



|

Gabriel Pereira Nunes

**Efeito da adição de nanopartículas de
hexametáfosphato de sódio em dentifrícios
fluoretados sobre a desmineralização
dentária: estudo *in vitro***

**Araçatuba-SP
2017**

Gabriel Pereira Nunes

**Efeito da adição de nanopartículas de
hexametáfosfato de sódio em dentifrícios
fluoretados sobre a desmineralização
dentária: estudo *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Profº. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba-SP

2017

Dedicatória

Dedico a minha família por sempre ter acreditado em mim e ter depositado toda confiança e apoio para que eu chegasse até aqui. Especialmente a minha mãe Vanderlene e o meu pai José (*in memoriam*) por serem minha inspiração para conquistar meus objetivos e superar os obstáculos que encontrei nesta jornada. A minha avó Maria, pelas orações e a incondicional demonstração de amor por mim. Também dedico a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

Agradecimentos

A Deus,

Por sempre ter guiado os meus passos e abençoado os caminhos que trilhei. Por nunca ter deixado de ser meu fiel amigo e verdadeiro. A Ele minha imensa gratidão pela minha existência e pelas dádivas que concedeu a mim, mesmo não sendo merecedor, mas Ele é misericordioso. Graças a Ele também por ter sido minha fortaleza, quando minhas fraquezas se pronunciavam, por ter sido meu bálsamo consolador quando a tristeza me abatia. A Ele por sempre ter mostrado sua presença quando me sentia sozinho, inseguro e desamparado. Por ter me dado ânimo para enfrentar as adversidades quando minhas forças não eram suficientes para seguir esta caminhada. A ti Senhor, toda a glória, por ter me ajudado a combater o bom combate, acabar esta carreira e manter a minha fé. Por ter me sondado e me livrado do laço do passarinho, ter sido o meu refúgio quando estava em perigo. E que sempre eu possa ter a certeza viva que nem mesmo a altura ou a profundidade ou qualquer outra coisa me separará do teu amor.

Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja vacas: todavia, eu me alegrarei no Senhor, exultarei no Deus da minha salvação. (Habacuque 3:17-18)

Aos meus pais,

Vocês foram e são minha base e parâmetro de vida. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ser filho de vocês.

Minha mamãe Vanderlene, peço sempre a Deus que te abençoe pela mulher guerreira e batalhadora que tu és; eu e meus irmãos somos extremamente honrados pela mulher de fibra que demonstrou ser e pela tua presença em nossas vidas. Agradeço por tudo que ofereceu a mim, desde laços sentimentais como a estortante preocupação em me fazer feliz. Por ter me dado coisas que, as vezes, nem merecia e, por ter sacrificado suas vontades para construir a minha felicidade. Como diria o apóstolo Paulo “o amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”, e a senhora provou que o amor nunca falha mesmo quando submetido a tantas provas e, que ele sempre se multiplica mesmo quando é dividido. A meu papai José (*in memoriam*), hoje fisicamente não está ao meu lado, mas sua presença estará sempre habitando o meu coração. Obrigado por ter sido o meu mestre, por ter me ensinado os princípios e morais que me tornaram a ser uma pessoa digna e melhor. Deus te abençoe por ter me proporcionado (mesmo que somente por catorze anos) amor, companheirismo, amizade e lições de vida que marcaram a minha vida e tenho certeza que a faz distinta. Não pude me despedir de ti, mas creio que estás sempre velando por mim e acompanhando meus passos. Metade de mim é saudade e a outra também.

A glória dos filhos são seus pais. (Provérbios 17:06)

Aos meus irmãos Leonardo, Thais e Larissa,

Por sempre estarem ao meu lado, me dando forças para nunca desistir dos meus sonhos. Meu amor por vocês nunca acabará e serão meus amigos por toda a vida. Eu amo vocês.

Aos meus primos Poliana, Dijalma, Marcílio, Fábio, Marcelo

Por serem especiais e constantemente acreditando em meu potencial. Quão é a grandiosidade tê-los em minha vida, tornando ela muito mais fácil. Eu amo vocês, e sempre orarei para que Deus vos abençoe.

Aos meus tios Zete, Mara, Marivone, Márcia, Dóris, Pê, Nice, Jânia e Tone

Vocês sempre torceram e oraram muito para que todas as coisas desse certo em minha vida e que a mão de Deus sempre estivesse estendida sobre mim. Eu jamais poderia esquecer tudo que fizeram por mim. Amo vocês.

Aos Amigos,

Juliana Fogaça,

Por ter sido uma grande amiga-irmã em Araçatuba, desde a minha recepção a moradia estudantil até o seu último dia de curso, sempre esteve comigo me instruindo e me auxiliando em tudo que precisei. Obrigado pela companhia nos congressos da vida, em muitas reuniões da mocidade e estudos incansáveis. Ficará para sempre em minha memória e levarei para sempre em meu coração.

Sara Akabane,

Como me sinto privilegiado em ter sua amizade. Falar que você faz a diferença na vida de muitas pessoas parece até vã repetição, diga se de passagem. Juntos, conseguimos muitas conquistas, alcançamos diversos objetivos e sempre estive ao meu lado quando precisei. Desde as caronas diárias, até mesmo a mínima preocupação desnecessária que você teve por mim, faz com que eu nunca esqueça o quão importante você foi e é em minha vida. Sua personalidade forte, até as mais puras qualidades sempre me lembrarão o imenso reconhecimento que tenho por ti. Eu sou eternamente grato a você e a sua mãe que sempre preocuparam comigo e sempre torceram pela minha felicidade e pelos meus objetivos. Eu amo vocês.

Aniele Lacerda,

Você foi umas das primeiras pessoas que conheci e que realmente já tinha a certeza que faria a diferença em minha vida. Desde a época em que residia na moradia, sempre tive confiança em ti, segurança para contar as coisas, pedi conselhos e ajuda e, você sempre estava lá pra poder me ajudar. Como esquecer os momentos pré-prova, as conversas que superavam os estudos, as cocas que nos davam força antes, durante e pós as aulas rs. Foram inúmeros os momentos de convívio que marcaram nossa amizade. Peço a Deus para abençoar imensamente sua vida. Saiba que és muito especial pra mim e continuará em minha mente e coração.

Beatriz Pirovani,

Desde os primeiros dias de aula também notei que você faria diferença em minha vida em Araçatuba. Para iniciar, te agradeço pela paciência nas diversas vezes que foi comigo no Muffato rs, realmente fazia meu fim de semana e

almoço mais descontraído e animado. Obrigado pela pessoa que és, pela cumplicidade, pela sinceridade e pelo carinho que sempre demonstrou por mim, mostrando que nossa amizade era recíproca. Me sentia aliviado e seguro em poder ter alguém pra confiar e pedi conselhos, sabendo que sua sinceridade resolveria meus problemas e me ajudaria quando necessitava rs. Poucos são os que se podem orgulhar e alegrar por, na sua vida, possuírem uma amizade verdadeira, e eu me orgulho da nossa. Talvez não possa fazer muito por ti, mas peço a Deus que lhe conceda uma vida repleta de realizações e felicidade, que você tanto merece.

Francienne Castro,

Falar de você é tão difícil e ao mesmo tempo tão fácil, parece uma bipolaridade rs. Mas foram tantos momentos juntos e de superação, que nos conhecemos muito bem. Uma coisa ficou muito nítida, sei o quanto és uma pessoa boa, generosa, verdadeira e foi ímpar em tudo na minha vida araçatubense, principalmente na parte acadêmica. Foram muitas clínicas como dupla (muitas), muitos materiais compartilhados, mas a cima de tudo isso, o companheirismo, a amizade que nutrimos um pelo outro fez com que até os momentos maus não se tornassem tão frustrantes. Você sempre estará em meu coração.

Malena Moraes,

Falar de você é um “trem muito bão sô”rs. Você é a mineira predileta em minha vida. Foram tantas situações e momentos compartilhados que ao lembrar passa um filme em minha mente, e só consigo memorizar coisas boas e sua presença tão essencial e importante para que tudo isso tenha acontecido. Nunca deixe de ser essa pessoa ímpar, e contente com tudo.

Não importa a distância que possamos estar um do outro, no meu coração estará sempre por perto. Para não perder o costume, sucesso sempre tilápia rs.

Sandy Tatibana,

Muito obrigado por alegrar meus dias no primeiro anom principalmente. Por estar comigo nos nossos “momentos bad” rs, por sempre ter torcido, se alegrado pelas minhas vitórias e acreditado em meu potencial. Nunca me esquecerei dos conselhos, das risadas e de todos os momentos que marcaram nossa amizade. Que Deus te abençoe infinitamente.

Erika Chiba,

Sou extremamente grato a você por tudo que tem feito por mim. Desde o primeiro acno quando entramos juntos no estágio, foram muitos fins de semana de convivência intensa rs, e tudo se tornava mais fácil e mais tranquilo com sua presença. Já nessa época notei o quanto você é generosa, dedicada e outras dezenas de qualidades, inclusive especial. Obrigado por fazer a diferença em minha vida. Levarei sempre comigo. Deus te abençoe sempre.

Ronaldo Prette,

Eu agradeço pela amizade sincera, pelo companheirismo(até mesmo nos momentos turbulentos pediátricos rs). Me sinto honrado em ser amigo de uma pessoa tão boa, humilde e generosa. Obrigado por toda ajuda e auxílio quando precisei, por ser meu irmão mais velho quando me demonstrou palavras sábias de correção ou quando foste meu irmão mais novo, quando eu „puxei a orelha” rs. Deus lhe abençoe amigo e, conte sempre comigo.

Mariana Martins,

Mesmo a conhecendo no decorrer desta caminhada, você também nunca deixou de ser crucial para que os meus dias se tornassem melhores. Eu te agradeço pela amizade, pelo carinho e por sempre estar comigo, seja nos momentos de risadas, companhia no BK rs ou quando precisei de ti, sempre esteve me apoiando. Nunca me esquecerei de você, Deus te abençoe em tudo e sempre estará em minha mente e coração.

Francinne Benetti,

Falar de você é muito bom, porque consigo mentalizar uma pessoa inteligente, generosa, simpática e tantas outras qualidades que Deus reservou pra você. Você é um orgulho, pela profissional e pessoa que sempre busquei me espelhar. Seus princípios e atitudes sempre mostraram quão grandiosa tu és. Louvo a Deus por sua amizade, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e ponderações. Tenho certeza que terá um futuro promissor e muito abençoado por Deus. Que Ele a abençoe continuamente e, meu muito obrigado.

Fred Lucas,

Por ter sido muito importante para mim quando ingressei na moradia e durante os anos que convivemos, você se tornou e mostrou ser um excelente amigo e um exemplo de pessoa, sou extremamente grato.

Ana Victória,

Falar de você só me remete coisas boas e momentos bons, Deus caprichou em conceder tantas qualidades a você. De tantas pessoas que conheci, você com certeza é uma das que sempre esteve ao meu lado e torceu incansavelmente por mim. Seus pais estão de parabéns por ter uma filha tão especial e que faz a diferença na vida de muitas pessoas, e tenha certeza que a minha vida não seria a mesma caso não a conhecesse. Também estarás sempre em minha mente e coração. Minha eterna gratidão.

Andreia Tairine,

Até amizade estrangeira eu conseguir fazer rs Tairine, você é uma pessoa extraordinária e desde já quero aqui dizer o quanto você é especial. Mesmo o Brasil sendo um país culturalmente tão distinto do seu, você mostrou superação aos diversos problemas que encontrou e sempre esteve comigo, inclusive aos fins de semana solitários rs. Continue essa pessoa amiga, companheira e verdadeira. Você é um exemplo de superação. Nunca me esquecerei de você e vamos conhecer a África rs. Obrigado por tudo.

Lucas Marcondes,

Ao meu afilhado por ter sempre estar com bom humor, pelas conversas rotineiras na central de aulas, por ter demonstrado ser um amigo que eu posso confiar. Pelos momentos de zoeira, com minhas piadas sem graça ou nos momentos tensos pré-farmacologia rs, ao longo da graduação se tornou uma pessoa importante e um grande amigo. Obrigado por tudo.

Aos meus companheiros da Casa I Bloco II, **Nilson, Arthur, César, Guilherme, Matheus e Henrique**, pelos anos de convivência, amizade, apoio e companheirismo.

Meus grandes amigos araçatubences,

Saulo Bassani,

Louvo a Deus por sua amizade, por todas as coisas que fez por mim, por ter se preocupado continuamente comigo, pela minha vida espiritual, e por nunca ter me desamparado quando eu solicitei ou demonstrei que necessitava de sua ajuda. Você é um excelente amigo, uma pessoa extraordinária que poucos tem a proeza/sorte em conhecer. Guardarei pra sempre em meu coração.

Thiago Henrique,

Também me sinto extremamente privilegiado por ser seu amigo, obrigado pelas inúmeras vezes que se preocupou comigo, pelos convites e por vir me buscar para congregar e sair com a mocidade, os meus fins de semana não seriam iguais caso não conhecesse todos vocês. Peço a Deus para que ilumine sempre seus passos e abençoe continuamente sua vida. Nunca me esquecerei de você e Deus lhe abençoe por tudo que fizeste por mim.

Josué de Paula,

Agradeço pela amizade, pelos momentos excelentes que passamos juntos, pelas risadas que foram inúmeras e que nos contagiava de alegria e felicidade por estar ali perto de vocês. Tenho certeza que terá um futuro promissor e oro pra que Deus cumpra todos seus planos e concretize seus objetivos.

Assírio Andrade,

Agradeço por todas as vezes que precisei de você e sempre foi companheiro, inclusive pra fazer rodízio do seu violino rs. Continue essa pessoa generosa, humilde, são pessoas como você que nos mostram que ainda podemos confiar e acreditar no próximo. Conte comigo sempre.

Amanda Pinatti,

Quando a conheci jamais poderia imaginar que seria uma pessoa tão importante e que sentiria uma extrema gratidão em ser teu amigo. Eu louvo a Deus, por ter me permitido a chance em conhecer e conviver com sua família. Vocês são espetaculares e fizeram a diferença em minha vida. Sua mãe - Irmã Tereza (também a considero como minha mãe rs) permanecerá em meu coração e serei eternamente grato por tudo que tem feito por mim.

Vinicius Capelari,

Deus te abençoe pela amizade, pelas reuniões de mocidade, pelas conversas na soft, e por ser outro amigo que posso confiar. Tenho certeza que também serás abençoado por Deus e Ele já tem excelentes coisas planejadas para ti..

Amigos:

São tão raros, que se consagram...

São tão importantes, que não se esquecem...

São tão fortes, que protegem...

São tão unidos, que prospera...

São tão amigos, que se eternizam...

(Olimpya Ferraz)

A Banca Examinadora

Meu Orientador Profº Alberto Delbem,

Agradeço muito pela sorte que tive em ser seu orientado. Muito obrigado pelo aprendizado, e pela oportunidade em conviver com uma pessoa que é exemplar na profissão e que se destaca tanto como pesquisador. Tenha certeza que isso me serviu como estímulo e motivação. Realmente, se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes.

Profº. André Bertoz,

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer você com justiça, com o devido merecimento. Sua ajuda e seu apoio foram para mim de valor inestimável. Agradeço pela pessoa e profissional extraordinários que você é. Continue essa pessoa bondosa e que seu caminho seja sempre iluminado, repleto de boas surpresas. Conte sempre com minha amizade e admiração.

Profª. Marcelle Danelon,

Deixar esse agradecimento por último foi algo estratégico. Talvez você não saiba, mas foi a pessoa essencial para que tudo que eu planejasse desse certo durante a graduação. Talvez também se eu escrevesse aqui parágrafos e mais parágrafos demonstrando a minha gratidão a ti, não seria suficiente para expressar sua importância para minha formação. Eu te agradeço por toda compreensão, ensino, paciência, carinho e preocupação que teve por mim. Você é uma pessoa muito especial, com qualidades raras, possui uma competência enorme e um coração maior ainda. Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo, Tive aprendizados importantes para toda a vida. Peço e oro a Deus para que Ele cumpra todos os desejos de seu coração e, tenho certeza que todos seus objetivos serão concretizados, pela pessoa fantástica que é e pelo imenso merecimento que tem. Obrigado por se dedicar ao seu trabalho com tanto entusiasmo e verdade. Você faz os seus alunos se sentirem especiais e as lições que aprendi com você estarão sempre comigo. Agradeço tudo que já fez por mim, por me ouvir, por me fazer sorrir! E outras coisas que aprendi com você. E mais uma vez, obrigado por existir!

A Turma 59,

Pelas grandes amizades que construir e por ser uma sala que marcou minha vida, lembrarei de todos e deixo aqui expressa minha gratidão por tudo que fizeram por mim.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Em nome da pessoa do diretor Profº. Dr. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Profº. João Eduardo Gomes Filho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Pela concessão das bolsas de iniciação científica que foram fundamentais para realização dos trabalhos e pela grande importância para minha vida acadêmica e pessoal.

Ao Frigorífico Friboi,

Pelo fornecimento dos dentes bovinos cruciais para realização deste trabalho.

Epígrafe

“O quão sortudo eu sou de ter alguma coisa, que faz com que dizer adeus seja tão difícil.”

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.”

II A Timóteo 4:7

Nunes, G.P. Efeito da adição de nanopartículas de hexametáfosfato de sódio em dentifrícios fluoretados sobre a desmineralização dentária: estudo *in vitro*. 2017. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Resumo

Este estudo avaliou o efeito de dentifrícios contendo 1100 ppm F associado a nanopartículas de hexametáfosfato de sódio (HMPnano) sobre a desmineralização do esmalte *in vitro*, utilizando um modelo de ciclagem de pH. Desenho: Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=72) selecionados pela dureza de superfície inicial (SHi), foram alocados em seis grupos (n=12), de acordo com os dentifrícios teste: sem flúor ou HMPnano (Placebo), 550 ppm F (550F), 1100 ppm F (1100F), 1100F acrescido de HMPnano nas concentrações de 0,25% (1100F/0,25%HMPnano), 0,5% (1100F/0,5%HMPnano), e 1,0% (1100F/1,0%HMPnano). Blocos foram tratados 2x/dia com suspensões de dentifrícios e submetidos a cinco ciclagens de pH (soluções desmineralizante/remineralizante) a 37 °C. A seguir, dureza de superfície final (SHF), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) e concentração de fluoreto (F) no esmalte foram determinadas. Os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). Resultados: Dentifrício com 1100F/0,5%HMPnano levou à menor perda mineral e maior concentração mineral em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), que foram de 26% (SHF) e 21% (Δ KHN) inferior e ~ 58% maior ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) quando comparado ao 1100F ($p < 0,001$). Foram observados valores similares de F no esmalte para todos os dentifrícios fluoretados ($p > 0,001$). Conclusão: A adição de 0,5%HMPnano ao dentifrício 1100F aumenta significativamente os seus efeitos anticárie quando comparado com o seu equivalente sem HMPnano.

Palavras-chave: Desmineralização, Esmalte dental, Dentifrício, Fosfatos, Dentifrícios, Nanopartículas.

Nunes, G.P. Effect of the addition of nano-sized sodium hexametaphosphate to fluoride toothpastes on tooth demineralization: an *in vitro* study. 2017. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

This study evaluated the effect of toothpastes containing 1100 ppm F associated with nano-sized sodium hexametaphosphate (HMPnano) on enamel demineralization *in vitro*, using a pH-cycling model. *Design:* Bovine enamel blocks (4 mm x 4 mm, n=72) selected by initial surface hardness (SHi) were randomly allocated into six groups (n=12), according to the test toothpastes: without fluoride or HMPnano (Placebo), 550 ppm F (550F), 1100 ppm F (1100F), 1100F plus HMPnano at concentrations of 0.25% (1100F/0.25%HMPnano), 0.5% (1100F/0.5%HMPnano), and 1.0% (1100F/1.0%HMPnano). Blocks were treated 2x/day with slurries of toothpastes and submitted to five pH cycles (demineralizing/remineralizing solutions) at 37 °C. Next, final surface hardness (SHf), integrated loss subsurface hardness (Δ KHN), integrated mineral loss ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) and enamel fluoride (F) concentration were determined. Data were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls" test ($p < 0.001$). Results: Toothpaste with 1100F/0.5%HMPnano led to the lowest mineral loss and the highest mineral concentration among all groups, which were 26% (SHf) and 21% (Δ KHN) lower and ~58% higher ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) when compared to 1100F ($p < 0.001$). Similar values of enamel F were observed for all fluoridated toothpastes ($p > 0.001$). *Conclusion:* The addition of 0.5%HMPnano to a 1100F toothpaste significantly enhances its effects against enamel demineralization when compared to its counterpart without HMPnano *in vitro*. Clinical Significance: Toothpaste containing 1100 ppm F associated with HMPnano has a higher potential to reduce the demineralization compared to 1100 ppm F. This toothpaste could be a viable alternative to patients at high risk of caries.

Keywords: Demineralization; Dental enamel; Phosphates; Toothpastes; Nano-size.

Figure legends

Figure 1. X-Ray Diffraction Patterns of HMP after (HMP) and before (HMPnano) grinding of powder by 48 hours in ball mill. The possible phases $\square$ $(\text{NaPO}_3)_6$ PDF# 3643 Sodium hexametaphosphate, $\square\square$ NaPO_3 PDF# 76788, $\square\square$ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ PDF# 10187, * $\text{NaH}_2\text{PO}_4 (\text{H}_2\text{O})$ DF#11651, $\square\square$ NaH_2PO_4 PDF#11657 and $\square\square$ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ PDF# 11652.

Figure 2. SEM images of Sodium hexametaphosphate particles, a) HMP and b) HMPnano after grinding of powder by 48h in ball mill.

Figure 3. Depth profiles of integrated mineral loss ($g_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3}$) in lesions for each treatment.

Figure 4. Relationship between integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN) and integrated mineral loss ($g_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3}$). $n = 72$.

Table legend

Table 1: Mean (SD) total (TF) and ionic (IF) F concentrations, and pH of the toothpastes.

Table 2: Mean (SD) surface and cross-sectional hardness, integrated mineral loos and enamel fluoride concentrations according to the toothpastes.

List of Abbreviations

ANOVA	Análise de variância
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
Ca ⁺²	Íon cálcio
CaF ⁺	Íon Fluoreto de cálcio
CaHPO ₄ ⁰	Fosfato de cálcio neutro
SD	Desvio padrão
F	Fluoreto
g	Grama
g _{HAp} ×cm ⁻³	Concentração mineral
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HF ⁰	Fluoreto de hidrogênio neutro
HMP	Hexametafosfato de sódio
HMPnano	Hexametafosfato de sódio nanoparticulado
ie	Ou seja
IF	Fluoreto iônico
IML	Perda mineral integrada
KCl	Cloreto de potássio
kV	Quilovoltagem
KHN	Unidade de dureza Knoop
L	Litro
mA	Miliamper
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MicroCT	Microtomografia computadorizada
mL	Mililitro
mL/mm ²	Mililitro por milímetro ao quadrado
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mol L ⁻¹	Mol por litro
mmol L ⁻¹	Milimol por litro
n	Número de amostra
Na ⁺	Íon sódio
NaF	Fluoreto de sódio

NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	nanométrico
P	Fósforo
pH	Potencial de Hidrogênio
ppm F	Partes por milhão de fluoreto
s	Segundo
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SHi	Dureza de superfície inicial
SHf	Dureza de superfície final
TISAB II	Tampão ajustador de força iônica total
TMP	Trimetafosfato de sódio
SD	Desvio padrão
μg	Micrograma
μg/mm ³	Micrograma por milímetro cúbico
μg F/mL	Micrograma de fluoreto por mililitro
XRD	X-ray diffraction/Difração de raio-x
μm	Micrômetro
ΔKHN	Perda integrada de dureza de subsuperfície

Summary

1 Introduction	18
2 Materials e Methods	19
2.1 Experimental Design	19
2.2 Synthesis and characterization of nano-sized sodium hexametaphosphate.	20
2.3 Toothpaste formulation and fluoride and pH assessment	20
2.4 pH-cycling and treatment with toothpastes	21
2.5 Analysis of enamel hardness	22
2.6 Analysis of enamel mineral concentrations	22
2.7 Analysis of F concentration in the enamel	23
2.8 Statistical analysis	24
3 Results	24
4 Discussion	26
5 Conclusion.....	29
6 Acknowledgments	30
7 References	31
8 Annexes	38

INTRODUCTION

Despite the widespread use of fluorides (F) in different vehicles and modes of application, dental caries is still a very common chronic disease during childhood [1], affecting approximately a quarter of all children and negatively influencing their oral and general health and their quality of life [2-3]. Considering the benefits and extensive use of F toothpastes [4-5], the increase of their efficacy would be extremely advantageous, especially for individuals with high caries experience [6-7]. Among the strategies available, the supplementation of toothpastes with organic and inorganic phosphates has been intensively investigated over recent years.

The addition of sodium trimetaphosphate (TMP) to toothpastes containing 500 ppm F [7-8] or 1100 ppm F [9] was shown to promote a synergistic effect against enamel demineralization using *in vitro* and *in situ* protocols. Besides TMP, sodium hexametaphosphate (HMP) has also been shown to enhance the effect of toothpastes containing 250 ppm F [10] or 1100 ppm F [11-12]. Such effects occur due to specific characteristics of this phosphate, such as its capacity to form complexes with cations and its ability in reducing enamel solubility.

Currently, nano-sized phosphates emerge as an innovative method, aiming to optimize the effect of the F toothpaste on remineralization processes [6]. The effect of nanoparticles is a result of their superior physical and chemical properties when compared to the above-mentioned micrometric phosphates [13]. In this sense, it was recently shown that the addition of nano-sized TMP was more effective to promote enamel remineralization *in situ* when compared to formulations supplemented with micrometric TMP or not supplemented with any phosphate [6].

Given the positive results obtained by the addition of nano-sized TMP on enamel remineralization and considering the absence of studies assessing the effects of nano-sized sodium hexametaphosphate (HMPnano), the aim of this study was to evaluate the effect of toothpastes containing 1100 ppm F associated with HMPnano on enamel demineralization *in vitro*, using a pH cycling model. The study's null hypothesis was that the effect of the toothpastes on enamel demineralization would not be influenced by the addition of HMPnano.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental Design

Enamel blocks (4 mm × 4 mm, n=72) were obtained from bovine incisors kept in formaldehyde 2%, pH 7.0, for 30 days prior to experimental procedures [14]. The enamel surfaces were sequentially polished using 600, 800 and 1,200-grade water-cooled silicon carbide paper disks (Buehler), with a final polish using a felt disk (Buehler Polishing Cloth 40–7618) moistened with a 1-μm diamond polishing suspension (Extex Corp., Enfield, CT, USA), removing ~120 μm of the outer enamel (measurement performed with a digital caliper). Blocks were selected by initial surface hardness test (SHi; 320 to 380 KHN) and randomly divided in six experimental toothpastes (n=12 each), according to the 95% confidence interval. They were submitted to a pH-cycling regimen (5 days) and to treatments (twice a day) with the following toothpastes: without fluoride or HMPnano (Placebo), 550 ppm F (550F), 1100 ppm F (1100F), 1100F plus HMPnano at concentrations of 0.25% (1100F/0.25%HMPnano), 0.5% (1100F/0.5%HMPnano), and 1.0% (1100F/1.0%HMPnano). Next, final surface hardness (SHf), integrated loss subsurface hardness (ΔKHN), enamel mineral

concentration ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) and enamel fluoride (F) concentration were determined.

2.2 Synthesis and characterization of nano-sized sodium hexametaphosphate

The synthesis and characterization of nano-sized HMP was based on study of Danelon et al. [6]. In short, 70 g of pure sodium hexametaphosphate ($((NaPO_3)_6)$) (average size of $31 \pm 33 \mu m$), Aldrich, purity $\geq 95\%$ CAS 7785-84-4, United Kingdom) was ball milled using 500 g of zirconia spheres (diameter of 2 mm) in 1 l of hexane. After 48 h, the material was filtered and sealed with aluminum foil, and the vials were dried at $75^\circ C$ to evaporate the hexane.

X-ray diffraction (XRD) was used to identify the crystalline structure and estimating crystallographic coherency domain HMP and milled for 48 h (HMPnano). The X-ray diffractograms were obtained from samples in powder form, using Shimadzu XRD 6000 equipment with CuK radiation source ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$), voltage 30 kV and current of 30 mA. Measurements were made continuously, in the range of $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$, a 2° sweep speed/min. The structural identification of the samples was done by comparing the diffraction patterns obtained with tabulated patterns available in databases "Joint Committee on Powder Diffraction Standards - Powder Diffraction File (JCPDS - PDF)". The particle morphology of HMP and HMP milled for 48h (HMPnano) was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The SEM images were collected using a Philips XL-30 FEG.

2.3 Toothpaste formulation and fluoride and pH assessment

Toothpastes were produced in the laboratory of Pediatric Dentistry School of Dentistry, Araçatuba (Unesp, Brazil) with the following components: titanium

dioxide, carboxymethyl cellulose, sodium methyl-p-hydroxybenzoate, sodium saccharin, mint oil, glycerine, abrasive silica, sodium lauryl sulfate and water [11]. Toothpastes containing 1100 ppm F (as NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Germany) and nano-sized HMP at concentrations of 0.25%, 0.5% and 1.0% were prepared. Also, a Placebo toothpaste (without F or HMPnano), and toothpastes with 550 ppm F (550F) and 1100 ppm F (1100F) were prepared with the same ingredients the other toothpastes. The total (TI) and ionic (IF) concentrations of fluoride and the pH of the toothpastes were determined in triplicate [15-16] prior to the beginning of the study (Table 1).

2.4 pH-cycling and treatment with toothpastes

Prior to pH cycling, two layers of acid-resistant nail varnish (Risqué®-Brazil) were applied on the sides (cut surfaces) and on the bottom of each block. Next, the blocks were submitted, in individual vials, to five pH cycles during five days (one cycle/day), and immersed in a fresh remineralizing solution for two additional days [17]. They were immersed under constant stirring in suspensions of toothpastes and deionized water (1:3-weight:weight) when removed from the demineralizing (6 hours – Ca and P 2,0 mmol l⁻¹ in acetate buffer 0,075 mol l⁻¹, 0,04 µg F/ml in pH 4,7 – 2,2 ml/mm²) and from the remineralizing solutions (18 hours – Ca 1.5 mmol l⁻¹, P 0.9 mmol l⁻¹, KCl 0.15 mol l⁻¹ in cacodylic buffer 0.02 mol l⁻¹, 0. 05 µg F/ml in pH 7,0 – 1,1 ml/mm²). The blocks were washed with jets of deionized water for 30 seconds whenever blocks were removed from the pH-cycling solutions or from the toothpaste suspensions.

2.5 Analysis of enamel hardness

Surface hardness was determined with Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) and Buehler Omni Met software (Buehler, Lake Bluff, USA) with a Knoop diamond indenter under a 25 g load for 10 s. Five indentations, separated by a distance of 100 μm , were made in the center of each block to analyze initial surface hardness (SHi). After the pH-cycling, final surface hardness (SHf) was calculated by producing five other indentations (100 μm from the baseline indentations). For cross-sectional hardness measurements, blocks were sectioned at the center and one of the halves was included in acrylic resin and gradually polished until the enamel was totally exposed. One sequence of 14 indentations were created at different distances (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220, and 330 μm) from the surface of the enamel, in the central region of the blocks, using a Micromet 5114 hardness tester (Buehler Lake Bluff, IL, USA) with a Knoop diamond indenter under a 5-g load for 10 s. Integrated hardness ($\text{KHN} \times \mu\text{m}$) for the lesion into sound enamel was calculated by the trapezoidal rule (GraphPad Prism, version 3.02) and subtracted from the integrated hardness for sound enamel to obtain the integrated area of the subsurface regions in enamel, which was named integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN ; $\text{KHN} \times \mu\text{m}$) [18].

2.6 Analysis of enamel mineral concentrations

Samples ($n=10/\text{group}$, 1 mm x 1 mm) were analyzed by micro computed tomography (MicroCT) operated at 70 kV, 142 mA, aluminum filter of 0.5 mm, at 1.5 mm of spatial resolution, rotation step at 0.400° and random moviment at 10. The projections of the images were rebuilt using the NRecon software (version

1.6.10.2, Skyscan1272, Bruker Micro-CT) and smoothing at 5, ring artifact correction at 7, beam hardening correction at 50%. Following image reconstruction, two-dimension virtual slices in the sagittal and coronal plane were acquired using the Data Viewer software (Skyscan1272). The stacked 2D was imported into ImageJ software to produce an overall mineral concentration ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) profile in function of the depth (μm). The mineral concentrations were calculated from the linear attenuation coefficient (LAC) and expressed as the mass of pure hydroxyapatite ($\rho = 3.15 g \times cm^{-3}$) per unit volume of tissue ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) [19-20].

The integrated area above the curve (cross-sectional profiles of mineral concentration into the enamel), using the mineral concentration values ($g_{HAp} \times cm^{-3}$), was calculated by trapezoidal rule (GraphPad Prism, version 3.02) in each depth (μm) from the lesion up to sound enamel. This value was subtracted from integrated area of sound enamel, to obtain the integrated area of the subsurface regions in enamel, which was named integrated mineral loss (IML).

2.7 Analysis of F concentration in the enamel

Blocks ($n=12/\text{group}$, $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$) were obtained from the halves of the original $4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ specimens not embedded, and fixed with adhesive glue on a mandrel for straight. Self-adhesive polishing discs (diameter, 13 mm) and 400-grit silicon carbide (Buehler) were fixed to the bottom of polystyrene crystal tube (J-10; Injeplast, Sao Paulo, SP, Brazil). One layer of $50.0 \pm 0.03\text{ }\mu m$ each enamel block was removed. The vials, after the addition of $0.5\text{ ml HCl } 1.0\text{ mol l}^{-1}$, were kept under constant stirring for 1 hour [21-22]. For F analysis, specific electrode 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) and microelectrode reference (Analyser, São Paulo, Brazil) coupled to an ion analyzer (Orion 720A⁺, Thermo

Scientific, Beverly, MA, USA) was used. The electrodes were calibrated with standards containing from 0.25 to 4.00 $\mu\text{g F/ml}$ (100 ppm F, Orion 940907), under the same conditions as the samples. The readings were conducted using 0.25 ml of the biopsy solution, buffered with the same volume of TISAB II modified NaOH 1.0 mol l^{-1} . The results were expressed in $\mu\text{g/mm}^3$.

2.8 Statistical analysis

For statistical analysis, SigmaPlot software version 12.0 (SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, USA) was used, and the significance limit was set at 5%. The data presented normal (Shapiro-Wilk test) and homogenous (Cochran test) distribution. Data from SHf, ΔKHN and F (log transformation) and $\text{g}_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3}$ (square root transformation) were submitted to 1-way analysis of variance followed by Student–Newman–Keuls test. Pearson's correlation coefficients between ΔKHN and $\text{g}_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3}$ were also calculated.

3. RESULTS

Table 1 presents mean (SD) total and ionic F concentrations, as well as mean pH values of the toothpastes. F concentrations in the products presented only small variations around the expected values (lower than 8%). Similarly, mean pH of toothpastes presented variations (ranging from 6.8 to 7.7).

The X-ray diffraction pattern (XRD) of commercial micrometric HMP in Figure 1 shows few and broad peaks, revealing a material of low crystallinity. On the other hand, the XRD of nano-sized HMP after ball milling for 48 h (HMPnano) shows a mixture of several crystalline polymorphs of phosphates, as assigned in Figure 1. Grinding altered HMP, causing particles to fragment, and reducing their

specific surface area and size distribution. It also induced structural changes such as crystallization of the material, as seen in micrographs of samples in Figure 2a, which shows the SEM images of HMP with large aggregates and particles of smaller sizes (average size of $31 \pm 33 \mu\text{m}$). Figure 2b shows MEV images of HMPnano particles with low size distribution and average size of $91 \pm 34 \text{ nm}$.

Mean (SD) SHi considering all blocks was 375 (1.2) KHN. No significant differences were observed among the groups after random allocation ($p = 0.474$). SHf of blocks treated with 550F and 1100F were approximately 182% and 306% higher compared to Placebo ($p < 0.001$). The addition of 0.5% HMPnano to 1100F led to SHf ~26% higher when compared with 1100F ($p < 0.001$), while concentrations of 0.25% and 1.0% were shown to significantly reduce the protective effect of the toothpastes when compared with 1100F (Table 2). A similar pattern was observed for the integrated loss subsurface hardness. ΔKHN values were approximately 17% and 60% lower, respectively for 550F and 1100F, when compared with the Placebo. The addition of 0.5% HMPnano to 1100F significantly reduced the ΔKHN when compared with 1100F ($p < 0.001$), while HMP at 0.25 and 1.0% were shown to increase subsurface hardness loss by approximately 13% and 34% when compared with 1100F ($p < 0.001$), (Table 2).

Table 2 shows the mean IML ($g_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) for the different treatments obtained from the profile of mineral concentration in function of depth (Figure 3). Significantly higher IML (~58%) was observed in enamel treated with 1100F/0.5% HMPnano compared to 1100F ($p < 0.001$); no significant differences were observed among groups treated with 550F, 1100F/0.25% HMPnano and 1100F/1.0% HMPnano ($p > 0.001$). Positive and significant correlations were observed between ΔKHN and IML (Pearson's $r = 0.874$; $p < 0.001$) (Figure 4).

A dose-response pattern was observed between F concentrations in the toothpastes not supplemented with HMPnano and enamel fluoride uptake. The supplementation of 1100F with HMPnano did not significantly alter enamel fluoride levels ($p > 0.001$) (Table 2).

4. DISCUSSION

To optimize conventional F toothpastes (1100 ppm F), this study evaluated the efficacy of a 1100 ppm F toothpaste associated with different concentrations of HMP (administered as nano-sized particles) in reducing enamel demineralization. The results showed that HMPnano added at concentration of 0.5% promoted a superior efficacy when compared with a conventional toothpaste, leading to the rejection of the study's null hypothesis.

The evaluation of the dose-response relationship is an important step in assessing the effects of any supplement added to toothpastes, as well as to validate the experimental protocol used [23]. Such relationship was indeed confirmed, given that data from Placebo, 550F and 1100F were dose-dependent for all variables assessed (Table 2). Anbar et al. [1979] [24] demonstrated that the adsorption of a polyphosphate to enamel surface is highly fast and can compete with the absorption of ionic F, which would, in turn, decrease F diffusion into the enamel, thus leading to greater mineral loss. The addition of HMPnano at concentrations of 0.25% to 1.0%, however, did not affect enamel F concentrations, suggesting that the presence of HMPnano does not impair enamel F uptake, in opposition to the findings of Anbar et al. [1979] [24]. Moreover, although the 1100F/0.5HMPnano toothpaste had a slightly lower pH than the other toothpastes, it is noteworthy that it was very close to a neutral

value, so that it is likely that it had negligible or no effect on the response variables assessed.

HMPnano concentrations tested in this study were based on F/HMP ratio from previous studies showing that the addition of micrometric particles of HMP at 1.0% to a 1100 ppm F toothpaste promoted a higher effect against enamel demineralization when compared with its counterpart without HMP [11-12]. Previous *in vitro* and *in situ* studies using higher HMP concentrations, on the other hand, failed to demonstrate a synergistic effect between fluoride and HMP. Pfarrer et al. [25] observed in an *in vitro* study using pH cycling that treatment with 1100 ppm F toothpaste supplemented with 7% HMP resulted in integrated mineral loss equivalent to that of Crest® and no significant difference in the incorporation of F by enamel. In an *in situ* study, Wefel et al. [26] reported that toothpastes containing 0.243% NaF with 7% HMP or 0.454% SnF₂ with 13% HMP showed results similar to the respective controls without HMP with respect to enamel lesion analyzed by polarized light microscopy. All of these studies evaluated the effect of HMP at high concentrations, which differ from the studies by da Camara et al. [11-12], in which HMP was added at 1% to a 1100 ppm F toothpaste, promoting a synergistic effect on enamel demineralization both *in vitro* and *in situ*. However, as the effect of HMPnano (as well as other phosphates) is related to its ability to adsorb on the enamel, the study clearly demonstrates that the HMPnano:F molar ratio has a strong influence on the reducing enamel demineralization effect. Therefore, the dose dependency relation is not observed; These finding is in agreement with the studies carried out by da Camara et al. [10-12].

In the present study, the addition of 0.5%HMPnano to a 1100 ppm F

toothpaste significantly increased surface hardness (~ 26%) and reduced subsurface hardness (~ 21%) in comparison with 1100F, justifying the use of nano-sized HMP. The procedure used to synthesize HMPnano promoted more reactive particles with increased adsorption on enamel, due to the reduction in size and increase in surface area (in proportion to its volume), which leads to a higher number of atoms on the surface (Figure 2). Also, the effect of 0.5%HMPnano concentration on ΔKHN suggests that, under clinical conditions, the subsurface lesion would take longer to develop when compared to conventional toothpaste.

Besides the analysis of enamel by traditional hardness measurements (surface and cross sectional), the use of micro computed tomography (microCT) was of great importance to explain how the treatments modified the mineralization patterns throughout the subsurface lesions, and how these patterns were influenced by treatments with F, especially when associated with HMPnano. In the analysis of integrated mineral loss (IML, $g_{HAp} \times cm^3$) by microCT at different depths, mineral profiles varied widely among the treatment groups; the 1100F/0.5%HMPnano toothpaste promoted the lowest IML, approximately 58% lower than 1100F group (Table 2). The mineral profile of the lesion in groups treated with F/HMPnano was different in relation to the group containing only F, confirming previous findings that the F and HMP have a different action mode on the dynamics of caries process (Figure 3) [10-11].

The present findings can also be explained by the characteristics of the studied salt. HMP is considered a non-hydrolyzable and cyclic phosphate [27-28] which forms strong complexes with metal ions [29-30] in the oral environment. Based in previously studies [11-12], HMP interacts with the enamel and adsorbed

into the enamel surface retain charged ions (CaF^+ and Ca^{2+}) through the replacement of Na^+ in the cyclic structure, leading to a reticular formation [31] through the binding of Ca^{2+} with one or more HMP molecules. As a result of these multiple connections, HMP molecules form a layer of condensed phosphates, changing the selective permeability of the enamel [32] and, in this case, increasing the cations selectivity. These data are in agreement with findings of da Camara et al. [11] showing that the ionic activity of species such as CaF^+ and Ca^{2+} , as well as neutral species of HF^0 and CaHPO_4^0 in the dental biofilm formed *in situ* were significantly higher when compared to the 1100 ppm F toothpaste.

Although it is well known that the pH-cycling models are appropriate for evaluating the impact of new active ingredients in fluoride toothpastes as well as their association with other anticaries treatments, *in vitro* protocols have limitations, including: (1) do not evaluate the oral conditions and interaction of HMPnano with the enamel surfaces; (2) the faster periods of de/remineralization when compared to *in vivo* conditions; and (3) the lower reactivity of fluoride than *in vivo* [33]. Moreover, this study did not include a toothpaste supplemented with conventional (micrometric) HMP, what does not allow the determination of the additional benefit of nano-sized particles over their micrometric counterparts. Therefore, the results should be evaluated with caution, and future *in situ* and clinical studies should be conducted in order to better understand the effect of this cyclic phosphate on the de/remineralization processes.

5. CONCLUSION

To sum up, the addition of 0.5% HMPnano to a 1100F toothpaste significantly enhances its effects against enamel demineralization when compared to its counterpart without HMP under *in vitro* conditions.

6. ACKNOWLEDGMENTS

We thank FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation, 2014/06676-9) for the concession of a scholarship. Thank to the Multi-user laboratory of FOA-UNESP and to FINEP (FINEP/CT-INFRA - Agreement FINEP: 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) for the use of the high resolution micro computed tomography equipment (SkyScan 1272 Model).

7. REFERENCES

- 1) Nunes AM, da Silva AA, Alves CM, Hugo FN, Ribeiro CC (2014) Factors underlying the polarization of early childhood caries within a high-risk population. *BMC Public Health* 14:988.
- 2) Ferreira SH, Béria JU, Kramer PF, Feldens EG, Feldens CA (2007) Dental caries in 0- to 5-year-old Brazilian children: prevalence, severity, and associated factors. *Int J Paediatr Dent* 17:289-296.
- 3) Tomar SL, Reeves AF (2009) Changes in the Oral Health of US Children and Adolescents and Dental Public Health Infrastructure Since the Release of the Healthy People 2010 Objectives. *Acad Pediatr* 9:388-395.
- 4) Rølla G, Ogaard B, Cruz Rde A (1991) Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J* 41:171-174.
- 5) Vanichvatana S, Auychai P (2013) Efficacy of two calcium phosphate pastes on the remineralization of artificial caries: a randomized controlled double-blind in situ study. *Int J Oral Sci* 5:224-228.
- 6) Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC (2015) Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 43:806-813.
- 7) Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC (2015) Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res* 49:394-400.
- 8) Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC (2009) In vitro evaluation of

- dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 43:50-56.
- 9) de Castro LP, Delbem ACB, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C (2015) In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 19:1683-1687.
- 10) da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sassaki KT, Delbem AC (2014) Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent* 42:256-262.
- 11) da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC (2015) Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent* 43:1249-1254.
- 12) da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC (2016) Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clin Oral Investig*, Jan 13 [Epub ahead of print].
- 13) Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al (2010) Strong nanocomposites with Ca, PO(4) and F release for caries inhibition. *J Dent Res* 89:19-28.
- 14) Delbem AC, Cury JA (2002) Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* 15:169-172.
- 15) Delbem AC, Sassaki KT, Vieira AE, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, et al (2009) Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. *Caries Res* 43:359-365.
- 16) Moretto MJ, Magalhaes AC, Sassaki KT, Delbem AC, Martinhon CC (2010)

- Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 44:135-140.
- 17) Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF (2005) Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 39:514-520.
- 18) Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC (2009) Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res* 43:302-307.
- 19) Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS (2003) Longitudinal study of the three-dimensional development of subsurface enamel lesions during in vitro demineralization. *Caries Res* 37:237-245.
- 20) Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P (2004) Synchrotron X-ray microtomographic investigation of mineral concentrations at micrometer scale in sound and carious enamel. *Caries Res* 38:514-522.
- 21) Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki, H (1985) Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 19:97-102.
- 22) Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC (2007) In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 41:263-267.
- 23) ten Cate JM, Mundorff-Shrestha SA (1995) Working group report 1: laboratory models for caries (in vitro and animal models). *Adv Dent Res* 9:332-334.
- 24) Anbar M, Farley EP, Denson DD, Maloney KR (1979) Localized fluoride release from fluorine-carrying polyphosphonates. *J Dent Res* 58:1134-1145.
- 25) Pfarrer AM, White DJ, Rapozo-Hilo, Featherstone ID (2002) Anticaries and

- hard tissue abrasion effects of a “dual action” whitening, sodium hexametaphosphate tartar control dentifrice. *J Clin Dent* 13:50-54.
- 26) Wefel JS, Stanford CM, Ament DK, Hogan MM, Harless JD, Pfarrer AM, Ramsey LL, Leusch MS, Biesbrock AR (2002) In situ evaluation of sodium hexametaphosphate-containing dentifrices. *Caries Res* 36:122-128.
- 27) Choi IK, Wen WW, Smith RW (1993) Technical note the effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. *Mineral En* 6:1191-1197.
- 28) Castellini E, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L (2005) Thermodynamic aspects of the adsorption of hexametaphosphate on kaolinite. *Journal of Colloid and Interface Science* 292:322-329.
- 29) Andreola F, Castellini E, Manfredini T, Romagnoli M (2004) The role of sodium hexametaphosphate in the dissolution process of kaolinite and kaolin. *The Journal of the European Ceramic Society* 24:2113-2124.
- 30) Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC (2008) Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 42:88-97.
- 31) van Wazer JR, Campanella DA (1950) Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions. *Journal of the American Chemical Society* 72:655-663.
- 32) van Dijk JW, Borggreven JM, Driessens FC (1980) The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel. *Arch Oral Biol* 25:591-595.
- 33) Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC (2010). pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci* 18:316

Table 1: Mean (DP, n = 3) total (TF), ionic (IF) F concentrations and pH in the toothpastes

Toothpastes	IF (ppm F)	TF (ppm F)	pH
Placebo	10.0 (1.2)	10.5 (0.9)	7.7 (0.3)
550F	557.3 (11.4)	546.1 (6.5)	7.4 (0.1)
1100F	1102.4 (28.5)	1186.0 (33.2)	7.3 (0.2)
1100F/0.25%HMPnano	1136.5 (42.6)	1168.3 (5.9)	7.2 (0.3)
1100F/0.5%HMPnano	1100.9 (27.2)	1156.6 (19.7)	6.8 (0.3)
1100F/1.0%HMPnano	1127.3 (19.7)	1131.5 (8.4)	7.4 (0.3)

Table 2: Mean (SD) surface and cross-sectional hardness, integrated mineral loss and enamel fluoride concentrations according to the toothpastes

Toothpastes	Variables			
	¹ SHf	² ΔKHN	³ IML	⁴ F
Placebo	61.2 (8.8) ^a	7373.4 (958.3) ^a	45.5 (10.3) ^a	0.6 (0.2) ^a
550F	172.6 (8.1) ^b	6096.1 (669.7) ^b	22.2 (3.6) ^b	0.9 (0.4) ^b
1100F	248.6 (9.1) ^c	3003.3 (403.4) ^c	8.7 (3.4) ^c	1.4 (0.8) ^c
1100F/0.25%HMPnano	240.5 (7.7) ^d	3390.6 (308.8) ^d	21.4 (4.0) ^b	1.1 (0.5) ^{b,c}
1100F/0.5%HMPnano	312.9 (7.3) ^e	2383.6 (282.9) ^e	3.7 (2.2) ^d	1.3 (0.4) ^c
1100F/1.0%HMPnano	238.7 (9.4) ^d	4024.5 (592.0) ^f	18.4 (7.2) ^b	0.9 (0.3) ^{b,c}

¹SHf: final surface hardness - KHN

²ΔKHN: integrated loss of subsurface hardness - KHN x μm

³IML: Integrated mineral loss - $g_{HAP} \times cm^{-3} \times \mu m$

⁴F: Fluoride concentration in enamel - μg/mm³

Distinct superscript lowercase letters indicate statistical significance among groups in each variable (1- way ANOVA, Student-Newman-Keuls test, p < 0.001).

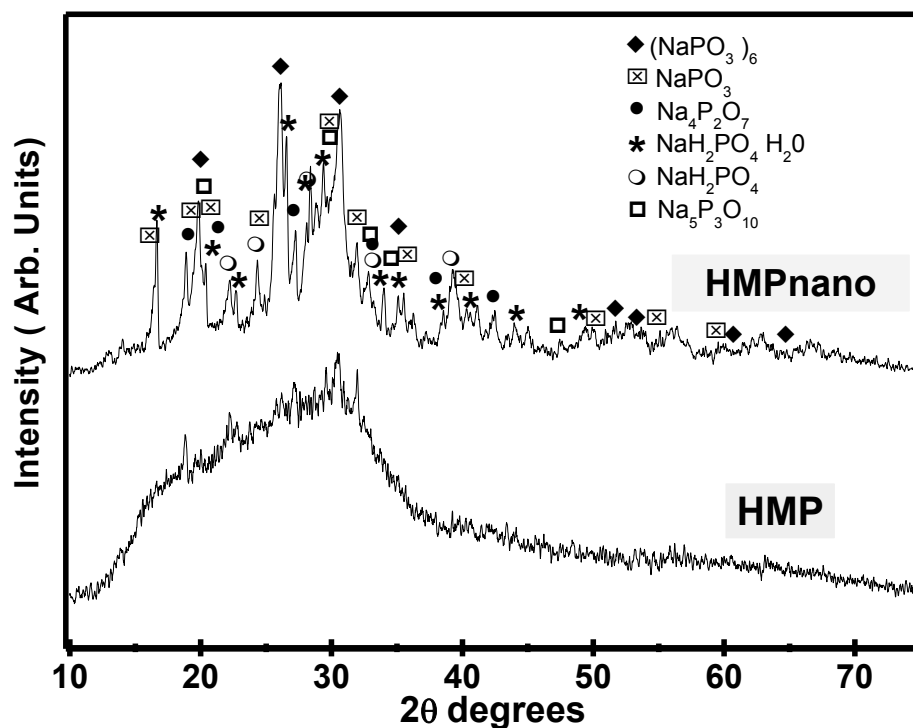


Figure 1. X-Ray Diffraction Patterns of HMP after (HMP) and before (HMPnano) grinding of powder by 48 hours in ball mill. The possible phases $\diamond$ $(\text{NaPO}_3)_6$ PDF# 3643 Sodium hexametaphosphate, $\square$ NaPO_3 PDF# 76788, $\square\square$ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ PDF# 10187, * $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ DF#11651, $\circ$ NaH_2PO_4 PDF#11657 and $\square\square$ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ PDF# 11652.

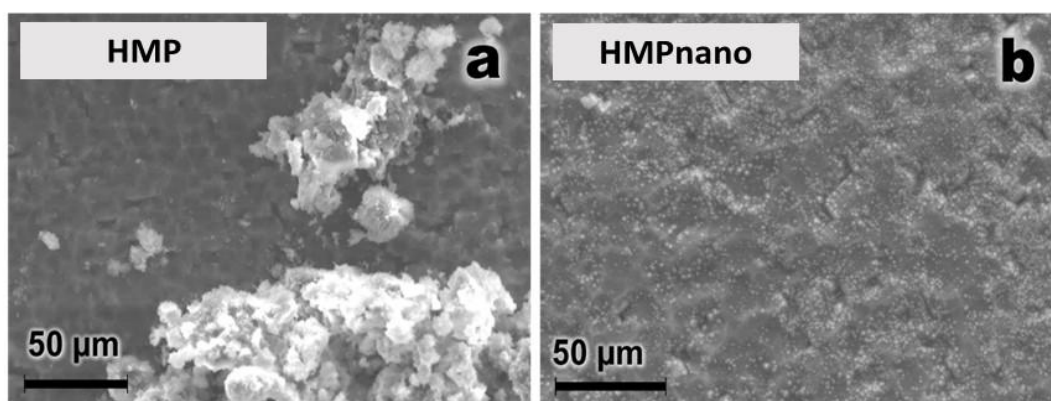


Figure 2. SEM images of Sodium hexametaphosphate particles, a) HMP and b) HMPnano after grinding of powder by 48h in ball mill.

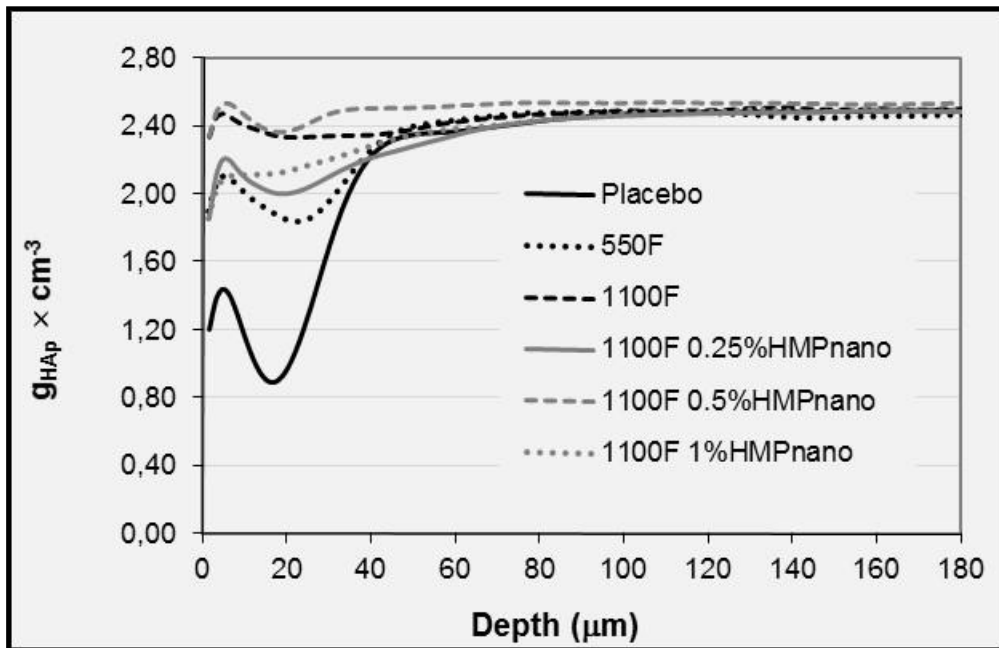


Figure 3. Depth profiles of integrated mineral loss ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) in lesions for each toothpaste.

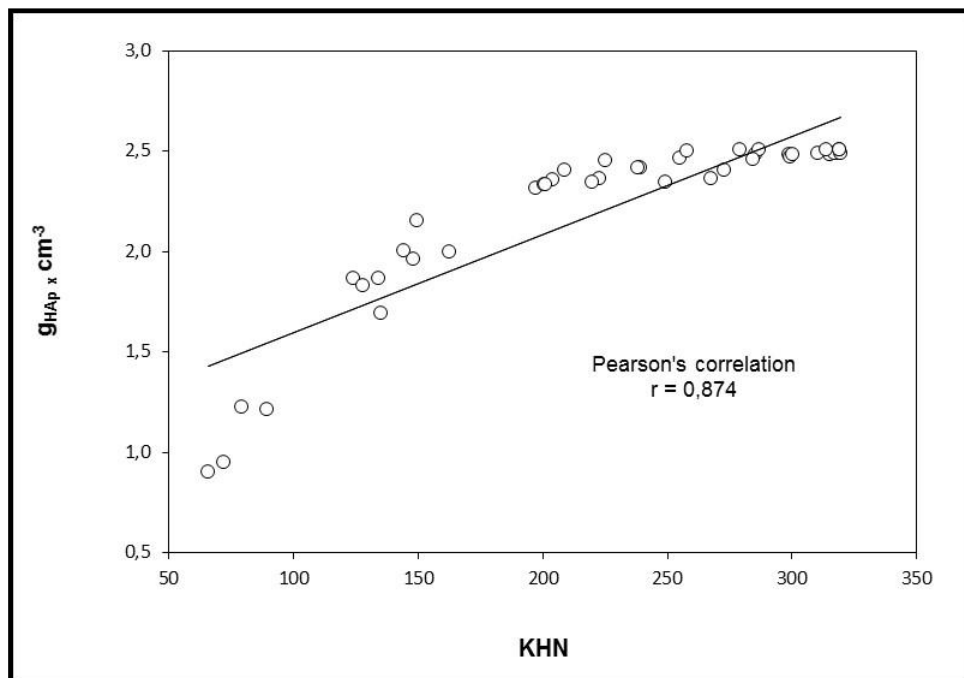
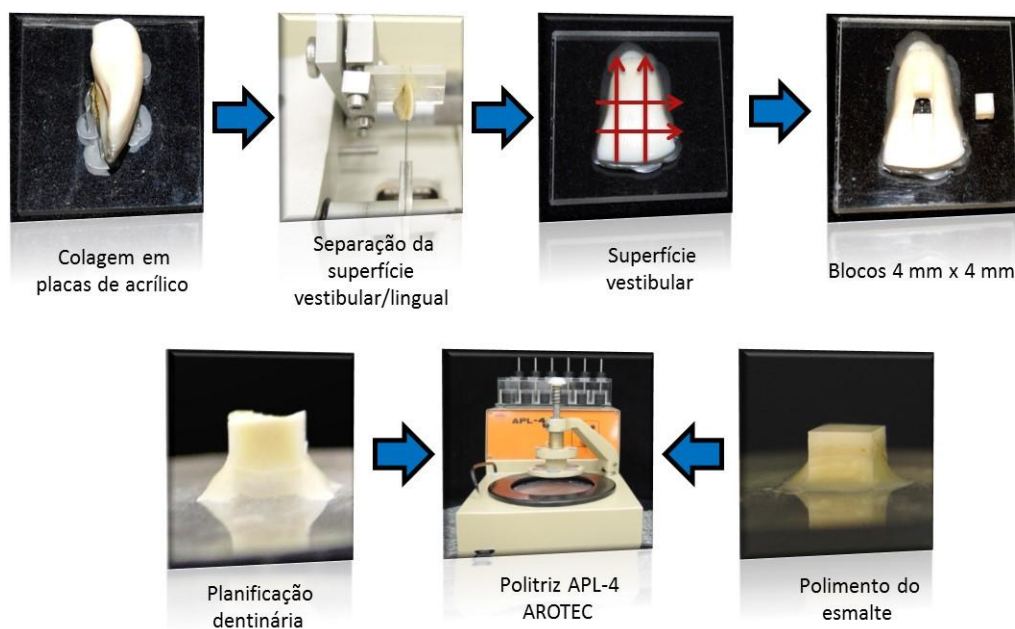


Figure 4. Relationship between integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN) and integrated mineral loss ($g_{HAp} \times cm^{-3}$). $n = 72$.

8. ANNEXES

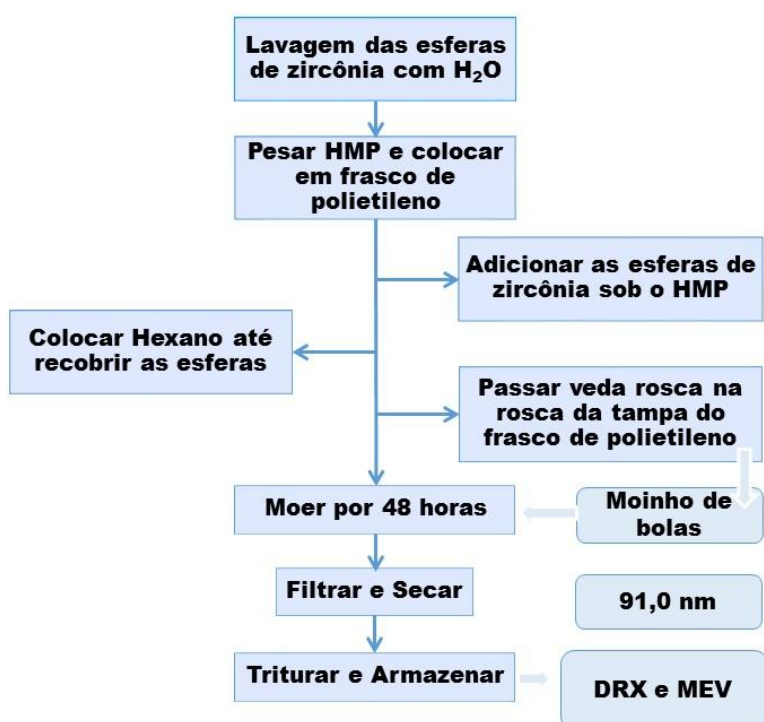
ANNEXE A

PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE



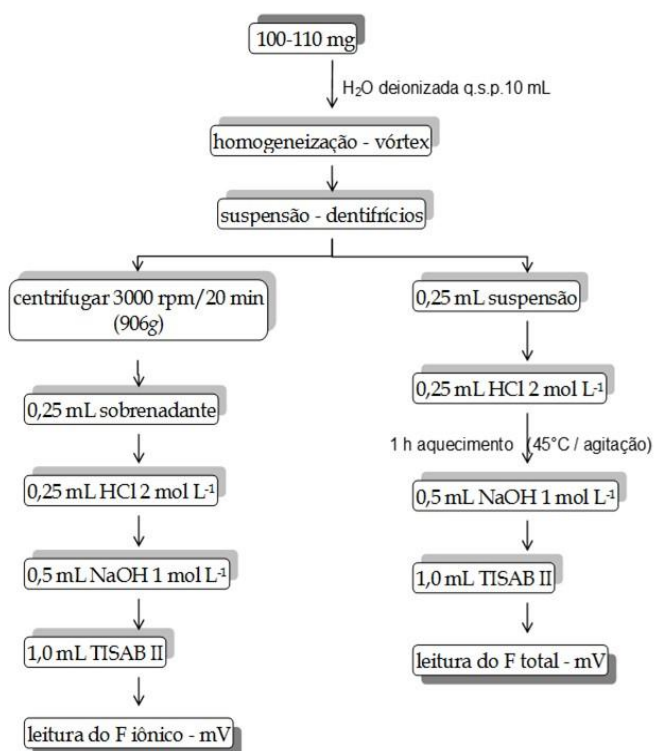
ANNEXE B

SÍNTESE DO HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO NANOPARTICULADO



ANNEXE C

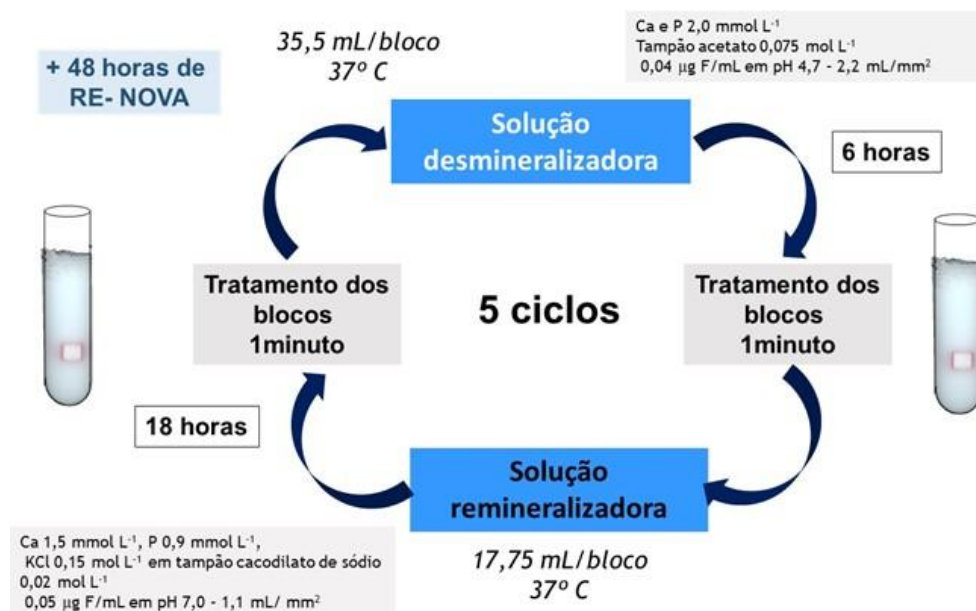
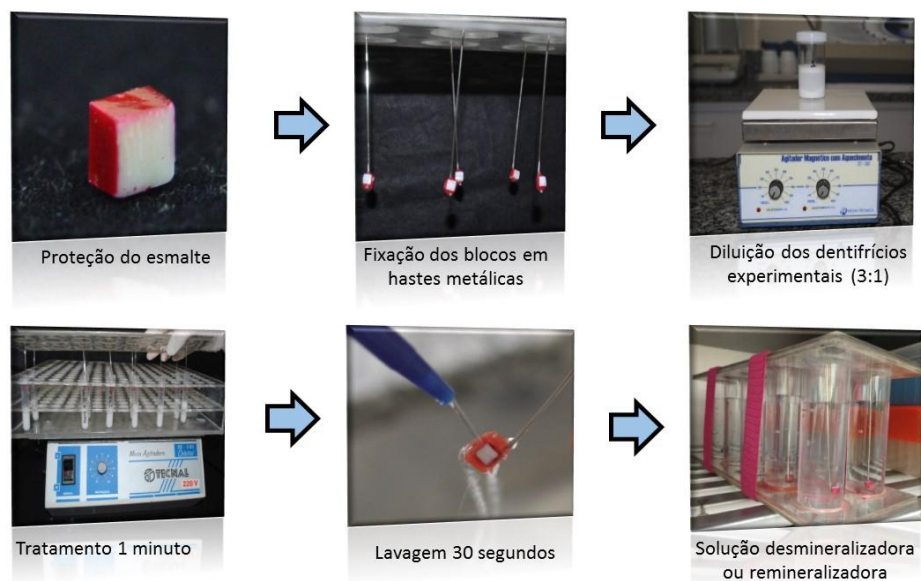
DOSAGEM DE FLUORETO NOS DENTIFRÍCIOS EXPERIMENTAIS



- ❖ Eletrodo específico para F; Orion 9409-BN
- ❖ Microeletrodo de referência
- ❖ Analisador de íons

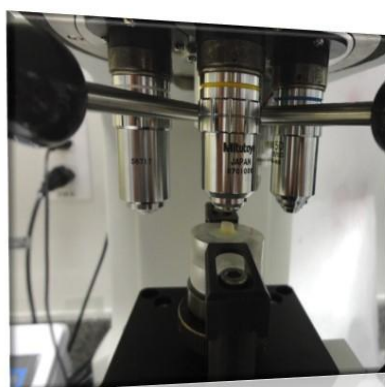
ANNEXE D

CICLAGEM DE pH

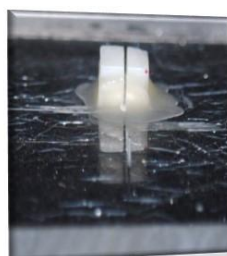
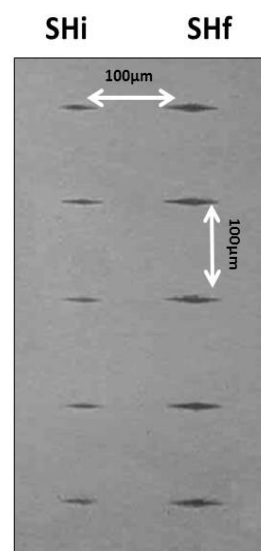


ANNEXE E

ANÁLISE DA DUREZA SUPERFICIAL E LONGITUDINAL DO ESMALTE



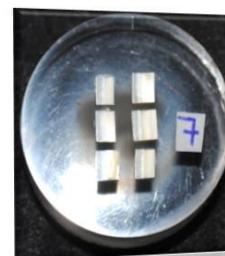
Microdurômetro Buehler
Carga 25 gramas
Tempo 10 segundos



Secção dos blocos de
esmalte no sentido
longitudinal



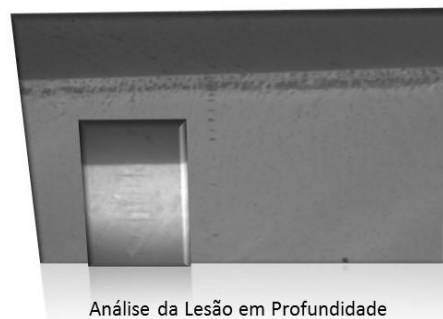
Embutimento dos blocos
de esmalte com resina
acrílica



Aspecto final dos blocos
de esmalte



Microdurometro Buehler
Carga 5g; Tempo 10 segundos



Análise da Lesão em Profundidade

ANNEXE F

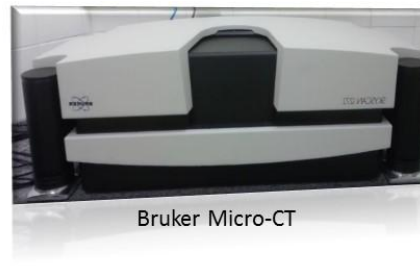
ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO MINERAL DO ESMALTE PELA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA



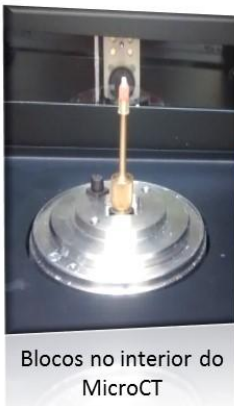
Blocos com espessura
de 1 mm



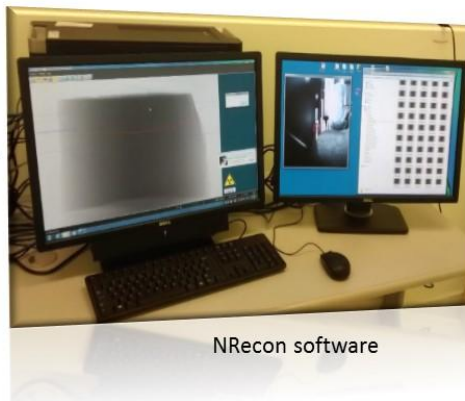
Fixação dos blocos



Bruker Micro-CT



Blocos no interior do
MicroCT



NRecon software



Imagem gerada após leitura
pelo MicroCT

ANNEXE G

ANÁLISE DE FLUORETO NO ESMALTE



Micrômetro eletrônico digital com saída acoplado a uma base de microscópio e blocos fixados



Desgaste 50 μm Lixa 400 (CARBIMET – BUEHLER)



0,5 mL de HCl 1,0 mol/L

Agitação por 1 hora



0,25mL da amostra + 0,25 mL TISAB II modificado com NaOH 1,0 mol/L