vivo*.

Feng et al. (2007) avaliaram, em um estudo clínico randomizado, a eficácia do método da fluorescência quantitativa em detectar diferenças na remineralização do esmalte da superfície vestibular de dentes decíduos anteriores. Participaram do estudo 296 crianças, apresentando pelo menos 1 lesão de mancha branca visível clinicamente. Foi realizada a escovação supervisionada, uma vez ao dia por 2 minutos, com os seguintes dentifrícios: fluoreto de sódio (NaF; 1450 $\mu\text{gF/g}$), monofluorofosfato de sódio (MFP; 1450 $\mu\text{gF/g}$) e um dentifrício placebo sem F. Vinte e uma escolas em Chengdu, China fizeram parte do estudo e serviram como unidade de randomização, sendo aleatoriamente atribuídas a um dos 3 dentifrícios. As crianças foram examinadas no *baseline* e após 3 e 6 meses do uso dos dentifrícios. Após 3 meses houve uma diferença significativa entre o grupo que usou o MFP e o grupo placebo ($p < 0,02$) e após 6 meses de uso entre os grupos MFP ($p < 0,001$), NaF ($p < 0,002$) e o grupo placebo. O método da fluorescência quantitativa possibilitou a detecção de uma diferença significativa na remineralização do esmalte entre dentifrícios com e sem F, dentre 3 a 6 meses de escovação supervisionada. A remineralização das lesões pôde ser observada nos 3 grupos, sendo significativamente maior nos grupos que usaram dentifrícios fluoretados. O presente

estudo demonstrou que um sistema diagnóstico baseado na perda de fluorescência pode detectar a desmineralização do esmalte em um estudo clínico randomizado em menor tempo quando comparado aos estudos clínicos convencionais. No entanto, mais estudos são necessários envolvendo diferentes concentrações de F nos dentifrícios para que se possa confirmar a habilidade do sistema em detectar efeitos dose-resposta.

Assim, o emprego do QLF como ferramenta adicional na avaliação da progressão e regressão de lesões cariosas pode trazer uma importante complementação aos resultados obtidos com exame clínico.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Hipotetizou-se que, numa área fluoretada, o dentifrício de baixa concentração de F ácido e convencional neutro teriam a mesma eficácia anticáries que o dentifrício de baixa concentração neutro, em crianças de 2-4 anos de idade, independentemente da sua atividade de cárie.

Para testar esta hipótese, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Comparar o efeito anticárie dos dentifrícios líquidos: de baixa concentração de F ácido (550 ppm) e neutro e dentifrício convencional (1100 ppm F) neutro em crianças de 2-4 anos de idade, cárie-ativas e cárie-inativas, residentes em uma comunidade fluoretada. As variáveis de resposta foram a inspeção visual (índice de Nyvad) e o método da fluorescência quantitativa induzida por luz (QLF).
2. Avaliar a incorporação de F no biofilme bacteriano em uma sub amostra das crianças após a utilização continuada dos dentifrícios por 6 meses, a fim de se aprimorar os conhecimentos sobre o mecanismo de ação dos dentifrícios de baixa concentração de F (550 ppm) e pH reduzido.
3. Avaliar a concentração de F nas unhas dos pés em uma sub amostra das crianças após a utilização continuada dos dentifrícios por 6 meses, a fim de se avaliar a biodisponibilidade do F dos dentifrícios de baixa concentração de F (550 ppm) comparada à do dentifrício convencional (1100 ppm F).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo clínico randomizado duplo-cego foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru (protocolo 016/2009, Apêndice A) e envolveu crianças de 2-4 anos de idade, de cinco escolas públicas primárias localizadas em diferentes regiões de Bauru, São Paulo, Brasil, com concentração de F na água de abastecimento variando entre 0,6 e 0,8 mg/L (RAMIRES et al., 2006a; BUZALAF et al., 2012).

4.1.1 Seleção e Randomização da Amostra

A amostra foi selecionada de forma equilibrada, representando todas as regiões da cidade (Norte, Sul, Leste, Oeste e Central). Em cada região, as escolas que tinham mais de 150 alunos com idade entre 2-4 anos foram pré-selecionadas e, no caso de determinada região apresentar-se com mais de uma escola com a mesma quantidade de alunos, seria realizado o sorteio ponderado. O estudo foi cego para o examinador e para os voluntários, já que os dentifrícios tinham a mesma consistência e foram armazenados em tubos idênticos, apenas a sua cor sendo diferenciada.

A determinação do tamanho da amostra necessária para obter significância clínica entre os grupos de tratamento foi obtida no trabalho de Lima et al. (2008). De acordo com este trabalho realizado em uma área não fluoretada, 22 crianças de 24 a 36 meses de idade com diferentes experiências de cárie, resultou em uma força de 85% ($\alpha=0,05$) na detecção de um incremento de cárie de 1,0 e 2,0 com um desvio padrão de 0,92 e 2,30 nos grupos cárie inativos e ativos, respectivamente, quando os dentifrícios de 550 e 1000 ppm F neutros foram comparados (LIMA et al., 2008). Na área fluoretada, espera-se uma progressão de cárie 40% menor do que na área não fluoretada (SILVA et al., 2001; VILHENA et al., 2010). Desta maneira, na área fluoretada a amostra foi aumentada em 25% (36 crianças por grupo), e, esperando-

se uma perda de 30% da amostra ao longo do ano, 47 crianças deveriam ser incluídas em cada grupo.

Aproximadamente 876 crianças foram convidadas a participar do estudo (Figura 1). Os critérios de exclusão foram: escolas que apresentavam alta mobilidade das crianças (incompatível com o planejamento de um estudo longitudinal), crianças que haviam participado em outras pesquisas nos últimos 3 meses, crianças utilizando aparelhos ortodônticos ou crianças apresentando lesões de cárie extensas ou sensibilidade dentária durante o estudo (neste caso, estas crianças seriam excluídas do estudo e enviadas para tratamento). Foi feita uma reunião com pais, professores e diretores das escolas antes do início do estudo, a fim de esclarecer os objetivos e metodologia que seriam adotados, bem como dar explicações sobre a possibilidade de desistência a qualquer momento durante a pesquisa, caso o voluntário ou seus pais julgassem necessário. Estas informações estavam contidas na Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices B e C) .

As crianças cujos pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em torno de 389) foram selecionadas, mas apenas 315 foram clinicamente examinadas, pelo fato do restante das crianças ter faltado no dia do exame. Essas crianças foram primeiramente examinadas com espátulas de madeira nas escolas e, de acordo com o critério de diagnóstico de atividade de cárie (ativa, inativa) (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999), foram alocadas em dois grupos: 155 cárie-inativos e 160 cárie-ativos. Para a redistribuição aleatória em 3 novos grupos, de acordo com o tipo de dentifrício que seria utilizado ao longo de 12 meses, as salas de aula foram consideradas como unidades de sorteio, a fim de que apenas um tipo de dentifrício fosse distribuído em cada sala de aula, facilitando assim o controle de entrega dos dentifrícios pelas professoras, bem como a realização da escovação supervisionada na escola. 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 por um dos pesquisadores, que não tinha contato com os voluntários participantes da pesquisa, aplicando-se um algoritmo previamente estabelecido a um conjunto de números aleatórios de 0 a 0,99, sendo

que a composição dos grupos seguiu a seguinte distribuição: G1 $\leq 0,33$; G2 $> 0,33$ a $\leq 0,66$; G3 $> 0,66$ a $\leq 0,99$. Tanto as crianças cárie-ativas quanto as cárie-inativas foram alocadas a um dos seguintes grupos: Grupo 1 (n = 104): dentifrício líquido, 550 ppm F, pH 4,5; Grupo 2 (n = 104): dentifrício líquido, 1100 ppm F, pH 7,0; Grupo 3 (n = 107): dentifrício líquido, 550 ppm F, pH 7,0 (Figura 1). A distribuição dos dentifrícios por escola está demonstrada na Tabela 1.

A estabilidade do fluoreto e pH foi testada nas formulações experimentais e demonstrou ser mantida, um ano após a fabricação. Sua fórmula básica está sendo objeto de pedido de patente e portanto não será detalhada. Todos os dentifrícios possuem fluoreto de sódio em sua formulação.

Ao início do estudo, todas as crianças com necessidades restauradoras foram encaminhadas para tratamento na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru, para que o nível de infecção bucal não interferisse na ação dos dentifrícios na des/remineralização das manchas brancas. Independentemente do tipo de dentifrício utilizado, orientações gerais de higiene bucal foram passadas aos professores, pais e crianças envolvidas no estudo.

4.2 REGIME DO ESTUDO

Instruções sobre o regime do estudo foram passadas aos diretores das escolas, professores e pais das crianças, através da participação dos pesquisadores em reuniões no início do ano letivo, com esclarecimentos a respeito dos objetivos do estudo e a importância de seguir corretamente o protocolo. Os Kits escolares da empresa Oralls (São José dos Campos, SP) distribuídos aos professores incluíam: 1 case para armazenamento de escovas de dente com espaço para 40 escovas (cada tubo contendo uma escova de dente da marca MedFio, marcado com o nome da criança) e o dentifrício correspondente à sala de aula (Figura 2). A escovação diária nas escolas foi supervisionada pelos professores como parte de um programa de saúde bucal escolar em curso, sendo realizada após o almoço em um lugar especial sobre uma pia com acesso a água, durante 1 minuto, cronometrado pelas professoras (Figuras 3 e 4). Kits familiares com quatro escovas de dentes, duas para adultos e duas infantis (marca MedFio), 4 tubos de dentifrício (120 g cada) e um

folheto contendo instruções de uso do material foram distribuídos para todos os participantes a cada 3 meses (Figuras 5 e 6). Os Kits foram fornecidos para serem usados por toda a família, a fim de garantir o uso dos respectivos dentifrícios pelas crianças, facilitando assim o cumprimento do protocolo do estudo. Os pais foram orientados a escovar os dentes de seus filhos por 1 min, pelo menos duas vezes ao dia (pela manhã e antes de dormir, nos dias escolares; na parte da manhã, depois do almoço e antes de dormir durante as férias e nos finais de semana) e foram também orientados a não usar outros produtos de higiene oral. Não foram fornecidas instruções sobre enxágue bucal. Os dentifrícios líquidos foram colocados nas escovas utilizando-se a “técnica da gota” (VILHENA et al., 2008). Um questionário foi entregue aos voluntários após 6 meses de uso dos dentifrícios e ao final do estudo (Apêndices D e E). Este questionário avaliou a frequência de escovação, o *compliance* com o estudo, as opiniões em relação aos dentífricos, dificuldades em seguir o protocolo e possíveis alterações bucais.

4.3 EXAMES CLÍNICOS

4.3.1 Coleta de dados

Os exames clínicos foram realizados por 2 examinadores no *baseline* e após 12 meses de estudo, usando-se o critério de diagnóstico de atividade de cárie (ativa, inativa) e integridade da superfície da lesão (intacta, superfície com descontinuidade, cavidade) (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 1999). Foram utilizadas fichas específicas para o exame (Apêndice F), e todas as superfícies dos dentes decíduos foram avaliadas, atribuindo-se os seguintes escores:

- 0 – Sadio:** Translucência e textura normais do esmalte (fissuras sadias podem apresentar ligeira coloração).
 - 1 - Atividade – superfície intacta:** A superfície do esmalte apresenta-se esbranquiçada/amarelada, opaca; sensação de rugosidade quando a ponta da sonda exploradora é movida gentilmente pela superfície, geralmente coberta por biofilme. Nenhuma perda de substância clinicamente detectável. Superfície lisa: lesão cariosa tipicamente
-

localizada perto da margem gengival; Sulcos e fissuras: morfologia da fissura intacta; lesão estendendo-se ao longo das paredes da fissura.

- 2 – Atividade – superfície com descontinuidade:** O mesmo critério do escore 1. Defeito de superfície (microcavidade) localizado somente em esmalte. Ausência de esmalte sem suporte ou assoalho amolecido detectável com sonda.
- 3 - Atividade – cavitação:** Cavidade em esmalte/dentina facilmente visível a olho nu; a cavidade, quando sondada suavemente, dá uma sensação de toque em uma superfície feita de couro ou de consistência amolecida. Pode haver ou não envolvimento pulpar.
- 4 – Inatividade – superfície intacta:** A superfície do esmalte é esbranquiçada, acastanhada ou negra. O esmalte encontra-se brilhante, com textura lisa e endurecida, quando a ponta da sonda exploradora é passada gentilmente pela superfície. Sem perda de substância clinicamente detectável. Superfície lisa: lesão cáriosa tipicamente localizada a alguma distância da margem gengival. Sulcos e fissuras: morfologia da fissura intacta; lesão estendendo-se ao longo das paredes da fissura.
- 5 – Inatividade – superfície com descontinuidade:** O mesmo critério do escore 4. Defeito de superfície (microcavidade) localizado somente em esmalte. Ausência de esmalte sem suporte ou assoalho amolecido detectável com sonda exploradora.
- 6 – Inatividade – cavitação:** Cavidade em esmalte/dentina facilmente visível a olho nu; a superfície da cavidade pode estar brilhosa e endurecida à sondagem com leve pressão. Sem envolvimento pulpar.
- 7 – Restaurado – sadio**
- 8 – Restaurado – atividade:** Lesão de cárie pode estar cavitada ou não.
- 9 – Restaurado – inatividade:** Lesão de cárie pode estar cavitada ou não.

Antes dos exames, cada criança escovou seus dentes para a remoção do biofilme dentário e o exame clínico foi conduzido sob as mesmas condições para as cinco escolas como segue: mesas e cadeiras da escola e um equipo portátil contendo ar comprimido e um dispositivo de sucção (Figura 7) foram alocados em um ambiente com luz natural (como o pátio da escola) e todas as superfícies dos

dentes decíduos foram registradas usando-se gaze, espelho clínico e sonda exploradora CPI, após a secagem com ar comprimido por 3-5 segundos (Figuras 8-12).

As crianças foram consideradas cárie-ativas quando tinham, pelo menos, uma ou mais lesões de mancha branca ativa (ANC – códigos Nyvad 1 e 2) ou cavidade (código Nyvad 3 ou 8) e aquelas que não tinham cavidades ou lesões de mancha branca ativa (ANC) (códigos Nyvad 0, 4, 5, 7 ou 9) foram consideradas como cárie-inativas (Figuras 13-16). A progressão ou regressão das lesões foi avaliada por meio dos dados do exame clínico no início e após 12 meses de estudo. As lesões foram consideradas como progressão, quando originalmente se apresentavam como superfície sadia ou lesão de cárie inativa não cavitada (códigos Nyvad 0, 4, 5) e após 12 meses foram reavaliadas como lesão de cárie ativa não cavitada (códigos Nyvad 1 e 2) ou cavidade (códigos Nyvad 3, 7, 8 ou 9 - cavidade não tratada ou dente restaurado) ou quando uma lesão de cárie ativa não cavitada se transformou em cavidade (cavidade não tratada ou dente restaurado). A regressão foi considerada quando uma lesão de cárie ativa não cavitada (códigos Nyvad 1 e 2) foi reavaliada após 12 meses como uma lesão de cárie inativa não cavitada (códigos Nyvad 4 ou 5) ou superfície sadia (código Nyvad 0).

4.3.2 Calibração

A confiabilidade intra-e inter-examinador foi avaliada através do coeficiente Kappa, considerando-se a superfície do dente como unidade. Dentes perdidos foram registrados como não irrompidos ou extraídos. A concordância intra-examinador foi testada pela duplicação de 20 exames por examinador no início e ao final do estudo ($k = 0,78$) e a confiabilidade inter-examinador também foi avaliada. Vinte crianças foram examinadas no início e ao final do estudo por ambos os dentistas e os valores do kappa foram 0,78 e 0,75, para o primeiro e segundo exames, respectivamente. No exame realizado ao final do estudo, os examinadores eram cegos em relação ao exame clínico realizado no *baseline*.

Figura 1 – Desenho experimental do estudo

Tabela 1 – Distribuição das crianças em função dos dentífricos utilizados, de acordo com as escolas participantes

	azul	verde	vermelho
Escola 1	22	22	30
Escola 2	13	10	12
Escola 3	34	23	22
Escola 4	14	18	32
Escola 5	21	31	11
Total	104	104	107

Figura 2 – Kits de escovação para a escola

Figura 3 – Orientações da professora às crianças

Figura 4 – Uso do gel fornecido pelos pesquisadores na escola

Figura 5 – Kits de escovação para a família

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. 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 fones- 8137-8855, 3206-7624.**

Dra. Cristiane Baldini

Figura 6 – Orientações aos pais

Figura 7 – Consultórios portáteis (Odontocase, Odontomobile Ind e com Equipamentos Odontológicos, Rio de Janeiro)

Figura 8 – Início dos exames de cárie – escola 1

Figura 9 – Exames de cárie – escola 2

Figura 10 – Exames de cárie – escola 3

Figura 11 – Exames de cárie – escola 4

Figura 12 – Exames de cárie – escola 5

Figura 13 e 14 – Crianças consideradas cárie-ativas: pelo menos uma ou mais lesões de mancha branca ativa (ANC) ou cavidade. Superfície lisa: lesão cariosa tipicamente localizada perto da margem gengival.

Figura 15 e 16 – Crianças consideradas cárie-inativas: sem cavidades ou lesões de mancha branca ativa (ANC). Superfície lisa: lesão cariosa tipicamente localizada a alguma distância da margem gengival.

4.4 AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LUZ DAS LESÕES DE CÁRIE

A progressão ou regressão das lesões de mancha branca também foi determinada pela avaliação da fluorescência quantitativa (QLF) em uma amostra de 75 crianças que participaram do estudo. As imagens foram capturadas de todos os dentes decíduos que tinham pelo menos uma superfície com uma lesão clinicamente visível de mancha branca ativa, e a inspeção visual foi realizada por um dos examinadores no momento do exame clínico inicial. Estas crianças foram então selecionadas aleatoriamente, de acordo com o dentifrício que estavam usando, e divididas em 3 grupos (25 crianças/grupo) conforme descrito na Figura 1. O tamanho da amostra foi calculado de acordo com Tranaeus et al. (2001). A fluorescência do esmalte foi medida no baseline e após 12 meses de uso dos dentifrícios.

Foi usado um dispositivo portátil QLF (Inspektor PRO System), equipado com lâmpada arco com microdescarga “xenon” como fonte de luz e um sistema de filtro óptico produzindo luz azul com máximo de comprimento de onda de 370 nm, conduzido por um guia preenchido por líquido (Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, The Netherlands) (Figura 17). A fluorescência re-emitida pelo dente foi coletada com uma microcâmera de vídeo CCD (Panasonic WV-KS 152, Matsushita Electric Industrial Co, Ltd, Osaka, Japan) equipada com filtro amarelo de alta passagem ($\gamma > 520$ nm) para excluir qualquer excitação ou luz do ambiente que possa chegar ao detector (Figura 18). Após secagem prolongada (cerca de 5 s), as imagens foram tomadas dos dentes decíduos superiores e inferiores por um examinador treinado (C.A.B.C.), em um ambiente escuro (Figura 19). O exame com o QLF segue os seguintes princípios: o operador demarca uma linha ao redor da lesão de mancha branca selecionada no *software*, a qual deve ser posicionada totalmente em esmalte visualmente julgado como sadio pelo operador, para que a fluorescência emitida desta área seja utilizada para simular o esmalte sadio. A diferença do brilho da fluorescência entre a área sadia e a área da lesão de cárie fornece a perda de intensidade de fluorescência na lesão, expressa como uma porcentagem da fluorescência do esmalte sadio. Iluminado com luz *xenon*, o esmalte sadio aparece fluorescente, enquanto que as áreas desmineralizadas aparecem escuras. O *software* QLF 2.00F (Inspektor Research Systems BV) foi usado para mostrar, armazenar e analisar as imagens. Para cada lesão, a perda de fluorescência (ΔF em %), a área da lesão (mm^2), e o produto destes dois parâmetros (ΔQ em $\% \cdot \text{mm}^2$) foram calculados pelo *software* com um limiar de 5%, sendo os dados expressos por criança ao final. A progressão ou regressão das lesões de mancha branca foi medida pela variação na área da lesão (mm^2) e pela variação média da fluorescência da lesão (ΔF) após 1 ano de utilização dos dentífrícios (Figura 20). A análise dos dados foi realizada de forma cega e em uma ordem aleatória. A reprodutibilidade e repetibilidade da análise com o QLF foi calculada pelo coeficiente de correlação intra-classe (ICC), que foi de 0,91 e 0,95 para a área e ΔF , respectivamente.

Figura 17– Aparelho QLF

Figura 18 – ponta com microcâmera de vídeo CCD

Figura 19 – Escola (EMEI) que possui consultório odontológico - tomada das imagens com o QLF no baseline em ambiente escuro

Figura 20 - Tomada da imagem automaticamente pelo programa sobreposta no contorno da imagem tirada no ano anterior

4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR INCORPORADO NO BIOFILME BACTERIANO

4.5.1 Material utilizado para coleta de biofilme

Previamente à coleta de biofilme, foram pesados ($\pm 0,01$ mg) e numerados 60 tubos plásticos tipo *ependorf*, os quais foram utilizados para armazenamento do biofilme. Foram também preparadas espátulas tipo *hollembach*, previamente esterilizadas, para a coleta do biofilme. Foi utilizado papel craft para forrar as mesas escolares, onde seria realizada a coleta, além de luvas, máscara, gorro e avental, sendo o material contaminado descartado em sacos plásticos específicos para lixo contaminado.

4.5.2 Coleta do biofilme

Uma amostra de 45 crianças participantes do estudo clínico, que estavam usando um dos 3 dentifrícios por 6 meses, foi aleatoriamente selecionada e dividida em 3 grupos de acordo com o tipo de dentifrício utilizado (15-16/grupo). Para a coleta de biofilme, optou-se por realizar a escovação na escola, coletando-se biofilme 5 minutos após a escovação da superfície oclusal dos dentes (de uma das hemi-arcadas) e 1 h após a escovação (da outra hemi-arcada) (Figuras 21-23). As crianças escovaram os dentes com o dentifrício que já estava sendo utilizado diariamente por elas, durante 1 minuto, fazendo bochecho com água logo após a escovação. No período de 1 h de espera, as professoras foram orientadas a não deixar que a criança bebesse ou comesse qualquer coisa, nem mesmo água. Foram enviados bilhetes aos pais no dia anterior ao experimento, informando que a coleta seria realizada (Figura 24). Estes períodos de coleta foram adotados pela dificuldade de contato com todos os pais das crianças participantes da pesquisa, para lembrá-los de que não deixassem a criança comer ou beber qualquer coisa no dia anterior à coleta após a última escovação do dia, e no dia da coleta pela manhã, caso fossem coletadas amostras de biofilme de 12 h e 1 h após a escovação, como no estudo de Pessan et al. (2008).

4.5.3 Análise da concentração de F no biofilme

Após a coleta, os *ependorfs* com o biofilme dentário foram congelados em câmara fria. Antes da análise, as amostras foram descongeladas e secas em estufa a 190°C por 2 h e novamente pesadas (peso seco). As amostras de biofilme foram analisadas quanto ao flúor 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 biofilme 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 3M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas 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 contém todo o flúor do biofilme foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, No. 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.

Figura 21 – Escovação prévia antes da coleta da biofilme dentário.

Figura 22 – Coleta de biofilme dentário.

Figura 23 – Biofilme dentário em *eppendorfs* para análise.

<p>Srs Pais,</p> <p>Estamos encaminhando o segundo tubinho de coleta de unha. Pedimos a gentileza que devolvam o primeiro tubinho e o segundo tubinho até o dia 19 de agosto à diretora da Escola.</p> <p style="text-align: right;">Dra Cristiane</p>	<p>Srs Pais,</p> <p>No dia 15 de agosto (segunda-feira) faremos a escovação dos dentes e coleta do biofilme dentário (sujeirinha dos dentes) em seu filho(a).</p> <p style="text-align: right;">Dra Cristiane</p>
---	---

Figura 24 – Modelos de bilhetes entregues aos participantes da pesquisa.

4.5.4 Validação da análise

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração (contendo de 0,005 a 0,19 µg de F) foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em duplicata, em concomitância com as amostras que foram analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de biofilme e a segunda 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 e $r \geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas. Além disso, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,2 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 que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras em milivoltagem mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

4.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE F PRESENTE NAS UNHAS

4.6.1 Coleta das unhas

Uma amostra de 161 crianças participantes do estudo clínico, que estavam utilizando um dos dentifrícios experimentais durante 6 meses, foi selecionada e dividida em 3 grupos de acordo com o tipo de dentifrício utilizado (50 crianças/grupo). Previamente à coleta de unhas, foram numerados 170 tubos tipo *ependorf*, os quais foram distribuídos aos pais, para a coleta das unhas dos dedos hálux (dedos maiores dos pés) das crianças participantes da pesquisa. Os pais foram instruídos a deixar as unhas das crianças crescerem durante um período de 15 dias, anteriormente ao seu corte. A coleta foi realizada em duas etapas, com intervalo de 2 semanas, obtendo-se duas amostras das unhas de cada criança.

Foram coletadas as unhas dos dedos hálux, por fornecerem uma massa de unha suficiente para análise e porque tem sido relatado que há menor possibilidade de contaminação nas unhas dos pés (BUZALAF; PESSAN; ALVES, 2006). As unhas foram limpas e preparadas para análise (Figuras 25 e 26).

4.6.2 Análise da concentração de F presente nas unhas

As amostras de unha de cada criança foram limpas com água deionizada, com o auxílio de uma escova de dentes convencional ou interdental, levadas ao aparelho de ultrassom com água deionizada por 10 min, secas a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ e pesadas em balança ($\pm 0,01$ mg; AND, Tóquio, Japão). Sempre que o peso da amostra foi > 20 mg, a análise foi realizada em duplicata. As amostras de unha foram analisadas quanto ao flúor, 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 unha 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 3M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas 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 contém todo o flúor do biofilme foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, No. 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.

4.6.3 Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta a vantagem 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 concentrações de F acima de 0,0015 µg de F, o que é suficiente para amostras de unha pesando mais que 5 mg.

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração (contendo de 0,005 a 0,19 µg de F) foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em duplicata, em concomitância com as amostras que foram analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de biofilme e a segunda 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 e $r \geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas. Além disso, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,2 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 que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras em milivoltagem mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Figura 25 – Preparação das unhas.

Figura 26 – Limpeza das unhas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os *softwares* Sigma Plot versão 12,0 para Windows (SigmaPlot Software Inc., San Jose, USA) e Statistica versão 11,0 para Windows (Stat Soft Inc., Tulsa, USA) foram utilizados. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade. As lesões que progrediram ou regrediram e o incremento líquido (progressão - regressão) foram verificados para cada criança, comparando-se o exame clínico do baseline com o exame clínico após 12 meses de estudo, e o efeito dos dentifrícios foi avaliado através destes parâmetros para cada grupo de crianças.

O efeito dos dentifrícios sobre a progressão das lesões foi avaliado por ANOVA para as crianças cárie-inativas, e ANCOVA (considerando as lesões de mancha branca existentes no *baseline* como covariável) seguida pelo teste de Tukey para comparações individuais para progressão, regressão e incremento líquido das lesões em crianças cárie-ativas.

Com relação ao QLF, os dados da variação média de fluorescência (ΔF) e variação na área da lesão (mm^2) foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Dunn para comparações individuais.

Para o biofilme dentário, os dados passaram no teste de normalidade, mas a diferença entre os desvios-padrão foi significativa. Eles foram então analisados por ANOVA a dois critérios para medidas repetidas, após a transformação logarítmica, e teste de Bonferroni para comparações individuais.

Para as unhas dos pés, os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Dunn para comparações individuais.

Em todos os casos, o nível de significância foi fixado em 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

A amostra inicial de 315 crianças (148 meninos e 167 meninas, com idade média de 3,4 (0,6) anos) caiu para 195 (90 meninos e 105 meninas com idade média de 4,2 (0,6) anos) ao final do estudo (perda de 38% da amostra após 12 meses). Esta perda já era esperada, pois as famílias se mudam facilmente da área de estudo e também há uma grande rotatividade de crianças nas escolas, principalmente na educação infantil. O número de perdas para o QLF foi de 7, 9 e 14, para os grupos de dentifrícios 550 ppm F, pH 4,5, 1100 ppm F pH 7,0 e 550 ppm F pH 7,0 respectivamente (Figura 1).

O *compliance* dos voluntários ao estudo foi considerado adequado. Considerando-se as respostas ao questionário de seis meses, 90% dos pais das crianças relataram ter escovado os dentes de seus filhos três vezes por dia com o dentifrício fornecido. Também não houve relatos de efeitos desconfortáveis e o gosto amargo do dentifrício foi relatado por apenas um dos pais. Alguns voluntários relataram o uso esporádico de outro dentifrício pela criança ao viajar ou ficar na casa de um parente. Oito voluntários não responderam ao questionário. Os problemas de adesão também foram diminuídos pela entrega, a cada três meses, dos dentifrícios para serem usados por todos os membros da família e pela escovação supervisionada diária realizada pelas professoras na escola. Aos 12 meses do estudo, 82% dos pais responderam o questionário. Dentre estes, 80% reportaram escovar os dentes de seus filhos de 2-3 vezes ao dia com o dentifrício fornecido pelos pesquisadores.

5.1 Progressão, Regressão e Incremento líquido das lesões de cárie

A Tabela 1 mostra a progressão de cárie no grupo de indivíduos cárie-inativos após 12 meses de estudo, de acordo com os diferentes tipos de dentifrício utilizados. O incremento médio $\pm$ DP (n) foi de $0,03 \pm 0,19$ (29), $0,14 \pm 0,74$ (29) e $0,10 \pm 0,50$ (40) para os dentifrícios com 550 ppm F, pH 4,5, 550 ppm F pH 7,0 e 1100 ppm F pH 7,0, respectivamente. Após um ano de uso dos dentifrícios, e apesar de uma diferença numérica no incremento de cárie aos 12 meses de estudo (dentifrício 550 ppm F pH 7,0 > dentifrício 1100 ppm F pH neutro > dentifrício 550 ppm F pH ácido), não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1. Progressão de cáries (número médio $\pm$ DP de novas lesões) no grupo de indivíduos cárie inativos após 12 meses de estudo, de acordo com os diferentes tipos de dentifrícios utilizados.

Dentifrícios	Lesões/criança
550 ppm F pH 4,5	0,03 $\pm$ 0,19 ^a (n=29)
1100 ppm F pH 7,0	0,10 $\pm$ 0,50 ^a (n=40)
550 ppm F pH 7,0	0,14 $\pm$ 0,74 ^a (n=29)

Média $\pm$ DP. Não houve diferença significativa entre os grupos. Análise feita por ANOVA ($p < 0.05$).

Para o grupo de indivíduos cárie-ativos, a Tabela 2 mostra a progressão e regressão médias das lesões iniciais, bem como seu incremento líquido, no período de 12 meses do estudo, para os diferentes dentifrícios utilizados. A progressão e o incremento líquido foram significativamente maiores para o dentifrício de 550 ppm F pH 7,0 quando comparado ao dentifrício de 550 ppm F e pH ácido. Embora o dentifrício contendo 550 ppm F e pH 7,0 tenha levado a uma progressão de cáries maior do que aquela observada para o dentifrício de 1100 ppm F e pH neutro, as diferenças não foram significativas. Para a regressão de cárie, os valores encontrados para os 3 grupos foram mais parecidos entre si, não havendo diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 2. Progressão e regressão média $\pm$ DP (n) de lesões de mancha branca pré-existent e incremento líquido após 1 ano no grupo de indivíduos cárie-ativos, de acordo com o tipo de dentifrício utilizado.

Dentifrícios	Baseline	Progressão	Regressão	Incremento
550 μ gF/g pH4,5 n=34	1,73 $\pm$ 1,69 ^a	0,56 $\pm$ 0,96 ^a	1,47 $\pm$ 1,86 ^a	-0,91 $\pm$ 1,69 ^a
1100 μ gF/g pH7,0 n=31	2,61 $\pm$ 1,89 ^a	1,39 $\pm$ 1,91 ^{ab}	1,87 $\pm$ 1,59 ^a	-0,48 $\pm$ 2,64 ^{ab}
550 μ gF/g pH7,0 n=32	1,37 $\pm$ 1,34 ^a	1,66 $\pm$ 1,98 ^b	0,97 $\pm$ 0,93 ^a	0,69 $\pm$ 2,00 ^b

Média $\pm$ DP. Para o número de lesões de mancha branca no baseline, progressão, regressão e incremento das lesões, letras distintas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Análise feita por ANCOVA e teste de Tukey para comparações individuais ($p < 0.05$).

5.2 Variação da área e fluorescência das lesões de mancha branca (QLF)

Os dados da variação média de fluorescência (ΔF) e variação na área da lesão (mm^2) foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Dunn para comparações individuais. A mesma tendência do exame clínico foi observada para o exame feito com o QLF, no entanto, tanto para a variação média da fluorescência quanto para a variação da área da lesão, os dentifrícios contendo 550 ppm F e pH 4,5 e 1100 ppm F e pH neutro não diferiram significativamente entre si mas foram significativamente melhores do que o dentifrício de 550 ppm F e pH 7,0 (Tabela 3), (Figuras 28-33). As áreas médias ($\pm \text{DP}$) das lesões nos grupos que utilizaram os dentifrícios com 550 ppm F, pH 4,5 e 1100 ppm F, pH 7,0 regrediram ou não sofreram alteração no período de 12 meses (área inicial – área final = $0,13 \pm 0,80$ e $-0,06 \pm 0,80 \text{ mm}^2$, respectivamente), sendo que a diferença entre a área inicial e a área final foi significativamente diferente daquela observada para o dentifrício contendo 550 ppm F e pH 7,0, no qual a área da lesão aumentou no período de 12 meses (área inicial – área final = $-1,03 \pm 1,22 \text{ mm}^2$). Perfil similar foi obtido em relação ao outro parâmetro avaliado pelo QLF, a variação da fluorescência. O delta F médio ($\pm \text{DP}$) obtido ao longo dos 12 meses de estudo não diferiu significativamente entre os dentifrícios com 550 ppm F e pH ácido ($-3,46 \pm 5,65\%$) e 1100 ppm F e pH neutro ($-2,72 \pm 3,97\%$), mas ambos diferiram significativamente do dentifrício contendo 550 ppm F e pH neutro ($2,66 \pm 2,52\%$).

Tabela 3. Alteração da fluorescência (ΔF , %) e da área da lesão (mm^2) 12 meses (baseline – 12 meses) após o uso de dentifrícios com diferentes concentrações de fluoreto e pH por crianças de 2 a 4 anos de idade, residentes em uma área otimamente fluoretada

Grupos	Área (mm^2)	ΔF (%)
550 ppm F pH 4,5 (n=18)	$0,13 \pm 0,80^a$	$-3,46 \pm 5,65^a$
1100 ppm F pH 7,0 (n=16)	$-0,06 \pm 0,80^a$	$-2,72 \pm 4,00^a$
550 ppm F pH 7,0 (n=11)	$-1,03 \pm 1,22^b$	$2,66 \pm 2,52^b$

Média $\pm$ DP. Para cada parâmetro avaliado, letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os dentifrícios. Análise feita por ANOVA e teste de Dunn para comparações individuais ($p < 0.05$). "Crianças" foram consideradas como unidade.

Fig 28. Imagem de uma lesão de mancha branca no baseline.

Fig 29. Imagem da mesma lesão de mancha branca após 12 meses de uso do dentifrício contendo 550 ppm F e pH ácido – regressão da lesão.

Fig 30. Imagem de uma lesão de mancha branca no baseline.

Fig 31. Imagem da mesma lesão de mancha branca após 12 meses de uso do dentífrício contendo 1100 ppm F e pH neutro – regressão da lesão.

Fig 32. Imagem de uma lesão de mancha branca no baseline

Fig 33. Imagem da mesma lesão de mancha branca após 12 meses de uso do dentífrico contendo 550 ppm F e pH neutro – progressão da lesão

5.3 Incorporação de F no biofilme dentário

Para o biofilme dentário, os dados passaram no teste de normalidade, mas a diferença entre os desvios-padrão foi significativa. Eles foram então analisados por ANOVA a dois critérios para medidas repetidas, após transformação logarítmica, e teste de Bonferroni para comparações individuais. Foi detectada uma diferença significativa tanto entre os dentifrícios ($F=9,314$, $p=0,0004$) quanto entre os tempos de coleta ($F=26,7$, $p<0,0001$) e nenhuma interação foi observada entre estes critérios ($F=0,253$, $p=0,7778$) (Tabela 4, gráfico 1). As concentrações de F foram significativamente maiores no biofilme dentário coletado 5 minutos após o uso dos dentifrícios, quando comparadas às concentrações de F do biofilme coletado 60 minutos após a escovação, para todos os tipos de dentifrício. Um efeito dose-resposta claro foi observado para os diferentes tipos de dentifrício, sendo este efeito dependente do pH. O dentifrício contendo 1100 ppm F levou às maiores médias de concentração de F no biofilme. Estes valores foram cerca de duas vezes maiores em relação aos observados para o dentifrício contendo 550 ppm F, com mesmo pH, para ambos os tempos após a última utilização dos dentifrícios e esta diferença foi significativa ($p<0,05$ e $p<0,01$ para 5 e 60 minutos, respectivamente). Considerando-se o dentifrício contendo 550 ppm F e pH ácido, 5 minutos após a escovação o mesmo não levou a concentrações de F no biofilme diferentes daquelas observadas para os dentifrícios neutros. Entretanto, 60 minutos após a escovação o dentifrício com 550 ppm F e pH ácido levou a concentrações de F no biofilme similares às aquelas observadas para o dentifrício contendo 1100 ppm e pH neutro e significativamente maiores que aquelas vistas para o dentifrício contendo 550 ppm F e pH neutro.

Tabela 4. Concentrações médias de fluoreto (variação) no biofilme dentário (mg/Kg, peso seco) 5 e 60 minutos após a última utilização dos dentifrícios contendo 550 ppm F, pH 4,5; 550 ppm F, pH 7,0 e 1100 ppm F pH 7,0 em Bauru, comunidade fluoretada.

Dentifrícios	Tempo de coleta	
	5 min ^A	60 min ^B
550 ppm F (pH 4,5)	25,2±4,4 ^{ab} (10,3±66,7)	18,1±4,1 ^a (5,3-37,8)
550 ppm F (pH 7,0)	14,5±1,5 ^a (4,9-23,0)	8,7±1,3 ^b (2,7-20,0)
1100 ppm F (pH 7,0)	30,3±3,9 ^b (10,6-66,2)	19,4±2,4 ^a (6,1-33,7)

Média ± ep. Letras maiúsculas sobrescritas distintas indicam diferença significativa entre os tempos após a última utilização de dentifrícios. Para cada tempo, letras minúsculas sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre os dentifrícios, ($p < 0,05$). A comparação foi feita por ANOVA a dois critérios para medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações individuais. $n=15$

Gráfico 1- Concentrações médias de fluoreto no biofilme dentário (mg/kg, peso seco) 5 e 60 min após a última utilização dos dentifrícios contendo 550 ppm F, pH 4,5; 550 ppm F, pH 7,0 e 1100 ppm F pH 7,0 em Bauru. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos após a última utilização de dentifrícios. Para o mesmo tempo, letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dentifrícios ($p < 0,05$). A comparação foi feita por ANOVA a dois critérios para medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações individuais. $n=15$. As barras indicam ep.

5.4 Incorporação de F nas unhas dos pés

Com relação às concentrações de F nas unhas dos pés, a ANOVA seguida pelo teste de Dunn para comparações individuais encontrou uma diferença significativa entre os resultados ($F=8,699$, $p=0,003$). As médias ($\pm$ EP) das concentrações de F nas unhas encontradas para as crianças que estavam usando os dentifrícios contendo 550 ppm F foram semelhantes ($1,80 \pm 0,13$ e $1,72 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ para os dentifrícios ácidos e neutros, respectivamente) e significativamente menores do que aquela observada para as crianças usando o dentifrício de 1100 ppm F neutro ($2,57 \pm 0,19$ $\mu\text{g/g}$) ($p<0,01$). O número de amostras analisadas foi de 53, 58 e 50 para os dentifrícios com 550 ppm F ácido, 550 ppm F neutro e 1100 ppm F neutro, respectivamente (Gráfico 2).

Gráfico 2- Concentrações médias de fluoreto nas unhas (mg/kg) 6 meses após o início da utilização dos dentifrícios contendo 550 ppm F, pH 4,5; 550 ppm F, pH 7,0 e 1100 ppm F pH 7,0 em Bauru, comunidade fluoretada. Letras distintas indicam diferença significativa entre as concentrações de F nas unhas, de acordo com o dentifrício utilizado ($p < 0,05$). A comparação foi feita por ANOVA seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais. As barras indicam erro-padrão. $n=50-58$.

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

Este estudo clínico longitudinal foi realizado com o objetivo de promover maior evidência na indicação de dentifrícios para crianças na primeira infância, já que esta é uma questão importante, porém não completamente esclarecida. Foi o primeiro estudo que avaliou a progressão e a regressão de cárie, com o uso de um dentifrício ácido de baixa concentração de F por crianças de 2 a 4 anos de idade com diferentes experiências de cárie, por meio da inspeção visual e da avaliação da fluorescência quantitativa (QLF), em uma área otimamente fluoretada.

Os resultados, após um período de 12 meses, mostraram que quando se consideram crianças cárie-inativas, o efeito anticárie dos dentifrícios contendo 500 ou 1100 ppm F, independentemente do pH, não é significativamente diferente. Este resultado já poderia ser esperado, uma vez que no estudo anterior realizado por Vilhena et. al (2010) também não foi encontrada diferença significativa no incremento de cárie após um período de 20 meses, utilizando-se o ceo-s como variável de resposta, embora não tenha sido levado em conta as diferentes experiências de cárie das crianças envolvidas no estudo. Além disso, o estudo de Lima et al. (2008), cujo delineamento experimental serviu de base para o presente estudo, não mostrou diferença significativa na progressão das lesões para as crianças cárie-inativas, em uma área não fluoretada. Deve-se notar que o aumento de cárie observado para os dentifrícios neutros no presente estudo foram numericamente inferiores aos reportados por Lima et al. (2008), o que pode ser atribuído ao efeito sinérgico do F presente na água de abastecimento público (RAMIRES et al., 2006b).

Para o grupo cárie-ativo, os resultados não confirmam a hipótese de que, em uma área otimamente fluoretada, o dentifrício ácido de baixa concentração de F e o dentifrício convencional neutro têm a mesma eficácia do dentifrício de baixa concentração de F neutro. A progressão de cárie e o incremento líquido seguiram um padrão decrescente para as crianças cárie-ativas de acordo com o dentifrício usado (500 ppm F neutro > 1100 ppm F e pH neutro > 500 ppm F pH 4,5) mas somente os dentifrícios de baixa concentração de F diferiram significativamente entre si quando avaliados por meio da inspeção visual. No estudo de Lima et al. (2008) a eficácia anti-cárie do dentifrício de baixa concentração de F para crianças

de 2 a 4 anos de idade cárie-ativas foi significativamente menor do que o efeito do dentifrício convencional. No entanto, estes dentifrícios tinham um pH neutro e o estudo foi conduzido em uma área não fluoretada. Como discutido para os indivíduos cárie-inativos, a presença de F na água de abastecimento pode ter feito as diferenças entre as concentrações de F e pH dos dentifrícios clinicamente menos evidentes.

Uma revisão sistemática com meta-análise publicada recentemente (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2012) comparou o efeito anticárie de dentifrícios com diversas concentrações de F em crianças pré-escolares. As frações prevenidas (FP) e os riscos relativos (RR) foram estimados separadamente para os estudos testando dentifrícios de baixa concentração de F (< 600 ppm) e dentifrícios convencionais (1000-1500 ppm F). Oito estudos clínicos preencheram os critérios de inclusão e a maioria deles comparou a ação de dentifrícios fluoretados associados à educação em saúde bucal em relação a nenhuma intervenção. No entanto, apenas três estudos compararam dentifrícios de baixa concentração de F e apenas um deles comparou este dentifrício em relação ao convencional (DAVIES et al., 2002). Quando os dentifrícios fluoretados convencionais foram comparados ao placebo ou nenhum tratamento, foi observada a redução de cárie na superfície dentária (FP = 31%, 95% IC 18-43; 2644 participantes em cinco estudos), dente (FP = 16%; IC 95% 8-25; 2555 participantes em um estudo) e indivíduos (RR = 0,86, 95% CI 0,81-0,93; 2806 participantes em dois estudos). Os dentifrícios de baixa concentração de F foram eficazes apenas quando se considerou a superfície dentária (FP = 40%, 95% IC 5-75; 561 participantes em dois estudos). Os autores concluíram que os dentifrícios convencionais são eficazes na redução da cárie dentária em dentes decíduos de crianças pré-escolares e, assim, o seu uso deve ser recomendado para essa faixa etária.

No entanto, deve-se analisar estes resultados com cautela uma vez que foram incluídos apenas 3 estudos com dentifrícios de uma concentração de F intermediária, sendo o primeiro deles relatado pelos próprios autores da revisão como tendo grande número de vieses (ANDRUSKEVICIENE et al., 2008), o segundo não se enquadrando no critério de estudo controlado, pois os dentifrícios foram fornecidos aos pais quando as crianças tinham 8 meses de idade e depois somente quando elas completaram 20 meses (WHITTLE; WHITEHEAD; BISHOP, 2008) e um terceiro que é o estudo de Davies et al. (2002). Neste último estudo, os autores

avaliaram o impacto do fornecimento regular de dentifrícios com diferentes concentrações de F para crianças inicialmente com 12 meses de idade, que viviam em áreas não fluoretadas de alto risco à cárie em nove distritos do noroeste da Inglaterra, sobre o nível de cárie na dentição decídua aos 5-6 anos de idade. Além disso, compararam a eficácia na redução de cárie entre um dentifrício contendo 440 ppm F (Colgate Gel 0-6 anos) e outro contendo 1450 ppm F (Colgate Sabor Regular Adulto). Foram avaliados o índice ceo-d, dentes perdidos e a prevalência de cárie. O índice ceo-d foi de 2,15 para o grupo que usou o dentifrício contendo 1.450 ppm F e de 2,49 para o grupo que usou o dentifrício contendo 440 ppm F. O ceo-d médio para o grupo controle foi de 2,57. Esta redução de 16% entre o grupo que utilizou o dentifrício contendo 1450 ppm F e o grupo controle foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A diferença entre o grupo que utilizou o dentifrício contendo 440 ppm F e o grupo controle não foi significativa. É difícil comparar o nosso estudo com os resultados da revisão sistemática (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2012), bem como com o estudo de Davies et al. (2002), porque estes avaliaram apenas dentifrícios com pH neutro, além do que no estudo de Davies et al. (2002), a diferença na concentração de F entre os dentifrícios testados foi muito alta (440 X 1450 ppm F). Em adição, no nosso estudo não havia um grupo com dentifrício placebo, pois sabendo-se da importância da utilização de dentifrícios fluoretados para o controle da cárie, especialmente em crianças cárie-ativas, seria difícil obter aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Entretanto, nossos resultados analisados conjuntamente (exame clínico, exame com o QLF e [F] no biofilme) sugerem que, em crianças cárie-ativas, quando se pensa em dentifrícios com pH neutro, dentifrícios com baixa concentração de F (550 ppm) apresentam menos eficácia que os convencionais (1100 ppm F), indo, de certa forma, ao encontro dos resultados relatados por Davies et al. (2002) e reforçados em revisões sistemáticas recentes (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2012; WALSH et al., 2010; WONG et al., 2011; WONG et al., 2010).

No presente estudo, para ambos os parâmetros do QLF, não foram detectadas diferenças significativas entre os dentifrícios contendo 500 ppm F e pH ácido e 1100 ppm F e pH neutro. No entanto, ambos apresentaram desempenho significativamente melhor do que o dentifrício com 550 ppm F e pH neutro. Vale notar que o perfil observado quando as lesões foram examinadas clinicamente e por meio da fluorescência quantitativa foi similar. O fato de terem sido encontradas

diferenças significativas entre os dentifrícios neutros por meio da fluorescência quantitativa e não pelo exame clínico é devido à maior sensibilidade da primeira. A análise com o QLF permite quantificar a perda mineral determinada pela perda de fluorescência e variação na área da lesão, possibilitando o monitoramento da progressão ou regressão da lesão ao longo do tempo. Estes fatores são um grande benefício em comparação aos dados qualitativos e subjetivos obtidos pelo exame visual convencional (KUHNISCH et al., 2007). Os resultados confirmam os achados do estudo clínico randomizado de Tranaeus et al. (2001), em que não foram detectadas alterações clínicas nas lesões por meio da inspeção visual e o QLF foi o único meio de detectar e quantificar as pequenas mudanças obtidas durante o período do estudo. De acordo com Tranaeus et al. (2002), o QLF mostra excelente repetibilidade e reprodutibilidade *in vivo* e pode ser de grande valia para observações em estudos longitudinais, comparando e monitorando os efeitos de diferentes programas preventivos. Em concordância com estes trabalhos, foi recentemente descrito que o QLF foi capaz de detectar, dentro de 3-6 meses de escovação supervisionada, uma diferença significativa na remineralização do esmalte, quando comparados dentifrícios de 1,450 ppm F e dentifrícios sem F (FENG et al., 2007).

Do que se tem conhecimento da literatura, este estudo é o primeiro que mostra a habilidade do sistema QLF em detectar diferenças na desmineralização e remineralização do esmalte por dentifrícios com diferentes concentrações de F. Os dados indicam que a associação do QLF com a inspeção visual quando o incremento de cárie é o que se pretende avaliar, tem grande valia para aumentar o potencial de diferenciação entre os tratamentos.

Uma questão que vem à mente quando se analisam os resultados do presente estudo, é por que a redução do pH do dentifrício aumenta a sua eficácia anticárie.

Yamazaki e Margolis (2008) demonstraram que o pH ácido de uma solução pode acelerar consideravelmente a mineralização do esmalte em profundidade, reduzindo a remineralização preferencial da lesão externa e promovendo assim a penetração de íons minerais, quando comparado com o padrão observado com uma solução neutra. Fox et al. (1983) e Lynch, Mony e Ten Cate (2006) demonstraram que tampões ácidos que contêm F podem simultaneamente promover a dissolução e a deposição de compostos de fluorapatita dentro do esmalte, em valores de pH

muitas vezes associados à desmineralização (de 4,8 a 5,2). No estudo de Nobre-dos-Santos et al. (2007) foi observada uma diferença significativa na formação de FAP na superfície do esmalte quando considerados os dentifrícios de baixa concentração de F e pH ácido e dentifrício convencional neutro em comparação ao dentifrício controle. Estas poderiam ser as prováveis razões pelas quais dentifrícios acidulados apresentam uma melhor *performance* que os neutros em estudos *in vitro*, na ausência de biofilme (ALVES et al., 2007; BRIGHENTI et al., 2006).

Outro possível mecanismo de ação do pH reduzido seria o aumento dos depósitos de CaF_2 sobre o esmalte (OGAARD, 2001). No entanto, testes recentes demonstraram que este não é o principal mecanismo, pelo menos quando concentrações de F por volta de 550 ppm são avaliadas (MAGALHÃES et al., 2012), como é o caso do dentifrício empregado no presente estudo.

Quando se pensa nos modelos *in situ* (NOBRE-DOS-SANTOS et al., 2007) ou mesmo clínicos, envolvendo a presença de biofilme dentário, uma hipótese natural para explicar o mecanismo de ação dos dentifrícios com pH reduzido seria sua capacidade de aumentar a concentração de F no biofilme (BUZALAF et al., 2009), uma vez que este é um dos principais e mais importantes reservatórios de F (VOGEL, 2011) e os indivíduos, principalmente as crianças, não removem completamente o biofilme durante a escovação. Duckworth, Morgan e Gilbert (1992) reportaram que as concentrações médias de F na saliva e no biofilme são inversamente proporcionais à média de incremento de cárie em um período de 3 anos. Estas observações foram feitas a partir de um estudo clínico, em que 3 dentifrícios fluoretados à base de monofluorofosfato de sódio foram utilizados, contendo 0, 1000, 1500 e 2500 ppm F (STEPHEN et al., 1988). Isto sugere que a mensuração dos níveis intraorais de F é um método *in vivo* bastante válido quando se quer avaliar a eficácia anti-cárie de produtos contendo F.

No presente estudo, um efeito dose-resposta claro foi observado para os diferentes tipos de dentifrício, sendo este efeito dependente do pH. Independentemente do tipo de dentifrício, as concentrações de F no biofilme encontradas 60 minutos após a escovação foram significativamente menores do que aquelas encontradas 5 minutos após. As concentrações de F no biofilme para o dentifrício de 1100 ppm F e pH neutro foram cerca de duas vezes maiores em relação às observadas para o dentifrício contendo 550 ppm F, com o mesmo pH, para ambos os tempos após a última utilização dos dentifrícios, e esta diferença foi

significativa. O dentifrício de 550 ppm F e pH ácido não diferiu do dentifrício de 1100 ppm F e pH neutro para ambos os tempos após a escovação, entretanto, diferiu significativamente do dentifrício de 550 ppm de F neutro, 60 minutos após a escovação. Estes achados estão de acordo com o estudo de Kondo et al. (2013), no qual foi demonstrado que a utilização de dentifrícios com pH acidulado (4,5) é capaz de elevar significativamente a concentração de F também no fluido do biofilme, 1 h após a escovação, em comparação aos dentifrícios com pH neutro. De acordo com Olympio et al. (2007), a diminuição do pH do dentifrício também leva a um aumento na concentração de F na saliva após a escovação. Provavelmente, os níveis mais elevados de F salivares presentes após o uso de dentifrícios ácidos pode ter refletido nas concentrações aumentadas de F no biofilme.

As concentrações de F encontradas no biofilme 60 minutos após a escovação com os dentifrícios líquidos foram similares às concentrações encontradas em um estudo prévio, em que os mesmos dentifrícios foram usados, as crianças tinham idade similar e também eram provenientes de uma área fluoretada (BUZALAF et al., 2009). No entanto, as concentrações foram menores do que as encontradas por Pessan et al. (2010), mas neste caso as crianças eram mais velhas (8-10 anos, apresentando dentição mista) e a quantidade de dentifrício, utilizado na forma de pasta (ao invés de dentifrícios líquidos), era maior (~0.5 g vs ~0.15 g).

Uma questão a ser respondida é como a redução do pH do dentifrício seria capaz de aumentar a incorporação de F no biofilme. Apesar de não ter sido testada experimentalmente, uma hipótese pode ser sugerida baseada no mecanismo de acúmulo de F nas bactérias. É bem estabelecido que o F atravessa membranas celulares na forma de HF, em resposta a um gradiente de pH (do meio mais ácido para o mais alcalino). O HF é um ácido fraco com pK em torno de 3,4 (BUZALAF; WHITFORD, 2011). Sendo assim, quando o pH do dentifrício é 4,5, existe uma maior concentração de HF quando comparado a um dentifrício com pH neutro e com isso mais F é capaz de entrar na bactéria, aumentando assim o número de ligações intracelulares por pontes de Ca, formando ligações do tipo Ca-F (ROSE; SHELLIS; LEE, 1996). O mecanismo proposto está ilustrado na Figura 34. Além disso, tem-se relatado que a incorporação de F no biofilme é fortemente dependente das concentrações de cálcio presente no mesmo (PESSAN et al., 2008; WHITFORD et al., 2005; WHITFORD et al., 2002). Sabendo-se que o esmalte pode contribuir com os níveis de cálcio presentes no biofilme frente a uma queda de pH (exposição à

sacarose) (TANAKA; MARGOLIS, 1999), o dentifrício ácido poderia contribuir da mesma forma para a liberação de maior quantidade de Ca pelo esmalte, o que consequentemente aumentaria a incorporação de F no biofilme. Esse Ca liberado, pode ainda aumentar o número de ligações extracelulares por pontes de Ca, formando ligações do tipo Ca-F na parede celular das bactérias.

Os resultados do presente estudo trazem conhecimentos adicionais sobre o mecanismo de ação de dentifrícios com diferentes concentrações de F e pH. Já que o biofilme é um dos reservatórios mais importantes de F (VOGEL, 2011) e os dentifrícios têm ação na sua presença na situação clínica, este aumento de F no biofilme ocasionado pelo dentifrício ácido, levando a concentrações similares ao dentifrício convencional, que contém o dobro da concentração de F, indica que o pH ácido do dentifrício pode levar a um maior efeito anticárie quando comparado ao efeito de um dentifrício neutro, com a mesma concentração de F.

Um aspecto importante a ser levado em conta quando se pensa na utilização de dentifrícios com pH acidulado (4,5) é se os mesmos são capazes de potencializar o desgaste dentário, combinando efeitos erosivos com a abrasão pela escovação. Entretanto, um estudo *in vitro* revelou que isto não acontece (ALVES et al., 2009; MORON et al., 2013).

No presente estudo procurou-se também avaliar a biodisponibilidade do F a partir das diferentes formulações dentifrícias utilizadas, utilizando-se para isto a unha como biomarcador (PESSAN; BUZALAF, 2011). Foi observado que os dentifrícios contendo 550 ppm F levaram a concentrações de F nas unhas dos pés significativamente menores que o dentifrício com 1100 ppm F, indicando que eles podem ser uma boa opção para as crianças como uma medida para reduzir a ingestão de F e, consequentemente, a fluorose dentária. Os achados estão de acordo com Buzalaf et al. (2009). Além disso, um estudo recente sugere que concentrações de F nas unhas menores que 2 µg/g, que foi o caso encontrado para as crianças que usaram os dentifrícios com baixa concentração de F, está associado um menor risco de desenvolvimento de fluorose dentária na dentição permanente (BUZALAF et al., 2012). Um fator que pode ter contribuído para a diminuição da ingestão foi o treinamento que as crianças receberam para usar os dentifrícios líquidos com a técnica da “gota” (VILHENA et al., 2008), a qual reduz a quantidade de dentifrício colocado na escova e ao mesmo tempo possibilita uma padronização

desta quantidade, quando comparada à quantidade dispensada pelos cremes dentais convencionais.

Figura 34. Mecanismo de absorção de fluoreto presente em dentifrícios ácidos pelas bactérias. Quando o pH do dentifrício é de 4,5, existe uma maior concentração de HF quando comparado a um dentifrício com um pH neutro. Isto significa que mais F pode entrar nas bactérias, aumentando assim o número de ligações intracelulares do tipo Ca-F.

Os resultados do presente estudo, analisados em conjunto e à luz do conhecimento existente indicam que o dentifrício de baixa concentração de F e pH acidulado combina as características desejáveis em um produto para ser usado por crianças, independentemente de sua atividade de cárie. Entretanto, o dentifrício de baixa concentração de F neutro não deve ser indicado para crianças cárie-ativas, mesmo que elas residam em áreas fluoretadas.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que o dentifrício ácido experimental, de baixa concentração de F:

1. Não diferiu significativamente dos dentifrícios contendo 550 ppm F e 1100 ppm F neutros, quando usado por crianças cárie-inativas e realizada inspeção visual por meio do critério Nyvad;
2. Teve efeito anticárie significativamente melhor do que o dentifrício de 550 ppm F neutro, não diferindo significativamente do dentifrício convencional (1100 ppm F) neutro, quando usado por crianças cárie-ativas e realizada inspeção visual por meio do critério Nyvad;
3. Teve efeito anticárie significativamente melhor do que o dentifrício de 550 ppm F neutro, não diferindo significativamente do dentifrício convencional (1100 ppm F) neutro, quando usado por crianças cárie-ativas e feita avaliação por meio da fluorescência induzida por luz das lesões de mancha branca, usando o sistema QLF;
4. Levou a uma incorporação de F no biofilme significativamente maior que o dentifrício de 550 ppm F e pH neutro aos 60 minutos após a escovação e a uma incorporação similar àquela observada para o dentifrício convencional (1100 ppm F e pH neutro), independentemente do tempo de coleta do biofilme;
5. Reduziu a concentração de F presente nas unhas das crianças após 6 meses de utilização, sugerindo menor ingestão (e biodisponibilidade) de F em comparação ao dentifrício convencional (1100 ppm F).

Referências

REFERÊNCIAS

- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, et al. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res.* 2007;41(4):263-7.
- Alves KM, Pessan JP, Buzalaf MA, Delbem AC. Short Communication: In vitro evaluation of the abrasiveness of acidic dentifrices. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009;10 Suppl 1:43-5.
- 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.
- Andruskeviciene V, Milciuviene S, Bendoraitiene E, Saldunaite K, Vasiliauskiene I, Slabsinskiene E, et al. Oral health status and effectiveness of caries prevention programme in kindergartens in Kaunas city (Lithuania). *Oral Health Prev Dent.* 2008;6(4):343-8.
- Bardsen A. "Risk periods" associated with the development of dental fluorosis in maxillary permanent central incisors: a meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* 1999;57(5):247-56.
- Beltran-Valladares PR, Cocom-Tun H, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sanchez AA, Medina-Solis CE, Maupome G. [Prevalence of dental fluorosis and additional sources of exposure to fluoride as risk factors to dental fluorosis in schoolchildren of Campeche, Mexico]. *Rev Invest Clin.* 2005;57(4):532-9.
- Beltran ED, Szpunar SM. Fluoride in toothpastes for children: suggestion for change. *Pediatr Dent.* 1988;10(3):185-8.
- Bottenberg P, Declerck D, Ghidey W, Bogaerts K, Vanobbergen J, Martens L. Prevalence and determinants of enamel fluorosis in Flemish schoolchildren. *Caries Res.* 2004;38(1):20-8.
- Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4 (Pt 2)):416-22; discussion 23-5, 30-2.
-

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.

Brothwell DJ, Limeback H. Fluorosis risk in grade 2 students residing in a rural area with widely varying natural fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27(2):130-6.

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

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. *J Appl Oral Sci.* 2002;10:196-200.

Buzalaf MAR, Moraes CM, Olympio KPK, Pessan JP, Grizzo LT, Silva TL, et al. Seven years of external control of fluoride levels in the public water supply in Bauru, São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2013;2(1):92-8.

Buzalaf MA, Caroselli EE, Cardoso de Oliveira R, Granjeiro JM, Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol.* 2004;28(4):249-52.

Buzalaf MA, Levy SM. Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:1-19.

Buzalaf MA, Massaro CS, Rodrigues MH, Fukushima R, Pessan JP, Whitford GM, et al. Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. *Caries Res.* 2012;46(4):394-400.

Buzalaf MA, Pessan JP, Alves KM. Influence of growth rate and length on fluoride detection in human nails. *Caries Res.* 2006;40(3):231-38.

Buzalaf MA, Pessan JP, Honorio HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011a;22:97-114.

Buzalaf MA, Rodrigues MH, Pessan JP, Leite AL, Arana A, Villena RS, et al. Biomarkers of fluoride in children exposed to different sources of systemic fluoride. *J Dent Res.* 2011b;90(2):215-19.

Buzalaf MA, Vilhena FV, Iano FG, Grizzo L, Pessan JP, Sampaio FC, et al. The effect of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on plaque and nail fluoride levels in young children. *Caries Res.* 2009;43(2):142-46.

Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:20-36.

Clarkson J, Watt RG, Rugg-Gunn AJ, Pitiphat W, Ettinger RL, Horowitz AM, et al. Proceedings: 9th World Congress on Preventive Dentistry (WCPD): "Community Participation and Global Alliances for Lifelong Oral Health for All," Phuket, Thailand, September 7-10, 2009. *Adv Dent Res.* 2010;22(1):2-30.

Conway DI, MacPherson LM, Stephen KW, Gilmour WH, Petersson LG. Prevalence of dental fluorosis in children from non-water-fluoridated Halmstad, Sweden: fluoride toothpaste use in infancy. *Acta Odontol Scand.* 2005;63(1):56-63.

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(2):109-14.

Czarnowski W, Krechniak J. Fluoride in the urine, hair, and nails of phosphate fertiliser workers. *Br J Ind Med.* 1990;47(5):349-51.

Davies GM, Worthington HV, Ellwood RP, Bentley EM, Blinkhorn AS, Taylor GO, et al. A randomised controlled trial of the effectiveness of providing free fluoride toothpaste from the age of 12 months on reducing caries in 5-6 year old children. *Community Dent Health.* 2002;19(3):131-6.

Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The rational use of fluoride toothpaste. *Int J Dent Hyg.* 2003;1(1):3-8.

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(1):53-63.

Delbem AC, Bergamaschi M, Rodrigues E, Sassaki KT, Vieira AE, Missel EM. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(1):94-8.

Denbesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:81-96.

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

Dos Santos AP, Nadanovsky P, de Oliveira BH. A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2012.

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 No:836-40.

Feagin F, Patel PR, Koulourides T, Pigman W. Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces. *Arch Oral Biol*. 1971;16(5):535-48.

Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:620-5; discussion 34-6.

Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand*. 1981;39(4):241-9.

Feng Y, Yin W, Hu D, Zhang YP, Ellwood RP, Pretty IA. Assessment of autofluorescence to detect the remineralization capabilities of sodium fluoride, monofluorophosphate and non-fluoride dentifrices. A single-blind cluster randomized trial. *Caries Res*. 2007;41(5):358-64.

Feskanich D, Owusu W, Hunter DJ, Willett W, Ascherio A, Spiegelman D, et al. Use of toenail fluoride levels as an indicator for the risk of hip and forearm fractures in women. *Epidemiology*. 1998;9(4):412-6.

Fox JL, Iyer BV, Higuchi WI, Hefferren JJ. Solution activity product (KFAP) and simultaneous demineralization-remineralization in bovine tooth enamel and hydroxyapatite pellets. *J Pharm Sci*. 1983;72(11):1252-5.

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

Fukushima R, Rigolizzo DS, Maia LP, Sampaio FC, Lauris JR, Buzalaf MA. Environmental and individual factors associated with nail fluoride concentration. *Caries Res.* 2009;43(2):147-54.

Fukushima R, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Risk assessment of external contamination of nails with fluoride. In: 55th Congress of the European Organization for Caries Research; 2012; Groningen, The Netherlands. *Caries Res*; 2008. p. 235.

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

Gerdin PO. Studies in dentifrices, 8: clinical testing of an acidulated, nongrinding dentifrice with reduced fluorine contents. *Sven Tandlak Tidskr.* 1974;67(5):283-97.

Grandjean P. Biomarkers in epidemiology. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1800-3.

Hamilton J. New CDC report offers fluoride use tips. *J Calif Dent Assoc.* 2001;29(11):723-4.

Holt RD, Morris CE, Winter GB, Downer MC. Enamel opacities and dental caries in children who used a low fluoride toothpaste between 2 and 5 years of age. *Int Dent J.* 1994;44(4):331-41.

Hong L, Levy SM, Broffitt B, Warren JJ, Kanellis MJ, Wefel JS, et al. Timing of fluoride intake in relation to development of fluorosis on maxillary central incisors. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006a;34(4):299-309.

Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B, Cavanaugh J. Fluoride intake levels in relation to fluorosis development in permanent maxillary central incisors and first molars. *Caries Res.* 2006b;40(6):494-500.

Horowitz HS. The need for toothpastes with lower than conventional fluoride concentrations for preschool-aged children. *J Public Health Dent.* 1992;52(4):216-21.

Jackson RD, Kelly SA, Katz B, Brizendine E, Stookey GK. Dental fluorosis in children residing in communities with different water fluoride levels: 33-month follow-up. *Pediatr Dent.* 1999;21(4):248-54.

Kargul B, Caglar E, Tanboga I. History of water fluoridation. *J Clin Pediatr Dent*. 2003;27(3):213-7.

Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE, Blanken DD, Flaig SM, et al. In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *J Dent Oral Hyg*. 2011;3(2):22-9.

Khan A, Moola MH, Cleaton-Jones P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. *SADJ*. 2005;60(10):418-21.

Kobayashi CA, Belini MR, Italiani Fde M, Pauleto AR, Araujo JJ, Tessarolli V, et al. Factors influencing fluoride ingestion from dentifrice by children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011;39(5):426-32.

Koch G, Petersson LG, Kling E, Kling L. Effect of 250 and 1000 ppm fluoride dentifrice on caries. A three-year clinical study. *Swed Dent J*. 1982;6(6):233-8.

Kondo KY, Manarelli MM, Levy FM, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Pessan JP. Acidic dentifrices increase fluoride in the biofilm fluid. In: IADR 91th General Session; 2013, Seattle, USA. *J Dent Res* 92 (Spec Iss A): 2033, 2013.

Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res*. 2008;20(1):17-21.

Kuhnisch J, Iffland S, Tranaeus S, Hickel R, Stosser L, Heinrich-Weltzien R. In vivo detection of non-cavitated caries lesions on occlusal surfaces by visual inspection and quantitative light-induced fluorescence. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(3):183-8.

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

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.

Lima YB, Cury JA. [Fluoride intake by children from water and dentifrice]. *Rev Saude Publica*. 2001;35(6):576-81.

Lynch RJ, Mony U, Ten Cate JM. The effect of fluoride at plaque fluid concentrations on enamel de- and remineralisation at low pH. *Caries Res.* 2006;40(6):522-9.

Lynch RJ, Navada R, Walia R. Low-levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the demineralisation and remineralisation of enamel; role of fluoride toothpastes. *Int Dent J.* 2004;54(5 Suppl 1):304-9.

Magalhães, AC, Lacerda B, Charone S, Cardoso CAB, Grizzo, LT, Vilhena FV, Buzalaf MAR. Fluoridated Liquid Dentifrices: Effect on Enamel Demineralisation and Alkali-Soluble Fluoride Deposition in vitro. In: 59th Congress of the European Organization for Caries Research; 2012; Cabo Frio, Brazil. *Caries Res*; 2012. p. 269.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(1):CD002278.

Marquis RE. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol.* 1995;41(11):955-64.

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

Mascarenhas AK, Burt BA. Fluorosis risk from early exposure to fluoride toothpaste. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998;26(4):241-8.

Maupomé G, Shulman JD, Clark DC, Levy SM. Socio-demographic features and fluoride technologies contributing to higher fluorosis scores in permanent teeth of Canadian children. *Caries Res.* 2003;37(5):327-34.

Moraes SM, Pessan JP, Ramires I, Buzalaf MA. Fluoride intake from regular and low fluoride dentifrices by 2-3-year-old children: influence of the dentifrice flavor. *Braz Oral Res.* 2007;21(3):234-40.

Morgan L, Allred E, Tavares M, Bellinger D, Needleman H. Investigation of the possible associations between fluorosis, fluoride exposure, and childhood behavior problems. *Pediatr Dent.* 1998;20(4):244-52.

Moron BM, Miyazaki SS, Ito N, Wiegand A, Vilhena F, Buzalaf MA, et al. Impact of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on tooth erosion/abrasion in vitro. *Austr Dent J.* 2013;58(1):106-11.

Negri HM, Cury JA. [Dose-response effect of a dentifrice formulation with low fluoride concentration - an in vitro study]. *Pesqui Odontol Bras*. 2002;16(4):361-5.

Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel-Cury AA, Cury JA. 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.

Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*. 2002;36(5):347-52.

Nyvad B, Fejerskov O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):69-75.

Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res*. 1999;33(4):252-60.

Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res*. 2003;82(2):117-22.

Ogaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res*. 2001;35 Suppl 1:40-4.

Ogaard B, Rolla G, Dijkman T, Ruben J, Arends J. Effect of fluoride mouthrinsing on caries lesion development in shark enamel: an in situ caries model study. *Scand J Dent Res*. 1991;99(5):372-7.

Ögaard B, Rølla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res*. 1988;96(3):209-11.

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.

Osugi OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res*. 1988;67(12):1488-92.

Oulis C, Raadal M, Martens L. Guidelines on the use of fluoride in children: An EAPD policy document. *Eur J Paediatr Dent*. 2000;1:7-12.

Paiva SM, Cury JA. Dentifrício fluoretado e risco de fluorose dentária. *RPG Rev Pós Grad*. 2001;8(4):322-28.

Pendrys DG, Katz RV. Risk of enamel fluorosis associated with fluoride supplementation, infant formula, and fluoride dentifrice use. *Am J Epidemiol*. 1989;130(6):1199-208.

Pendrys DG, Katz RV. Risk factors for enamel fluorosis in optimally fluoridated children born after the US manufacturers' decision to reduce the fluoride concentration of infant formula. *Am J Epidemiol*. 1998;148(10):967-74.

Pendrys DG, Katz RV, Morse DE. Risk factors for enamel fluorosis in a fluoridated population. *Am J Epidemiol*. 1994;140(5):461-71.

Pendrys DG, Katz RV, Morse DE. Risk factors for enamel fluorosis in a nonfluoridated population. *Am J Epidemiol*. 1996;143(8):808-15.

Pereira AC, Da Cunha FL, Meneghim Mde C, 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, 83.

Pessan JP, Alves KM, Ramires I, Taga MF, Sampaio FC, Whitford GM, et al. Effects of regular and low-fluoride dentifrices on plaque fluoride. *J Dent Res*. 2010;89(10):1106-10.

Pessan JP, Buzalaf MR. Historical and recent biological markers of exposure to fluoride. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:52-65.

Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SM, Whitford GM, Buzalaf MA. 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.

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(5):461-5.

Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:115-32.

Pfarrer AM, Karlinsey RL. Challenges of implementing new remineralization technologies. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):79-82.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. Detection of in vitro demineralization of primary teeth using quantitative light-induced fluorescence (QLF). *Int J Paediatr Dent.* 2002;12(3):158-67.

Ramires I, Maia LP, Rigolizzo Ddos S, Lauris JR, Buzalaf MA. [External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil]. *Rev Saude Publica.* 2006a;40(5):883-9.

Ramires I, Olympio KP, Maria AG, Pessan JP, Cardoso VE, Lodi CS, et al. Fluoridation of the public water supply and prevalence of dental fluorosis in a peripheral district of the municipality of Bauru, SP. *J Appl Oral Sci.* 2006b;14(2):136-41.

Reed MW. Clinical evaluation of three concentrations of sodium fluoride in dentifrices. *J Am Dent Assoc.* 1973;87(7):1401-3.

Riordan PJ. Dental fluorosis, dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. *Caries Res.* 1993;27(1):71-7.

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

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(3):171-4.

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

Sagheri D, McLoughlin J, Clarkson JJ. The prevalence of dental fluorosis in relation to water or salt fluoridation and reported use of fluoride toothpaste in school-age children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2007;8(1):62-8.

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.

Sellos MC, Soviero VM. Reliability of the Nyvad criteria for caries assessment in primary teeth. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(3):225-31.

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(7):1023-9.

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 No:19A-23A.

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

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.

Stephen KW, Creanor SL, Russell JI, Burchell CK, Huntington E, Downie CF. A 3-year 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.

Szpunar SM, Burt BA. Dental caries, fluorosis, and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. *J Dent Res.* 1988;67(5):802-6.

Tabari ED, Ellwood R, Rugg-Gunn AJ, Evans DJ, Davies RM. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. *Br Dent J.* 2000;189(4):216-20.

Takeshita EM, Castro LP, Danelon M, Sassaki KT, Delbem ACB. Evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate on biofilm and enamel demineralization in an in situ study. In: 57th Congress of the European Organization for Caries Research; 2010; Montpellier, France. *Caries Res*; 2010. p. 201.

Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res.* 2009;43(1):50-6.

Takeshita EM, Exterkate RA, Delbem AC, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. *Caries Res.* 2011;45(5):494-7.

Tanaka M, Margolis HC. Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol.* 1999;44(3):253-8.

Tavener JA, Davies GM, Davies RM, Ellwood RP. The prevalence and severity of fluorosis in children who received toothpaste containing either 440 or 1,450 ppm F from the age of 12 months in deprived and less deprived communities. *Caries Res.* 2006;40(1):66-72.

Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta.* 1968;15(9):969-74.

ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res.* 1983;17(3):193-9.

ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):283-96.

Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1978;6(6):315-28.

Tranaeus S, Al-Khateeb S, Bjorkman S, Twetman S, Angmar-Mansson B. Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci.* 2001;109(2):71-5.

Tranaeus S, Shi XQ, Lindgren LE, Trollsas K, Angmar-Mansson B. In vivo repeatability and reproducibility of the quantitative light-induced fluorescence method. *Caries Res.* 2002;36(1):3-9.

Tsutsui A, Yagi M, Horowitz AM. The prevalence of dental caries and fluorosis in Japanese communities with up to 1.4 ppm of naturally occurring fluoride. *J Public Health Dent.* 2000;60(3):147-53.

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

Vilhena FV, Olympio KP, Lauris JR, Delbem AC, Buzalaf MA. Low-fluoride acidic dentifrice: a randomized clinical trial in a fluoridated area. *Caries Res*. 2010;44(5):478-84.

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(1):61-5.

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):312-7.

Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:146-57.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VCC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;(1): CD007868.

Wang NJ, Gropen AM, Ogaard B. Risk factors associated with fluorosis in a non-fluoridated population in Norway. *Community 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.

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

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(2):100-7.

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(4):256-65.

Whittle JG, Whitehead HF, Bishop CM. A randomised control trial of oral health education provided by a health visitor to parents of pre-school children. *Community Dent Health.* 2008;25(1):28-32.

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

Wong MC, Clarkson J, Glenny AM, Lo EC, Marinho VC, Tsang BW, et al. Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. *J Dent Res.* 2011;90(5):573-9.

Wong MC, Glenny AM, Tsang BW, Lo EC, Worthington HV, Marinho VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1):CD007693.

Yamazaki H, Margolis HC. Enhanced enamel remineralization under acidic conditions in vitro. *J Dent Res.* 2008;87(6):569-74.

Apêndices

APÊNDICE A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Proc. CEP nº 016/2009

Bauru, 18 de agosto de 2009.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para inclusão da Ms. Cristiane de Almeida Baldini Cardoso no projeto de pesquisa **"Efeito do pH, da consistência e da concentração de flúor presente em dentifrícios líquidos no controle de cárie em áreas fluoretadas e não fluoretadas: estudos clínicos randomizados"**, de autoria de Fabiano Vieira Vilhena, sob sua orientação, informamos que somos favoráveis à referida inclusão, tendo em vista não haver impedimentos éticos.

Lembramos que, qualquer outra alteração no trabalho de pesquisa deverá ser comunicada ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

APÊNDICE B – Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
 Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
 PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos solicitando a participação de seu filho no projeto **"Efeito do pH, da consistência e da concentração de flúor presente em dentífricos líquidos no controle de cárie em áreas fluoretada e não fluoretada: estudos clínicos randomizados"**. Esperamos com este estudo estabelecer um protocolo de uso correto dos dentífricos (pastas de dente), procurando minimizar o risco de fluorose dentária e maximizar o efeito anti-cárie dos mesmos, beneficiando assim a população infantil. Como benefício direto aos participantes, tem-se o fornecimento de dentífrico e escova dentária para toda a família durante o período de estudo. Os riscos contidos no presente estudo são mínimos, visto que existirá um monitoramento constante dos pesquisadores envolvidos, e também a supervisão de adultos em relação à população alvo. Seu filho deverá escovar os dentes 3 vezes ao dia com o dentífrico que será distribuído por nós durante 1 ano. 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 dentes 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 Faculdade correspondente.

* Caso o participante da pesquisa queira apresentar reclamação ou tenha alguma dúvida, poderá entrar em contato com a pesquisadora Cristiane de A. B. Cardoso pelos telefones (14) 81378855, (14) 32067624, (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).

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 tomaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru, _____ de _____ de 2009

Assinatura do responsável do
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE C – Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

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 coletadas unhas 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. Depois de cortadas e colocadas nos tubinhos, entregar na secretaria da escola. Novamente será entregue mais 1 tubinho 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 a pesquisadora Cristiane Baldini pelo telefone (14) 81378855 ou o pesquisador Fabiano Vilhena pelos telefones (14) 32345633, (12) 9129-1020 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.

Bauru, _____ de _____ de 2010

Assinatura do responsável do
Sujeito da Pesquisa

Assinatura do pesquisador

Nome da Criança:
Turma:

APÊNDICE D – Questionário de Acompanhamento de 6 meses

QUESTIONÁRIO DE ACOMPANHAMENTO

1. Quantas vezes por dia a criança tem escovado os dentes desde a entrega das pastas de dente? Se algum dia houve alguma mudança na frequência de escovação, explique.

R.: _____

2. Desde o início do tratamento, a criança esqueceu e usou outra pasta de dentes diferente da recomendada? Quantas vezes isto aconteceu?

R.: _____

3. Você percebeu se a criança está tendo alguma dificuldade em seguir as orientações do tratamento? Se a resposta for sim, qual (is)?

R.: _____

4. Após o início do tratamento, você percebeu alguma mudança na boca da criança? Se a resposta for sim, qual (is)?

R.: _____

Nome da mãe:

Nome da criança:

Turma:

APÊNDICE E – Questionário de Acompanhamento de 12 meses

QUESTIONÁRIO DE ACOMPANHAMENTO

Srs Pais,

Este questionário é referente à pesquisa concluída em junho, em que seu filho utilizou a pasta de dentes fornecida por nós. Assim como o outro questionário entregue aos 6 meses de uso da pasta de dentes, a sua informação ao final do estudo é muito importante para nós! Por favor, seja sincero, responda e entregue na secretaria da escola. Obrigada.

1. Nos últimos meses da pesquisa, quantas vezes por dia a criança escovou os dentes? Se houve alguma mudança neste período, explique.

R.: _____

2. Nos últimos 6 meses do tratamento, a criança usou outra pasta de dentes diferente da recomendada? Quantas vezes isto aconteceu?

R.: _____

3. Você percebeu se a criança teve alguma dificuldade em seguir as orientações do tratamento? Se a resposta for sim, qual (is)?

R.: _____

4. Até o final do tratamento, você percebeu alguma mudança na boca da criança? Se a resposta for sim, qual (is)?

R.: _____

Nome da mãe:

Nome da criança:

Turma:

APÊNDICE F – Ficha para exame clínico

Exame N°

Projeto de Pesquisa Doutorado ♦Bauru 2010 - 2011

Nome:

Sala:

Período:

NUM FICHA	SEXO	ETNIA	ESCOLA	REGIÃO	DATA
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Condição de Saúde Bucal

Arco Superior

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------	----------------------

Arco Inferior

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input checked="" type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------	----------------------

APÊNDICE G – Artigo aceito para publicação no periódico Clinical Oral
Investigations

The effect of pH and fluoride concentration of liquid dentifrices on caries progression

Cristiane de Almeida Baldini Cardoso, PhD^{a*}

Dayane Franco Barros Mangueira, PhD^{b*}

Kelly Polido Kaneshiro Olympio, PhD^a

Ana Carolina Magalhães, PhD^a

Daniela Rios, PhD^c

Heitor Marques Honório, PhD^c

Fabiano Vieira Vilhena, PhD^a

Fábio Correia Sampaio, PhD^b

Marília Afonso Rabelo Buzalaf, PhD^{a**}

^aDepartment of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP, 17012-901 Brazil.

^bHealth Sciences Center, Paraíba Federal University, João Pessoa, PB, Brazil. Jardim Universitário, s/n, João Pessoa/PB, 58051900 Brazil.

^cDepartment Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Public Health, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP, 17012-901 Brazil.

Running title: Low-fluoride acidic liquid dentifrice: RCT

*Contributed equally to this work

****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, 17012-901 Brazil. Tel. + 55 14 32358346; Fax + 55 14 32271486; E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br (to whom reprint requests must be sent)

Number of words of the complete text: 2748

Abstract

Objective: This randomized clinical trial evaluated the effect of pH and fluoride concentration of liquid dentifrices (LD) on caries progression and fluoride uptake in toenails of 2-4-year-old children. **Materials and methods:** Schoolchildren living in a fluoridated area, with(A) or without(I) active caries lesions, were randomly allocated into 3 groups according to the LD used over 12 months: Group 1 (n=48-A/56-I): 550µgF/g-pH4.5, Group 2 (n=56-A/48-I) 1100µgF/g-pH7.0, Group 3 (n=52-A/55-I): 550µgF/g-pH7.0. The number of lesions becoming active/cavities or inactive was clinically evaluated determining progression or regression. Additionally, white spot lesions were evaluated by the QLF method in 75 children. Toenail fluoride concentration was also evaluated. Data were analyzed by ANOVA followed by Dunn's test or ANCOVA followed by Tukey's test ($p<0.05$). **Results:** Caries net increment followed a decreasing pattern according to the dentifrice used ($G1<G2<G3$), regardless caries activity, but significant differences were detected only for caries progression and net increment ($G1<G3$) for the caries-active group when evaluated through visual inspection. For the regression, the values found for the three groups were more similar, without significant differences. QLF analysis detected no significant difference between Groups 1 and 2, but they performed significantly better than Group 3. A significantly lower toenail fluoride concentration was observed when children used the low-fluoride dentifrices. **Conclusions:**The low-fluoride acidic LD has good potential to prevent caries and reduce fluoride intake. **Clinical Relevance:** The low-F acidic dentifrice combines the desirable characteristics of caries prevention and reduced fluoride intake, for a product to be used by children, regardless their caries status.

Keywords: Dentifrices; Dental caries; Fluoride; Randomized, clinical trials; Toe nails; Caries activity.

Introduction

Fluoridated dentifrice is an important source of fluoride (F) intake in early childhood[1-3], when excessive F intake can lead to dental fluorosis in permanent maxillary central incisors[1]. One strategy to diminish the F intake from dentifrices is the reduction of the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush[4,5].

Another alternative is the use of dentifrices with low F concentration. However, only a few studies assess the primary dentition and there is still uncertainty about the efficacy of low-F dentifrices (around 500µg/g) to prevent caries in early childhood compared with the conventional ones (around 1000µg/g)[6,7]. When developing new low-F dentifrice formulations, the great challenge is to keep the same anticaries efficacy of conventional dentifrices. Among the available strategies, the reduction of the pH has gained attention. Low-F acidic dentifrices are as effective as conventional neutral dentifrices *in vitro*[8,9] and *in situ*[10].

Recently, a low-F acidic liquid dentifrice (LD) was developed to combine the available strategies to reduce the F intake from dentifrices. The liquid consistency allows the application of the dentifrice through the “drop” technique, which standardizes and reduces the amount of dentifrice loaded onto the toothbrush[4]. This formulation was effective to increase F uptake in dental plaque and to reduce nail F concentration[11]. Moreover, it led to similar caries progression rate as the conventional 1100µgF/g toothpaste in a randomized clinical trial conducted for 20 months with 4-year-old children living in a fluoridated area[12].

The caries activity status should be considered when indicating low-F dentifrices. The dentifrice with low-F concentration (500µg/g) had similar anticaries efficacy to that of a conventional dentifrice (1100µgF/g) for 2-4-year-old caries-inactive children. However, for caries-active children, the conventional dentifrice significantly reduced the progression and the net increment of initial carious lesions when compared with the low-F toothpaste[13]. It is important to note that these formulations had neutral pH and these children lived in a non-fluoridated community. It was then hypothesized that in a fluoridated area, the low-F acidic and the conventional neutral dentifrice would have the same anticaries efficacy as the low-F neutral dentifrice, even for caries-active children. To test this, the present clinical trial compared the anticaries effect of low-F (550µg/g) acidic, low-F neutral and conventional (1100µgF/g) neutral LDs in 2-4-year-old caries-active and caries-inactive schoolchildren living in a fluoridated community. The response variables were visual inspection and the quantitative light-induced fluorescence method (QLF). Additionally, toenail F concentration was evaluated, in order to estimate F intake from these formulations.

Materials and methods

Experimental Design

This randomized, double-blind clinical trial was approved by the IRB of Bauru Dental School (16/2009). It involved 2-to-4-year-old children who attended 5 public primary schools in Bauru, Brazil (0.6–0.8 µgF/mL in drinking water)[14].

The sample size was based on a previous trial[13]. Accordingly, 22 children per dentifrice treatment resulted in a 85% power ($\alpha=0.05$) for detecting difference of 1.0 and 2.0 in caries increment and a SD of 0.92 and 2.3 in the caries-inactive and caries-active groups, respectively, when the 500 and 1100 µgF/g neutral dentifrices were used in a non fluoridated area. In a fluoridated area, caries increase is expected to be approximately 40% lower than in a non-fluoridated area[15,12]. Thus, sample size was increased around 25% (36 children/group). Expecting a sample loss of 30% throughout the year, 47 children should be included in each group.

Schools that had over 150 students aged 2-4 years were pre-selected. Among these, 5 schools (one from each geographical region of the city) were chosen by draw. All 876 children from the 5 schools were invited to participate and received the informed consent. From these, 389 signed informed consents were obtained. These children were invited for clinical examination. From them, 74 children missed clinical examination or filled the exclusion criteria (participation in other researches in the last 3 months or use of orthodontic appliances). Thus, the total number of children enrolled was 315. They were examined according to diagnostic criteria of caries activity and surface lesion integrity[16] and allocated into two main groups (156 caries-inactive and 159 caries-active). Each group was randomly reassigned into 3 subgroups differing according to the type of dentifrice they should use over 12 months. This assignment was done by one of the researchers (F.V.V.) with the application of an algorithm previously established. The software Excel generated random numbers ranging from 0 to 0.99. The volunteers were assigned to the subgroups as follows: G1 $\leq$ 0.33; G2 $>$ 0.33 to $\leq$ 0.66; G3 $>$ 0.66 to $\leq$ 0.99. Thus, three subgroups were composed according to the type of LD: 1-550µgF/g-pH4.5 (low-F acidic); 2-1100µgF/g-pH7.0 (conventional neutral); 3-550µgF/g-pH7.0 (low-F neutral). The number of children allocated in subgroups 1, 2 and 3 was 48, 56 and 52 for the caries-active children, respectively. For the caries-inactive children, the corresponding numbers were 56, 48 and 55, respectively (Figure 1). F concentration and pH of the experimental formulations, manufactured by Dental Prev Ind. Com. Ltda (Lorena, Brazil), were stable (25°C) until the end of the experimental period. All formulations were NaF-based and identical, except for the dentifrices' color. The colors' code was kept by one person not involved in the examination of the children.

At baseline, children with restorative needs were treated at the Pediatric Dentistry Clinics of Bauru Dental School.

Study Regimen

Instructions about the study regimen were given to school directors, teachers, and children's parents. Kits containing dentifrices and toothbrushes were supplied for the whole family every 3 months to guarantee the use of the experimental LD by the children, facilitating compliance with the study protocol.

Parents and teachers were instructed to brush their children's teeth for 1min, at least twice/day (in the morning and before going to bed on schooldays; in the morning, after lunch and before going to bed during holidays and weekends) and were also asked not to use other oral hygiene products. No instructions regarding rinsing procedures were given. The LDs were applied onto the toothbrushes using the 'drop' technique (around 0.15g)[4]. A questionnaire was applied to the volunteers' parents 6 months after the use of LDs and at the end of the study. It evaluated toothbrushing frequency, compliance with the study, opinion about the dentifrices, difficulties in following the protocol and possible adverse effects.

Caries Registration

Two examiners (C.A.B.C and D.F.B.M.) evaluated the children's teeth at baseline and after 12 months, using caries-diagnostic criteria assessing the activity (active, inactive) and surface integrity (intact, surface discontinuity, cavity) of the lesions [16]. The intra-examiner agreement was tested by duplication of 20 examinations/examiner at the beginning ($k=0.88$ and 0.78 for examiners 1 and 2, respectively) and at the end of the study ($k=0.84$ and 0.75 , respectively). The inter-examiner kappa values were 0.78 and 0.75 for the first and second examinations, respectively. The examiners were blinded with respect to the baseline caries recordings at the follow-up year.

The examiners brushed the children's teeth for plaque removal before the examinations that were conducted under natural light, using chairs and tables from the school and a portable dental unit equipped with compressed air and a suction device. All the surfaces of the deciduous teeth were recorded using gauze and plane mouth mirrors after being dried with compressed air for 3-5s.

Missing teeth were recorded as either unerupted or extracted. Children were considered as caries-active when they had at least 1 or more active cavities or active noncavitated caries lesions (ANC). Those having no cavities neither ANC caries lesions were considered as caries-inactive. The lesions' progression or regression was evaluated by the data from the examinations at baseline and after 12 months. Net increment was calculated from the difference between lesions progressing and regressing. The lesions were considered to have progressed

when a sound surface or inactive noncavitated (INC) caries lesion was reevaluated after 12 months as an ANC lesion or cavity (untreated cavity or filled tooth). The lesions' regression was considered when an ANC lesion was reevaluated after 12 months as INC or sound surface[16,13].

QLF Registration

The white spot lesions' progression or regression was also determined by the QLF in a subsample of 75 caries-active children. The images were captured from the deciduous teeth which had at least one smooth surface with a clinically visible ANC. These children were then randomly selected, according to the dentifrice they had been using, and divided into 3 groups (25/group; Table 1). The sample size was calculated according to Tranaeus et al. (2001). Enamel fluorescence was measured at baseline and after 12 months using a portable QLF device (InspeKtor PRO System, Amsterdam, Holland). Equipment specifications are described elsewhere[17]. After prolonged airdrying (5s), QLF images were taken of the deciduous maxillary and mandibular teeth by a trained examiner (C.A.B.C) in a darkened room. QLF 2.00f software (Inspektor Research Systems BV) was used to display, store, and analyze the images. For every lesion, the fluorescence loss (ΔF in %) and the area of the lesion (mm^2) were calculated by the software at the QLF threshold of 5%. Data analysis was performed blindly and in a random order. The reproducibility and repeatability of the QLF analysis was calculated by intra-class correlation coefficient (ICC) that was 0.91 and 0.95 for area and ΔF , respectively.

F Concentrations in Nails

A sample of 161 children participating in the randomized clinical trial that had been using the LDs for 6 months was randomly selected and divided into 3 groups according to the type of dentifrice used. Parents were instructed to let the children's big toenails grow for 15 days before clipping them. Two samples were obtained from each child. Nail clippings were cleaned with deionized water, sonicated for 10min, dried at $60 \pm 5^\circ\text{C}$ and weighed. F concentrations were determined after overnight hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion[18,19], as previously described[11]. The mean repeatability of the readings, based on duplicate samples, was 95%. The standard curve had a coefficient of determination ≥ 0.98 .

Statistical Analysis

Data were checked for normality and homogeneity. Data from lesion area, ΔF and toenail F concentration were evaluated by ANOVA and Dunn's *post hoc* test. Data from the clinical exams were evaluated by ANOVA for the caries-inactive children and ANCOVA and Tukey's *post hoc* test for progression, regression and caries increment for the caries-active children. The significance level was set at 5%. The softwares used

were Sigma Plot for Windows version 12.0 (SigmaPlot Software Inc., San Jose, USA) and Statistica for Windows version 11.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA).

Results

The initial sample of 315 children (148 male, 167 female; mean age (SD) 3.4 (0.6) years) fell to 195 (90 male, 105 female; mean age 4.2 (0.6) years) at the end of the study (38% loss, mainly due to the fact that parents changed their children's school). The number of the QLF sample dropouts was 7, 9 and 14, for groups 1-3, respectively (Figure 1).

Compliance with the study protocol was satisfactory. According to the questionnaire applied at 6 months, 90% of the children brushed 2-3 times/day with the LD. There were no reports of adverse effects, but some children complained about the taste of the dentifrice. A few volunteers reported sporadic use of another dentifrice. Eight volunteers did not answer the questionnaire. At 12 months, 82% of the children's parents answered the questionnaire. Among them, 80% reported to have brushed 2-3 times/day with the LD.

In the caries-inactive group (Table 1), although a numerical difference in caries increment could be seen after 12 months (low-F neutral>conventional neutral>low-F acidic), there were no significant differences among the groups ($p=0.9337$).

For the caries-active group (Table 2), the caries progression and net increment were significantly higher for the low-F neutral compared to the low-F acidic LD and although the low-F neutral led to a higher caries increment when compared to the conventional neutral LD, no significant difference was seen between these groups. For the regression, the values found for the three groups were more similar, without significant differences.

The same tendency observed for the clinical examination was seen for the QLF, but a significant difference between the conventional neutral and the low-F neutral LDs was detected. Both for change in lesion area and fluorescence, the low-F acidic and conventional neutral LDs did not significantly differ from each other, but performed significantly better than the conventional neutral LD (Table 3).

Mean $\pm$ SD toenail F concentrations were similar for the children using the low-F dentifrices (1.80 ± 0.92 $\mu\text{g/g}$ ($n=53$) and 1.73 ± 0.68 $\mu\text{g/g}$ ($n=58$) for the acidic and neutral LDs, respectively) and significantly lower than those observed for the children using the conventional neutral dentifrice (2.57 ± 1.31 $\mu\text{g/g}$ ($n=50$)).

Discussion

This clinical trial was designed to add evidence to guide the indication of dentifrices to young children, since this is an important, but incompletely answered clinical question.

Our results do not confirm the hypothesis that in a fluoridated area the low-F acidic and the conventional neutral dentifrices would have the same anticaries efficacy as the low-F neutral dentifrice, even for caries-active children. Caries progression and net increment followed an increasing pattern for caries-active children according to the dentifrice used (low-F acidic < conventional neutral < low-F neutral), but only the low-F dentifrices significantly differed from each other when evaluated through visual inspection. The QLF analyses showed the same tendency observed for the clinical examination, but a significant difference between the neutral dentifrices was also detected. The low-F acidic and the conventional neutral LDs performed significantly better than the low-F neutral LD. The higher discriminatory ability by the QLF method when compared with the clinical examination, which was also observed in the study by Traaen and co-workers[20], is attributed to the higher sensitivity of the first method[17]. In-line with this, it was recently described that the QLF diagnostic system was able to detect, within 3- and 6-month periods of supervised brushing, a difference in remineralization between F (1,450 µgF/g) and no F dentifrices[21]. To our knowledge, the present study is the first one that shows the ability of the QLF system to detect significant differences in enamel remineralization among dentifrices with different F concentrations. Our data indicate that the association of QLF analysis with clinical examination when caries increment is the final outcome is important to increase the potential of differentiation among the treatments.

Information is still lacking regarding the mechanisms by which the reduction of the dentifrice pH can increase the anticaries efficacy of the dentifrice. It seems that increased formation of CaF_2 -like deposits on enamel[22] is not the probable mechanism, at least in the range of F concentrations employed in the present study (unpublished observations). One possible hypothesis for the higher anticaries potential of the acidic dentifrices might be the increased uptake of F in plaque (Buzalaf et al., 2009), since this might be one of the most important F reservoirs[23] and people do not completely remove plaque during toothbrushing. Another possible explanation would be a higher salivary flow rate caused by the use of low-pH dentifrices. It has been reported that the acidic taste of candies stimulated much higher saliva flow rates than chewing stimulation of non-acidic gum [24]. However, there is no data reporting the effect of low-pH dentifrices on the salivary flow-rate, which should be confirmed in future studies.

Calculation of the sample size in the present study was based on the study by Lima and co-workers[13]. The authors evaluated children in the same age range as those enrolled in the present study and reported a significantly lower anti-caries efficacy for the low-F dentifrice when compared to the conventional one. However, these dentifrices had a neutral pH, and the study was conducted in a non fluoridated area. The

presence of fluoride in drinking water could have made the differences among the F concentrations of the dentifrices clinically less evident.

Children that used the low-F dentifrices might have had reduced F intake throughout the study, since a significantly lower F concentration was found in their toenails, as described previously[11]. Additionally, it was recently suggested that nail F concentration lower than 2 µg/g, which was the case for the children using the low-F LDs, is associated with absence of dental fluorosis in the permanent dentition[25]. Taken together, our findings indicate that the low-F acidic dentifrice combines the desirable characteristics for a product to be used by children, regardless their caries status. However, the low-F neutral dentifrice should not be indicated for caries-active children, even if they live in fluoridated areas.

Acknowledgements

This study was funded by FAPESP (2008/58402-9, 2010/11916-8 and 2010/01944-4). Authors thank Prof. José Roberto Lauris for statistical advice.

Conflict of interest: University of São Paulo has a patent request in Brazil (INPI) for “Low-fluoride acidic liquid dentifrice and its use”.

Registration number and name of trial registry: Protocol ID: USP0162009/ClinicalTrials.gov ID: NCT01049503.

Where the full trial protocol can be accessed: <http://clinicaltrials.gov/>

Authors contribution: Conceived and designed the experiments: MARB, DR, FCS. Performed the experiments: CABC, DFBM, KPKO, FVV. Analyzed the data: ACM, MARB, CABC, HMH. Wrote the paper: CABC, MARB, ACM, DR

References

1. Buzalaf MA, Levy SM (2011) Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci* 22:1-19. doi:000325101-10.1159/000325101
2. Mascarenhas AK (2000) Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent* 22 (4):269-277.
3. Wong MCM, Glenn AM, Tsang BWK, Lo ECM, Worthington HV, Marinho VCC (2010) Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Db Syst Rev* (1). doi:Artn Cd007693-Doi 10.1002/14651858.Cd007693.Pub2
4. Vilhena FV, Silva HM, Peres SH, Caldana Mde L, Buzalaf MA (2008) The drop technique: a method to control the amount of fluoride dentifrice used by young children. *Oral Health Prev Dent* 6 (1):61-65.
5. 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.

6. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VCC, Shi X (2010) Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Db Syst Rev* (1). doi:Artn Cd007868-Doi 10.1002/14651858.Cd007868.Pub2
 7. Wong MC, Clarkson J, Glenny AM, Lo EC, Marinho VC, Tsang BW, Walsh T, Worthington HV (2011) Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. *J Dent Res* 90 (5):573-579. doi:0022034510393346-10.1177/0022034510393346
 8. Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sassaki KT, Delbem AC (2007) In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 41 (4):263-267. doi:000101915-10.1159/000101915
 9. Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sassaki KT (2006) In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 40 (3):239-244. doi:92232-10.1159/000092232
 10. 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):147-154. doi:JST.JSTAGE/josnusd/49.147
 11. Buzalaf MA, Vilhena FV, Iano FG, Grizzo L, Pessan JP, Sampaio FC, Oliveira RC (2009) The effect of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on plaque and nail fluoride levels in young children. *Caries Res* 43 (2):142-146. doi:000211717-10.1159/000211717
 12. Vilhena FV, Olympio KP, Lauris JR, Delbem AC, Buzalaf MA (2010) Low-fluoride acidic dentifrice: a randomized clinical trial in a fluoridated area. *Caries Res* 44 (5):478-484. doi:000320364-10.1159/000320364
 13. 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. doi:000111749-10.1159/000111749
 14. Ramires I, Maia LP, Rigolizzo Ddos S, Lauris JR, Buzalaf MA (2006) [External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil]. *Rev Saude Publica* 40 (5):883-889. doi:S0034-89102006000600019
 15. Silva MF, Melo EV, Stewart B, De Vizio W, Sintes JL, Petrone ME, Volpe AR, Zhang Y, McCool JJ, Proskin HM (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 Spec No:19A-23A.
 16. Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V (2003) Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res* 82 (2):117-122.
 17. Kuhnisch J, Ifland S, Tranaeus S, Hickel R, Stosser L, Heinrich-Weltzien R (2007) In vivo detection of non-cavitated caries lesions on occlusal surfaces by visual inspection and quantitative light-induced fluorescence. *Acta Odontol Scand* 65 (3):183-188. doi:778855374-10.1080/00016350701291685
 18. Taves DR (1968) Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 15 (9):969-974. doi:0039-9140(68)80097-9
 19. Whitford GM (1996) The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* 16 Rev 2:1-153.
 20. Tranaeus S, Al-Khateeb S, Bjorkman S, Twetman S, Angmar-Mansson B (2001) Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci* 109 (2):71-75.
 21. Feng Y, Yin W, Hu D, Zhang YP, Ellwood RP, Pretty IA (2007) Assessment of autofluorescence to detect the remineralization capabilities of sodium fluoride, monofluorophosphate and non-fluoride dentifrices. A single-blind cluster randomized trial. *Caries Res* 41 (5):358-364. doi:000104793-10.1159/000104793
 22. Petersson LG, Lodding 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.
 23. Vogel GL (2011) Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci* 22:146-157. doi:000325166-10.1159/000325166
 24. Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A (2005) Effects of Sucking Acidic Candy on Whole-Mouth Saliva Composition. *Caries Res* 39:468-474. doi: 10.1159/000088181
 25. Buzalaf MA, Massaro CS, Rodrigues MH, Fukushima R, Pessan JP, Whitford GM, Sampaio FC (2012) Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. *Caries Res* 46 (4):394-400. doi:10.1159/000339088
-

Table 1. Progression of dental caries in the caries-inactive group, after 12 months of study, according to the different types of dentifrice used.

Dentifrices	Lesions/child
550 µgF/g pH 4.5	0.03 ± 0.18 (n=29)
550 µgF/g pH 7.0	0.14 ± 0.74 (n=29)
1100 µgF/g F pH 7.0	0.10 ± 0.50 (n=40)

Mean ± SD. There were no significant differences among the groups (p>0.05).

Table 2. Mean baseline number of active white spot lesions (ANC), progression, regression and net increment after 1 year in the caries-active group, according to the type of dentifrice used

Dentifrices	Baseline	Progression	Regression	Net Increment
550 µgF/g pH4.5 n=34	1.73 ± 1.69	0.56 ± 0.96 ^a	1.47 ± 1.86 ^a	-0.91 ± 1.69 ^a
550 µgF/g pH7.0 n=32	1.37 ± 1.34	1.66 ± 1.98 ^b	0.97 ± 0.93 ^a	0.69 ± 2.00 ^b
1100 µgF/g pH7.0 n=31	2.61 ± 1.89	1.39 ± 1.91 ^{ab}	1.87 ± 1.59 ^a	-0.48 ± 2.64 ^{ab}

Mean ± SD. For progression, regression and net increment, distinct superscript letters in the same column indicate significant differences among the dentifrices (for progression and net increment). Comparison made by ANCOVA and Tukey' test ($p < 0.05$).

Table 3. Mean baseline and change in fluorescence (ΔF , %) and lesion area (mm^2) after 12 months (baseline – 12 months) of use of dentifrices with different fluoride concentrations and pH by 2-4-year-old children living in a fluoridated area

Groups	Area (mm^2)		ΔF (%)	
	Baseline	Change	Baseline	Change
550 $\mu\text{gF/g}$ pH 4.5 (n=18)	1.98 $\pm$ 1.31	0.13 $\pm$ 0.80 ^a	-17.82 $\pm$ 6.37	-3.46 $\pm$ 5.65 ^a
550 $\mu\text{gF/g}$ pH 7.0 (n=11)	3.46 $\pm$ 2.50	-1.03 $\pm$ 1.22 ^b	-15.80 $\pm$ 3.86	2.66 $\pm$ 2.52 ^b
1100 $\mu\text{gF/g}$ pH 7.0 (n=16)	2.34 $\pm$ 1.93	-0.06 $\pm$ 0.80 ^a	-17.54 $\pm$ 6.58	-2.72 $\pm$ 3.97 ^a

Mean $\pm$ SD. For change in fluorescence and lesion area, distinct superscript letters in the same column indicate significant differences among the dentifrices. Comparison made by ANOVA and Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$). "Children" was used as the unit.

Figure 1. Experimental design of the study.