



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



GLÁUBER CAMPOS VALE

EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE FLÚOR E USO DE DENTIFRÍCIO FLUORETADO NO BIOFILME DENTAL E DENTINA RADICULAR

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, como
requisito para obtenção do título de Doutor
em Odontologia, Área de Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury

PIRACICABA

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

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

V234e	Vale, Gláuber Campos. Efeito da aplicação tópica de flúor e uso de dentifrício fluoretado no biofilme dental e dentina radicular. / Gláuber Campos Vale. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Cínthia Pereira Machado Tabchoury. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Cárie dentária. I. Tabchoury, Cínthia Pereira Machado. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Effect of professional fluoride application and fluoride dentifrice use on dental biofilm and root dentine

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental caries

Área de Concentração: Cariologia

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Cínthia Pereira Machado Tabchoury, Cassiano Kuchenbecker Rosing, Josimeri Hebling Costa, Adriana Franco Paes Leme, Marinês Nobre dos Santos Uchoa

Data da Defesa: 19-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2010, considerou o candidato GLÁUBER CAMPOS VALE aprovado.

Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Prof. Dr. CASSIANO KUCHENBECKER ROSING

Profa. Dra. JOSIMERI HEBLING COSTA

Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME

Profa. Dra. MARINÊS NOBRE DOS SANTOS UCHOA

Dedico este trabalho a minha mãe, Fátima Campos, pelo amor incomensurável e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, pelo exemplo de profissionalismo, retidão e dedicação. Pela sua competência, paciência e excelente convívio ao longo desses anos.

A minha família: meus pais **Fátima** e **José Gregório**, meus irmãos **Juliano** e **Viviane**, e a **Socorro** e **Isabel** pelo apoio constante.

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. **Francisco Haiter Neto**.

Ao curso de Pós-graduação da FOP/UNICAMP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. **Jacks Jorge Júnior**.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa Dra. **Maria Beatriz Duarte Gavião**.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP**, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, **CAPES**, pelas bolsas concedidas (05/03090-4 e BEX 1110/08-0).

A Profa. Dra. **Cíntia Pereira Machado Tabchoury** pela exímia orientação.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury** pelas críticas e sugestões ao trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury** pela colaboração no andamento da pesquisa.

À Profa. Dra. **Livia Maria Andaló Tenuta** pela colaboração em todas as fases do trabalho.

Aos professores **Adriana Franco Paes Leme, Jaime Aparecido Cury, Pedro Luiz Rosalen e Livia Maria Andaló Tenuta** pelas sugestões feitas nos exames de qualificação.

Aos professores **Bob ten Cate e Wim Crielaard** pela orientação durante estágio realizado no Academic Centre for Dentistry Amsterdam.

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

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

Aos amigos de pós-graduação: **Renzo Vasquez, Rodrigo Arthur, Carol Aires, Carol Nóbrega, Fernando Hugo, Maximiliano Cenci, Tatiana Pereira, Rosana Hoffman, Stela Pereira, Maria Paula Meirelles, Renato Pereira, Karine Cortelazzi, Anna Papa, Cláudia Zamataro, Juliana Braga, Marília Correia, Danilo Catani, Sandro Kusano, Ana Flávia Bissoto, Karla Cook, Regiane Amaral, Fabiana Gouveia e Pedro Ricomini** pelas discussões científicas e não-científicas.

Aos alunos de Iniciação Científica **Lenita, Valdemir e Patrícia** e aos estagiários **Tamires e Jerônimo Jr.** pela ajuda no laboratório durante todo o doutorado.

Aos amigos do Departamento de Cariologia, Endodontia e Odontopediatria do Academic Centre for Dentistry Amsterdam, em especial **Mark Buijs, Michel Hoogenkamp, Rob Exterkate, Egija Zaura, Chi Pham, Alexa Lahey, Eliane Takeshita, Thiago Cruvinel e Agnes Pereira** pelos muitos ensinamentos, amizade, ajuda com as atividades de laboratório, e produtivas discussões científicas durante o período de estágio no exterior realizado junto àquele departamento.

Aos amigos **Karla Mychellyne, Renzo Vasquez, Carlos Junior, Renato Pereira, Luísa Tôrres e Marília Correia** pelo convívio harmonioso durante esses anos.

Aos queridos amigos: **Lívia, Tainá, Carol, Yuri e Paulo** pelo companheirismo e pela sempre boa acolhida em São Paulo.

Aos voluntários pela valiosa participação nesta pesquisa.

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

RESUMO

A combinação de métodos de uso de flúor (F) tem sido indicada para indivíduos ou grupos considerados de alto risco de cárie. O efeito aditivo da combinação da aplicação tópica profissional de flúor (ATF) e uso diário de dentifrício fluoretado (DF) resulta em uma modesta redução de cárie em esmalte quando comparado ao uso isolado do DF. Entretanto, o efeito dessa combinação não tem sido estudado com relação à dentina radicular, a qual é mais susceptível à cárie que o esmalte. Este trabalho de tese teve por objetivos avaliar o efeito da combinação da ATF e uso do DF na desmineralização da dentina radicular, na disponibilidade de F no biofilme dental formado *in situ* bem como nos produtos de reatividade formados sobre a dentina radicular. Doze voluntários adultos participaram desse estudo *in situ* cruzado e duplo-cego (em relação ao dentifrício) e utilizaram dispositivos palatinos contendo espécimes de dentina radicular bovina, com dureza de superfície pré-determinada. Os espécimes de dentina foram submetidos, em quatro fases experimentais de sete dias de duração cada uma, a um alto desafio cariogênico (acúmulo de biofilme e uso de solução de sacarose 8x/dia) e um dos seguintes tratamentos: dentifrício placebo (DP), dentifrício fluoretado contendo 1100 ppm de F (DF), ATF + DP e ATF + DF. Os espécimes dos grupos ATF foram pré-tratados com flúor fosfato acidulado em gel (1,23% F) por 4 minutos no início da respectiva fase experimental. Os dentifrícios foram usados 3x/dia. Para a análise estatística, um modelo fatorial 2 x 2 foi utilizado, onde os fatores em estudo foram ATF em dois níveis (aplicado ou não) e dentifrício fluoretado (sim ou não) com limite de significância adotado de 5%. Menor desmineralização e maior concentração de F no fluido do biofilme foram observadas quando DF foi utilizado em comparação com DP ($p < 0,05$) e quando ATF foi realizada em relação aos grupos onde não houve este tratamento ($p < 0,05$). A combinação da ATF e uso de DF mostrou efeito sinérgico na redução da desmineralização da dentina radicular, na disponibilidade de F no fluido do biofilme e no aumento da retenção de produtos de reatividade em dentina, sugerindo que essa combinação deve ser relevante no controle de cárie radicular.

Palavras-chave: ATF, biofilme dental, dentifrício, cárie dental, dentina radicular, flúor.

ABSTRACT

The combination of methods of fluoride (F) use has been suggested for high caries risk individuals or groups. The additive effect of the combination of professional application of fluoride and fluoride dentifrice (FD) use achieve a modest reduction in enamel caries compared to dentifrice used alone. Nevertheless the anti-caries effect of this combination has not been studied for root dentine, which is more susceptible to caries than enamel. This study aimed to evaluate the effect of the combination of application of acidulated phosphate fluoride (APF) and DF use on root dentine demineralization, F availability in dental biofilm formed *in situ* as well as on reactivity products formed on root dentine. Twelve adult volunteers took a part in this crossover, double-blinded (considering the dentifrices) *in situ* study and wore palatal appliances containing bovine root dentine slabs with pre-determined surface hardness. The dentine slabs were subjected during four experimental phases of seven days each to a high cariogenic challenge (biofilm accumulation and sucrose solution exposure 8x/day) and to one of the following treatments: placebo dentifrice (PD), 1,100 ppm F-dentifrice (FD), APF + PD and APF + FD. The slabs of APF groups were pre-treated with APF gel (1.23% F) for 4 min at the beginning of the respective experimental phase. The dentifrices were used 3x/day. For statistical analyses, a factorial 2 x 2 was used, with the APF (applied or not) and fluoride dentifrice (yes or not) considered as study factors. The significance limit was set at 5%. Lower demineralization and higher F concentration in biofilm fluid was observed when FD was used in comparison with PD ($p < 0.05$) and when APF application was done in relation to those groups in which APF was not applied ($p < 0.05$). The combination of APF and use of FD showed a synergic effect on reduction of root dentine demineralization, on F availability in biofilm fluid and on the enhanced retention of reactivity products formed on dentine, suggesting that the combination of APF gel application and the daily use of F dentifrice may be relevant to control root caries.

Key-words: APF, dental biofilm, dentifrice, dental caries, root dentine, fluoride

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
PROPOSIÇÃO.....	4
CAPÍTULO.....	5
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
APÊNDICES.....	26
ANEXOS.....	31

INTRODUÇÃO

Cárie radicular é uma doença cuja ocorrência está intimamente relacionada com a população adulta e idosa (Clarkson, 1995). Tal fato é importante, considerando o aumento da expectativa de vida da população em geral reportada nos últimos anos. No Brasil, dados apontam um aumento na expectativa de vida de 43,3 anos em 1950 para 72,7 anos em 2008 (IBGE, 2009). Dessa forma, torna-se previsível um aumento na incidência e prevalência dessa condição como mostrado em países desenvolvidos (Fure, 1998; Imazato *et al.*, 2006). De fato, estudo epidemiológico realizado no Brasil mostrou que a maioria da população estudada com raiz exposta não apresentou cárie radicular, embora um aumento dessa condição seja esperado considerando a reduzida prevalência de edentulismo (Rihs *et al.*, 2008).

Assim, o aumento da expectativa de vida e o maior número de dentes e raízes expostas observadas na cavidade oral dos indivíduos parecem levar ao aumento do risco de desenvolvimento de cárie radicular (Curzon and Preston, 2004), apesar do declínio da cárie dental, especialmente em esmalte, ocorrido nas últimas décadas no Brasil (Narvai *et al.*, 1999) e no mundo (Clarkson & McLoughlin, 2000). Tal declínio tem sido atribuído principalmente ao amplo uso do flúor (F), sendo o dentifrício fluoretado considerado o mais importante entre os métodos de uso de F que contribuíram para esse fato (Rölla *et al.*, 1991; Bratthall *et al.*, 1996; Cury *et al.*, 2004).

Sabe-se que a dentina é mais susceptível ao desenvolvimento da cárie, 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.*, 1987). Dessa forma, dentifrício com alta concentração de F (5000 ppm F) tem sido indicado para o controle da cárie radicular (Baysan *et al.*, 2001), já que mais F é necessário para reduzir a desmineralização das lesões em raiz do que em esmalte (Herkstroter *et al.*, 1991).

Para o controle da cárie dental, especialmente em pacientes considerados de alto risco, a associação de métodos de uso de F tem sido indicada, como bochecho ou aplicação tópica profissional (ATF) de flúor gel em adição ao dentifrício fluoretado, mas o benefício adicional parece ser modesto para esmalte (Marinho *et al.*, 2007). Estudo

prévio mostrou que a associação da aplicação de flúor fosfato acidulado em gel e uso de dentifrício fluoretado não foi mais efetiva na prevenção da desmineralização do esmalte quando comparada com os tratamentos ATF e dentifrício fluoretado isoladamente (Paes Leme *et al.*, 2004). Contudo, o efeito dessa combinação em dentina radicular é desconhecido.

O efeito preventivo de produtos com alta concentração de F, como o gel acidulado usado nas ATFs, está principalmente relacionado à formação de reservatórios de F na superfície do dente na forma de fluoreto de cálcio (CaF_2), também denominado flúor fracamente ligado (Saxegaard & Rølla, 1988). Estes reservatórios liberam o íon F para interferir com o processo de desmineralização durante as quedas de pH que ocorrem no biofilme dental pela exposição a carboidratos fermentáveis (Rølla *et al.*, 1993). Em acréscimo, ocorre ainda a formação de fluorapatita (FAp), também denominada de flúor fortemente ligado, que pode apresentar também algum efeito na inibição da desmineralização (Tagaki *et al.*, 2000). Aparentemente, o CaF_2 formado pode permanecer na superfície dental por diversos dias (Ögaard *et al.*, 1983; Saxegaard *et al.*, 1988), devido à deposição de fosfatos na superfície dos glóbulos, o que diminui sua solubilidade (Saxegaard *et al.*, 1988; Ögaard, 1990). Dessa forma, o CaF_2 agiria como um depósito de liberação lenta de F para o fluido do biofilme, local onde ocorrem as trocas iônicas com o mineral do dente (Margolis & Moreno, 1994). De fato, um estudo mostrou haver relação dose-resposta entre as concentrações de CaF_2 no esmalte, a liberação de F para o fluido do biofilme e o efeito na inibição da desmineralização do esmalte (Tenuta *et al.*, 2008).

Com relação ao efeito preventivo do dentifrício fluoretado no desenvolvimento da cárie, este está relacionado com a supersaturação de F no meio em relação ao mineral do dente, levando à precipitação de minerais e consequente remineralização, mesmo em baixas concentrações de F como encontrado na saliva após escovação com dentifrício fluoretado (ten Cate, 1999). Adicionalmente, o enriquecimento de F no biofilme não removido durante a escovação, pode interferir significativamente com os subseqüentes eventos de remineralização na interface biofilme-dente (Tenuta *et al.*, 2009). De fato, o uso de dentifrício fluoretado mantém elevados níveis de F tanto no

biofilme total (Paes Leme *et al.*, 2004) como no fluido do biofilme (Cenci *et al.*, 2008), mesmo após 10 horas ou mais da última escovação.

Dessa forma, considerando a maior solubilidade da dentina e que para o controle de cárie radicular uma maior quantidade de F tem sido sugerida, seria interessante avaliar a combinação da aplicação profissional de flúor fosfato acidulado e uso do dentifrício fluoretado de 1100 ppm F no desenvolvimento da cárie radicular, bem como na composição do biofilme dental, numa situação de alto desafio cariogênico.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo *in situ* teve como objetivo avaliar o efeito da combinação da aplicação tópica de flúor fosfato acidulado e uso de dentifrício fluoretado:

- 1- Na disponibilidade de flúor no biofilme dental;
- 2- Na retenção de produtos de reatividade na dentina radicular e;
- 3- Na desmineralização 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 “Journal of Dental Research”, conforme apresentado no comprovante de envio presente no Anexo 3.

Effect of APF and Dentifrice on Root Dentine Demineralization and Biofilm

Vale GC¹, Tabchoury CPM^{1*}, Del Bel Cury AA¹, Tenuta LMA¹, ten Cate JM², Cury JA¹.

¹Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

² Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Amsterdam, The Netherlands

Short title: APF and F dentifrice on dentine

Key Words: APF, biofilm, demineralization, dentifrice, fluoride, root dentine.

Number of words in the abstract: 149

Number of words in the abstract and the text: 2340

Number of tables and figures: 2

Number of cited references: 26

***Corresponding author:**

Cíntia Pereira Machado Tabchoury

E-mail: cinthia@fop.unicamp.br

Based on a thesis submitted by the first author to Piracicaba Dental School, University of Campinas, SP, Brazil, in partial fulfillment of the requirements for the Doctorate in Dentistry (Cariology Area). A preliminary report of this study was presented at the 87th General Session of the IADR (Miami, FL, 2009).

ABSTRACT

Since dentine is more caries-susceptible than enamel, we hypothesized that combination of professional fluoride (F) application and use of 1,100 ppm F dentifrice would be necessary to control root caries. Twelve adult volunteers wore palatal appliances containing root dentine slabs, which were subjected during 4 experimental phases of 7 days each to biofilm accumulation and sucrose exposure 8x/day. The volunteers were randomly assigned to the following treatments: placebo dentifrice (PD), 1,100 ppm F dentifrice (FD), acidulated phosphate F (APF) + PD and APF+FD. APF gel (1.23% F) was applied on the slabs once at the beginning of the experimental phase and the dentifrices were used 3x/day. APF and FD increased F concentration in biofilm fluid and reduced root dentine demineralization, presenting additive effect. The data suggest that the combination of APF gel application and daily regular use of 1,100 ppm F dentifrice may be relevant to control root caries.

INTRODUCTION

In recent decades, a significant decline in caries prevalence and incidence has been observed worldwide (Petersen and Lennon, 2004). This decline has been basically noticed for enamel caries and the widespread use of fluoride (F), especially in dentifrice, is considered the main cause for this phenomenon both in developed (Rölla *et al.*, 1991) and developing countries (Cury *et al.*, 2004).

On the other hand, there seems to be a higher risk of root lesions in elderly population, due to an increase in life expectation and a greater number of teeth and exposed root surfaces in the mouth of these individuals (Curzon and Preston, 2004). It is well known that dentine differs from enamel due to smaller mineral crystallites, with higher carbonate content and considerably greater volume of organic components. Consequently, dentine is more soluble than enamel (Hoppenbrouwers *et al.*, 1987).

For enamel caries prevention, the combination of F dentifrice with other topical F treatments has shown some possible additive effect, mainly in patients at high caries risk (Zimmer *et al.*, 2001), but the extra benefit seems to be modest (Marinho *et al.*, 2007). Moreover, Paes Leme *et al.* (2004) showed that APF combination with F dentifrice did not enhance inhibition of enamel demineralization compared to F dentifrice

alone. Also in this study, use of F dentifrice increased F concentration in whole biofilm, but its combination with APF did not result in higher F accumulation in the biofilm. Furthermore, F concentration in biofilm fluid, where it is important to interfere with de-mineralization during the caries process (Pearce, 1998), was not determined.

Thus, since dentine is considered more caries-susceptible than enamel and a high F concentration dentifrice (5,000 ppm) has been shown to control root caries (Baysan *et al.*, 2001), we hypothesized that if 1,100 ppm F dentifrice is being daily used, professional APF should be applied for a more effective root caries control.

MATERIALS & METHODS

Experimental Design

This study, approved by the local Research and Ethics Committee, had a crossover, double-blind (considering the dentifrices) design and was conducted in 4 experimental phases of 7 days each. Twelve healthy volunteers (20-34 years old) signed a written informed consent and wore acrylic palatal appliances, each containing four root dentine slabs (two on each side) with known surface hardness (SH). The sample size was determined on the basis of our previous findings using the same experimental protocol, expecting a statistical power of 0.8. The volunteers were randomly assigned using a computer generated randomization list to the following treatments: (1) PD (placebo dentifrice); (2) FD (fluoride dentifrice, 1100 ppm F as NaF, silica-based); (3) APF+PD; and (4) APF+FD. In addition, 2 dentine slabs were fixed in the appliance in an anterior position to evaluate APF immediate reactivity (APF group), being removed soon after its application for F determination. Also, F concentration was assessed on dentine slabs not-submitted to any treatment (control group). At the end of each phase, F concentration in dental biofilm formed on the slabs was assessed. In dentine slabs, the amounts of calcium fluoride-like material (“CaF₂”) and fluorapatite (FAp) retained were determined, as well as dentine demineralization.

Preparation of Dentine Slabs and Palatal Appliance

Dentine slabs (4 X 4 x 2 mm) were obtained from sound bovine incisor roots (Hara *et al.*, 2003). Baseline SH was determined by making 5 indentations, spaced 100

µm from each other, using a Shimadzu HVM-2000 hardness tester (Kyoto, Japan) with a Knoop diamond indenter with 5-g load for 5 sec. SH determination was standardized waiting 30 min to start the indentations after removing the slabs from the humid environment where they are stored. Slabs with a mean hardness of 38.0 Kg/mm² (SD=3.6) were selected, randomly divided into the treatment groups, and mounted into palatal appliances as described by Hara *et al.* (2003).

Treatments

To provide a cariogenic challenge, the volunteers dripped 20% sucrose solution extraorally onto each slab 8x/day. APF gel (1.23% F, pH = 3.6-3.9, Dentsply, Petropolis, RJ, Brazil) was applied with a cotton swab to the slabs placed onto the appliance and to the volunteers' teeth during 4 min on the 1st day of the respective phase, with the appliances in the volunteers' mouths. The excess gel on the slab surfaces was removed with cotton swabs, the volunteers expectorated for 30 sec, and 30 min later a plastic mesh was fixed to the appliance over the slabs, to allow plaque accumulation. This timing, during which the volunteers did not eat or drink anything, was followed to simulate F clearance effect in saliva (Paes Leme *et al.*, 2004). In the groups not-treated with APF, a plastic mesh was already fixed over the slabs in the beginning of the phase. Throughout the experiment, volunteers brushed their teeth and the appliance after main mealtimes, 3x/day (07:30, 12:30, and 20:00 hrs), with the dentifrice assigned for each phase. The volunteers drank optimally fluoridated water (0.69±0.03 mg F/L) and no restrictions were made with regard to their diet, considering the crossover design of this study. They also received oral and written information to refrain from using any antibacterial substance. During the pre-experimental and washout periods, the volunteers brushed their teeth with PD.

Biofilm Collection and F Analysis in the Fluid and Solids

On the 7th day of each experimental phase, 10 hrs after the last exposure to sucrose solution and without brushing, biofilm formed was collected for F analysis; two slabs were collected and stored for SH and transversal microradiography (TMR) analyses and the other 2 were collected for CaF₂ and FAp determination.

For F determination in biofilm fluid and solids, biofilm was collected with the use of a plastic spatula and immediately placed inside an oil-filled centrifuge tube (Vogel *et al.*, 1997). After fluid extraction, the tip of the centrifuge tube was then cut and the remaining biofilm was centrifuged into a microcentrifuge tube containing 0.5 M HCl (0.1 mL/10 mg of biofilm wet weight) for extraction of acid-soluble whole biofilm F (Ccahuana-Vásquez *et al.*, 2007). F analysis of all the samples was done on the surface of an oil-covered inverted F electrode with the use of a microscope and micro-reference electrode to close the circuit (Vogel *et al.*, 1997; Tenuta *et al.*, 2006).

Analysis of Dentine Demineralization

After each experimental phase, SH of the slabs was again measured as already described and the percentage of SH loss (%SHL) was calculated. After that, dentine slabs were longitudinally sectioned and 3 sections per specimen were radiographed and analyzed by TMR (Lagerweij *et al.*, 1996). Mineral loss, expressed as integrated mineral loss (IML), was calculated (TMR software 11.15, Inspektor Research Systems, Amsterdam, The Netherlands). Three scans, perpendicular to the surface, were made at random positions and IML for each specimen was obtained by averaging corresponding values of scans and sections.

Determination of “CaF₂” and FAp in Dentine

All surfaces of dentine slabs were isolated with wax, except for the surface exposed to the treatments, whose dimensions were measured with a digital caliber (± 0.01 mm). After “CaF₂” extraction (Caslavská *et al.*, 1975), 2 consecutive dentine layers were removed by acid immersion for 15 and 30 sec under agitation for FAp determination. The results of “CaF₂” and FAp were expressed in $\mu\text{g F/cm}^2$ and F amounts in the 2 layers of dentine removed by etching acid were combined (Delbem *et al.*, 2005).

Statistical Analyses

A factorial 2 x 2 was considered for the statistical analysis and the factors under evaluation were: APF at 2 levels (applied or not), and dentifrice at 2 levels (fluoridated or

not). Volunteers were considered 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 (Box *et al.*, 1978). All data were analyzed by ANOVA. Spearman coefficient test was used to study the correlation between %SHL and IML, since the data failed the normality test. The SAS software system (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) was used with a significance level fixed at 5%.

RESULTS

Table 1 shows the results of ANOVA for all response variables studied. For %SHL and IML (Table 2), a significant effect was observed for the isolated factors dentifrice and APF, but not for their interaction. Lower %SHL and IML was observed when FD was used in comparison with PD ($p < 0.05$) and also when APF was applied in relation to non-APF groups ($p < 0.05$). In addition, %SHL data positively correlated with IML ($r = 0.88$, $p < 0.001$). F in biofilm fluid (Table 2) showed statistical significance for the factors dentifrice and APF, with statistically higher concentration in FD group compared with PD and in APF groups compared with those without this treatment. F in biofilm solids (Table 2) showed a significant effect for the interaction dentifrice and APF; statistically higher F concentration was found in FD group in comparison to PD in non-APF groups, and no difference between the dentifrices was observed when APF was applied. CaF_2 and FAp concentration in dentine (Table 2) showed significant effect for the isolated factors, with higher amounts of these products when FD or APF were used in relation to PD or non-APF groups. Additionally, an interaction between the factors was observed for FAp data, with no difference between the dentifrices when APF was applied and significantly higher amounts of FAp in FD than PD group when APF was not applied.

DISCUSSION

Although the combination of F methods on enamel caries prevention has been studied before (Paes Leme *et al.*, 2004; Marinho *et al.*, 2007), there are no data about its effect on control of root dentine caries.

Demineralization data, either by SH or TMR, showed that the combination of APF gel application and daily regular use of 1,100 ppm F dentifrice was more effective than either treatment alone in reducing root dentine caries. This finding contrasts with the results found for enamel using a similar protocol, when no significant effect of the combination was observed compared to F dentifrice alone (Paes Leme *et al.*, 2004). This discrepancy may be explained by the differences in mineral composition and solubility between enamel and dentine (Hoppenbrouwers *et al.*, 1987), and agrees with the observed effect of high F concentration products on remineralization or arrestment of root carious lesions in a clinical study (Baysan *et al.*, 2001). Thus, the combination of APF and F-dentifrice could be an important regimen to be followed clinically in order to reduce root caries incidence and activity.

The higher F concentration in biofilm fluid found for FD and APF groups clearly supports the demineralization results, corroborating that dentine benefits from high F availability (Lynch and Baysan, 2001). To the best of our knowledge, this is the first study to show the enrichment of F in the fluid of biofilm formed on dentine. Thus, enrichment of biofilm fluid with F coming both from regular F dentifrice use and CaF₂ dissolution due to APF application can significantly inhibit dentine demineralization and, better yet, with an additive effect. Furthermore, it must be emphasized that this is the first study to show that F released from CaF₂ reservoirs, formed after APF application, is found in fluid of biofilm directly formed on teeth surface. Interestingly, this higher F concentration in fluid of APF groups was observed even 7 days after a single APF application, suggesting that these reservoirs may last for a significant period of time as already proposed (Ögaard *et al.*, 1983; Saxegaard *et al.*, 1988). Probably even higher concentrations of F in biofilm fluid in APF groups would have been found if biofilm were collected after a shorter period of accumulation rather than 7 days. With regard to F dentifrice, F increase in biofilm fluid and solids due to its use has already been shown even 10 h or more after brushing (Cenci *et al.*, 2008), just as observed in the present study.

A high concentration of CaF₂ was formed on dentine after APF application ($76.5 \pm 16.5 \mu\text{g F/cm}^2$), which was around 3.5 times greater than that formed on enamel (Tenuta *et al.*, 2008). During the experimental phases, CaF₂ dissolution occurred with

decreasing pH due to the cariogenic challenge used (ten Cate, 1997), releasing F and making it available in the biofilm fluid to interfere with the de-remineralization process.

Although a correlation between cross-sectional hardness and mineral content was presented for enamel in previous papers (Featherstone *et al.*, 1983; Kielbassa *et al.*, 1999), a correlation between surface hardness of in situ-demineralized dentine and microradiographical data observed in the present study has not been shown in dental literature. This is important considering that TMR technology (the “gold standard” of mineral changes techniques) is not available in many research centers. In that case, dentine could be analyzed by surface hardness without loss of the confidence of the data.

In conclusion, the combination of APF and 1,100 ppm F dentifrice provided a synergistic effect, enhancing the availability of F in biofilm fluid and reducing root dentine demineralization. The anticaries efficacy of this combination should be confirmed in real conditions by clinical trials.

ACKNOWLEDGMENTS

To the volunteers for their valuable participation. The study was supported by FAPESP (process 2005/03090-4 and 2008/11696-8) and Capes.

REFERENCES

- Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Petersson L, Borsboom P (2001). Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. *Caries Res* 35:41-46.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978). Statistics for experimenters. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Caslavska V, Moreno EC, Brudevold F (1975). Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 20:333-339.
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA (2007). Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 41:9-15.
- Cenci MS, Tenuta LMA, Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA (2008). Effect of microleakage and fluoride on enamel-dentine demineralization around restorations. *Caries Res* 42:369-379.
- Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF (2004). The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J* 15:167-174.
- Curzon ME, Preston AJ (2004). Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res* 38 Suppl 1:24-33.
- Delbem AC, Carvalho LP, Morihisa RK, Cury JA (2005). Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res* 39:258-260.
- Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J (1983). Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 17:385-391.
- Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA (2003). Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 37:339-344.
- Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM (1987). The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol* 32:319-322.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E (1999). Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol* 44:243-251.

Lagerweij MD, Damen JJ, ten Cate JM (1996). The effect of fluoridated toothpaste on dentinal lesions in plaque-filled grooves: an intra-oral crossover study. *J Dent Res* 75:1687-1691.

Lynch E, Baysan A (2001). Reversal of primary root caries using a dentifrice with a high fluoride content. *Caries Res* 35:60-64.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S (2007). Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD002781.

Ögaard B, Rølla G, Helgeland K (1983). Uptake and retention of alkali-soluble and alkali-insoluble fluoride in sound enamel in vivo after mouthrinses with 0.05% or 0.2% NaF. *Caries Res* 17:520-524.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA (2004). In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 83:71-75.

Pearce E (1998). Plaque minerals and dental caries. *N Z Dent J* 94:12-15.

Petersen PE, Lennon MA (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol* 32:319-321.

Rolla G, Ögaard B, Cruz RA (1991). Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J* 41:171-174.

Saxegaard E, Lagerlöf F, Rølla G (1988). Dissolution of calcium fluoride in human saliva. *Acta Odontol Scand* 46:355-359.

ten Cate JM (1997). Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 105:461-465.

Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA (2008). Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res* 87:1032-1036.

Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA (2006). Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 9:834-838.

Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC (1997). Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. *J Dent Res* 76:761-767.

Zimmer S, Bizhang M, Seemann R, Witzke S, Roulet JF (2001). The effect of a preventive program, including the application of low-concentration fluoride varnish, on caries control in high-risk children. *Clin Oral Investig* 5:40-44.

Table 1. Statistical Results of Analyses of Variance (*p*-values).

Variables	Factors		Interaction
	Dentifrice	APF	Dentifrice*APF
<i>Mineral loss</i>			
%SHL	<.0001	<.0001	0.3176
IML	<.0001	<.0001	0.2006
F in biofilm fluid	0.0127	0.0057	0.0940
F in biofilm solids	<.0001	<.0001	0.0052
<i>F in dentine</i>			
“CaF ₂ ”	0.006	<.0001	0.055
FAp	<.0001	<.0001	0.018

APF=acidulated phosphate fluoride; %SHL=percentage of surface hardness loss; IML=integrated mineral loss; F=fluoride; CaF₂=calcium fluoride; FAp=fluorapatite.

Table 2. Analysis of Dentine and F in Dental Biofilm According to Treatments (Mean $\pm$ SD, n=12).

Treatments ^a	Mineral loss		Dental Biofilm		F in dentine ^g	
	%SHL ^a	IML ^b (vol % x μ m)	F in fluid ^c (μ M)	F in solids ^d (μ mol/g)	CaF ₂ ^e (μ g F/cm ²)	FAp ^f (μ g F/cm ²)
PD	71.2 $\pm$ 7.3	1951.8 $\pm$ 1139.6	2.2 $\pm$ 1.1	0.03 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 1.4
FD	38.0 $\pm$ 7.8	376.7 $\pm$ 189.5	5.4 $\pm$ 3.9	0.23 $\pm$ 0.40	0.5 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 2.8
APF + PD	52.5 $\pm$ 9.4	751.6 $\pm$ 369.2	7.5 $\pm$ 7.0*	0.25 $\pm$ 0.47	5.0 $\pm$ 3.5	21.0 $\pm$ 4.3**
APF + FD	24.2 $\pm$ 10.2	183.9 $\pm$ 41.7**	8.4 $\pm$ 9.4*	0.29 $\pm$ 0.40	11.4 $\pm$ 5.9**	24.0 $\pm$ 5.1

^a PD = placebo dentifrice; FD = fluoridated dentifrice; APF = acidulated phosphate fluoride application.

^a %SHL=Percentage of surface hardness loss.

^b IML=Integrated mineral loss; transformed in inverse square root.

^c Fluoride (F) in biofilm fluid was transformed in inverse square root.

^d F in biofilm solids was transformed by the power of -0.2.

*n=11, biofilm samples collected were not enough for these analyses.

^e Calcium fluoride was log-transformed.

^f FAp=Fluorapatite; square root-transformed.

** n=11; One value indicated by the SAS Software as an outlier was removed. Outliers removed: IML, APF+FD = 495.7 vol % x μ m; CaF₂, APF+FD = 2.1 μ g F/cm²; FAp, APF+PD = 2.0 μ g F/cm².

^g Control group (not submitted to any treatment): CaF₂ = 0.4 $\pm$ 0.1 μ g F/cm²; FAp = 1.1 $\pm$ 0.6 μ g F/cm²

APF group (immediately removed after APF application): CaF₂ = 76.5 $\pm$ 16.5 μ g F/cm²; FAp = 9.8 $\pm$ 2.0 μ g F/cm²

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do declínio da cárie dental em esmalte observado nas últimas décadas, parece haver um aumento do risco ao desenvolvimento de cárie radicular na população adulta e idosa (Rihs *et al.*, 2008). A utilização do flúor (F) tem se mostrado efetiva na prevenção e reversão dessas lesões, especialmente em altas concentrações (Baysan *et al.*, 2001). Embora a combinação de métodos de uso de F já tenha sido estudada para esmalte, com benefício adicional modesto, pouco se sabia sobre o efeito dessa combinação em dentina radicular, o que é pertinente, já que esse substrato dental é mais susceptível ao desenvolvimento da cárie, necessitando de uma maior quantidade de F para inibição de sua desmineralização (Herkstroter *et al.*, 1991). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in situ* o efeito da combinação de uma única aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (ATF) e uso diário e regular de dentifrício fluoretado de 1100 ppm F na disponibilidade de F no biofilme dental, na retenção de produtos de reatividade e na desmineralização da dentina radicular.

A escolha do modelo *in situ* para o desenvolvimento desse estudo deve-se ao fato do mesmo já estar bem estabelecido para o estudo de cárie em dentina radicular (Aires *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2003; Aires *et al.*, 2008). Além disso, este apresenta algumas características importantes como: possibilidade de serem conduzidos intra-oralmente, permitindo a inclusão de fatores salivares, e acúmulo natural de biofilme; controle das variáveis experimentais; integração de diversas técnicas analíticas, aumentando a sensibilidade e a validade científica da metodologia e o curto período de duração, evitando a implicação de problemas éticos (Zero, 1995).

Os resultados do presente estudo mostram que a combinação da aplicação tópica de flúor fosfato acidulado e uso de dentifrício fluoretado foi mais efetiva na diminuição da desmineralização da dentina radicular exposta a um alto desafio cariogênico (acúmulo de biofilme dental e alta frequência de exposição à sacarose) do que cada tratamento isoladamente. Das técnicas utilizadas para avaliação da perda mineral, a dureza de superfície e microradiografia estão entre as mais utilizadas, sendo a última considerada a mais prática para a quantificação do conteúdo, mudança e distribuição mineral (Arends & ten Bosch, 1992) e apesar de existir correlação dessas

técnicas para esmalte (Featherstone *et al.*, 1983; Kielbassa *et al.*, 1999), não se conhecia esse tipo de comparação para dentina. Assim, a perda mineral no presente estudo foi avaliada por dureza de superfície e microradiografia de secção transversa com resultados similares em ambas as técnicas e forte e significativa correlação entre as mesmas, sugerindo que as mudanças minerais ocorridas durante a desmineralização da dentina radicular avaliadas por microradiografia podem ser também monitoradas por meio da dureza de superfície.

A menor perda mineral encontrada no grupo onde houve a aplicação tópica de F e uso do dentifrício fluoretado é suportada pela maior concentração de F no fluido do biofilme. Sabe-se que os eventos de desmineralização e remineralização ocorrem no fluido do biofilme dental, a porção aquosa entre as bactérias e a matriz do biofilme (Tatevossian & Gould, 1976), onde a concentração de íons cálcio, fosfato e hidrogênio é determinante na dissolução, manutenção ou precipitação de minerais. Nesse local, a presença de F potencializa o ganho de fluorapatita ao mesmo tempo em que a hidroxiapatita da dentina é perdida, reduzindo a desmineralização. Dessa forma, deve-se salientar a importância do estudo da disponibilidade do F no fluido, que de forma inédita foi avaliado no biofilme formado sobre dentina radicular.

Após a aplicação de produtos com altas concentrações de F, especialmente aqueles com pH ácido como o utilizado nesse estudo, uma leve dissolução do substrato dental ocorre, com subsequente precipitação de produtos do tipo fluoreto de cálcio (Ögaard *et al.*, 1990). A retenção desse tipo de material foi avaliada no presente estudo. Assim, a combinação da ATF e uso do dentifrício fluoretado aumentou a retenção de fluoreto de cálcio (CaF_2) mesmo após sete dias de um alto desafio cariogênico. Sabe-se que o “ CaF_2 ” funciona como um reservatório lábil de F sobre o dente (Ögaard, 2001), liberando F para interferir com os processos de des e remineralização. De fato, o F liberado para o fluido do biofilme a partir da dissolução do CaF_2 deve ter inibido a desmineralização da dentina, especialmente no grupo onde ocorreu a associação da ATF e dentifrício fluoretado, corroborando recente estudo *in situ* de curta duração que mostrou correlação entre o CaF_2 formado no esmalte, o F liberado para o fluido da placa teste e a consequente diminuição da desmineralização do esmalte (Tenuta *et al.*, 2008). O presente estudo reforça os resultados do estudo

supracitado, trazendo informações novas com a utilização de dentina radicular como substrato e utilizando um modelo *in situ* de longa duração, onde o biofilme dental é formado diretamente sobre os blocos dentais. Adicionalmente, a formação de fluorapatita como consequência do processo de des e remineralização na presença de F foi demonstrada.

Dessa forma, os resultados obtidos ajudam a entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e prevenção da cárie radicular e abrem caminho para o estudo da combinação de meios de uso de F na prevenção e controle da doença em estudos clínicos.

CONCLUSÃO

A combinação de uma única aplicação tópica de flúor fosfato acidulado em gel e uso diário e constante de dentifrício fluoretado de 1100 ppm F aumentou a disponibilidade de flúor no biofilme dental, bem como a retenção dos produtos de reatividade formados com conseqüente redução da desmineralização da dentina radicular, mostrando um efeito protetor sinérgico.

REFERÊNCIAS¹

1. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of a lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. *Caries Res.* 2002; 36(3):167-9.
2. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42(5):380-6.
3. Arends J, ten Bosch JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; 71(suppl 1): 924–928.
4. 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: 41-6.
5. Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996; 104:416-22.
6. Cenci MS, Tenuta LMA, Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA. Effect of microleakage and fluoride on enamel-dentine demineralization around restorations. *Caries Res.* 2008; 42:369-379.
7. Clarkson JE. Epidemiology of root caries. *Am J Dent.* 1995; 8(6):329-34. Review.
8. Clarkson JJ, McLoughlin J. Role of fluoride in oral health promotion. *Int Dent J.* 2000; 50(3):119-28.
9. 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.
10. Curzon ME, Preston AJ. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res.* 2004; 38 Suppl 1:24-33.

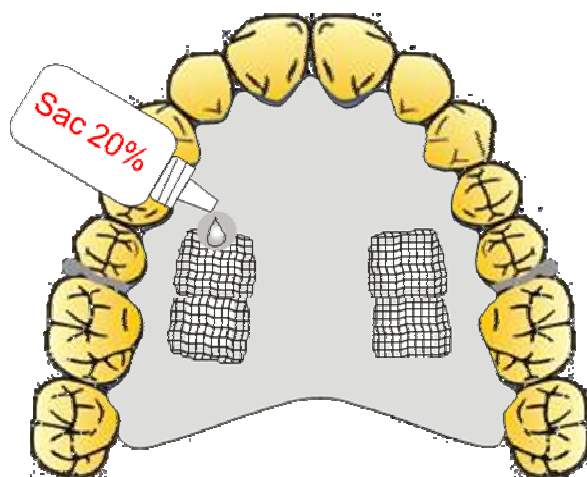
¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983; 17:385-391.
12. Fure S. Five-year incidence of caries, salivary and microbial conditions in 60-, 70- and 80-year-old Swedish individuals. *Caries Res.* 1998; 32(3):166-74.
13. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37: 339-44.
14. Herkströter FM, Witjes M, Arends J. Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. *Caries Res.* 1991; 25(5):317-22.
15. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol.* 1987; 32:319-322.
16. IBGE. Vida média do brasileiro chegará ao patamar de 81 anos em 2050. Consultado no endereço eletrônico http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1272&id_pagina=1, em 12 de dezembro de 2009.
17. Imazato S, Ikebe K, Nokubi T, Ebisu S, Walls AW. Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil.* 2006; 33(2):137-43.
18. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1999; 44:243-251.
19. Margolis HC, Moreno EC. Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid. *Critical Rev. Oral Biol. Med.* 1994; 5(1): 1-25.
20. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 1:CD002781.

21. Ögaard B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec Iss): 813-819.
22. Ögaard B. CaF_2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res.* 2001; 35(suppl 1): 40-4.
23. Ögaard B, Rølla G, Helgeland K. Uptake and retention of alkali-soluble and alkaliinsoluble fluoride in sound enamel in vivo after mouthrinses with 0.05% or 0.2% NaF. *Caries Res.* 1983; 17(6): 520-4.
24. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, 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.
25. Rihs LB, de Sousa Mda L, Wada RS. Root caries in areas with and without fluoridated water at the Southeast region of São Paulo State, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(1):70-4.
26. Rølla G, Ögaard B, Cruz RA (1991). Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J* 41:171-174.
27. Rølla G, Ögaard B, De Almeida Cruz R. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 105-8.
28. Saxegaard E, Lagerlöf F, Rølla G. Dissolution of calcium fluoride in human saliva. *Acta Odontol Scand.* 1988; 46: 355-9.
29. Saxegaard E, Rølla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96: 523-35.
30. Takagi S, Liao H, Chow LC. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization in vitro. *Caries Res.* 2000; 34:281-88.
31. Tatevossian A, Gould CT. The composition of the aqueous phase in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1976; 21(5): 319-23.
32. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999; 57:325-329.

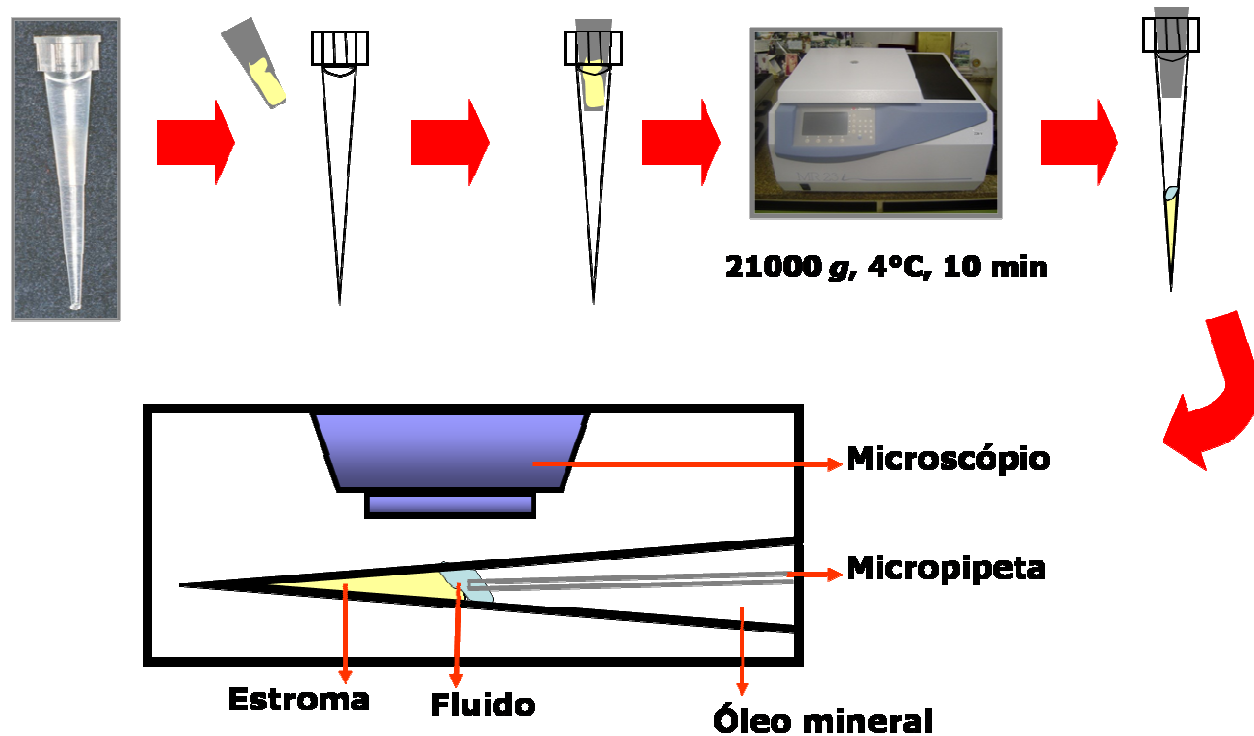
33. Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA . Fluoride release from CaF_2 and enamel demineralization. J Dent Res. 2008; 87:1032-1036.
34. Tenuta LMA, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA (2009). Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. Caries Res. 2009; 43:278-285.
35. Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res. 1995; 9:214-30.

APÊNDICE 1 – Esquema dispositivo intra-oral palatino



Esquema ilustrativo do dispositivo intra-oral palatino confeccionado em resina acrílica para os voluntários. Quatro blocos de dentina bovina hígida, sendo dois de cada lado eram alocados no dispositivo. Uma tela plástica era colocada sob os blocos para permitir o acúmulo de biofilme.

APÊNDICE 2 – Esquema da coleta e extração do fluido do biofilme



O biofilme era colocado em uma ponteira de 10 µL imerso em óleo mineral para evitar evaporação do fluido e centrifugado. Após a centrifugação, 3 fases se formavam na ponteira de 10 µL adaptada: precipitado de placa (estroma), fluido de placa e óleo mineral. O fluido era coletado com auxílio de micropipeta e armazenado em placa de petri sob óleo mineral para posterior determinação da concentração de flúor.

APÊNDICE 3 – Esquema de análise de flúor no fluido do biofilme

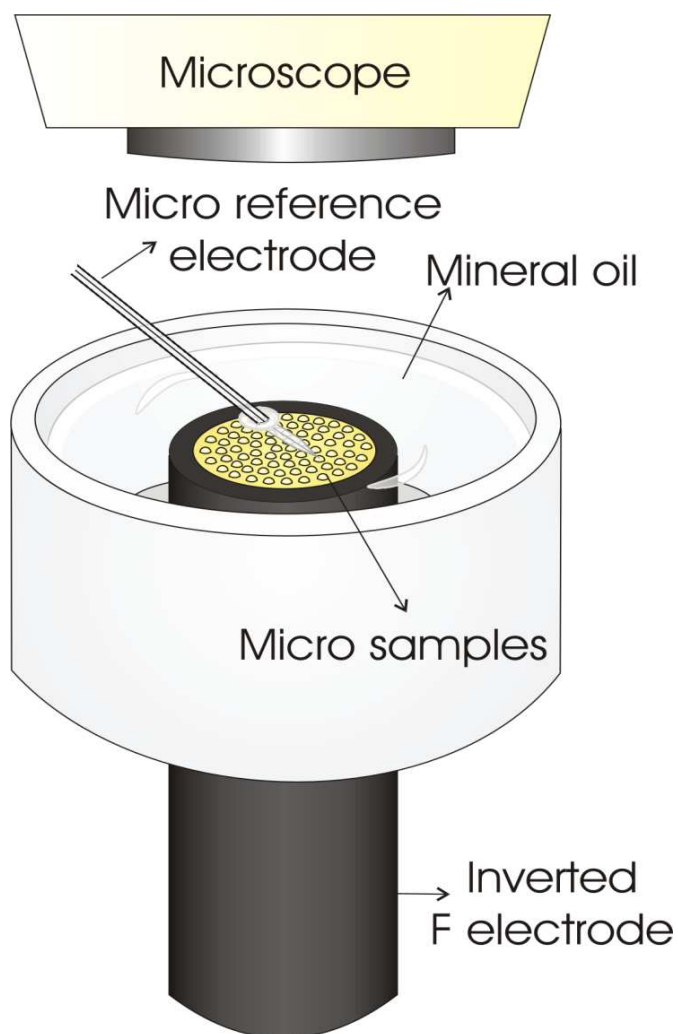
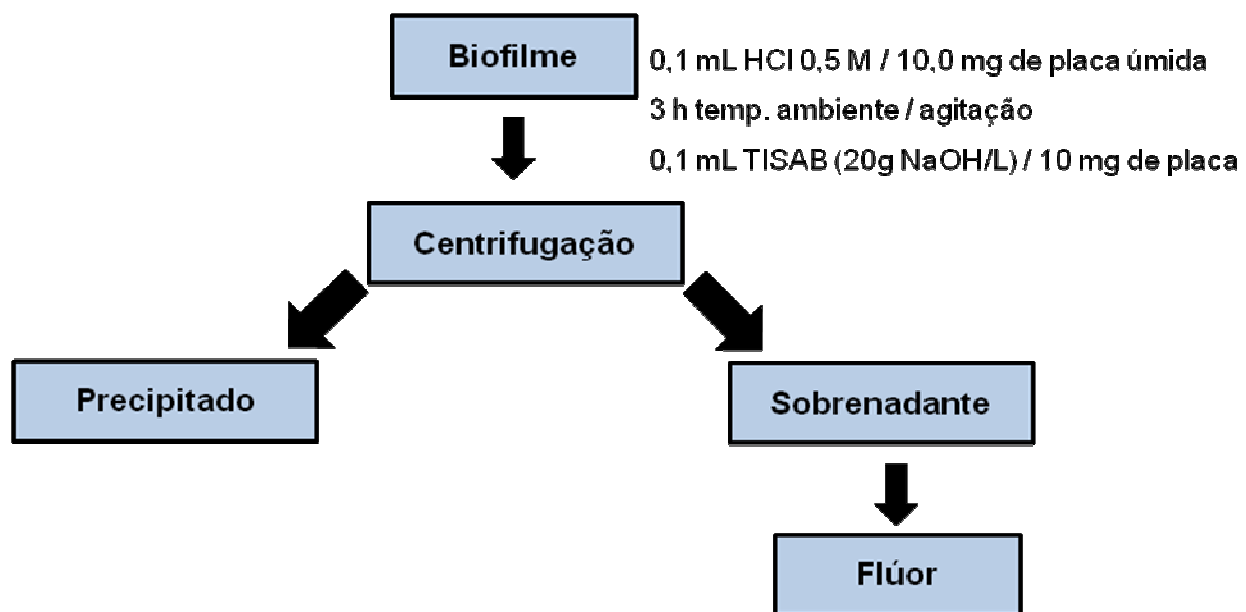


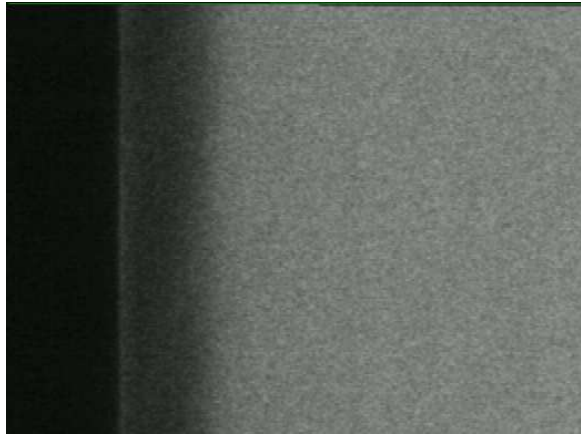
Ilustração do aparelho utilizado para microanálise de fluoreto. As amostras eram aplicadas na superfície do cristal sensível a fluoreto no eletrodo invertido íon-específico, diluídas com TISAB III (10:1), sob óleo mineral. Com o auxílio de um microscópio, o microeletrodo de referência era posicionado em contato com as amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto através de um potenciômetro.

APÊNDICE 4 – Esquema da extração e dosagem de flúor no estroma

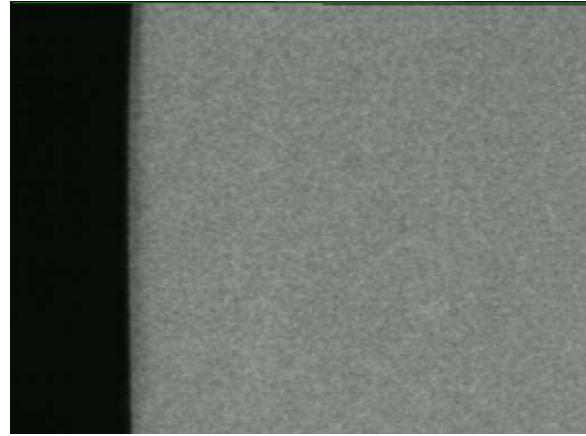


Potenciômetro com eletrodo específico para F

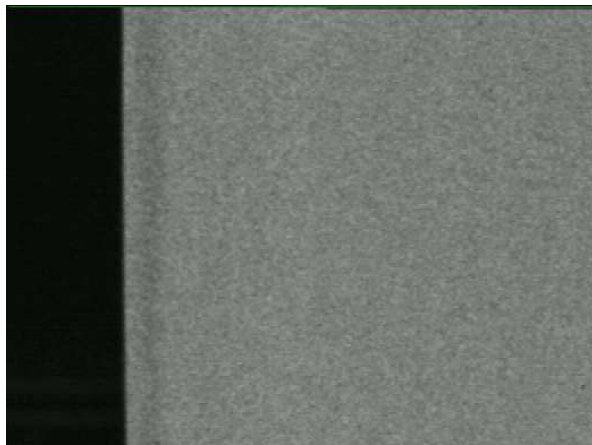
APÊNDICE 5 – Ilustração da avaliação da perda mineral por microrradiografia de secção transversal nos diferentes tratamentos



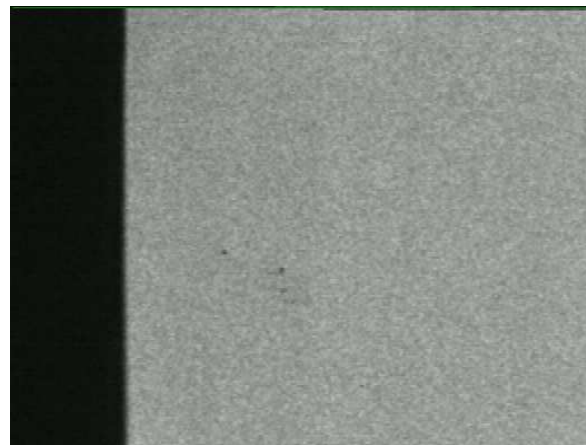
Dentifrício placebo



Dentifrício fluoretado



ATF + Dentifrício placebo



ATF + Dentifrício fluoretado

ANEXO 1 – Deliberação da 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

Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação

ANEXO 2 – Certificado de aprovação no Comitê de Ética

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Influência do flúor na acidogenicidade, concentração de polissacarídeos e diversidade genotípica de estreptococos do grupo mutans no biofilme dental detectados por AP-PCR - estudo in situ", protocolo nº 039/2006, dos pesquisadores CÍNTIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, GLÁUBER CAMPOS VALE, JAIME APARECIDO CURY, LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA, PATRÍCIA RIBEIRO BATISTA, RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER e RODRIGO ALEX ARTHUR, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 30/11/2007.		
The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Influence of fluoride on the acidogenicity, polysaccharide concentration and genotypic diversity of mutans streptococci in dental biofilm detected by AP-PCR - in situ study", register number 039/2006, of CÍNTIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, GLÁUBER CAMPOS VALE, JAIME APARECIDO CURY, LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA, PATRÍCIA RIBEIRO BATISTA, RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER and RODRIGO ALEX ARTHUR, 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 30/11/2007.		
 Prof. Cinthia Pereira Machado Tabchoury	Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.		

ANEXO 3 – Comprovante de submissão de artigo

 JOURNAL OF DENTAL RESEARCH® Featuring Critical Reviews in Oral Biology & Medicine	
Home Author Instructions Reviewer Instructions Contact JDR Tips Logout	
Manuscript #	10-0073
Current Revision #	0
Submission Date	2010-02-03
Current Stage	Under Consideration
Title	Effect of APF and Dentifrice on Root Dentine Demineralization and Biofilm
Running Title	APF and F dentifrice effect on dentine
Manuscript Type	Research Report
Special Section	N/A
Category	Biological
Manuscript Comment	Number of words in the abstract: 149 Number of words in the abstract and the text: 2340 Number of tables: 2 Number of cited references: 26
Corresponding Author	Cinthia Tabchoury (Piracicaba Dental School - University of Campinas)
Contributing Authors	Glauber Vale , Altair Del Bel Cury , Livia Tenuta , Bob ten Cate , Jaime Cury
Abstract	Since dentine is more caries-susceptible than enamel, we hypothesized that combination of professional fluoride (F) application and use of 1,100 ppm F dentifrice would be necessary to control root caries. Twelve adult volunteers wore palatal appliances containing root dentine slabs, which were subjected during 4 experimental phases of 7 days each to biofilm accumulation and sucrose exposure 8x/day. The volunteers were randomly assigned to the following treatments: placebo dentifrice (PD), 1,100 ppm F dentifrice (FD), acidulated phosphate F (APF) + PD and APF+FD. APF gel (1.23% F) was applied on the slabs once at the beginning of the experimental phase and the dentifrices were used 3x/day. APF and FD increased F concentration in biofilm fluid and reduced root dentine demineralization, presenting additive effect. The data suggest that the combination of APF gel application and daily regular use of 1,100 ppm F dentifrice may be relevant to control root caries.
Associate Editor	Not Assigned
Key Words	fluoride, root dentine, demineralization, APF, dentifrice
Author Disclosure	• Acknowledgement Section properly discloses sponsor remuneration - no. • Material and Methods Section properly reports animal or specimens protocols - no.

ANEXO 4

Súmula Curricular

Gláuber Campos Vale nasceu em 16 de abril de 1980, em Sousa, Paraíba. Completou o ensino médio em Teresina, Piauí. No ano de 1998 ingressou no curso de Odontologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), tendo sido graduado Cirurgião Dentista em 2002. No ano seguinte foi contratado como Professor Substituto junto ao curso de Odontologia da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), tendo atuado na disciplina de Dentística Restauradora II. Em 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cariologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, sob a orientação da Profa. Dra. Cínthia Pereira M. Tabchoury. Durante o período foi bolsista CNPq e obteve o título de Mestre em Odontologia em fevereiro de 2006. Ainda em 2006 iniciou seu doutoramento na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cariologia, sob orientação da Profa. Dra. Cínthia Pereira M. Tabchoury. Foi bolsista FAPESP, e bolsista CAPES durante Estágio de Doutorado no Exterior, o qual foi desenvolvido no Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), sob supervisão do Prof. Dr. Jacob M. “Bob” ten Cate.

Publicações:

1. Arthur RA, Tabchoury CP, Mattos-Graner Rde O, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, **Vale GC**, Cury JA. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. *Braz Dent J.* 2007; 18(3):185-91.
2. **Vale GC**, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res.* 2007; 41(5):406-12.
3. Hugo FN, **Vale GC**, Ccahuana-Vásquez RA, Cypriano S, de Sousa Mda L. Polarization of dental caries among individuals aged 15 to 18 years. *J Appl Oral Sci.* 2007 Aug; 15(4):253-8.
4. Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, **Vale GC**, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res.* 2007; 41(1):9-15.