

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

SANDRO CARVALHO KUSANO

**EFEITO DO USO DE DENTIFRÍCIO FLUORETADO ANTES OU APÓS OS
DESAFIOS DESMINERALIZANTES NA PERDA MINERAL DO ESMALTE E
DENTINA RADICULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
UNICAMP para obtenção do Título de Mestre
em Odontologia, na Área de Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

DEFENDIDA PELO ALUNO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

K968e Kusano, Sandro Carvalho, 1983-
Efeito do uso de dentífrico fluoretado antes ou após os
desafios desmineralizantes na perda mineral do esmalte e
dentina radicular / Sandro Carvalho Kusano. -- Piracicaba, SP :
[s.n.], 2011.

Orientador: Livia Maria Andaló Tenuta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Flúor. 2. Cárie dentária. 3. Desmineralização. I. Tenuta,
Livia Maria Andaló. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin
demineralization

Palavras-chave em Inglês:

Fluorine
Dental caries
Demineralization

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Livia Maria Andaló Tenuta [Orientador]
Carolina Patrícia Aires
Luis Alexandre Maffei Sartini Paulillo

Data da defesa: 21-06-2011

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 21 de Junho de 2011, considerou o candidato SANDRO CARVALHO KUSANO aprovado.

Livia M. A. Tenuta

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Carolina Patrícia Aires

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES

Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo

Prof. Dr. LUIS ALEXANDRE MAFFEI SARTINI PAULILLO

**Dedico este trabalho aos meus pais, Norma e
Renato, pelo amor, confiança e apoio
incondicionais.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por sempre manifestar Sua presença na minha vida, e me indicar os caminhos e sua forma de serem percorridos.

À minha família: meus pais **Norma Suely** e **Renato Maciel**, meu irmão-gêmeo **César**, e minha irmã **Denise**, pelo amor, apoio constante, fundamental e incondicional.

À minha orientadora, **Livia Maria Andaló Tenuta**, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Pela sua competência e perfeccionismo demonstrados diariamente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **Fernando Ferreira Costa**.

À FOP/UNICAMP, na pessoa do diretor Prof. Dr. **Jacks Jorge Júnior**.

Ao curso de Pós-graduação da FOP/UNICAMP, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. **Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. **Cíntia Pereira Machado Tabchoury**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP**, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior, **CAPES**, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, **CNPq**, pelas bolsas concedidas.

À Profa. Dra. **Livia Maria Andaló Tenuta** pela exímia orientação.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury** pela valiosa co-orientação, críticas e sugestões ao trabalho e pelos ensinamentos transmitidos durante todo o Mestrado.

À Profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury** pela inestimável participação no planejamento e execução desta pesquisa.

À Profa. Dra. **Cíntia Pereira Machado Tabchoury** pelo apoio em momentos importantes para a realização deste trabalho.

Aos professores **Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, **Cláudia Maria Coêlho Alves**, **Jaime Aparecido Cury**, e **Ynara Lima Arsati** pelas sugestões feitas durante os exames de qualificação.

Aos técnicos de laboratório **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva** pela ajuda e atenção indispensáveis.

À **Eliane Melo Franco** e **Maria Eliza dos Santos** pela disponibilidade e ajuda em todos os momentos necessários.

Aos amigos de pós-graduação: **Ana Flávia Bissoto**, **Regiane Amaral**, **Carlos Oliveira Jr**, **Marília Correia**, **Juliana Braga**, **Frederico Fernandes**, **Lívia Helena Souza**, **Nadia Masson**, **Karla Cook**, **Amanda Falcão**, **Alhetea Ratti**, **Tarcísio Jorge**, **Juliana Nunes**, **Naiara de Paula**, **Ana Carolina Aires**, **Renzo Vasquez**, **Gláuber Vale**, **Rodrigo Arthur**, **Rosana Hoffman**, **Danilo Catani**, **Fabiana Gouveia**, **Pedro Ricomini**, **Larissa Briet**, **Patrícia Lima**, **Andrea Sanchez**, **Frederico Martinho**, **Fernanda Sinhorette** e **Marcos Endo** pelas discussões científicas e não-científicas.

Aos estagiários **Tamires Munerato** e **Jerônimo Ribeiro Jr.** pela ajuda no laboratório durante todo o mestrado.

Aos amigos **Ana Flávia Bissoto**, **Danilo Telles**, **Leonardo Barros**, **André Baldassin**, **Regiane Amaral**, **Carlos Oliveira Jr**, **Thais de Paula**, **Luiza Barros**, **Renata**, pelo convívio fortalecedor e harmonioso durante esses anos.

Aos queridos amigos: **Fernando Fernandes, Rinaldi Campos, Agnaldo Mota Jr, Nádia Sampaio, Mayara Baldez, Monique Mouchrek, Felipe Limonge, Robson Oliveira, Daniel Negri, José Roberto, Rafael Benatto, Acácio Oliveira, Adamilton Strapassano, Alexandre Pistori, Carlos Crespo, Vanessa Oliveira, Cristiano Ferraz, Cristian Prado, Dione Costa, Henrique Alves, Ivan Zani, Jackson Domiciano, Osvaldo Pereira, Pedro Paulo Pedrozo, Rafael Pedrozo, Tiago Caprera, Agamenon Segundo, Reinaldo Ramires, Leonardo Veiga, Ícaro Malta, Humberto Rodrigues, Guilherme Cardoso, Welington Rodrigues, Bruno Alcântara, Leandro Noleto, Raquel Abreu, Carlos Borges e Denisson Pena**, pela agradável companhia e bons momentos, aonde quer que estivéssemos.

Aos voluntários **Amanda, Bruna, Ivan, Juliana, Karla, Letícia, Marcelo, Nádia Patrícia, Plínio e Tarcísio**, pela valiosíssima participação nesta pesquisa.

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

*"Convicções fortes conquistam homens fortes,
e então os fazem mais fortes".*

Walter Bagehot

RESUMO

O Fluoreto (F) interfere com o desenvolvimento de cárie dental quando presente no meio bucal, reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização da estrutura dental. Embora ambos os mecanismos estejam envolvidos na redução da perda mineral na presença de F, não foi encontrado nenhum estudo in situ que avaliasse a importância relativa de cada um deles na inibição do desenvolvimento de cárie. Desta forma, foi realizado um estudo in situ, cruzado e cego, com o objetivo de avaliar o efeito do momento de uso do dentifrício fluoretado, i.e., antes ou após desafios desmineralizantes diários (para simular efeito na redução da desmineralização ou ativação da remineralização, respectivamente), na perda mineral do esmalte e dentina radicular. Doze voluntários utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo 3 blocos de esmalte e 3 de dentina radicular hígidos e com dureza de superfície previamente determinada, durante 3 fases de 14 dias cada. Os blocos foram fixados 1 mm abaixo do nível do dispositivo e cobertos por uma tela plástica para favorecer o acúmulo de biofilme dental, e foram expostos à sacarose 20% 8x/dia. Os voluntários realizaram os seguintes tratamentos: G1 – dentifrício placebo (não-fluoretado) três vezes/dia (grupo controle); G2 – dentifrício fluoretado pela manhã (7:00), antes dos desafios desmineralizantes diários, e dentifrício não-fluoretado nas escovações seguintes; e G3 – dentifrício fluoretado à noite (entre 20:00 e 21:00), após os desafios desmineralizantes, e dentifrício não-fluoretado nas duas escovações anteriores. A desmineralização do esmalte e dentina radicular foi avaliada pela porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS). Também foi avaliada a concentração de fluoreto incorporado aos blocos dentais (fluorapatita). Os resultados de %PDS dos tratamentos com dentifrício fluoretado diferiram do grupo controle ($p < 0,05$), tanto para o esmalte ($G1=72,0\% \pm 20,8$; $G2=41,6\% \pm 21,5$; $G3=30,0\% \pm 15,8$) quanto para a dentina ($G1=76,5\% \pm 9,3$; $G2=61,8\% \pm 11,8$; $G3=48,4 \pm 19,1$), sendo que na dentina, a %PDS foi menor ($p < 0,05$) no grupo tratado com dentifrício fluoretado após os desafios desmineralizantes. A

concentração de F nos blocos de esmalte não diferiu entre os grupos tratados com dentifrício fluoretado ($p>0,05$), no entanto, foi significativamente maior no grupo tratado com dentifrício fluoretado após os desafios desmineralizantes, quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$). Nos blocos de dentina, os grupos tratados com dentifrício fluoretado apresentaram concentrações significativamente maiores quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$), entretanto não diferiram entre si ($p>0,05$). Os resultados do presente estudo sugerem que o dentifrício fluoretado é mais eficaz na redução da cárie através da ativação da remineralização do esmalte e dentina radicular, do que pela inibição da sua desmineralização.

Palavras-chave: fluoreto, dentifrício, desmineralização, dentina radicular, esmalte.

ABSTRACT

Fluoride (F) interferes with dental caries development when present in oral environment, reducing dental demineralization and enhancing its remineralization. Although both mechanisms are related to the reduction of mineral loss in the presence of F, no experimental study which evaluated the relative importance of each mechanism on the inhibition of development of dental caries was found. Thus, this in situ, crossover and blind study was performed to evaluate the effect of the period of F dentifrice use, i.e., either before or after daily cariogenic challenges (to simulate either the effect on the reduction of demineralization or on the enhancement of remineralization, respectively), on enamel and root dentin remineralization. Twelve volunteers wore palatal appliances containing three sound enamel slabs and three sound root dentin slabs, with surface hardness previously determined, during three phases of 14 days each. Dental slabs were fixed 1 mm underneath the level of the appliance and covered by a plastic mesh to allow dental biofilm accumulation, and exposed to sucrose 20% 8x/day. The volunteers performed the following treatments: G1 – placebo toothpaste (non-fluoride) three times/day (control group); G2 – fluoride toothpaste in the morning (7:00), before cariogenic challenges, and non-fluoride toothpaste in the next two toothbrushings; and G3- fluoride toothpaste at night (between 20:00 and 21:00), after cariogenic challenges, and non-fluoride toothpaste in the previous two toothbrushings. Enamel-dentin demineralization was evaluated by percentage of surface hardness loss (%SHL). F uptake by enamel and dentin was also determined (as fluorapatite). %SHL data in groups treated with fluoride toothpaste differ from control group ($p < 0.05$), for both enamel ($G1 = 72.0\% \pm 20.8$; $G2 = 41.6\% \pm 21.5$; $G3 = 30.0\% \pm 15.8$) and dentin ($G1 = 76.5\% \pm 9.3$; $G2 = 61.8\% \pm 11.8$; $G3 = 48.4 \pm 19.1$). For dentin, %SHL was lower ($p < 0.05$) in the group using fluoride toothpaste after cariogenic challenges. F concentration in enamel slabs did not differ between groups using fluoride toothpaste ($p > 0.05$), however, it was significantly higher in the group treated with fluoride toothpaste after cariogenic challenges compared to control

group ($p < 0.05$). For dentin slabs, groups using fluoride toothpaste showed significantly higher F concentration compared to control group ($p < 0.05$), but no difference was observed between each other ($p > 0.05$). The findings of this study suggest that F from toothpaste is more effective to reduce caries by enhancing enamel-dentine remineralization than by reducing their demineralization.

Keywords: fluoride, dentifrice, demineralization, root dentin, enamel.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
PROPOSIÇÃO.....	3
CAPÍTULO.....	4
CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
APÊNDICES.....	22
ANEXOS.....	26

INTRODUÇÃO

Quando presente nos fluidos do meio bucal (saliva e biofilme), o fluoreto (F) interfere fisicoquimicamente com o processo de cárie dental, reduzindo a desmineralização do esmalte-dentina quando o pH cai durante a fermentação de açúcares pela placa (biofilme) dental, e ativando a remineralização do mineral perdido quando o pH volta ao normal (Cury & Tenuta, 2008, como revisão).

Dentre os meios de usar F, creme dental tem sido considerado o fator responsável pelo declínio de cárie observado tanto em países desenvolvidos (Bratthall *et al.*, 1996) como nos em desenvolvimento (Cury *et al.*, 2004) e seu mecanismo de ação parece estar relacionado ao aumento da concentração de F em remanescentes de biofilme não perfeitamente removidos pela escovação (Cenci *et al.*, 2008; Tenuta *et al.*, 2009).

É bem estabelecido na literatura que o F interfere com a perda mineral dental através da inibição da desmineralização e da ativação da remineralização durante a dinâmica do processo de cárie (ten Cate *et al.*, 1988; ten Cate, 1990; Larsen, 1990), entretanto, a extensão de cada um desses efeitos não é conhecida devido à dificuldade de segregação de ambos os fenômenos. Assim, o fluoreto proveniente do dentifrício é capaz de inibir a desmineralização (em valores de pH abaixo do “crítico” para dissolução) e ativar a remineralização (valores de pH acima do “crítico” para dissolução) dos substratos dentais por disponibilizar íons F ao meio bucal (Cury & Tenuta, 2008; Tenuta *et al.*; 2009). No entanto, é desconhecido qual desses mecanismos é mais relevante.

No esmalte, o efeito anticárie do dentifrício fluoretado quando utilizado antes ou após o ciclo desmineralizante diário foi avaliado apenas *in vitro* (ten Cate *et al.*, 1988). Estes autores sugeriram que o efeito seria semelhante se o F fosse disponibilizado previamente ao ciclo desmineralizante, ou após este, para aumentar a taxa de reversão mineral que ocorreria durante o ciclo remineralizante subsequente. Entretanto, o efeito da variação do horário de utilização do dentifrício

fluoretado ainda não foi estudado sob condições que simulassem o uso clínico do fluoreto.

Sabe-se que a dentina é mais suscetível à desmineralização que o esmalte, já que possui composição diferente do esmalte, apresentando maior volume de componentes orgânicos e com pH crítico para o desenvolvimento de cárie maior que o esmalte (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986), portanto, é importante avaliar o efeito do horário de escovação com dentifrício F neste substrato, considerando a prevalência de cárie radicular devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial (Curzon & Preston, 2004). Além disso, outros estudos sugeriram que o efeito do fluoreto na redução de cárie de dentina (Vale *et al.*, 2010) parece não ser o mesmo do que para o esmalte (Paes Leme *et al.*, 2004).

Assim, seria interessante avaliar a importância do período de uso do dentifrício fluoretado, isto é, se antes (pela manhã) ou após (à noite) desafios desmineralizantes diários, no resultado final da desmineralização do esmalte e da dentina radicular.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo in situ teve o objetivo de avaliar o efeito do período de uso do dentífrico fluoretado, antes ou após os desafios desmineralizantes diários (pela inibição da desmineralização ou pela ativação da remineralização, respectivamente), na perda mineral final do esmalte e da dentina radicular.

Este trabalho foi realizado no formato alternativo, conforme deliberação número 002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Anexo 1).

CAPÍTULO

O presente artigo foi submetido ao periódico “Brazilian Oral Research”, conforme apresentado no comprovante de envio presente no anexo 3.

CARIOLOGY

Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization

Sandro Carvalho Kusano, Livia Maria Andaló Tenuta,

Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury

Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Corresponding author:

Livia M. A. Tenuta

Av. Limeira 901

CEP 13414-903

Piracicaba, SP, Brazil

Phone: +55-19-2106-5393

Email: litenua@fop.unicamp.br

ABSTRACT

It is not established if fluoride (F) more effectively interferes with caries lesion development by inhibiting the demineralization or by enhancing the remineralization processes. In this blind, crossover in situ study conducted in three phases of 14 days each, 12 volunteers wore palatal appliances containing enamel and root dentin slabs, on which biofilm was allowed to accumulate under exposure to 20% sucrose solution 8x/day. F toothpaste was used once a day, either before the demineralizing episodes induced or after them, and placebo toothpaste was the control group. F toothpaste was effective to reduce enamel and dentin demineralization compared with the control, but when it was used after the demineralization episodes, the effect was more effective than before, and was statistically significant for dentin. This study suggests that brushing with F dentifrice at night to remineralize daily mineral losses may be preferable than in the morning to inhibit the demineralizing episodes of the day.

Descriptors: demineralization; dentifrice; fluoride; enamel; root dentin.

INTRODUCTION

It has been long accepted that fluoride (F) interferes with dental mineral loss by inhibiting the demineralization and enhancing the remineralization during the dynamics of caries process ^{1, 2, 3}, but the extent of each of these effects is not known because it is difficult to isolate these phenomena. Thus, F toothpaste can inhibit dental demineralization and enhance the remineralization by providing F ions to the oral environment ^{4, 5} but which effect is more relevant is unknown.

The anticaries effect of F toothpaste used either before or after each daily demineralizing cycle on enamel was only studied in vitro ¹, and the authors suggested that effect would be similar if F is used either before the demineralizing cycle, to inhibit the demineralization process, or after it, to enhance the repairing of mineral that occurs during the subsequent remineralizing cycle. However, the effect of timing of toothbrushing with F toothpaste was never studied under conditions that simulate clinical F use. Also, the effect of timing of F toothpaste use on root dentine demineralization is completely unknown.

Thus, the aim of this study was to evaluate in situ the effect of timing of F toothpaste use, before or after daily cariogenic challenges, on enamel and root dentin mineral loss under biofilm accumulation and high frequency of sucrose exposure.

METHODOLOGY

A crossover, double blind in situ study of three phases of 14 days each was conducted after fulfilling ethical requirements (Ethics Committee, Piracicaba Dental School, protocol 104/2009). During each phase, 12 volunteers wore a palatal appliance containing three slabs of bovine enamel and three of root dentin ⁶, whose surface hardness (SH) was previously determined. Dental biofilm was allowed to accumulate on the enamel and dentin slabs and 8x/day (at times 8:00, 9:00, 10:00, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, and 19:00 h) they were extra-orally treated with a 20% sucrose solution as a cariogenic challenge ⁷. In the first phase, volunteers were allocated to one of the following group of treatments: G1 = brushing 3 times/day with a placebo, non-F toothpaste; G2 = brushing 1x/day with the F toothpaste (1,100 µg F/g as NaF, silica-based), in the morning, before the first sucrose exposure (at approximately 7:30 h), and the other two times with non-F toothpaste; and G3 = brushing 1x/day with the F toothpaste at night, after the last sucrose exposure (between 20:00 and 21:00 h), and in the other two occasions with non-F toothpaste. On the 15th day, the slabs were removed, SH was again determined and the percentage of loss (%SHL) was calculated as indicator of demineralization ^{7,8}. Also, F uptake by enamel and dentin was determined.

Seven-day lead-in periods were allowed before each phase, when volunteers used the treatment assigned for the next phase. Volunteers lived in an optimally fluoridated city (0.6-0.8 mg F/L, for the region), and drank and consumed foods prepared with this water. No restriction was made with regard to the volunteers' diet, but they were instructed to avoid F-rich food containing

bioavailable F, such as tea. They also received oral and written information to refrain from using any antibacterial substance.

Enamel demineralization assessment

The center of the enamel and dentin slabs were polished flat and baseline surface hardness (SH) was determined by making three indentations, spaced 100 μm from each other, using a Future-Tech FM hardness tester coupled to software FM-ARS 900. Knoop loads of 50 and 5 g were used for enamel and dentine, respectively, and before dentin hardness measurements the slabs were left to dry for at least 30 min in order to avoid interference of dentin dehydration on the measurements ⁸.

At the end of each experimental phase, SH was again measured in all the slabs. Three adjacent indentations were made at 100 μm from the baseline measurements and the values were averaged. The percentage of SH loss (%SHL) was calculated $[(\text{baseline SH} - \text{SH after in situ test}) \times 100 / \text{baseline SH}]$. The results of the three enamel and dentin slabs for each volunteer subjected to each treatment were averaged and submitted for statistical analysis ($n = 12$).

Determination of F in enamel and dentin

Slabs surface area was measured with a digital caliper ($\pm 0.01 \text{ mm}$) and all other surfaces were protected with a layer of wax. Each slab was immersed in 0.5 M HCl (3.75 mL/cm^2) for 30 s under constant agitation ⁹ and the extract was buffered with an equal volume of TISAB II (pH 5.0), modified with 20 g NaOH/L ⁹. F

concentration was determined using an ion-selective electrode (F 3005; Weiss Research, Houston, USA) and an ion analyzer (Orion EA-940; Orion Research), previously calibrated with standard F solutions prepared as the samples. Because of a difference in composition between sound and carious enamel and dentin, the data were expressed as $\mu\text{g F/cm}^2$, rather than in ppm^{10} . The results for each volunteer subjected to each treatment were averaged and submitted to statistical analysis ($n = 12$).

Statistical analysis

The data for enamel and dentin were independently analyzed. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of treatment groups on all variables. In order to reduce unknown variability from the error, volunteers were included as a source of variation (statistical blocks). The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for all response variables tested and those that did not satisfy these assumptions were transformed. The SAS software system (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) was used in all analyses, and the significance level was pre-fixed at 5%.

RESULTS

Significantly lower loss in surface hardness ($p < 0.05$), either in enamel or in dentin, was found for the groups treated with F-toothpaste compared with the control (Table). For dentin, a significant lower hardness loss was observed for the

group using F toothpaste at night when compared to the use in the morning ($p < 0.05$, Table).

In enamel slabs, F concentration was not significantly different between both groups using F toothpaste ($p > 0.05$), but was significantly higher in those treated with F toothpaste at night when compared to those treated with non-F toothpaste ($p < 0.05$), while the difference between slabs treated with F toothpaste in the morning and those treated with non-F toothpaste did not reach statistical significance ($p = 0.06$, Table). In dentin slabs, both groups treated with F toothpaste presented significantly higher F concentration than the non-F toothpaste ($p < 0.05$), with no significant difference between them ($p > 0.05$, Table).

DISCUSSION

The findings of a significant reduction of enamel and dentin demineralization by F toothpaste use once a day is relevant, considering the high cariogenic challenge induced by undisturbed biofilm accumulation for 14 days and exposure to sucrose 8x/day. The importance of frequency of toothbrushing with F toothpaste is based on evidence ^{11, 12} and using this in situ model we have shown that F toothpaste used 3x/day is effective to reduce enamel ¹³ and dentin ⁸ demineralization, but it has been recommended that toothbrushing with F toothpaste is done at least twice a day ^{12, 14}. Therefore, the data give support to the relevance of F toothpaste use to explain the caries decline observed in developing ¹⁵ and developed countries ¹⁶ because even when used only once a day it is effective to reduce tooth demineralization. Moreover, the higher F

concentration in enamel and dentin slabs when F toothpaste was used is in line with the effect of F on the inhibition of mineral loss during a cariogenic challenge, resulting from enhanced precipitation of calcium phosphates on tooth mineral in the presence of F ^{2, 3}.

More importantly, our findings showed that F toothpaste may be more effective if used every day at night to remineralize the mineral loss induced by acids produced by biofilm sugar metabolism than in the morning to reduce the demineralization happening during daytime. Lower %SHL was observed when F toothpaste was used at night than in the morning (Table) but statistical significance at 5% was found only for dentin. It should be emphasized that the use of surface hardness loss to evaluate enamel-dentine demineralization is supported by the literature available ^{8, 17}. It is possible that the timing of F toothpaste use affects F retention in the biofilm ¹⁸, which may help explain the results of mineral loss, and this should be studied in further details.

Although the present study did not aim to directly compare enamel and dentin, the results suggest that F available from 1,100 ppm F toothpastes has a more pronounced effect reducing mineral loss in enamel (42% and 58% for brushing in the morning and at night, respectively) than in dentin (19% and 37% for brushing in the morning and at night, respectively), which accords with studies showing that a higher concentration or frequency of F is needed to reverse dentin caries ^{19, 20}.

In conclusion, the results of this study suggest that F from toothpaste is more effective to reduce caries by enhancing enamel-dentine remineralization than

by reducing their demineralization. To explain these results future research should be conducted comparing the kinetics of F in dental biofilm after brushing teeth in the morning or at night.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the volunteers for their valuable participation and Colgate/Palmolive (São Paulo, SP, Brazil) for kindly providing the toothpaste formulations. The study was supported with a scholarship to the first author by CAPES and FAPESP (process 2009/07019-3), and a preliminary report was presented at the 89th General Session of the IADR (San Diego, CA, USA, 2011).

REFERENCES

1. ten Cate JM, Timmer K, Shariati M, Featherstone JD. Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Res.* 1988;22:20-26.
2. ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res.* 1990 Feb;69 Spec No:614-619.
3. Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res.* 1990 Feb;69 Spec No:575-580.
4. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 2008;20:13-16.
5. Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2009;43(4):278-285.
6. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentin in situ. *Caries Res.* 2003;37:339-344.
7. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec;34(6):491-497.

8. Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. *J Dent Res.* 2011 Jan;90(1):77-81.
9. Koo RH, Cury JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent.* 1998;11(4):173-176.
10. Delbem AC, Carvalho LPR, Morihisa LKU, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APG gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005;39:258-260.
11. Chesters RK, Huntington E, Burchell CK, Stephen KW. Effect of oral care habits on caries in adolescents. *Caries Res.* 1992;26(4):299-304.
12. Twetman S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009 Sep;10(3):162-167.
13. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004;83:71-75.
14. Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The rational use of fluoride toothpaste. *Int J Dent Hyg.* 2003 Feb;1(1):3-8.
15. Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996;104:416-422.
16. Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004;15:167-174.

17. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res. 1992 Apr;71 Spec No:924-928.
18. Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. J Dent Res. 1992 Nov;71(11):1768-1775.
19. Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Petersson L, Borsboom P. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. Caries Res. 2001 Jan-Feb;35(1):41-46.
20. Laheij AM, van Strijp AJ, van Loveren C. In situ remineralisation of enamel and dentin after the use of an amine fluoride mouthrinse in addition to twice daily brushings with amine fluoride toothpaste. Caries Res. 2010 Jul;44(3):260-266.

Table. Demineralization (%SHL) and F concentration ($\mu\text{g F/cm}^2$) in enamel and dentine according to the timing of F toothpaste use (mean $\pm$ SD, n = 12).

Timing of F toothpaste use	%SHL		F in enamel/dentin [§] ($\mu\text{g F/cm}^2$)	
	Enamel	Dentin	Enamel	Dentin
None (control, placebo toothpaste)	72.0 $\pm$ 20.8 a	76.5 $\pm$ 9.3 a	1.3 $\pm$ 0.6 a	1.8 $\pm$ 0.9 a
In the morning, before daily cariogenic challenges	41.6 $\pm$ 21.5 b	61.8 $\pm$ 11.8 b	2.0 $\pm$ 1.1 ab	3.7 $\pm$ 2.0 b
At night, after daily cariogenic challenges	30.0 $\pm$ 15.8 b	48.4 $\pm$ 19.1 c	2.4 $\pm$ 1.3 b	3.8 $\pm$ 2.2 b

%SHL = Percentage of surface hardness loss

[§] Transformed to the $\log_{10}$ to fit the assumptions of analysis of variance.

Groups with means followed by distinct letters differ from each other at $p < 0.05$ (comparisons within columns).

CONCLUSÃO

O fluoreto presente no dentifrício parece ser mais eficaz na redução da perda mineral final do esmalte e dentina radicular quando utilizado no período da noite, isto é, após os desafios desmineralizantes diários, e não pela manhã (antes dos desafios desmineralizantes diários).

.

REFERÊNCIAS

1. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res. 1992; 71(Spec Iss):924-8.
2. Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Petersson L, Borsboom P. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. Caries Res. 2001; 35(1):41-6.
3. Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? Eur J Oral Sci. 1996; 104:416-22.
4. Cenci MS, Tenuta LM, Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA. Effect of Microleakage and fluoride on enamel-dentin demineralization around restorations. Caries Res. 2008; 42:369-79.
5. Chesters RK, Huntington E, Burchell CK, Stephen KW. Effect of oral care habits on caries in adolescents. Caries Res. 1992; 26:299-304.
6. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res. 2000; 34:491-7.

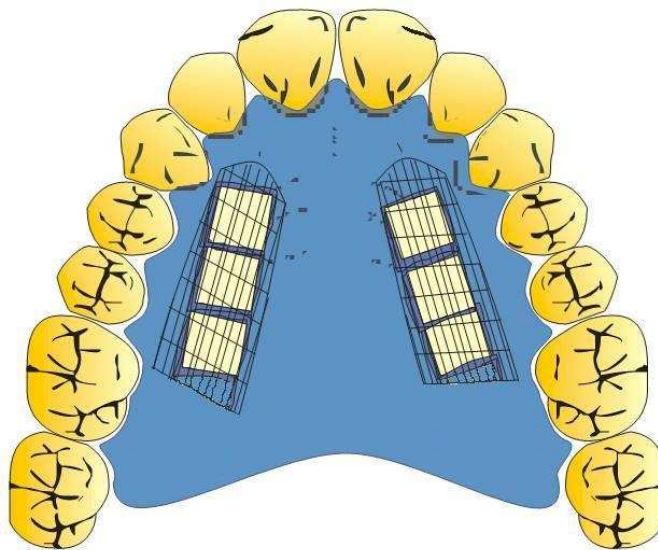
¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

7. Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15:167-74.
8. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 2008; 20:13-6.
9. Curzon ME, Preston AJ. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res.* 2004; 38 (Suppl 1):24-33.
10. Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The rational use of fluoride toothpaste. *Int J Dent Hyg.* 2003; 1(1):3-8.
11. Delbem AC, Carvalho LPR, Morihisa LKU, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APG gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005; 39:258-60.
12. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentin in situ. *Caries Res.* 2003; 37:339-44.
13. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol.* 1987; 32:319-322.
14. Koo RH, Cury JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent.* 1998; 11(4):173-6.

15. Laheij AM, van Strijp AJ, van Loveren C. In situ remineralisation of enamel and dentin after the use of an amine fluoride mouthrinse in addition to twice daily brushings with amine fluoride toothpaste. *Caries Res.* 2010; 44(3):260-6.
16. Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec No):575-80.
17. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004; 83:71-5.
18. ten Cate JM, Timmer K, Shariati M, Featherstone JD. Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Res.* 1988; 22:20-6.
19. ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res.* 1990; 69 (Spec No):614-9.
20. Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2009; 43(4):278-85.
21. Twetman S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009; 10(3):162-7.

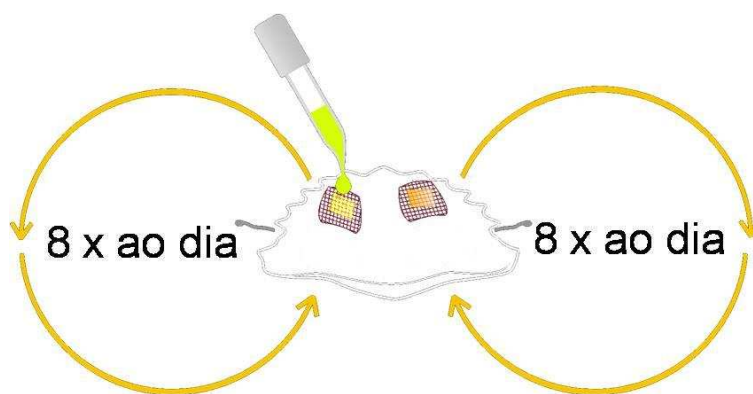
22. Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. J Dent Res. 2011; 90(1):77-81.
23. Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. J Dent Res. 1992; 71(11):1768-75.

APÊNDICE 1 – Esquema ilustrativo do dispositivo intrabucal palatino



Neste estudo do tipo boca dividida utilizou-se dois substratos dentais diferentes, esmalte e dentina radicular, num mesmo dispositivo intrabucal palatino. Os dispositivos foram confeccionados em resina acrílica incolor, e uma tela milimetrada de polietileno foi fixada na face livre do dispositivo para proporcionar o acúmulo do biofilme dental.

APÊNDICE 2 – Esquema ilustrativo da exposição à sacarose



A exposição à sacarose 20% foi realizada na frequência de oito vezes ao dia, em horários determinados (8:00, 9:00, 10:00, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00 e 19:00).

Os voluntários retiravam o dispositivo intrabucal e dispensavam uma gota da solução fornecida sobre cada bloco de esmalte e dentina. Em seguida, o dispositivo era armazenado na embalagem fornecida e após 5 minutos os voluntários retornavam os dispositivos à cavidade bucal.

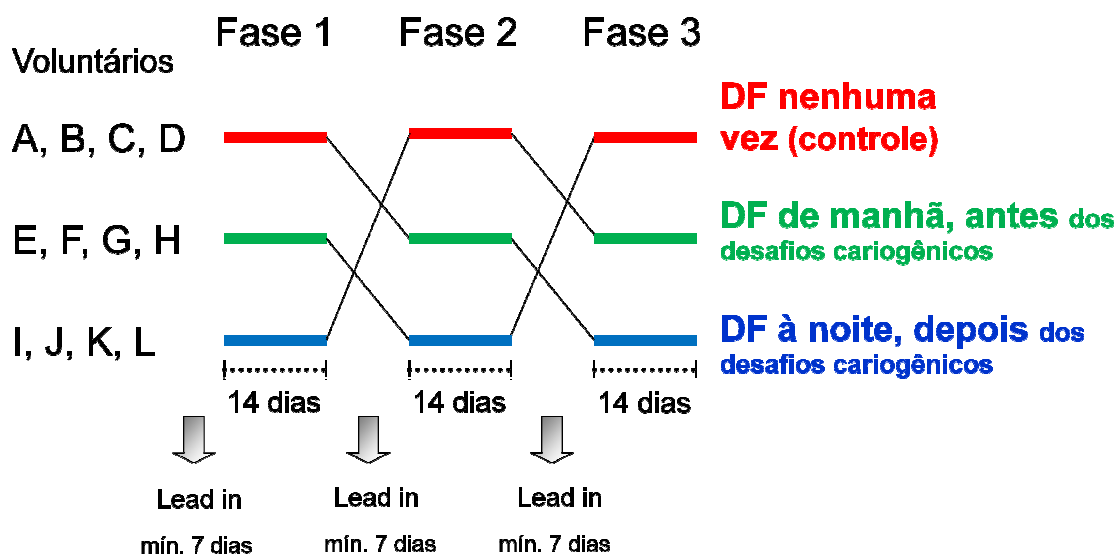
APÊNDICE 3 – Descrição do modo de higienização do dispositivo intrabucal palatino.

O dispositivo intrabucal palatino era higienizado três vezes ao dia com escova e o(s) creme(s) dental(is) fornecidos pelos pesquisadores em horários determinados (7:30, 12:30, e entre 20:00 e 21:00h), geralmente após as refeições. Os voluntários escovavam seus dentes de modo habitual e o dispositivo conforme a seguinte indicação:

- O dispositivo era removido da cavidade bucal;
- Realizava-se fricção da escova com creme dental na parte acrílica de contato ao palato;
- A escovação do dispositivo na área onde se localizavam os blocos dentais (abaixo da tela plástica) era realizada somente entre as telas plásticas, sendo a espuma proveniente da escovação gentilmente dirigida sobre a região dos blocos dentais;
- O enxágüe do dispositivo era realizado sob água corrente, no entanto, este era executado de forma delicada, evitando que jatos d'água perturbassem o biofilme dental em formação.
- Assim, após limpo, o dispositivo era novamente inserido na cavidade bucal do voluntário, sendo retirado somente durante as refeições e para ingestão de bebidas.

APÊNDICE 4 – Ilustração das fases experimentais que compõem o estudo do tipo cruzado em relação ao horário de utilização do dentifrício fluoretado.

Delineamento Experimental Cruzado:



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

A fase pré-tratamento consistia de um período mínimo de sete dias, no qual os voluntários seguiam o esquema de escovação com o(s) dentifrício(s) indicado(s) para a próxima fase do estudo a ser iniciada.

ANEXO 1: Deliberação da qualificação (defesa) em formato alternativo

INFORMAÇÃO CCPG/OO2/06⁶

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG n° 1985/96, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, a Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), a área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.
- VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.
- VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.
- VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.
- IX. Todas as páginas com numeração "ímpar" serão impressas como "frente" e todas as páginas com numeração "par" serão impressas como "verso".

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º - A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ único - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

Artigo 3º - Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ser apresentada em formato alternativo, desde que observados os incisos I, II, III IV, V e VII do artigo 1º.

Artigo 4º - Para impressão, na gráfica da Unicamp, dos exemplares definitivos de dissertações e teses defendidas, deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

§ 1º - A solicitação para impressão dos exemplares de dissertações e teses poderá ser encaminhada à gráfica da Unicamp pelas Unidades, que se responsabilizarão pelo pagamento correspondente.

§ 2º - Um original da dissertação ou tese, em versão definitiva, impresso em folha tamanho carta, em uma só face, deve ser encaminhado à gráfica da Unicamp acompanhado do formulário "Requisição de Serviços Gráficos", onde conste o número de exemplares solicitados.

§ 3º - A gráfica da Unicamp imprimirá os exemplares solicitados com capa padrão. Os exemplares solicitados serão encaminhados à Unidade em, no máximo, cinco dias úteis.

§ 4º - No formulário "Requisição de Serviços Gráficos" deverão estar indicadas as páginas cuja reprodução deva ser feita no padrão "cores" ou "foto", ficando entendido que as demais páginas devam ser reproduzidas no padrão preto/branco comum.

§ 5º - As dissertações e teses serão reproduzidas no padrão frente e verso, exceção feita às páginas iniciais e divisões de capítulos; dissertações e teses com até 100 páginas serão reproduzidas no padrão apenas frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica.

§ 6º - As páginas fornecidas para inserção deverão ser impressas em sua forma definitiva, ou seja, apenas frente ou frente/verso.

§ 7º - O custo, em reais, de cada exemplar produzido pela gráfica será definido pela Administração Superior da Universidade.

Artigo 5º - É obrigatória a entrega de dois exemplares para homologação.

Artigo 6º - Esta Informação entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário, principalmente as Informações CCPG 001 e 002/98 e CCPG/001/00.

Campinas, 13 de setembro de 2006

ANEXO 2: Certificado de aprovação no Comitê de Ética.

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Frequência de uso de dentifrício fluorinado e desmineralização do esmalte e dentina radicular**", protocolo nº 104/2009, dos pesquisadores Lívia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury e Sandro Carvalho Kusano, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/08/2009.

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

Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

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

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

ANEXO 3: Comprovante de submissão de artigo.



Of. BOR 733/2011

Manuscript Title: Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization

Authors: Sandro Carvalho Kusano, Livia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury.

Manuscript Title: Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization

Authors: Sandro Carvalho Kusano, Livia Maria Andaló Tenuta, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury.

Dear Dr. Livia Maria Andaló Tenuta,

Thank you for submitting your manuscript entitled “**Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization**” to *Brazilian Oral Research* - BOR. Your reference number for this submission is **733**.

Please reference **#733** in all communications with the journal office regarding your paper.