

**RENATA VALVANO CERZETTI**

**FLUORETO DE CÁLCIO COMO  
RESERVATÓRIO DE FLÚOR PARA O FLUIDO  
DO BIOFILME E SEU EFEITO NA INIBIÇÃO DA  
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE**

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 Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

Co-orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

PIRACICABA

2008

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

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

C334f	<p>Cerezetti, Renata Valvano. Fluoreto de cálcio como reservatório de flúor para o fluido do biofilme e seu efeito na inibição da desmineralização do esmalte. / Renata Valvano Cerezetti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Livia Maria Andaló Tenuta, Jaime Aparecido Cury Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Cárie dentária. I. Tenuta, Livia Maria Andaló. II. Cury, Jaime Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Calcium fluoride as F reservoir to the biofilm fluid and its effect in the inhibition of enamel demineralization

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

Área de Concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Livia Maria Andaló Tenuta, Cecília Pedroso Turssi, Cecília Gatti Guirado

Data da Defesa: 06-03-2008

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 06 de Março de 2008, considerou a candidata RENATA VALVANO CERZETTI aprovada.

*Livia M. A. Tenuta*

---

PROFa. DRa. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

*Cecilia Pedroso Turssi*

---

PROFa. DRa. CECÍLIA PEDROSO TURSSI

*Cecilia Gatti Guirado*

---

PROFa. DRa. CECÍLIA GATTI GUIRADO

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Antonio Carlos Cerezetti e Marysnel Valvano Cerezetti, meu querido Valdemir dos Santos e meu irmão Fernando Valvano Cerezetti por sempre estarem ao meu lado me dando força, amor e compreensão. Principalmente por sempre acreditarem nos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Magnífico Reitor da UNICAMP, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, e do diretor associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

À Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta, por ter sido uma orientadora atenciosa e presente nos momentos da realização desta dissertação, onde pude aprimorar meus conhecimentos através deste trabalho científico, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, pelo crescimento profissional.

À Deus e aos meus pais, pela oportunidade recebida e sua conclusão, sendo estes presentes em todos os momentos.

Ao Valdemir dos Santos, pela compreensão em todos os momentos.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury e a Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, pelos ensinamentos transmitidos durante o experimento.

Aos professores da Área de Odontopediatria, por terem me recebido desde o primeiro momento com muito carinho, engrandecendo minha vida profissional.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela dedicação a docência.

As minhas colegas de Mestrado da Odontopediatria e aos meus colegas de Pós-Graduação, pelos bons momentos passados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela contribuição ao estudo por meio da bolsa de estudos.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP/UNICAMP, Waldomiro Vieira Filho e José Alfredo da Silva, à estagiária Greice Josiane Rocha Toledo e a secretária Maria Elisa dos Santos, pela atenção e prontidão em ajudar.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, pelo senso de cooperação, desprendimento e dedicação.

A todas as demais pessoas que foram importantes para a execução do trabalho.

Que Deus os abençoe sempre.

## RESUMO

O efeito anticárie dos meios de aplicação tópica profissional de flúor (F) está descrito na literatura e tem sido associado à formação de um mineral tipo fluoreto de cálcio (“CaF<sub>2</sub>”) na superfície dental, que funciona como um reservatório do íon F. Entretanto, a relação entre a concentração de “CaF<sub>2</sub>” no esmalte e a inibição da desmineralização dental é desconhecida. Além disso, o aumento na disponibilidade de F no fluido do biofilme dental a partir da dissolução do “CaF<sub>2</sub>”, para interferir com os fenômenos de des e remineralização, ainda não foi demonstrado. Neste estudo *in situ* de curta duração, cruzado e duplo-cego, blocos de esmalte bovino foram previamente tratados com uma solução não fluoretada (grupo controle negativo) ou uma solução de NaF 0,5 M (pH 3,5). Para que o esmalte apresentasse diferentes concentrações de “CaF<sub>2</sub>”, os blocos tratados com F foram: não envelhecidos, ou envelhecidos precocemente por 6 h e 48 h em fluxo contínuo de saliva artificial. Em duas fases experimentais, dez voluntários utilizaram um dispositivo palatino contendo 8 blocos de esmalte com microdureza de superfície pré-determinada (quatro blocos de cada tratamento em cada lado), cobertos por uma placa teste de *S. mutans* IB1600. A liberação de F para o fluido da placa teste a partir da dissolução do “CaF<sub>2</sub>” foi determinada após 30 min de uso do dispositivo, quando a placa teste em contato com dois blocos de cada tratamento foi coletada. Os blocos restantes foram submetidos a um desafio cariogênico, realizado com solução de sacarose a 20%, e após 45 min a placa teste e os blocos foram coletados para análises. Uma alta correlação foi encontrada entre a concentração de “CaF<sub>2</sub>” no esmalte e a concentração de F no fluido da placa teste antes do desafio cariogênico ( $r=0,96$ ,  $p<0,001$ ). A perda mineral apresentou uma correlação negativa com a concentração de “CaF<sub>2</sub>” no esmalte ( $r=-0,80$ ,  $p<0,001$ ) e a concentração de F no fluido da placa teste ( $r=-0,75$ ,  $p<0,001$ ). Conclui-se que o efeito anticárie da aplicação de F profissional deve ser atribuída a liberação de F dos reservatórios de “CaF<sub>2</sub>” do esmalte para o fluido do biofilme.

Palavras-chave: Fluoreto, Fluido da Placa, Desmineralização, Biofilme dental.

## ABSTRACT

The anticaries effect of topical fluoride (F) application is well known and related to the formation of a F reservoir on tooth surface as calcium fluoride-like deposits ("CaF<sub>2</sub>"). However, the relation between the concentration of "CaF<sub>2</sub>" on enamel and the inhibition of enamel demineralization is unknown. Also, the increase in F availability in the biofilm fluid as a result of "CaF<sub>2</sub>" dissolution has not been demonstrated. In this crossover, double-blind, short-term *in situ* study, bovine enamel blocks were previously treated with a non-F solution (negative control group) or a 0.5 M NaF solution (pH 3.5). Enamel with different concentrations of "CaF<sub>2</sub>" was obtained from F-treated blocks, which were: not aged, or aged for 6 and 48 h in a continuous flow of artificial saliva. In two experimental phases, ten volunteers used a palatal appliance containing 8 enamel blocks with known surface microhardness (4 from each treatment at each side), covered with a test plaque of *S. mutans* IB1600. F released to plaque fluid from "CaF<sub>2</sub>" dissolution was determined after 30 min of intraoral use, when the test plaque in contact with two blocks from each treatment was collected. The remaining enamel blocks were challenged by rinsing a 20% sucrose solution, and after 45 min the test plaque and the blocks were collected for analysis. A high correlation was observed between the concentration of "CaF<sub>2</sub>" on enamel and F concentration in plaque fluid before cariogenic challenge ( $r=0.96$ ,  $p<0.001$ ). Mineral loss presented a negative correlation with the concentration of "CaF<sub>2</sub>" on enamel ( $r=-0.80$ ,  $p<0.001$ ) and the F concentration in plaque fluid ( $r=-0.75$ ,  $p<0.001$ ). The results suggest that the anticaries effect of topical F application may be related to F released from enamel "CaF<sub>2</sub>" reservoirs to the biofilm fluid.

Key words: Fluoride, Plaque fluid, Demineralization, Dental biofilm.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO.....	5
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
ANEXOS.....	26

## INTRODUÇÃO

A cárie é decorrente de freqüentes episódios de desmineralização da estrutura dentária devido à produção de ácidos por bactérias do biofilme, quando exposto a carboidratos fermentáveis (ten Cate *et al.*, 2003). O fluoreto (F) é considerado o grande responsável pelo declínio da cárie, observado nas últimas décadas, pois interfere com o fenômeno de des e remineralização (ten Cate, 1997). Entretanto, a manifestação da doença ainda permanece alta em alguns indivíduos, caracterizando-os como de alto risco de cárie. Para estes pacientes, a aplicação tópica profissional de F tem sido recomendada (Zimmer *et al.*, 2001), visando aumentar a disponibilidade do íon na cavidade bucal.

A aplicação tópica de F em alta concentração (> 100 ppm F) promove reação química do F com o tecido dental, formando 2 tipos de produtos: 1. fluorapatita (FA), ou F fortemente ligado e 2. reservatórios tipo fluoreto de cálcio (“CaF<sub>2</sub>”), ou F fracamente ligado (Saxegaard & Rølla, 1988).

Por muito tempo acreditou-se que o efeito anticárie dos métodos de aplicação tópica de F era resultado do aumento da FA no esmalte, enquanto o reservatório “tipo CaF<sub>2</sub>” seria esgotado em poucas horas em contato com a saliva (Brudevold *et al.*, 1967). De fato, o efeito isolado do aumento da concentração de FA na resistência à desmineralização do esmalte, na ausência de “CaF<sub>2</sub>”, foi demonstrado por Takagi *et al.* (2000). Esse efeito estaria relacionado com a menor solubilidade da FA em relação à hidroxiapatita (HA) em qualquer pH.

No entanto, atualmente considera-se que o efeito do F na inibição do desenvolvimento de cárie é essencialmente tópico, quando presente no biofilme dental para atuar na diminuição da desmineralização e ativação da remineralização do esmalte (ten Cate, 1999). A menor solubilidade do mineral FA é importante na dinâmica do processo de cárie, pois ao mesmo tempo em que a HA se dissolve quando há queda de pH no biofilme dental, o mineral FA, menos solúvel, ainda tem a tendência de se precipitar, e a perda mineral líquida é reduzida. Quando o pH se eleva novamente, a precipitação mineral é ativada na

presença de F, pois além de HA, FA também se depositará no esmalte. Nesse sentido, a presença de um reservatório lábil de F sobre o dente seria mais importante do que a própria deposição de FA no esmalte (Ögaard, 1990). De fato, Ögaard *et al.* (1990), demonstraram que o “CaF<sub>2</sub>” depositado sobre o esmalte é o principal responsável pelo efeito anticárie da aplicação tópica de F.

Ao contrário do inicialmente previsto com base na solubilidade do fluoreto de cálcio puro, o “CaF<sub>2</sub>” formado pode permanecer na superfície do esmalte por diversos dias (Ögaard *et al.*, 1983; Saxegaard *et al.*, 1988), devido à deposição de fosfatos na superfície dos glóbulos, que diminui sua solubilidade (Rölla & Ögaard, 1986; Saxegaard *et al.*, 1988; Ögaard, 1990). Além disso, a deposição de fosfatos sobre o “CaF<sub>2</sub>” confere uma maior solubilidade com o decréscimo do pH (Rölla & Ögaard, 1986). Assim, quando o pH do biofilme dental cai pela exposição a carboidratos fermentáveis, ocorreria uma maior dissolução do “CaF<sub>2</sub>” (Rölla *et al.*, 1993), liberando o F para interferir no processo de des e remineralização. Deste modo, este reservatório seria esgotado mais rapidamente quando de alta frequência de desafios ácidos no biofilme (pacientes de alto risco de cárie), sugerindo que as aplicações profissionais de F estão indicadas para pacientes em atividade de cárie, para repor os reservatórios de F perdidos.

Apesar da literatura apresentar evidências de que o “CaF<sub>2</sub>” é o principal responsável pelo efeito anticárie da aplicação tópica profissional de F, funcionando como um reservatório de liberação lenta do íon para a cavidade bucal, não há estudo demonstrando o aumento da concentração de F no fluido do biofilme formado sobre o esmalte tratado com F. Mais precisamente, o contato com o esmalte contendo reservas de “CaF<sub>2</sub>” deveria aumentar a concentração de F no fluido do biofilme dental. O fluido é a interface aquosa entre as células bacterianas e a matriz extracelular do biofilme, onde as trocas iônicas com o mineral do dente acontecem (Margolis & Moreno, 1994). O grau de saturação do fluido em relação aos minerais HA e FA, sob os distintos pHs do biofilme dental, determina a dissolução ou a precipitação desses minerais (Margolis & Moreno, 1985; Moreno, 1993). Assim, seria interessante estudar a relação entre a concentração de “CaF<sub>2</sub>”

no esmalte e o efeito anticárie, i.e., se há um efeito dose-resposta, e a dinâmica da liberação de F dos reservatórios de “CaF<sub>2</sub>” para o fluido do biofilme e a subsequente inibição da desmineralização dental.

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi estudar a relação entre diferentes concentrações de “CaF<sub>2</sub>” formados no esmalte dental pela aplicação tópica de F em alta concentração, sua liberação para o fluido do biofilme e a inibição da desmineralização dental.

O presente estudo é 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. O artigo intitulado **“Fluoride release from CaF<sub>2</sub> and enamel demineralization”** foi submetido ao periódico “Journal of Dental Research”.

## **CAPÍTULO**

### **Fluoride release from CaF<sub>2</sub> and enamel demineralization\***

R.V. Cerezetti, L.M.A. Tenuta<sup>§</sup>, A.A. Del Bel Cury, C.P.M. Tabchoury, J.A. Cury

Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

#### **§Corresponding author:**

Livia M. A. Tenuta

Av. Limeira 901

13414-903, Piracicaba, SP

Brazil

Phone: #55-19-2106-5393, Fax: #55-19-2106-5218

E-mail: [litenuta@fop.unicamp.br](mailto:litenuta@fop.unicamp.br)

\* Based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, SP, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements of the Master Program in Dentistry (Pediatric Dentistry). A preliminary report was presented at the 54<sup>th</sup> Orca Congress, in Helsingör, Denmark, July 2007.

## ABSTRACT

We hypothesized that calcium fluoride-like deposits ( $\text{CaF}_2$ ) formed on enamel by professional topical F application would work reducing enamel demineralization due to the increase of F availability in plaque fluid. Distinct levels of  $\text{CaF}_2$  were created on enamel to evaluate a dose-response effect. Enamel blocks were mounted in contact with a *S. mutans* test plaque and used *in situ* by 10 volunteers. F released to the test plaque fluid was measured before a cariogenic challenge and enamel demineralization was subsequently assessed. Plaque fluid F concentration was highly correlated to the concentration of  $\text{CaF}_2$  on enamel ( $r=0.96$ ,  $p<0.001$ ) and to enamel demineralization evaluated by surface microhardness ( $r=-0.75$ ,  $p<0.001$ ). The results suggest that F released to plaque fluid from  $\text{CaF}_2$  formed on enamel could explain the anticaries effect of topical F application.

## INTRODUCTION

Professional topical fluoride (F) application is considered an effective measure for caries prevention (Marinho *et al.*, 2007). It increases the amount of tooth-bound F (fluorapatite, FAp) on enamel, which was shown to enhance its resistance to demineralization (Takagi *et al.*, 2000). However, the main anticaries effect of topical F application seems to rely on the concomitant formation of a phosphate-contaminated calcium-fluoride deposit (calcium fluoride-like material, hereafter referred as CaF<sub>2</sub>) on dental hard tissues, which would act as a F reservoir, slowly releasing F to interfere with de/remineralization events at tooth/plaque interface (ten Cate, 1997, for review).

Therefore if CaF<sub>2</sub> is the main responsible for the anticaries effect of topical F treatment (Ögaard *et al.*, 1990; Ögaard, 2001), F released from CaF<sub>2</sub> should be found in plaque fluid, where it can significantly inhibit enamel demineralization, since calcium, phosphate and F concentrations in plaque fluid determine the saturation with respect to FAp (Carey *et al.*, 1986; Vogel *et al.*, 1990). Indeed, an increase in F concentration was found in whole plaque formed on enamel treated by topical F application (Paes Leme *et al.*, 2004), but in plaque fluid this was never studied. Also, a dose response effect of the concentration of CaF<sub>2</sub> on enamel, its release to plaque fluid and the subsequent inhibition of enamel demineralization has not been proved.

Thus, we hypothesized that if CaF<sub>2</sub> is responsible for the anticaries effect of topical F application, a relationship between its concentration on enamel, the concentration of F released to plaque fluid and the consequent inhibition of enamel demineralization should be found.



## MATERIALS & METHODS

### Experimental Design

This was a crossover, double-blind, split-mouth, short-term *in situ* study, approved by the Ethics Committee of Faculty of Dentistry of Piracicaba. Ten volunteers signed a written and informed consent. They used, in two distinct experimental phases, a palatal appliance containing bovine enamel blocks with distinct levels of  $\text{CaF}_2$ , in an intraoral demineralization test (Figure 1). Enamel blocks were treated with either a non-F solution, or an acidulated 0.5 M (9,500 ppm F) NaF solution. Different concentrations of  $\text{CaF}_2$  were created on F-treated blocks by either not aging them, or aging for 6 hrs or 48 hrs in artificial saliva. A set of enamel blocks was used for determination of  $\text{CaF}_2$  and FAp formed and retained on enamel by these procedures. Eight blocks were mounted in a palatal appliance, 4 from each treatment in each side of the appliance, in contact with a test plaque prepared from *S. mutans* (Figure 1a). After 30 min of intraoral use, test plaque from two blocks of each treatment was collected for determination of baseline F, calcium (Ca) and inorganic phosphorus ( $\text{P}_i$ ) concentrations in the plaque fluid (Figure 1b). The appliances were reinserted in the mouth and a cariogenic challenge was conducted by gently rinsing a 20% sucrose solution during 1 min (Figure 1c). Forty-five min after the cariogenic challenge, the test plaque and the other two blocks remaining from each treatment were collected (Figure 1d). Inorganic ions were measured in the test plaque fluid as chemical indicators of enamel demineralization, and mineral loss was also evaluated by the percentage of loss in enamel surface microhardness (SMH) (Figure 1e).  $\text{CaF}_2$  and FAp remaining in enamel were determined.

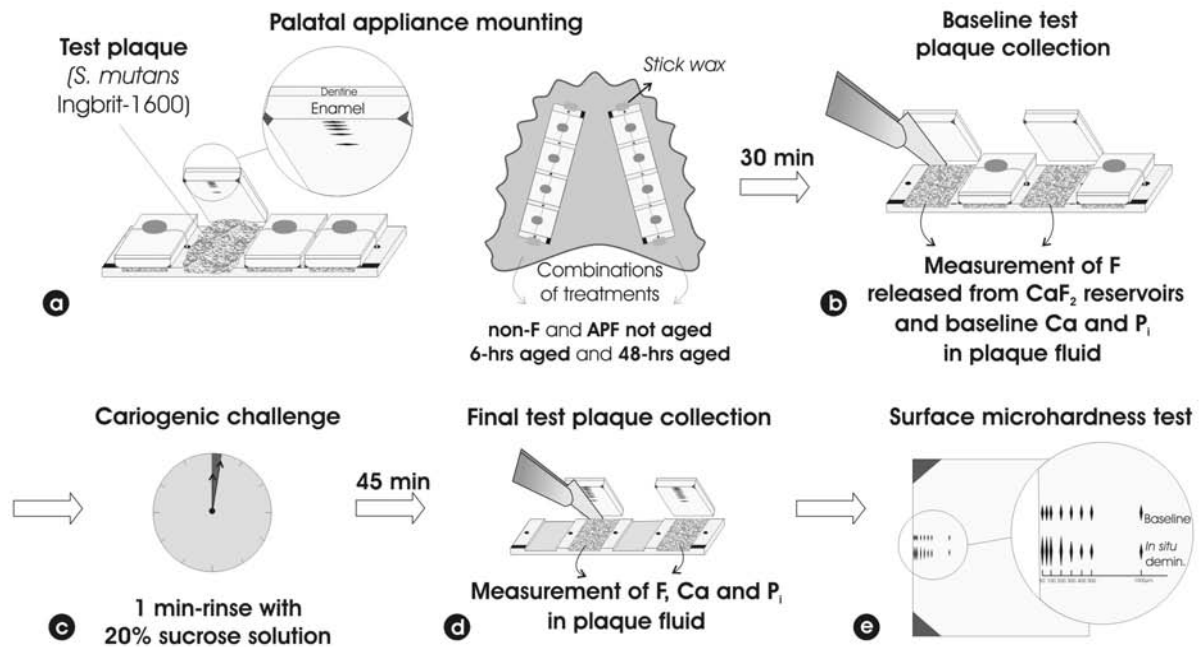


Figure. 1. Illustration of the experiment. a. Enamel blocks with known surface microhardness were fixed in acrylic holders, in contact with a test plaque prepared from *S. mutans* IB1600; each holder contained blocks from the same treatment, placed at each side of the appliance, in a split-mouth design. b. After 30 min inside the mouth, two enamel blocks from each holder were removed and the test plaque collected for analysis of F, Ca and  $P_i$  in plaque fluid. c. A 1-min rinse with sucrose solution was conducted and forty-five min after the rinse, the experiment was completed. d. Test plaque from the remaining blocks was collected for fluid analysis. e. Surface microhardness was determined again on enamel blocks to calculate the percentage of surface microhardness change (mineral loss).

### Topical Fluoride Application and Baseline SMH Determination

Enamel blocks (5 x 5 x 2 mm) were prepared from bovine incisors and the enamel surface was polished plane (Zero *et al.*, 1990). Those with a mean Knoop hardness of  $332.2 \pm 18.3$  were randomly divided into four groups of 56 specimens each, comprising the different groups/treatments. Blocks from negative

control group were individually immersed for 4 min in 0.1 M phosphate buffer solution pH 3.5 (10 mL/block). The remaining blocks were treated with 0.5 M NaF solution buffered with 0.1 M phosphate pH 3.5. After treatments, blocks were washed for 30 sec with a stream of distilled water. F-treated blocks were either not aged (group APF) or aged for 6 hrs (group APF, 6 hrs-aged) and 48 hrs (group APF, 48 hrs-aged) in a flow (0.5 mL/min) of artificial saliva (ten Cate and Duijsters, 1982) at a volume of 6 mL/mm<sup>2</sup>, in order to simulate the dissolution of CaF<sub>2</sub> that occurs in the mouth after F treatment (Dijkman *et al.*, 1983). To avoid distinct conditions between the experimental phases, blocks were treated and aged just before being used in the next phase. Sixteen blocks from each group were used for determination of the baseline CaF<sub>2</sub> and FAp concentrations and remaining blocks were used in the *in situ* test.

Before the intraoral test, baseline SMH was determined on enamel blocks to be used *in situ* by making eight indentations distant 50 to 1000 µm from one edge of the block, with a 50-g load, for 5 sec in a Future-Tech FM microhardness tester coupled to FM-ARS software. This edge was marked for subsequent mounting reference in the appliance (for further details, see Cury *et al.*, 2003).

### **Palatal Appliance Mounting**

Test plaque was prepared from *S. mutans* Ingbritt-1600 and mounted in contact with enamel blocks in two plastic holders which were fixed to the palatal appliance (Fig. 1a). The marked side of the enamel block where the baseline hardness measurements were made was mounted to the center of the palatal appliance (Cury *et al.*, 2003, for details). According to the split-mouth design, negative control and APF groups were combined in one phase, and groups aged for 6 and 48 hrs were combined in the other phase (Figure 1a).

### **Analysis of Mineral Ions in Plaque Fluid**

Test plaque samples collected from the appliance were immediately placed inside an oil-filled centrifuge tube to separate the fluid from the plaque solids (Vogel *et al.*, 1997). The fluid was immediately analyzed for F concentration, using an oil-covered inverted F electrode under microscope (Vogel *et al.*, 1997; Tenuta *et al.*, 2006, for details), and Ca and P<sub>i</sub> were determined by colorimetric reactions (Vogel *et al.*, 1983; Tenuta *et al.*, 2006).

### **Analysis of Enamel Mineral Loss**

SMH was measured in enamel blocks used *in situ*, at 100 µm from the initial indentations, at the same distance points from the block edge. From this block edge, sucrose solution and saliva had access to the enamel surface covered by test plaque, simulating a dental plaque thickness of up to 1.0 mm (Zero, 1995). The percentage of SMH change (%SMC) was calculated from the mean hardness values of each enamel block before and after the *in situ* test [%SMC = (SMH after *in situ* test – baseline SMH) x 100/ baseline SMH].

### **Determination of CaF<sub>2</sub> and FAp in Enamel**

For determination of CaF<sub>2</sub>, blocks were isolated using wax, leaving only the enamel surface exposed and individually immersed in 1.0 M KOH (1.0 mL per block) for 24 hrs (Caslavská *et al.*, 1975). After buffering with TISAB II containing 1.0 M HCl, F was measured using an ion-selective electrode (Orion 96-09) and an ion analyzer (Orion EA-940) and the concentration of CaF<sub>2</sub> was expressed as µg F/cm<sup>2</sup>.

After KOH extraction, FAp was estimated by removing one enamel layer in 0.75 mL of 0.5 M HCl for 30 sec under agitation. After neutralization with TISAB II containing 0.5 M NaOH, F was determined as described above.  $P_i$  was measured in the acid extract (Fiske and Subbarow, 1925) and the amount of enamel dissolved was calculated considering a  $P_i$  concentration in enamel of 17.4% and a density of 2.92. Thus, FAp concentration was expressed as  $\mu\text{g F/g}$  of enamel.

### **Statistical Analysis**

All data were analyzed using ANOVA, considering the volunteers as a source of variation (statistical blocks). Data which did not fit the assumptions of normal distribution of errors and equality of variances were transformed (Box *et al.* 1978). Tukey test was used for post-ANOVA comparisons. F in enamel before and after the *in situ* test was compared using t test. Correlation between variables was studied using Spearman coefficient of correlation, since they failed the normality test. All analyses were performed using the SAS software (SAS Institute Inc., version 8.01, Cary, NC, USA), with p level fixed at 5%.

### **RESULTS**

Pre-treatment of enamel blocks with an acidulated phosphate F (APF) solution significantly increased  $\text{CaF}_2$  and FAp concentrations in enamel (Table 1, columns 2 and 3). The aging process decreased  $\text{CaF}_2$  concentration, but did not affect FAp values.

After 30 min *in situ*, a significantly higher F concentration in plaque fluid was observed for the F-treated blocks, when compared to the negative control group (Table 1, column 4). The highest ( $p < 0.05$ ) F concentration was found in plaque fluid in contact with APF-treated, not aged enamel blocks, and significantly

lower F concentrations for groups aged for 6 and 48 hrs. Ca concentration in plaque fluid at this moment was similar for all groups, but  $P_i$  concentration was significantly higher for the negative control group when compared to groups APF and APF aged for 6 hrs (Table 1, columns 5 and 6).

Forty-five min after the cariogenic challenge, F concentration in the plaque fluid was still high in all F-treated groups, and the differences among the groups were maintained. Ca and  $P_i$  concentrations increased significantly after the cariogenic challenge for all groups (columns 8 and 9), and were higher for negative control group, followed by the groups APF aged for 48 hrs, APF aged for 6 hrs and APF not aged; these last two groups did not differ statistically from each other.

The results of %SMC (Table 1, column 10) show that the highest demineralization was observed for the negative control group and the lowest for the APF group, not aged, with intermediate demineralization levels for groups aged for 6 and 48 hrs.

$CaF_2$  significantly decreased and FAp significantly increased after the *in situ* test for groups APF and APF aged for 6 hrs when compared to the values after treatment/aging (Table 1, columns 11 and 12). For the negative control group, a significant increase in  $CaF_2$  was observed after the *in situ* test, but the values were still significantly lower than all other groups.

F released to the plaque fluid before cariogenic challenge was highly correlated to the concentration of  $CaF_2$  formed and retained on enamel ( $r=0.96$ ,  $p<0.001$ ) (Table 2), but correlation with FAp was weak ( $r=0.38$ ,  $p=0.02$ ). Correlation between  $CaF_2$  and F released to the plaque fluid before cariogenic challenge, and those variables representing enamel demineralization (Ca and  $P_i$  in the plaque fluid after cariogenic challenge and the %SMC) were high and negative (Table 2).

Table 1: Summary of the analyses made, according to the treatment/groups [mean (SD), n]

Treatment/ groups	F in enamel blocks after treatments/aging <sup>a</sup>		Mineral ions in the plaque fluid						% SMC	F in enamel blocks after the in situ test	
			After 30 min in situ, before cariogenic challenge			45 min after cariogenic challenge, at the end of the in situ test					
	CaF <sub>2</sub> (µg F/cm <sup>2</sup> )	FAP (µg F/g)	F (µM)	Ca (mM)	P <sub>i</sub> (mM)	F (µM)	Ca (mM)	P <sub>i</sub> (mM)		CaF <sub>2</sub> (µg F/cm <sup>2</sup> )	FAP (µg F/g)
Negative control	0.1 A <sup>b</sup> (0.03), n=16	94.9 A (59.6), n=16	2.1 A (0.8), n=10	2.3 A (0.9), n=10	5.4 A (1.2), n=10	1.5 A (0.6), n=10	19.4 A (5.5), n=10	15.3 A (1.9), n=10	37.4 A (9.7), n=10	0.2 A <sup>*c</sup> (0.02), n=9 <sup>d</sup>	109.0 A (58.0), n=10
APF	21.7 B (15.1), n=15 <sup>c</sup>	727.9 B (233.7), n=15 <sup>c</sup>	413.7 B (85.1), n=10	1.8 A (0.9), n=10	4.3 B (1.1), n=10	395.4 B (84.1), n=10	2.7 B (1.6), n=10	5.3 B (1.5), n=10	1.0 B (3.9), n=10	10.8 B <sup>*</sup> (4.4), n=10	1093.4 B <sup>*</sup> (232.9), n=10
APF, 6 hrs-aged	13.4 B (6.7), n=14 <sup>c,d</sup>	721.7 B (135.2), n=15 <sup>c</sup>	230.2 C (67.2), n=9 <sup>d</sup>	2.3 A (1.1), n=10	4.2 B (1.1), n=9 <sup>d</sup>	222.1 C (78.2), n=10	4.1 B (2.3), n=10	4.6 B (1.2), n=10	5.3 BC (6.3), n=10	6.5 C <sup>*</sup> (3.0), n=10	844.0 C <sup>*</sup> (118.9), n=10
APF, 48 hrs-aged	2.6 C (1.0), n=16	803.2 B (275.5), n=16	22.9 D (7.1), n=10	2.2 A (0.9), n=10	4.9 AB (1.3), n=10	43.3 D (16.1), n=10	7.8 C (2.4), n=10	7.5 C (1.5), n=10	14.4 C (11.1), n=10	1.9 D (0.7), n=10	660.0 D (155.9), n=10

<sup>a</sup> Determined from an extra set of enamel blocks not used in situ.

<sup>b</sup> Distinct capital letters are used to indicate treatment/groups which are significantly different from each other within each variable (p<0.05).

<sup>c</sup> One enamel block lost during in vitro procedures.

<sup>d</sup> One value pointed as an outlier was removed.

<sup>e</sup> Significantly different from the initial values of CaF<sub>2</sub> or FAP in enamel, after treatments/aging (p<0.05).

Table 2: Correlations between F availability in different reservoirs in enamel, that released to the plaque fluid and the different indicators of mineral loss [Spearman coefficient of correlation (p value)].

Variables	F in enamel blocks after treatments/aging		F in plaque fluid before the cariogenic challenge
	CaF <sub>2</sub>	FAp	
F in plaque fluid before the cariogenic challenge	0.96 ( $< 0.001$ )	0.38 (0.02)	-----
Ca in plaque fluid after the cariogenic challenge	-0.86 ( $< 0.001$ )	-0.38 (0.02)	-0.81 ( $< 0.001$ )
P <sub>i</sub> in plaque fluid after the cariogenic challenge	-0.80 ( $< 0.001$ )	-0.31 (0.05)	-0.80 ( $< 0.001$ )
%SMC	-0.80 ( $< 0.001$ )	-0.40 (0.01)	-0.75 ( $< 0.001$ )

## DISCUSSION

Most F formed on enamel in this study was CaF<sub>2</sub>, in agreement with the expected effect of the low pH of the acidulated phosphate F solution used (Larsen and Richards, 2001). Also, the aging protocol used was effective to create enamel with dissimilar concentration of CaF<sub>2</sub>, without significantly affecting FAp, due to the undersaturation of saliva with respect to CaF<sub>2</sub> (McCann, 1968). Thus, CaF<sub>2</sub> concentration decreased 10 times after 48 hrs in the continuous flow of artificial saliva used, and no change in FAp levels was observed.

Although the experimental model used did not rely on natural biofilm formation, which is the main limitation of the present study, it enabled the evaluation of the dynamics between F reservoirs on enamel, their dissolution and the inhibition of enamel demineralization. Thus, F released to the plaque fluid was significantly correlated to CaF<sub>2</sub> concentration created on enamel. It is usually accepted that CaF<sub>2</sub> is the main responsible for the anticaries effect of topical F



application, acting as F reservoir on the tooth surface (Rölla, 1988; Ögaard, 2001). However, this is the first time that the release of F from CaF<sub>2</sub> enamel reservoirs to plaque fluid is demonstrated. Also, a dose-response effect was observed between the concentration of F reservoirs on enamel and F released to plaque fluid, and the subsequent inhibition of enamel demineralization.

In fact, the %SMC was inversely correlated to F concentration in the plaque fluid before the cariogenic challenge. The increase in Ca and P<sub>i</sub> concentrations in the plaque fluid 45 min after the challenge would be the result of tooth dissolution, since they were significantly correlated to the %SMC (for Ca,  $r=0.71$ ,  $p<0.0001$ ; for P<sub>i</sub>,  $r=0.65$ ,  $p<0.0001$ ). Thus, F release to plaque fluid from CaF<sub>2</sub> dissolution significantly inhibited enamel demineralization, at a greater extent for the groups with a higher CaF<sub>2</sub> content. Enamel dissolution would have been impaired by F available in the plaque fluid due to the concomitant gain of FAp at the same time that hydroxyapatite from enamel dissolves (ten Cate, 1997). Indeed, an increase of F in enamel was observed after the cariogenic challenge in enamel blocks from groups not aged and aged for 6 hrs. Considering the high F concentration in plaque fluid at the moment of the cariogenic challenge, some inhibition of acid production by test plaque bacteria cannot be overruled as an additional effect (Bradshaw *et al.*, 2002).

A continuous dissolution of CaF<sub>2</sub> during the intraoral test is apparent, since plaque fluid F values were maintained before and 45 min after the cariogenic challenge. Thus, F would be effective not only in decreasing enamel demineralization during the pH drop, which was evaluated by the present study, but it would also enhance enamel remineralization when pH returns to pre-sugar values.

The CaF<sub>2</sub> concentration remaining on the blocks after the *in situ* test was about half of the initial values. It can be observed that after the 75-min intraoral test a similar CaF<sub>2</sub> concentration remained on enamel treated but not aged in comparison to those aged for 6 hrs in saliva. This indicates that the low pH environment created by sugar exposure increased the dissolution rate (Rölla and

Ögaard, 1986), suggesting that high-carries risk patients would benefit of more frequent professional F application to replenish the F reservoirs in the mouth. Although it is not known for how long CaF<sub>2</sub>-enamel reservoirs would last, a higher F concentration in whole plaque was still found 14 days after topical F application, under a high cariogenic challenge *in situ* (Paes Leme *et al.*, 2004), but such evaluation of F availability is still lacking for plaque fluid.

Since FAp concentration in enamel was not altered by the aging protocol, the correlation of FAp with F in the plaque fluid or mineral loss observed was weak. However, FAp in enamel increased after the cariogenic test, especially for the F-treated and not aged group, which reinforces the idea that FAp in enamel is mainly consequence of the caries process. The significance of this increase on the inhibition of mineral loss in subsequent demineralization events remains to be tested.

In conclusion, the findings showed a very clear relationship among concentration of CaF<sub>2</sub> on enamel, F release to plaque fluid and the consequent reduction of demineralization.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the volunteers for their valuable participation, and CNPq and FAPESP to the scholarships granted for the first and second authors, respectively.

## **REFERENCES**

Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM (2002). Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within *in vitro* dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res* 36:81-86.

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. *Archs Oral Biol* 20:333-339.
- Carey C, Gregory T, Rupp W, Tatevossian A, Vogel GL (1986). The driving forces in human dental plaque fluid for demineralization and remineralization of enamel mineral. In: Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Leach SA, editor. Oxford: IRL Press, pp. 163-174.
- Cury JA, Francisco SB, Simões GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM (2003). Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization *in situ*. *Caries Res* 37:194-199.
- Dijkman AG, de Boer P, Arends J (1983). *In vivo* investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical applications. *Caries Res* 17:392-402.
- Fiske CH, Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375-400.
- Larsen MJ, Richards A (2001). The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res* 35:57-60.
- Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A (2007). Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 3. Oxford: Update Software.
- McCann HG (1968). The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. *Archs Oral Biol* 13:987-1001.
- Ögaard B (2001). CaF<sub>2</sub> formation: cariostatic properties and factors enhancing the effect. *Caries Res* 35:40-44. Supplement 1.
- Ögaard B, Rölla G, Ruben J, Arends J (1990). Relative cariostatic effects of KOH-soluble and KOH-insoluble fluoride *in situ*. *J Dent Res* 69:1505-1507.
- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, 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.

Rölla G (1988). On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. *Acta Odont Scand* 46:341-345.

Rölla G, Ögaard B (1986). Studies on the solubility of calcium fluoride in human saliva. In: Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Leach SA, editor. Oxford: IRL Press, pp. 45-50.

Takagi S, Liao H, Chow LC (2000). Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization *in vitro*. *Caries Res* 34:281-288.

ten Cate JM, Duijsters PPE (1982). Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16:201-210.

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, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA (2006). Ca, P<sub>i</sub>, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 85: 834-838.

Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Tatevossian A (1990). Micro-analysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. *J Dent Res* 69:1316-1323.

Vogel GL, Chow LC, Brown WE (1983). A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 17:23-31.

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.

Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JDB (1990). Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res* 24:181-188.

Zero DT (1995). *In situ* caries models. *Adv Dent Res* 9:214-230.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação tópica de F profissional é um método efetivo no controle da cárie dental (Marinho *et al.*, 2007) e tem sido especialmente recomendada para aqueles indivíduos com alta atividade da doença (Zimmer *et al.*, 2001), visando aumentar a disponibilidade de F na cavidade bucal. O mecanismo de ação dos métodos tópicos foi amplamente estudado na década de 80, tendo sido relacionado à formação de “CaF<sub>2</sub>”, que funcionaria como um reservatório lábil de F sobre o dente (Ögaard, 2001). De fato, Ögaard *et al.*, 1990, demonstraram que o “CaF<sub>2</sub>” seria o responsável pelo efeito anticárie da aplicação tópica de F, já que esse efeito foi perdido quando o “CaF<sub>2</sub>” formado foi removido.

Apesar do conhecimento existente sobre a importância do “CaF<sub>2</sub>” como um provável reservatório de F para o ambiente bucal, nenhum estudo havia demonstrado a liberação de F a partir do “CaF<sub>2</sub>” para o fluido do biofilme dental, onde ocorrem as trocas iônicas entre a estrutura dental e o biofilme. Adicionalmente, não havia sido estudado se existiria uma relação dose resposta entre a concentração de “CaF<sub>2</sub>” no esmalte e o efeito anticárie.

Assim, o presente estudo demonstrou haver relação dose resposta entre as diferentes concentrações de “CaF<sub>2</sub>” no esmalte (criadas pelo protocolo de dissolução acelerada utilizado), a liberação de F para o fluido do biofilme e o efeito na inibição da desmineralização do esmalte. Adicionalmente, a formação de fluorapatita como consequência do processo de des e remineralização na presença de F foi demonstrada.

Embora o modelo *in situ* utilizado apresente limitações, como a utilização de uma placa teste artificial, ele permitiu estudar a relação entre reservatórios de F, sua liberação para o fluido do biofilme e efeito anticárie de modo padronizado. Os resultados contribuem para o entendimento do mecanismo de ação dos meios de aplicação tópica de F em alta concentração e suscitam a realização de novas pesquisas para avaliação de outros agentes tópicos

fluoretados e sua frequência ideal de utilização, de acordo com a atividade de cárie do paciente, dúvidas frequentes na Clínica Odontológica.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados sugerem que a formação de “CaF<sub>2</sub>”, sua dissolução liberando F para o fluido do biofilme e a subsequente inibição da desmineralização explique o efeito anticárie dos métodos de aplicação tópica profissional de F em alta concentração.

## REFERÊNCIAS\*

Brudevold F, McCann HG, Nilsson R, Richardson B, Coklica V. The chemistry of caries inhibition problems and challenges in topical treatments. *J Dent Res.* 1967; 46(Suppl 1): 37-45.

Margolis HC, Moreno EC. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res.* 1985; 19(1): 22-35.

Margolis HC, Moreno EC. Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid. *Critical Rev. Oral Biol. Med.* 1994; 5(1): 1-25.

Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library, Issue 3.* Oxford: Update Software; 2007.

Moreno EC. Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. *Int. dent. J.* 1993; 43: 71-80.

Ögaard B. Effects of fluoride on caries development and progression *in vivo*. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec Iss): 813-819.

Ögaard B, Rølla G, Helgeland K. 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.* 1983; 17(6): 520-524.

Ögaard B, Rølla G, Ruben J, Arends J. Relative cariostatic effects of KOH-soluble and KOH-insoluble fluoride *in situ*. *J Dent Res.* 1990; 69(8): 1505-1507.

---

\* 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.



Ögaard B. CaF<sub>2</sub> formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res.* 2001; 35(suppl 1): 40-44.

Rölla G, Ögaard B. Studies on the solubility of calcium fluoride in human saliva. In: S.A. Leach. Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL Press Ltd; 1986. p. 45-50.

Rölla G, Ögaard B, De Almeida Cruz R. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 105-108.

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

Saxegaard E, Rölla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application *in vitro*. *Scand J Dent Res.* 1988; 96: 523-535.

Takagi S, Liao H, Chow LC. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization *in vitro*. *Caries Res.* 2000; 34: 281-288.

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

ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999; 57: 325-329.

ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O, Kidd E, editores. *Dental Caries: The disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p.49-69.

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

INFORMAÇÃO CCPG/OO2/06<sup>5</sup>

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 "impar" 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

[home](#) [author instructions](#) [reviewer instructions](#) [contact idr](#) [tips](#) [logout](#)

<b>Manuscript #</b>	08-0060
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2008-02-01
<b><a href="#">Current Stage</a></b>	Under Consideration
<b>Title</b>	Fluoride release from CaF <sub>2</sub> and enamel demineralization
<b>Running Title</b>	CaF <sub>2</sub> and enamel demineralization
<b>Manuscript Type</b>	Research Report
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Category</b>	Biological
<b>Manuscript Comment</b>	the number of words in your abstract: 130 the total number of words in your manuscript and abstract: 2594 the number of references: 24 the number of tables: 2 the number of figures: 1 the number of appendices to be published online: 0
<b>Corresponding Author</b>	Livia Maria Tenuta (Faculty of Dentistry of Piracicaba - UNICAMP)
<b>Contributing Authors</b>	Renata Cerezetti , Altair Del Bel Cury , C�n�thia Tabchoury , Jaime Cury
<b>Abstract</b>	We hypothesized that calcium fluoride-like deposits (CaF <sub>2</sub> ) formed on enamel by professional topical F application would work reducing enamel demineralization due to the increase of F availability in plaque fluid. Distinct levels of CaF <sub>2</sub> were created on enamel to evaluate a dose-response effect. Enamel blocks were mounted in contact with a <i>S. mutans</i> test plaque and used <i>in situ</i> by 10 volunteers. F released to the test plaque fluid was measured before a cariogenic challenge and enamel demineralization was subsequently assessed. Plaque fluid F concentration was highly correlated to the concentration of CaF <sub>2</sub> on enamel (r=0.96, p<0.001) and to enamel demineralization evaluated by surface microhardness (r=-0.75, p<0.001). The results suggest that F released to plaque fluid from CaF <sub>2</sub> formed on enamel could explain the anticaries effect of topical F application.
<b>Associate Editor</b>	Not Assigned
<b>Key Words</b>	fluoride, plaque fluid, topical application, calcium fluoride, demineralization
<b>Author Disclosure</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Material and Methods Section properly reports animal or specimens protocols - no.</li> </ul>

**Manuscript Items**

- Article File #1 [PDF \(105KB\)](#)
- Author Cover Letter File #1 [PDF \(45KB\)](#)

**Manuscript Tasks**

[Send Manuscript Correspondence](#)  
[Check Status](#)



**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 "Avaliação in situ de meios de uso profissional de fluoreto usando modelo de curta duração", protocolo nº 084/2006, dos pesquisadores **RENATA VALVANO CERZETTI, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, CÍNTIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, JAIME APARECIDO CURY e LIVIA 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 05/07/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "In situ evaluation of professional methods for fluoride application using a short-term model", register number 084/2006, of **RENATA VALVANO CERZETTI, ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, CÍNTIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, JAIME APARECIDO CURY and LIVIA MARIA ANDALÓ TENUTA**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 05/07/2006.

  
**Profa. Cecília Gatti Guirado**  
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.