



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



ANA FLÁVIA BISSOTO CALVO

**Efeito do tempo de aplicação profissional de flúor fosfato
acidulado em gel na desmineralização do esmalte de dentes
decíduos e permanentes**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Odontologia,
Área de concentração em Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Co-Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

PIRACICABA

2011

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

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

C139e Calvo, Ana Flávia Bissoto.
Efeito do tempo de aplicação profissional de flúor fosfato acidulado em gel na desmineralização do esmalte de dentes decíduos e permanentes / Ana Flávia Bissoto Calvo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Jaime Aparecido Cury.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fluoreto de fosfato acidulado. 2. Dente decíduo. 3. Placa dentária. I. Tabchoury, Cíntia Pereira Machado. II. Cury, Jaime Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Effect of application time of acidulated phosphate fluoride on demineralization of deciduous and permanent enamel

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Acidulated phosphate fluoride. 2. Tooth, Deciduous. 3. Dental plaque

Área de Concentração: Cariologia

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Josimeri Hebling Costa, Rita Villena Sarmiento

Data da Defesa: 04-04-2011

Programa de Pós-Graduação em 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 04 de Abril de 2011, considerou a candidata ANA FLÁVIA BISSOTO CALVO aprovada.

Cynthia Machado Tabchoury

Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Josimeri Hebling Costa

Profa. Dra. JOSIMERI HEBLING COSTA

Rita Villena Sarmiento

Profa. Dra. RITA VILLENA SARMIENTO

*Aos meus pais Aldo e Lúcia e meus irmãos pelo exemplo de
perseverança, pelo apoio e ajuda incondicional.
Aos meus queridos, Luiz Paulo e Ana Victória por todo amor
e incentivo, sempre presente me apoiando e compreendendo
minha ausência.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, minha eximia orientadora, por todo conhecimento transmitido, exemplo de profissionalismo, pela disponibilidade e paciência além do ótimo convívio ao longo desses anos.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** pela co-orientação ao meu trabalho, por compartilhar sua sabedoria e a paixão pela ciência, proporcionando discussões científicas enriquecedoras à minha formação de pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar sempre iluminado nosso caminho.

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

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

Ao curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, na pessoa do coordenador **Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia**.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP**, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, **CAPES**, pelas bolsas concedidas (2009/01785-6 e 2010/20578-9).

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

À **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta** pelo ensinamento ao longo do mestrado e colaboração em todas as fases do trabalho.

Aos professores Dr **Jaime Aparecido Cury**, **Livia Maria Andaló Tenuta** e **Pedro Luiz Rosalen** pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Wander José da Silva**, pela imensurável ajuda na análise dos dados e suas sugestões.

Aos **voluntários** pela valiosa participação, colaboração e dedicação nesta pesquisa.

À estagiária **Paula Garcia**, pela dedicação e amizade durante todo o experimento.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica oral da FOP/UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva** pela amizade construída ao longo desses anos, pela ajuda e atenção indispensáveis.

Aos queridos amigos de pós-graduação **Sandro Kusano**, **Regiane Amaral**, **Rodrigo Arthur** e **Lidiany Rodrigues** por toda amizade, companheirismo, ajuda e ensinamentos ao longo de todo esse trajeto.

Aos amigos de pós graduação: **Carolina Aires, Danilo Catani, Frederico Fernandes, Giseli Moi, Glauber Vale, Juliana Braga Fernandes, Marília Correia, Pedro Ricomini, Renzo Vásques, Alhetea Ratti, Amanda Falcão da Silva, Juliana Botelho, Karla Cook, Livia Helena Souza e Terra, Nádia Masson, Naiara Ferreira e Tarcisio de Oliveira** pelas discussões científicas e não científicas.

Aos alunos de Iniciação Científica **Lenita, Valdemir, Patrícia e Gustavo** e aos estagiários **Tamires** e **Jerônimo Jr.** pela convivência durante o mestrado.

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

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

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”.

Thomas Huxley

Resumo

Embora o efeito de flúor fosfato acidulado em gel (FFA-gel) na redução da cárie dental em dentes permanentes esteja baseado em evidência, prévio estudo *in situ* realizado sob baixo desafio cariogênico sugere que a aplicação profissional de FFA-gel por 4 minutos não promove maior resistência a desmineralização ao esmalte permanente do que 1 minuto, porém sob maior desafio cariogênico o resultado poderia ser diferente. Além disso, apesar dos dentes decíduos serem mais susceptíveis há cárie do que os permanentes não há estudos na literatura que comparem o tempo de aplicação de FFA-gel no esmalte decíduo. Desta forma, foi realizado um estudo *in situ* com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de 1 e 4 minutos de aplicação profissional de FFA 1,23% F em gel na desmineralização de esmalte decíduo e permanente, assim como na formação e retenção de F no esmalte e a concentração de F no biofilme dental formado, numa condição de acúmulo de biofilme dental e alta freqüência de exposição à sacarose. Em três fases experimentais, 16 voluntários adultos utilizaram dispositivo palatino, no qual foram fixados 4 blocos de esmalte decíduo de um lado e 4 de permanente do outro. No início da primeira fase, os voluntários foram divididos aleatoriamente pelo tratamento que iriam iniciar o estudo: Controle negativo: nenhum tratamento; FFA-1 min: aplicação de FFA por 1 minuto, realizada no primeiro dia de cada fase experimental; FFA-4 min: aplicação de FFA por 4 minutos, sendo que ao final dos cruzamentos todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos. Adicionalmente, um bloco decíduo e um permanente foram fixados, com cera, na região anterior do dispositivo para determinação de flúor (F) tipo fluoreto de cálcio (“CaF₂”) formado no esmalte e, após 30 minutos, uma tela plástica foi fixada no dispositivo de acrílico sobre os outros blocos dentais. Durante as fases experimentais, solução de sacarose a 20% foi gotejada extraoralmente sobre os blocos 8x/dia e os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado. Após 14 dias do início de cada fase, o biofilme formado foi coletado e analisado quanto à concentração de F no fluido e na parte sólida. Nos blocos de esmalte foi determinado o “CaF₂” retido e a perda mineral foi

avaliada pela dureza do esmalte dental seccionado transversalmente. Aplicação de FFA-gel reduziu a desmineralização em ambos os substratos dentais ($p < 0,05$), independente do tempo de aplicação ($p > 0,05$). A concentração de “CaF₂” formado e retido foi significativamente maior nos grupos que receberam aplicação de FFA-gel ($p < 0,05$), porém sem diferença entre os tempos de aplicação ($p > 0,05$) tanto para esmalte decíduo quanto para o permanente. Os resultados do presente estudo sugerem que, mesmo sob um alto desafio cariogênico, um menor tempo de aplicação profissional de FFA-gel, isto é, 1 minuto, apresenta o mesmo efeito anticárie que o tempo de 4 minutos, tanto para o esmalte decíduo quanto para o permanente.

Palavras-chave: fluoreto de fosfato acidulado, dente decíduo, desmineralização, biofilme dental, esmalte dentário, flúor, testes de dureza

Abstract

Although the effect of acidulated phosphate fluoride gel (APF-gel) on caries reduction in permanent teeth is based on evidence, previous in situ study, conducted under low cariogenic challenge suggests that the professional application of APF-gel for 4 minutes does not promote greater resistance to demineralization for permanent enamel than 1 minute, however under higher cariogenic challenge the result could be different. Moreover, although deciduous teeth are more susceptible to caries than permanent ones, there are no studies in the literature that compare the application time of APF in deciduous enamel. Thus, an in situ study was conducted with the aim of evaluating the effect of application time for 1 and 4 minutes of professional APF gel with 1.23% F on demineralization of deciduous and permanent enamel, as well as on F formed and retained on enamel and F concentration of dental biofilm formed, in a condition of dental biofilm accumulation and high frequency of sucrose exposure. In three experimental phases, 16 adult volunteers wore palatal appliances, containing 4 deciduous enamel slabs in one side and 4 permanent ones in the other side. At the beginning of the first phase, the volunteers were randomly assigned by the treatment they would start the study: Negative control: no treatment; APF-1 min: APF application for 1 min, performed on the first day of each experimental phase; APF-4 min: APF application for 4 min, and at the end of the experimental phases all volunteers had been submitted to all treatments. Additionally, a deciduous and a permanent slab were fixed with wax in anterior position on appliance for determination of fluorine (F) as calcium fluoride ("CaF₂") formed on enamel and, after 30 minutes, a plastic mesh was fixed in the acrylic appliance over the other dental slabs. During the experimental phases, 20% sucrose solution was dripped extraorally over the slabs 8 x/day and the volunteers used non-fluoridated dentifrice. After 14 days of the beginning of each phase, dental biofilm formed was collected and analyzed with regard to F concentration in the fluid and the solids. On the slabs was determined "CaF₂" retained on enamel and mineral loss was evaluated by enamel cross-

sectional hardness. APF-gel application reduced demineralization in both dental substrates ($p < 0.05$), independent of the application time ($p > 0.05$). The concentration of "CaF₂" formed and retained was significantly higher in the groups treated with APF-gel ($p < 0.05$), however without difference between the application periods ($p > 0.05$) either for deciduous or permanent enamel. The results of the present study suggest that, even under a high cariogenic challenge, a shorter time of professional application of APF-gel, that is, 1 min, presented the same anticaries effect as the time of 4 minutes, either in deciduous or permanent enamel.

Key words: acidulated phosphate fluoride, tooth, deciduous, demineralization, dental biofilm, enamel, fluoride, hardness tests

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO.....	5
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICES.....	27
ANEXOS.....	32

Introdução

A cárie é uma doença resultante de sucessivos eventos de desmineralização, causados pela ação de ácidos produzidos por bactérias presentes no biofilme dental, após exposição a carboidratos fermentáveis (Marsh, 2009). Esta doença pode ser controlada com o auxílio do fluoreto (F), por meio de uso coletivo, individual ou profissional de acordo com as necessidades individuais. Assim, medidas como, a fluoretação da água de abastecimento e uso de dentifrício fluoretado estão relacionados à redução de cárie para grande parte da população (Cury *et al.*, 2004). Porém, para alguns grupos específicos com alto risco e atividade de cárie, se faz necessário a complementação com uso profissional de F (Øgaard *et al.*, 1994) e a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA) contendo 1,23% de F é um método utilizado no controle da progressão da cárie, sendo seu efeito claramente reconhecido (Marinho *et al.*, 2004; 2008).

O fluoreto, quando presente no meio bucal em concentração maior que 100 ppm de F, interfere no processo de cárie inibindo a desmineralização e ativando a remineralização (ten Cate, 1997). A aplicação profissional de FFA promove a formação de reservatórios tipo fluoreto de cálcio (“CaF₂”) que disponibilizam o íon F para o meio (Tenuta *et al.*, 2008). Durante o consumo de carboidratos fermentáveis as bactérias, presentes no biofilme dental, produzem ácidos que causam um decréscimo do pH na interface dente/biofilme. Se o pH estiver entre 4,5 e 5,5 ocorrerá a dissolução do mineral do dente (hidroxiapatita-HA), na presença de F no meio bucal, em especial no biofilme, ele irá interferir no processo de desmineralização ocorrendo a precipitação de fluorapatita (FA). Na ausência dos desafios cariogênicos, o ácido presente é diluído e neutralizado e quando pH for igual ou maior que 5,5, o F presente ativa a remineralização (Cury & Tenuta, 2009).

Os produtos com maiores concentrações de F formam mais “CaF₂” e o pH ácido disponibiliza o cálcio presente no mineral do dente para reação com o íon F (Delbem & Cury, 2002). O efeito preventivo da aplicação profissional de F está

relacionado principalmente com os produtos de reação formados no esmalte (CaF_2) durante o tratamento e sua liberação após aplicação (Tenuta *et al.*, 2008).

Os procedimentos clínicos realizados antes e após a aplicação de FFA foram adotados pela Academia Americana de Odontopediatria (AAPD - American Academy of Pediatric Dentistry) em 1967 e alguns deles como a necessidade de profilaxia prévia (Ripa *et al.*, 1984; Hawkins *et al.*, 2003) e o procedimento de lavar a boca (Delbem *et al.*, 2005) ou beber água (Lopes *et al.*, 2008) após a aplicação tópica têm sido questionados. O tempo de aplicação do FFA também tem sido discutido e a sugestão é que seja realizada por 4 minutos (American Dental Association Council on Scientific Affairs, 2006; AAPD, 2011).

Os resultados encontrados na literatura, em relação ao tempo de aplicação, são conflitantes: alguns estudos mostraram diferenças entre 1 e 4 minutos de aplicação (Wefel & Wei, 1979; Wei & Hattab, 1988; Wei *et al.*, 1988), enquanto outros não observaram qualquer diferença (Peixoto & Silva, 1992; Hebling *et al.*, 1995; Mendes *et al.*, 1996). Entretanto, a maioria destes estudos focou principalmente na incorporação de F pelo esmalte, apesar de não existir uma clara e direta relação entre F no esmalte e resistência à desmineralização (Delbem & Cury, 2002). Ainda, estudos *in vitro* mostraram que 4 minutos de aplicação de FFA não deixaram o esmalte mais resistente à desmineralização do que 1 minuto (Garcia-Godoy *et al.*, 1995; Delbem & Cury, 2002), apesar de ter ocorrido maior incorporação de flúor (Delbem & Cury, 2002).

Um estudo *in situ*, investigou o efeito da aplicação tópica de gel de FFA contendo 1,23% F na formação e retenção de F no esmalte dental e na inibição da desmineralização e também não observou diferença estatisticamente significativa entre 1 e 4 minutos de aplicação (Villena *et al.*, 2009). Entretanto neste estudo, os blocos de esmalte de terceiros molares permanentes foram expostos à sacarose apenas 3x/dia. Assim, é possível que sob condições de maior frequência de exposição à sacarose os resultados encontrados possam ser diferentes.

Os dentes decíduos têm em sua composição mais carbonato que os permanentes, o que pode contribuir para a progressão mais rápida da lesão de

cáries no esmalte decíduo do que no permanente (Sørnju-Clasen & Ruyter, 1997). Adicionalmente, há poucos estudos na literatura com este tipo de substrato (Marinho *et al*, 2002).

Um menor tempo clínico de aplicação, sem comprometimento do benefício anticárie do FFA, favoreceria o atendimento na saúde pública e em especial na clínica de odontopediatria, aumentando a colaboração do paciente e diminuindo o risco de toxicidade aguda pelo uso de produto de alta concentração de fluoreto. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in situ*, o efeito do tempo da aplicação profissional de FFA 1,23% de F em gel, por 1 ou 4 minutos, na desmineralização de esmalte decíduo e permanente hígidos, assim como na formação e retenção de F no esmalte e na composição bioquímica do biofilme dental formado, numa condição de acúmulo de biofilme e alta frequência de exposição à sacarose.

O presente estudo está apresentado no formato alternativo de dissertação de acordo com as normas estabelecidas pela deliberação 002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas (Anexo 1). O artigo intitulado **“Time of APF-gel application on formation and retention of CaF_2 ” on enamel of deciduous and permanent teeth and on demineralization**” foi submetido ao periódico “Caries Research” (Anexo 3).

Capítulo

Time of APF-gel application on formation and retention of “CaF₂” on enamel of deciduous and permanent teeth and on demineralization

Ana Flávia Bissoto Calvo, Cínthia Pereira Machado Tabchoury, Altair Antoninha Del Bel Cury, Livia Maria Andaló Tenuta, Jaime Aparecido Cury

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

Short Title: APF-gel application time and enamel demineralization

Key words: acidulated phosphate fluoride, deciduous, demineralization, dental biofilm, enamel, fluoride

Corresponding author

Prof. Dr. Cínthia Pereira Machado Tabchoury

Av. Limeira, 901 – Bairro Areião

Piracicaba – SP – Brazil

13414-903

ABSTRACT

Although the effect of acidulated phosphate fluoride gel (APF-gel) on caries reduction in permanent teeth is based on evidence, the relevance of the clinical time of application is still under debate; also, the effect of 4-min or 1-min application has not been evaluated in deciduous enamel. In a blind, crossover, in situ study of 3-leg of 14 days each, 16 adult volunteers wore palatal appliances containing 4 permanent and 4 deciduous enamel slabs. In the beginning of each phase, the slabs were submitted to one of the following treatments: no APF application (negative control); APF-gel (1.23% F) application for 1 min or 4 min. Biofilm accumulation on slab surface was allowed and the slabs were subjected 8x/day to 20% sucrose, simulating a high cariogenic challenge condition. On the 15th day of each phase, the biofilms were collected for fluoride determination in fluid and biofilm solids. On enamel of the slabs, fluoride retained as “CaF₂” was determined and demineralization was assessed by cross-sectional hardness. Fluoride as “CaF₂”, formed by APF-gel application, was determined in extra enamel slabs. APF-gel reduced demineralization in both enamel teeth ($p < 0.05$), but the difference between 1 and 4-min was not statistically different ($p > 0.05$). “CaF₂” formed and retained on deciduous and permanent enamel was significantly higher in APF-gel groups ($p < 0.05$), but no significant difference was found between 1 and 4 min ($p > 0.05$). The findings suggest that 1 min of APF-gel application provides the same anticaries effect than 4 min, either for permanent or deciduous enamel.

INTRODUCTION

There is clear evidence of the caries-inhibiting effect of acidulated fluoride gel [Marinho et al., 2002], but the relevance of the recommended pre- and post application procedures has been questioned [Delbem et al., 2005; Villena et al., 2009]. Among these clinical procedures, the application time of professional acidulated phosphate fluoride gel (APF-gel) has been studied in vitro and in situ.

The findings of in vitro studies, evaluating the effect of application time on fluoride uptake by permanent enamel, are conflicting and while some studies show that 4 min is more effective than 1 min of application [Wefel and Wei, 1979; Wei and Hattab, 1988; Wei et al., 1988], others did not find statistically significant difference [Peixoto and Silva, 1992; Hebling et al., 1995, Mendes et al., 1996]. The in vitro data based on F uptake, suggesting that 1 min of APF-gel application could be as effective as 4 min, was supported by two studies showing that 4 min does not lead the enamel more resistant to demineralization than 1 min [Garcia-Godoy et al., 1995; Delbem and Cury, 2002]. However, even using validated models, in vitro studies have limitations and it is very difficult to simulate the real life.

In situ studies have been considered as intermediate between in vitro and in vivo studies, because they allow the control of some clinical variables related to the development of caries [Zero, 1995]. Using an in situ model that has been widely used for different purposes on cariology [Paes Leme et al., 2006, as review], no statistically significant difference between APF-gel application for 1 or 4 min was shown, either on F uptake and its retention, or on reduction of demineralization [Villena et al., 2009]. However, in this study, the enamel slabs were exposed to sucrose at a frequency of 3 times a day, and it is possible that under a higher frequency of sucrose exposure [Cury et al., 2010] the longer time of application could be more effective. Also, in this study enamel slabs from human permanent teeth were used and deciduous enamel is considered more caries-susceptible than permanent one [Sønju-Clasen and Ruyter, 1997]. Moreover, according to Marinho et al. [2002], there is little information in the literature concerning the caries-inhibiting effect of APF-gel on deciduous dentition and in addition there are no

studies evaluating the effect of application time. Also, the retention of calcium fluoride-like products (“CaF₂”) formed on enamel by professional F application is desirable [Tenuta et al., 2008], but there is no study with deciduous teeth.

Therefore, this study aims to evaluate in situ the effect of 1 or 4 min of APF-gel application on F uptake by deciduous and permanent enamel, its retention and the consequence on demineralization under high cariogenic challenge induced by a high frequency of sucrose exposure and biofilm accumulation.

MATERIALS AND METHODS

Volunteers and Ethical Issues

Sixteen volunteers (18–40 years of age), who fulfilled the inclusion criteria (normal stimulated salivary flow rate (> 0.7 ml/min), good general and oral health, ability to comply with the experimental protocol, no antibiotic use during the 2 months prior to the study, not using a fixed or removable orthodontic device), were selected to take part in the study that was approved by the Research and Ethics Committee of Piracicaba Dental School (protocol n^o. 095/2009). They signed an informed, written consent (resolution no. 196 of the National Health Council, Health Ministry, Brasília, DF, 10/03/1996).

Experimental design

A blind, crossover in situ study was conducted in 3 experimental phases of 14 days each (fig. 1), during which 16 volunteers wore acrylic palatal appliances containing 4 deciduous and 4 permanent enamel slabs on each side of the appliance. Using a computer generated randomization list, the volunteers were randomly assigned to one of the following treatments done in each phase (fig. 1): no treatment of the slabs (negative control group), application of APF-gel to the slabs for 1 min (APF 1 min) and APF-gel application for 4 min (APF 4 min). Application of APF-gel for 1 or 4 min was performed at the 1st day of the experimental phase. Extra slabs, one deciduous and one permanent, placed at an anterior part of the appliance were removed immediately after application for determination of “CaF₂” formed.

During each phase, the 8 enamel slabs were extra-orally exposed to 20% sucrose solution eight times per day, biofilm was allowed to accumulate on the slabs and the volunteers used non-fluoridated dentifrice. At the end of each phase, the biofilm formed on all deciduous and permanent enamel slabs was collected separately for F analysis in the fluid and the solids. On two enamel slabs, “CaF₂” retained was determined and demineralization was assessed in the other two by cross-sectional hardness. After a washout period of at least 7 days, new slabs were placed in the appliance for the next experimental phase. After the three phases, all volunteers were submitted to all the treatments. For the statistical analysis, the volunteer was considered as an experimental block (n=16). The sample size was determined on the basis of our previous findings using the same experimental protocol [Paes Leme et al., 2004; Villena et al., 2009; Vale et al., 2011] with a statistical power higher than 90% for the variables demineralization and “CaF₂”. This study was blind only with respect to the examiners, who analyzed previously coded samples to ensure blindness.

Preparation of enamel slabs and palatal appliance

Sound exfoliated human deciduous and pre-molar teeth extracted for orthodontic reasons were selected for the study. They were stored in formaldehyde solution [White, 1987] for at least one month and enamel slabs (3 x 3 x 2 mm) were obtained from the middle third of them. The enamel surface of the slabs was not polished or flattened, 240 deciduous and permanent slabs were randomly divided into the groups of treatment and were sterilized by ethylene oxide. An acrylic resin intraoral palatal appliance, containing eight cavities measuring 4 x 4 x 3 mm (four at each side of the appliance), was made for each volunteer to set the slabs. In these cavities, new enamel slabs were placed for each phase of the study. In addition, one extra deciduous and one permanent enamel slab were fixed with wax in the anterior part of the appliance [Villena et al., 2009] to evaluate “CaF₂” formed by APF application.

Treatments

To provide a cariogenic challenge, the volunteers dripped 20% sucrose solution extra-orally onto each slab 8x/day [Cury et al., 1997]. On the 1st day of the respective phase, APF-gel (1.23% F, pH = 3.6-3.9, DFL[®], Petropolis, RJ, Brazil) was applied with a cotton swab during 1 or 4 min to the slabs placed in the appliances into the volunteers' mouths and also to the volunteers' teeth. The excess gel on the slab surfaces was removed with cotton swabs, the volunteers expectorated for 30 s and the extra slabs fixed at the anterior position were removed to evaluate "CaF₂" formed. Thirty minutes later [Paes Leme et al., 2004] a plastic mesh was fixed to the appliance over the slabs, to protect the enamel slab surfaces from mechanical attrition, leaving a 1 mm space for accumulation of dental biofilm [Hara et al., 2003 for details]. During these 30 min the volunteers did not eat or drink anything. In the negative control group, the appliances with the slabs were kept in the mouth during 4 min, the extra slabs were removed and the plastic mesh was fixed as already described. During the pre-experimental and washout periods, and during the 14 days of cariogenic challenge, volunteers brushed their teeth and the appliance, except for the area containing the slabs, with non-fluoride dentifrice. The volunteers drank and consumed foods prepared with optimally fluoridated water (0.6-0.8 mg F/l for the region) and no restrictions were made with regard to their diet, considering the crossover design of this study, but they were instructed to avoid F-rich food containing bioavailable F, such as tea.

Biofilm Collection and F Analysis in the Fluid and Solids

On the 15th day of each experimental phase, 10 h after the last exposure to sucrose solution, in fasting condition, the biofilm formed on all deciduous and permanent slabs was collected separately with a plastic spatula, immediately placed inside a mineral oil-filled plastic tip pipette adapted to a centrifuge tube and weighed ($\pm 10 \mu\text{g}$). The biofilm fluid was separated from the biofilm solids [Vogel et al., 1997] and its concentration determined [Tenuta et al., 2006]. After fluid extraction, biofilm solids were treated with 0.5 M HCl (0.1 ml per 10 mg of biofilm

wet weight) for acid soluble F extraction [Cury et al., 1997]. Samples were agitated for 3 h at room temperature, centrifuged, and the supernatant buffered with TISAB II (containing 20 g NaOH/l). The F concentration in the acid extract was measured using an ion-selective electrode Orion 96-09 and an ion analyzer Orion EA-940, with the standards containing HCl and NaOH in the same proportion as the samples.

Enamel demineralization assessment

After biofilm collection, 2 slabs of deciduous and 2 of permanent teeth were collected, longitudinally sectioned, embedded in acrylic resin and the cut surface was exposed and polished. Cross-sectional hardness was measured in the polished area using a Knoop indenter with a 25-g load for 5 s and a Future-Tech FM microhardness tester coupled to software FM-ARS 900 [Cury et al., 2000]. Three rows of 13 indentations each were made from the outer enamel surface, the first six spaced 10 μm from previous one and the last ones 20 μm . The mean values (kg/mm^2) at all measuring points of each distance from the surface were then averaged and the area of hardness loss versus lesion depth (ΔS) was calculated by numerical integration using the trapezoidal rule by the difference between the area under the curve ($\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) of the sound enamel minus the area of the demineralized one [Cury et al., 2010]. The results of the 2 slabs of deciduous and permanent enamel for each volunteer in each treatment were averaged.

According to a pilot study conducted, the use of enamel surface hardness assessment as indicator of demineralization was discarded due to artifacts on deciduous enamel surface provoked by the dissolution of “ CaF_2 ” formed by APF-gel application [Paes Leme et al., 2003].

Determination of “ CaF_2 ” formed and retained on enamel

“ CaF_2 ” retained in the other 2 slabs of deciduous and permanent teeth after the 14 days of cariogenic challenge and that formed on the extra slabs immediately after

APF-gel application was determined [Caslavska et al., 1975]. The area of enamel surface was measured with a digital caliber (± 0.001 mm), and all the slab surfaces were protected with wax, except for the enamel surface. Each slab was individually immersed in 1.0 M KOH (0.5 mL per slab) for 24 h, F extracted was determined with ion selective electrode and the results expressed in $\mu\text{g F}/\text{cm}^2$ [Moi et al., 2008]. The results of F retained in the 2 enamel slabs of deciduous and permanent teeth were averaged.

Statistical analysis

The data for deciduous and permanent enamel were independently analyzed. All data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test, with the volunteers considered as statistical blocks. The normality of errors distribution and the degree of non-constant variance were checked for each response variable using the SAS/LAB package (SAS software, version 9.0; SAS Institute, Cary, NC, USA). Data were transformed [Box et al., 2005] as suggested by the software and is described in the tables. F formed in enamel and that retained after the in situ experiment was compared by *t* test. SAS software was used for all analyses, and the significance limit was set at 5%.

RESULTS

Concentration of CaF_2 -like material ("CaF₂") formed on deciduous and permanent enamel after APF-gel application was statistically higher ($p < 0.05$) in both groups treated with APF-gel than the negative control group (Tables 1 and 2), however no significant difference was observed between the time of application ($p > 0.05$). Also, "CaF₂" retained on deciduous and permanent enamel at the end of the in situ phase for the groups treated with APF-gel application for 1 min and 4 min presented significantly higher values than the negative control group ($p < 0.05$), but the effect of time of APF-gel application was not significant ($p > 0.05$).

The results of enamel demineralization (Tables 1 and 2) evaluated by area of hardness loss (ΔS) showed that the groups treated with APF-gel had a statistically

lower ($p < 0.05$) demineralization than the negative control group, but the difference between them was not significant ($p > 0.05$), either for deciduous or permanent enamel teeth.

The results of F concentration in biofilm fluid and solids formed on enamel surface of deciduous and permanent slabs (Tables 1 and 2) were higher for the biofilms formed on enamel of groups treated with APF-gel compared with the non-treated, but the differences were not consistently significant ($p > 0.05$).

DISCUSSION

There is clear evidence of the anti-caries effect of professional topical application of APF-gel [Marinho et al., 2004; Marinho, 2008], but it has been recommended that the time of application should be further evaluated [ADA Council on Scientific Affairs, 2006].

The present in situ study, conducted under high cariogenic challenge, gives support to in vitro and in situ studies previously done [Peixoto and Silva, 1992; Garcia-Godoy et al., 1995; Hebling et al., 1995; Mendes et al., 1996; Delbem and Cury, 2002; Villena et al., 2009], suggesting that the application of APF-gel for 4-min does not render enamel of permanent teeth more resistant to caries. The results for permanent teeth (Table 2) were also found for deciduous teeth (Table 1) and these data are more relevant, because the literature lacks of studies with deciduous teeth and the reduction of the clinical time for APF-gel application in children is very important considering the difficulties to offer the best treatment for this age of patient.

The findings suggesting that 1 min of APF-gel application would be as effective as 4 min to control enamel demineralization either on permanent and deciduous enamel were supported by the data of “CaF₂” formed on enamel immediately after the application and those retained after 14 days of a high cariogenic challenge (Tables 1 and 2). Therefore, APF-gel application for 1 or 4 min was able not only to form high concentration of “CaF₂”, either in deciduous or permanent teeth, as after 14 days the concentration is still high compared with the control, but the difference

between 1 and 4 min was not significant. The data about permanent teeth are in agreement with the literature [Peixoto and Silva, 1992; Garcia-Godoy et al., 1995; Hebling et al., 1995; Mendes et al., 1996; Delbem and Cury, 2002; Villena et al., 2009] and for the first time the same is shown for deciduous.

The coherence between the data of enamel demineralization and “CaF₂” formed and retained on enamel either of permanent and deciduous teeth should have also been found for the data about F in biofilm, as it has been accepted that this product formed on enamel acts as a F reservoir [Rølla, 1988], releasing F to environment to interfere with the caries process [Tenuta et al., 2008]. In fact, higher values of F were found in the biofilm fluid and solids in the groups treated with APF-gel compared with the control (Tables 1 and 2), but the differences were not consistently significant. The absence of significance can be explained by the variability on the analysis as the power of the study to detect differences between the treatments was based on enamel demineralization as the main response variable. In our previous studies, a statistically significant association between APF-gel application and F concentration in biofilm solids [Paes Leme et al., 2004] and in the fluid [Vale et al., 2011] was observed with lower number of volunteers but the variability was also lower, showing the trend of the present data. Also, in these previous studies the statistical analysis followed a factorial design, which could explain the level of significance found.

In summary, the overall findings strongly suggest that the time of APF-gel application could be reduced from 4 to 1 min without jeopardizing its anticaries effect, either for permanent or deciduous teeth, but this in situ study should be complemented by clinical trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was 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 Master's Degree in Dentistry (Cariology Area). The authors thank the volunteers for their valuable participation and Prof. Dr. Wander José da Silva for

statistical analysis of the data and advice. The study was supported with a scholarship to the first author by FAPESP (process 2009/01785-6) and CAPES and was also supported by FAPESP (process 2010/20578-9).

REFERENCES

American Dental Association Council on Scientific Affairs. Professionally applied topical fluoride: evidence-based clinical recommendations. *J Am Dent Assoc* 2006;137:1151-1159.

Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2005.

Caslavska V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 1975;20:333-339.

Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-360.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTV, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000;34:491-497.

Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci* 2010;118:370-375.

Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* 2002;15:169-172.

Delbem ACB, Carvalho LPR, Morihisa RKU, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2005;39:258-260.

Garcia-Godoy F, Hicks MJ, Flaitz CM, Berg JH. Acidulated phosphate fluoride treatment and formation of caries-like lesions in enamel: effect of application time. *J Clin Pediatr Dent* 1995;19:105-110.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003;37:339-344.

Hebling J, Santos-Pinto LM, Cury JA. In vitro formation of calcium fluoride on sound enamel, as a function of application time of acidulated fluoride. *Rev Bras Odontol* 1995;52:30-35.(in Portuguese).

Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride gels for preventive dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2002, Issue 2. DOI: 10.1002/14651858. CD002280.pub2

Marinho VCC, Higgins JPT, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 1. DOI: 10.1002/14651858. CD002781.pub1

Marinho VCC. Evidence-based effectiveness of topical fluorides. *Adv Dent Res* 2008;20:3-7.

Mendes S, Souza IP, Cury JA. Firmly and loosely bound fluoride deposited on enamel by APF gel: effect of application time. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1996;10:281-285. (in Portuguese).

Moi GP, Tenuta, LMA, Cury JA. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated *in vitro* by validated protocols. Braz Dent J 2008;19:91-96.

Paes Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. Am J Dent 2003;16:91-95.

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

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J Dent Res 2006;85:878-887.

Peixoto EMC, Silva MFA. In vivo evaluation in humans of a fluoride gel applied for 1 minute. Rev Bras Odontol 1992;49:1-4. (in Portuguese).

Rølla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. Acta Odontol Scand 1988;46:341-345.

Sønju-Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. Adv Dent Res 1997;11:523-527.

Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, P_i, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. J Dent Res 2006;85:834-838.

Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. J Dent Res 2008;87:1032-1036.

Vale GC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. J Dent Res 2011;90:77-81.

Villena RS, Tenuta LMA, Cury JA. Effect of APF gel application time on enamel demineralization and fluoride uptake in situ. Braz Dent J 2009;20:37-41.

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

Wefel JS, Wei SHY. In vitro evaluation of fluoride uptake from a thixotropic gel. Pediatr Dent 1979;1:97-99.

Wei SHY, Hattab FN. Time dependence of enamel fluoride acquisition from APF gels. I. In vitro study. Pediatr Dent 1988;10:168-172.

Wei SHY, Lau EWS, Hattab FN. Time dependence of enamel fluoride acquisition from APF gels. II. In vivo study. Pediatr Dent 1988;10:173-177.

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. Caries Res 1987;21:126-140.

Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res 1995;9:214-30.

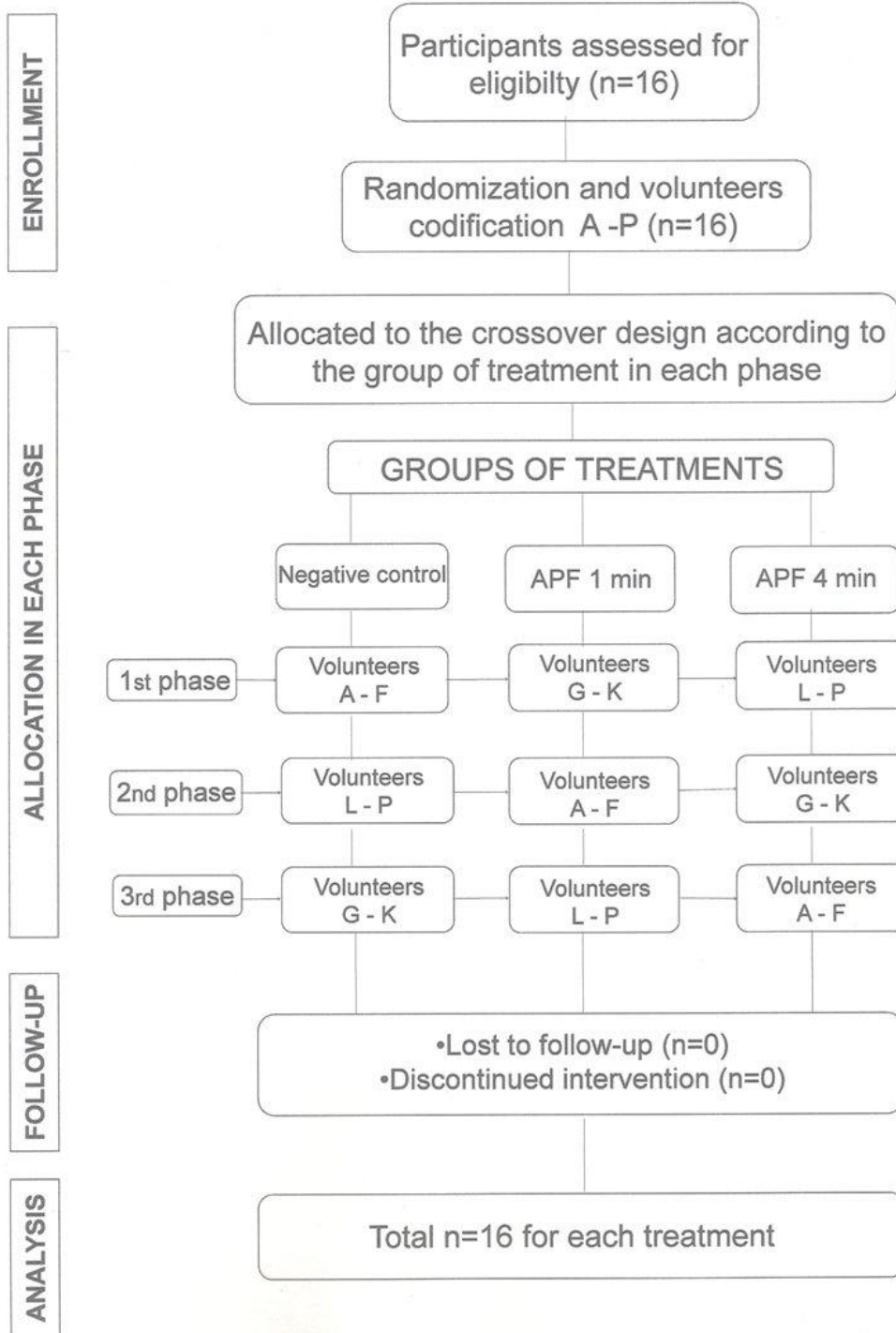


Fig. 1. The CONSORT flow chart

Table 1: Results for deciduous slabs according to the treatment groups (mean±SD; n=16)

Treatment groups	Enamel Analyses			Dental biofilm Analyses	
	ΔS^a (kg/mm ² x μ m)	"CaF ₂ " (μ g F/cm ²)		F in fluid (μ M)	F in solids (μ mol/g)
		Formed	Retained		
Negative control	12097.8 ± 5069.9 ^A	0.29 ± 0.15 ^A	0.34 ± 0.14 ^A	9.93 ± 8.42 ^A	0.04 ± 0.03 ^A
APF-gel ^b 1 min	4438.0 ± 2965.5 ^B	21.86 ± 8.81 ^B	2.67 ± 3.55 ^B	10.56 ± 9.10 ^A	0.36 ± 1.09 ^A
APF-gel 4 min	3652.3 ± 2344.6 ^B	26.86 ± 8.94 ^B	3.89 ± 3.51 ^B	26.90 ± 46.28 ^A	0.45 ± 0.92 ^A

Distinct capital letters show statistically significant differences among treatment groups for each variable (p<0.05).

^a ΔS – carious lesion area

^b APF-gel – acidulated phosphate fluoride gel application

For statistical analysis data for ΔS were log-transformed; data for "CaF₂" were decimal transformed (0.3); data for F biofilm fluid were transformed to the inverse; and F in biofilm solids was transformed to the inverse square root.

The data in this table are the original.

Table 2: Results for permanent slabs according to the treatment groups (mean±SD; n=16)

Treatment groups	Enamel Analyses			Dental biofilm Analyses	
	ΔS^a (kg/mm ² x μm)	"CaF ₂ " ($\mu\text{g F/cm}^2$)		F in fluid (μM)	F in solids($\mu\text{mol/g}$)
		Formed	Retained		
Negative control	12076.2 ± 6352.9 ^A	0.31 ± 0.16 ^A	0.52 ± 0.52 ^A	9.87 ± 10.33 ^A	0.03 ± 0.03 ^A
APF-gel ^b 1 min	3740.3 ± 1964.9 ^B	21.99 ± 10.92 ^B	1.55 ± 0.93 ^B	14.22 ± 17.42 ^{AB}	0.29 ± 0.84 ^A
APF-gel 4 min	4407.8 ± 1586.2 ^B	29.20 ± 11.58 ^B	3.43 ± 3.94 ^B	22.16 ± 25.42 ^B	0.39 ± 0.91 ^A

Distinct capital letters show statistically significant differences among treatment groups for each variable (p<0.05).

^a ΔS – carious lesion area

^b APF-gel – acidulated phosphate fluoride gel application

For statistical analysis data for ΔS were log-transformed; data for calcium fluoride (CaF₂) were decimal transformed (0.3); data for F biofilm fluid were transformed to the inverse; and F in biofilm solids was transformed to the inverse square root.

The data in this table are the original.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação tópica de FFA é um método efetivo no controle da doença cárie (Marinho *et al.*, 2004). Embora haja no mercado produtos com a sugestão de aplicação profissional de FFA 1,23% F por 1 minuto não há evidências científicas para tal e a recomendação dada é que a aplicação seja feita por 4 minutos (ADA, 2006).

Estudos *in situ* são uma alternativa para avaliar o efeito do F frente à desmineralização, pois mimetizam as condições bucais como fluxo salivar, microbiota e temperatura sendo possível padronizar a exposição a sacarose e ao F utilizando grupo controle negativo (sem aplicação), fator não aplicável a estudo clínico por razões éticas (Altenburger *et al.*, 2009). Como mostrado pelos resultados encontrados no presente estudo.

Assim, o presente trabalho mostrou que, em condições de alto desafio cariogênico, a aplicação tópica profissional de FFA 1,23% F por 1 minuto foi capaz de evitar a desmineralização de esmalte decíduo e permanente da mesma forma que a aplicação por 4 minutos. Os resultados contribuem para a prática clínica, diminuindo o tempo de atendimento e consequentemente o custo além do risco de intoxicação aguda, especialmente na odontopediatria.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, a aplicação profissional de FFA 1,23% em gel por 1 minuto, mesmo sob um alto desafio cariogênico, é capaz de promover efeito anti cárie semelhante a 4 minutos, tanto em esmalte decíduo quanto em esmalte permanente.

REFERÊNCIAS*

Altenburger MJ, Schirrmeyer JF, Lussi A, Klapper M, Hellwig E. In situ fluoride retention and remineralization of incipient carious lesions after the application of different concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci.* 2009; 17: 58–63.

American academy of pediatric dentistry. Guideline on fluoride therapy. [acesso 2011 fev 1]. http://www.aapd.org/media/Polices_Guidelines/G_FluorideTherapy.pdf.

Cury JA, Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Paes Leme AF. The Importance of Fluoride Dentifrices to the Current Dental Caries Prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15: 167-174.

Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 2009;23:23-30.

Hawkins R, Locker D, Noble J, Kay EJ. Prevention. Part 7: Professionally applied topical fluorides for caries prevention. *Br Dent J.* 2003; 195: 313-7.

Lopes MF, Braga JK, Oliveira AE, Cavalcante PR, Ribeiro CC. Fluoride oral retention after professional topical application in children with caries activity: effect of the immediate water consumption. *J dent Child.* 2008; 75: 121-4.

Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent.* 2009; 30: 76-87.

Øgaard B, Seppä L, Rølla G. Professional Topical Fluoride Applications - Clinical Efficacy and Mechanism of Action. *Adv Dent Res.* 1994; 8: 190-201.

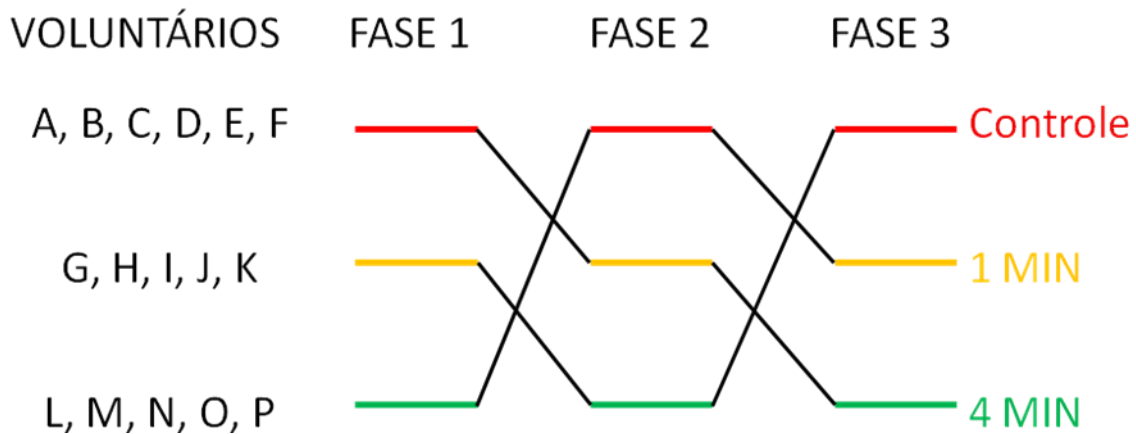
*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Ripa LW, Leske GS, Sposato A, Varma A. Effect of prior toothcleaning on bi-annual Professional acidulated phosphate fluoride topical fluoride gel-trey treatments. Results after three years. *Caries Res* 1984;18:457-64.

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

APÊNDICE 1 - Delineamento experimental cruzado

O presente estudo in situ foi realizado em três fases experimentais de 14 dias cada. Dezesesseis voluntários foram aleatorizados para determinar a qual tratamento seria submetido na primeira fase e seguiram o cruzamento mostrado abaixo. Ao final do experimento, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos.



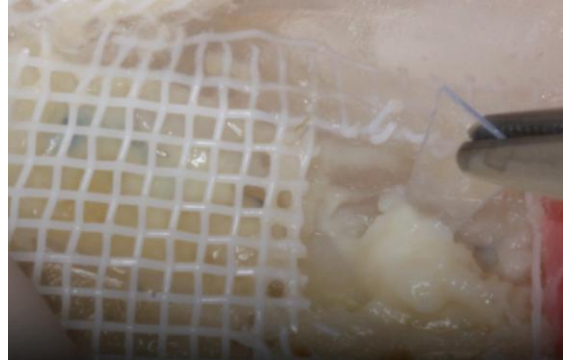
APÊNDICE 2 - Esquema do dispositivo palatino



Esquema ilustrativo do dispositivo palatino confeccionado em resina acrílica para os voluntários, contendo quatro blocos de esmalte decíduo de um lado e quatro blocos de esmalte permanente do outro. O lado de cada substrato foi determinado por meio de aleatorização para cada voluntário no início do experimento e mantido em todas as fases.

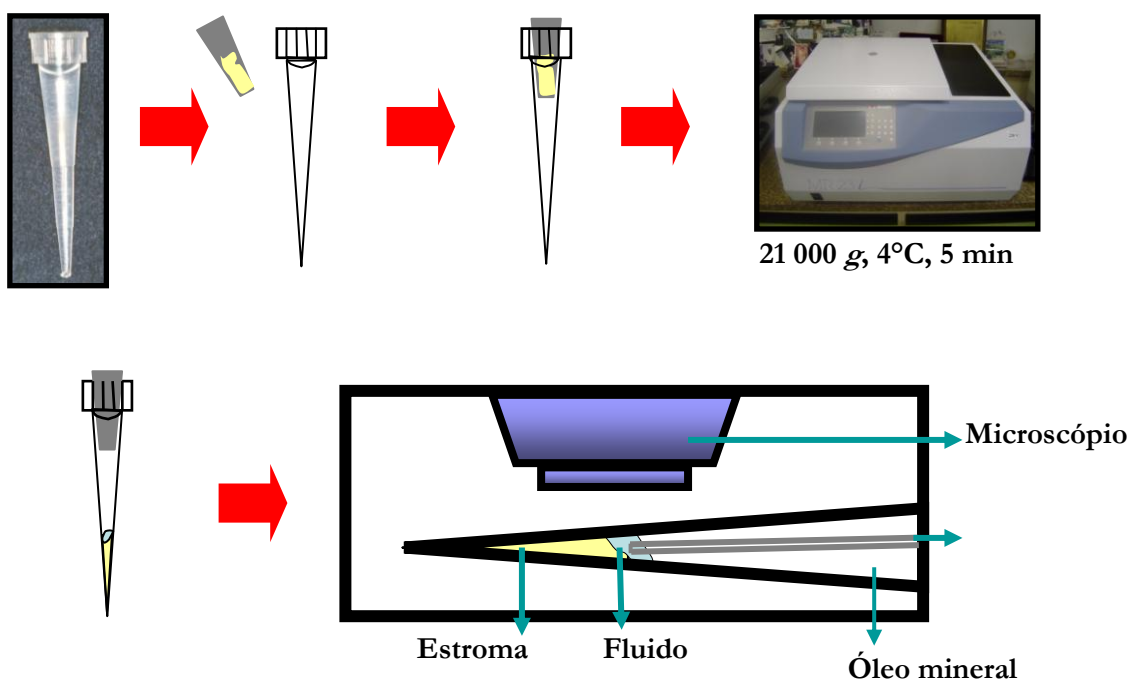
Uma tela plástica foi fixada no acrílico, 1 mm acima dos blocos, para permitir o acúmulo de biofilme (Hara et al.,2003).

APÊNDICE 3 - Fotos da coleta do biofilme e separação do fluido



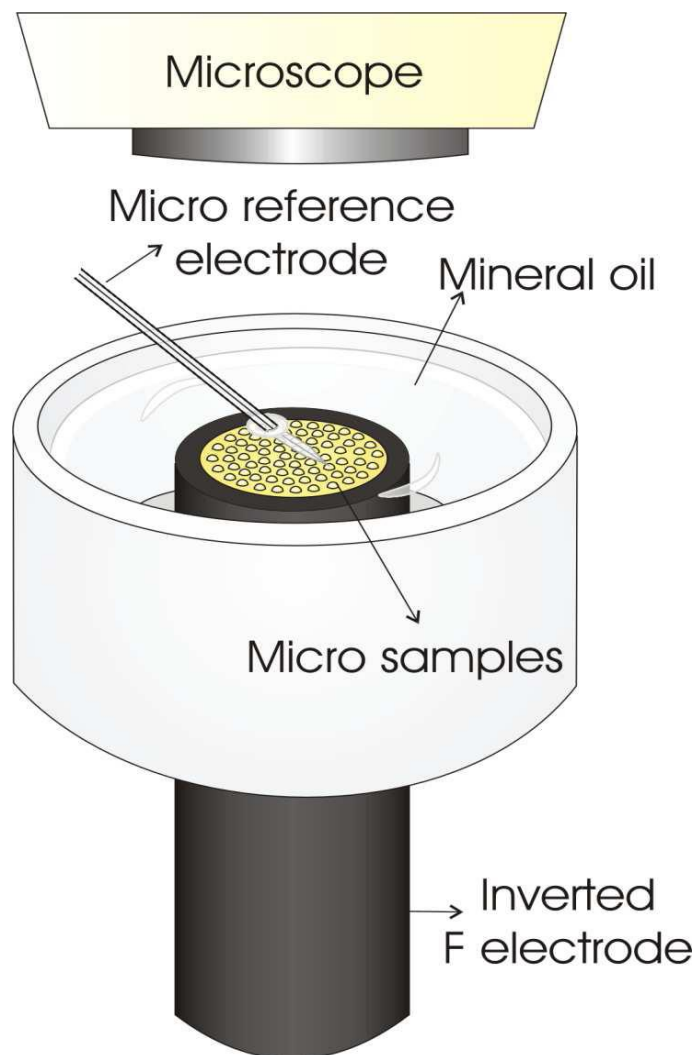
No 15º dia de cada fase experimental, o dispositivo era entregue pelos voluntários para a coleta do biofilme dental formado.

Fluxograma da coleta do biofilme e extração do fluido



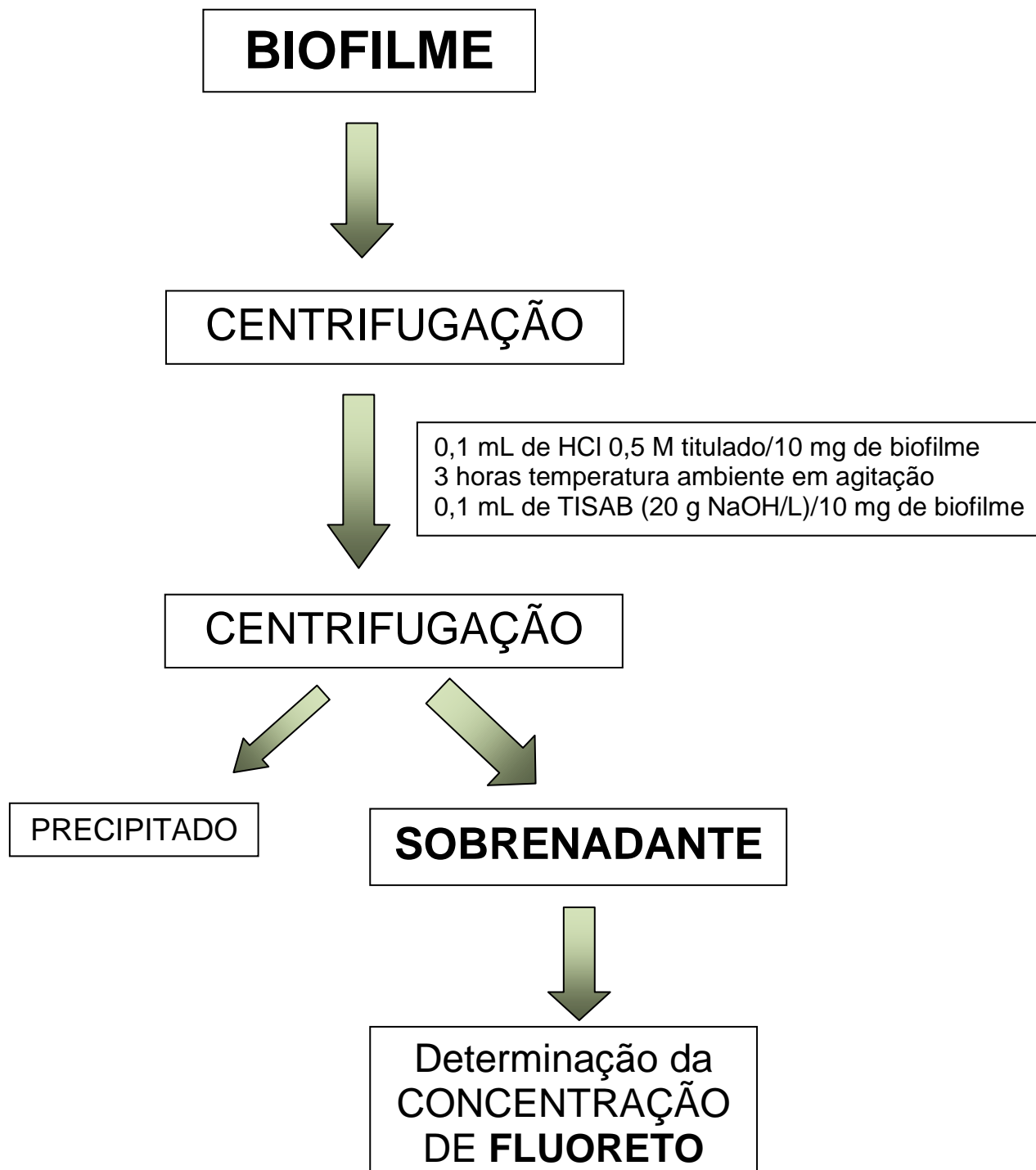
Após coletado com auxílio de uma espátula, o biofilme dental foi inserido em uma ponteira com óleo mineral a fim de evitar evaporação do fluido, pesado e centrifugado. Na ponteira, sob microscópio, 3 fases podiam ser observadas: parte sólida do biofilme (estroma), fluido do biofilme e óleo mineral. O fluido foi removido com o auxílio de uma micropipeta de vidro e armazenado sob óleo mineral para posterior análise da concentração de F.

APÊNDICE 4 - Esquema de microanálise de flúor no fluido do biofilme



Com o auxílio de microscópio, as amostras foram colocadas na superfície do cristal do eletrodo íon específico de F invertido e diluídas com TISAB III (10:1), sob óleo mineral. O microeletrodo de referência era posicionado em contato com as amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto por meio de um potenciômetro.

APÊNDICE 5 - Esquema da extração e dosagem de flúor na parte sólida do biofilme



Aferição da concentração de F com auxílio do potenciômetro conectado ao eletrodo específico para íon F.

ANEXO 1 - Deliberação da defesa em formato alternativo

INFORMAÇÃO CCPG/OO2/06⁵

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 do 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 **"Efeito do tempo de aplicação de flúor fosfato acidulado na desmineralização do esmalte dental in situ"**, protocolo nº 095/2009, dos pesquisadores Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Altair Antoninha Del Bel Cury, Ana Flávia Bissoto Calvo, Jaime Aparecido Cury e Lívia Maria Andaló Tenuta, 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 **"Effect of application time of acidulated phosphate fluoride on dental enamel demineralization in situ"**, register number 095/2009, of Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Altair Antoninha Del Bel Cury, Ana Flávia Bissoto Calvo, Jaime Aparecido Cury and Lívia Maria Andaló Tenuta, 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 Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


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

Nota: O título do projeto 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 do artigo

Dear Prof. Dr.

Thank you for submitting your manuscript entitled "Time of APF-gel application on formation and retention of CaF₂" on enamel of deciduous and permanent teeth and on demineralization" to "Caries Research"; the submission number is: 2484. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

Editorial Office

ANEXO 4 - Orientações aos voluntários

1. O dispositivo intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, sendo removido da boca **apenas** durante as refeições ou quando você for comer ou beber alguma coisa.
2. Quando estiver fora da boca, **em nenhum momento o dispositivo deve ser deixado à seco**. Guarde-o no porta-aparelho, com uma gaze umedecida em água.
3. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação.
4. Utilize apenas o dentifrício fornecido.
5. Realize a higiene bucal normalmente, **3 vezes ao dia** (veja abaixo – Escovação).
6. **Não** utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza na cavidade bucal durante a fase experimental.
7. **Não** beba chá preto e chá verde durante o experimento, pois eles contêm grande quantidade de flúor.
8. Quando a pasta estiver acabando, entre em contato com a pesquisadora responsável para que seja reposta.

Gotejamento da solução de sacarose a 20%

1. Seu aparelho possui 8 blocos, 4 de cada lado.
2. Uma gota da solução de sacarose deverá ser aplicada sobre cada bloco, como seu aparelho possui 8 blocos, você gotejará 8 gotas.
3. O gotejamento da sacarose nos blocos deve ser realizado nos horários fixados na caixa do aparelho
4. Para gotejar a solução, remova o dispositivo da boca, seque levemente com gaze a região da tela e goteje uma gota da solução sobre cada bloco, evitando tocar a ponta do conta-gotas no dispositivo para não contaminar a solução. Aguarde 5 minutos e então recoloque o aparelho na boca.

5. Se o primeiro gotejamento do dia não puder ser realizado às 8 horas, goteje no horário possível e mantenha todos os outros gotejamentos. **É importante manter o total de gotejamentos prescrito na caixa do aparelho!**
6. Sempre que gotejar a sacarose, aguarde 5 min, nem mais, nem menos, e retorne o aparelho para a boca. **Não goteje a solução e deixe por mais de 5 minutos sem colocar o dispositivo na boca.**
7. O objetivo é que ocorra a formação de grande quantidade de biofilme sob a tela plástica; **não** tente remover o biofilme!

ESCOVAÇÃO:

1. Utilize somente a pasta de dente fornecida pelo pesquisador.
2. Realize a escovação dos seus dentes **3 vezes ao dia** (nem mais, nem menos) após as principais refeições, preferencialmente nos horários: 7:30, 12:30, e 20:00 h.

Modo de escovação:

1. Retire o aparelho da boca.
2. Escove seus dentes e enxágüe a boca do modo como está habituado.
3. Coloque mais creme dental na escova e escove o dispositivo, iniciando pela parte que entra em contato com o palato.
4. Na parte onde está a tela plástica, não escove a região da tela, para não remover o biofilme que está se formando. Escove na região entre as telas e passe a espuma do creme dental sobre a tela, com a lateral da escova de dente.
5. Enxágüe o dispositivo, tomando cuidado para que os jatos de água da torneira não atinjam a tela plástica de forma direta.

- **As soluções deverão ser trocadas toda segunda, quarta e sexta-feira. Solicitamos que você venha ao laboratório buscar a nova solução nesses dias.**