

JOSÉ ANTONIO SANTOS SOUZA

**AÇÃO DO TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO SOBRE A
HIDROXIAPATITA DURANTE CICLAGEM DE pH: ANÁLISE
BIOQUÍMICA, POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO E
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.**

ARAÇATUBA – SP

2011

JOSÉ ANTONIO SANTOS SOUZA

**AÇÃO DO TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO SOBRE A
HIDROXIAPATITA DURANTE CICLAGEM DE pH: ANÁLISE
BIOQUÍMICA, POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO E
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.**

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

**Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos
Botazzo Delbem**

**Coorientadora: Prof.^a. Dra. Kikue
Takebayashi Sasaki**

ARAÇATUBA – SP

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pela colaboração na minha formação acadêmica, por me compreenderem diante de minhas escolhas. Por me ensinarem o dom da partilha e da solidariedade. Amo muito vocês!

À meus pais, João Carlos e Mariauva, por seu amor e paciência para comigo. Vocês foram e sempre serão a minha fonte de inspiração, fonte de sabedoria e humildade. Agradeço a Deus por ter sido fruto de tão nobre e incomparável amor que existe entre vocês. Com vocês, aprendi o que é e como praticar o amor ensinado por nosso mestre Jesus Cristo.

À minha irmã, Izabella, pelo seu companheirismo e apoio em todas as etapas da minha vida.

A todos que me ajudaram nesta caminhada rumo à vitória. Através de suas contribuições, vejo que o Amor deve ser vivido e testemunhado e não apenas dito com palavras.

“Viver sem amar não é realmente viver.”

Molière

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, fonte de toda sabedoria e fonte de inesgotável amor. Pela sua presença constante em minha vida protegendo-me e guiando meus passos rumo à coroa da vitória. Diante das dificuldades, Tu és presença doce e incomparável. Sempre renderei graças a Ti, ó Pai, por tantas maravilhas que fizestes por mim. Sinto em meu coração que o Seu sonho para minha vida está se concretizando. Muito Obrigado!

“O que nós somos é o presente de Deus a nós. O que nos tornamos é nosso presente a Deus.”

Eleonor Powell

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu conhecimento científico e intelectual. Obrigado pela sua paciência diante de minhas fraquezas. Vejo em você um exemplo a ser seguido para a carreira profissional e docência. Obrigado pela oportunidade de trabalhar contigo. Agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos. Que Ele, com Seu infinito amor e misericórdia, derrame sobre você e sua família inúmeras bênçãos do céu, revestindo-o de sabedoria, humildade e amor. Mais uma vez, muito obrigado!

À Prof.^a Dra. Kikue Takebayashi Sassaki, pela coorientação neste trabalho. Agradeço pela atenção e apoio que nos destes. Saiba que suas orientações foram muito importantes para a realização desta pesquisa. Obrigado pela sua paciência, pela oportunidade que me deste de trabalhar contigo, a final de contas foi através de você que hoje sou estagiário na disciplina de Odontopediatria. Que Deus derrame sobre você copiosas bênçãos revestindo-a com sabedoria, humildade e amor. Obrigado professora, por tudo!

Aos professores do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da disciplina de Odontopediatria, Prof. Robson Frederico Cunha, Prof. Célio Percinoto, Prof. Juliano Pelim

Pessan, Prof.^a. Sandra Maria Herondina Ávila Aguiar e Prof.^a. Rosangela Santos Nery pela convivência ao longo desses anos. Agradeço por terem enriquecido minha formação acadêmica.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

À Ana Carolina Soares Fraga Zaze, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar com você. Obrigado pela paciência que teve comigo. Aprendi muito com você. A vejo como exemplo de garra e otimismo. Que Deus conceda a você e a sua família muitas felicidades. Muito Obrigado por tudo!

À Eliana Mitsue Takeshita, pela colaboração neste trabalho. A considero um exemplo a ser seguido. Agradeço pela paciência que tivestes comigo. Que Deus a abençoe.

Aos meus amigos, Aljomar Vechiato, Fábio Lázaro Queiroz e Rafael Gonçalves Mazini, pela ajuda prestada para a realização desse trabalho. Foram tantas caronas! Mas delas saíram novas e eternas amizades. Desejo a vocês muito sucesso e que Deus revista as vossas inteligências com muita sabedoria. Muito obrigado.

Às minhas amigas, Josiane Braga Scarpa e Marcela Lumi Myasaki, pela agradável convivência ao longo de nossa trajetória. Desejo-lhes muitas felicidades no caminho que escolherem. Que Deus as abençoe sempre.

“A amizade é um amor que nunca morre.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Diretora e Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Vice-Diretor.

Ao Prof. João Carlos Silos Moraes, pela sua contribuição para o êxito deste trabalho.

Aos funcionários da disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luís da Silva, pelo auxílio indispensável e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório que sempre incentivaram, ajudaram e compreenderam o esforço na realização desse trabalho, Jackeline, Marcelle, Danielle Camara, Daniela Oliveira, Michelle, Luciene, Isabeli, Carol Lodi, Marcelo, Lidiane, Gabriel, Adelisa. Agradeço a todos por terem compartilhado comigo essa caminhada.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela atenção e disponibilidade que nos recebem.

Aos Demais Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos transmitidos durante a graduação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho.

A todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Minha eterna gratidão...

ACIMA DE TUDO O AMOR

Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos, se eu não tivesse o amor, seria como sino ruidoso ou como címbalo estridente.

Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transpor montanhas, se eu não tivesse o amor, eu não seria nada.

Ainda que eu distribuísse todos os meus dons aos famintos, ainda que entregasse o meu corpo às chamas, se eu não tivesse o amor, nada disso me adiantaria.

O amor é paciente, o amor é prestativo; não é invejoso, não se ostenta, não se incha de orgulho. Nada faz de inconveniente, não procura seu próprio interesse, não se irrita, não guarda rancor.

Não se alegra com a injustiça, mas se regozija com a verdade.

Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais passará.

Agora, portanto, permanecem estas três coisas: a fé, a esperança e o amor. A maior delas, porém, é o amor.

(1Cor 13, 1-8; 13)

SOUZA, J. A. S. **Ação do trimetafosfato de sódio sobre a hidroxiapatita durante ciclagem de pH: Análise Bioquímica, por Espectrometria de Infravermelho e Difração de Raios-X.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

Estudos mostram que o trimetafosfato de sódio (TMP) tem ação preventiva na desmineralização do esmalte dentário quando associado a baixas concentrações de fluoreto (F), porém o mecanismo pelo qual o TMP age no esmalte ainda é incerto. O objetivo deste trabalho foi analisar a ação do TMP e/ou F sobre a hidroxiapatita (HA). A HA foi preparada pelo método de precipitação (nitrato de cálcio e fosfato de amônio) e maturada durante 7 dias (37 °C). O precipitado foi separado por filtração, seco (70 °C) e triturado até obter grãos entre 75 e 53 µm de diâmetro. Amostras de HA (n=5) foram suspensas em soluções (100 mL) que definiram os seguintes grupos: placebo (água deionizada), 500 (500 µg F/mL), 1100 (1100 µg F/mL), TMP 1%, TMP 3%, 500 TMP 1% e 500 TMP 3%. A ciclagem de pH foi realizada 3 vezes reduzindo o pH das soluções até 4,0 e, após 30 minutos, elevando para 7,0. Após 24 horas de maturação, o precipitado foi seco a 70 °C por 24 horas, triturado em um pó fino (53 µm) e caracterizado por Espectrometria de Infravermelho (FTIR) e Difração de Raios-X (DRX), assim como análise de F, Cálcio (Ca) e Fósforo (P) sendo os dados submetidos à Análise de Variância, seguida pelo teste de Bonferroni ($p<0,05$). A DRX mostrou picos mais definidos no grupo 1100 quando comparado aos demais. A associação F (500 µg F/mL) ao TMP 1% ou 3% produziu picos mais definidos quando comparado a HA preparada (HAp), TMP 1% e TMP 3%. O FTIR mostrou que a intensidade das bandas de fosfatos foi maior nos grupos fluoretados em relação ao placebo. Menor intensidade das bandas de carbonato foi observada nos grupos 1100 e 500 TMP 1%. A associação TMP 1% ou 3% à solução de 500 aumentou quatro vezes a formação de CaF_2 quando comparada ao grupo 500 e duas vezes em relação ao 1100 ($p<0,05$). Os grupos 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3% apresentaram relação Ca/P mais próxima a da HA hígida. Conclui-se que a associação F/TMP aumentou a concentração de F (CaF_2) na estrutura da HA e favoreceu a precipitação de uma HA mais estável.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Trimetafosfato. Desmineralização. Fluoreto.

SOUZA, J. A. S. Sodium trimetaphosphate effect on hydroxyapatite submitted to pH-cycling conditions: Biochemical, Infrared Spectroscopy and X-ray Diffraction Analyses.

2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

Studies have shown that sodium trimetaphosphate (TMP) has a preventive effect in dental enamel demineralization when associated with low fluoride (F) concentrations, but the mechanisms by which TMP acts in enamel is still uncertain. The aim of this study was to analyze the effect of TMP and/or F in hydroxyapatite (HA). HA was prepared by precipitation (calcium nitrate and ammonium phosphate) and matured during 7 days (37 °C). The precipitate was separated by filtration, dried (70 °C) and ground to obtain particles between 75 and 53 µm in diameter. Synthetic HA (n=5) was suspended in TMP solutions (100 mL) and divided into the following groups: placebo (deionizer water), 500 (500 µg F/mL), 1,100 (1,100 µg F/mL), TMP 1%, TMP 3%, 500 TMP 1% and 500 TMP 3%. The pH-cycling regimen was repeated 3 times, by lowering the solution's pH to 4.0 and, after 30 minutes, rising to pH 7.0 (37 °C). After 24 of maturation, the precipitate was dried at 70 °C for 24 hours, ground into a fine powder (53 µm in diameter) and characterized by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray Diffraction (DRX), as well as F, calcium (Ca) and phosphorous (P) analyses. Data was submitted to ANOVA, followed by Bonferroni's test ($p<0,05$). Results of DRX showed more defined peaks for the group 1,100, when compared to the others. The association of F (500 µg F/mL) with TMP at 1 or 3% resulted in more defined peaks when compared to HA prepared (HAp), TMP 1% and TMP 3%. FTIR analysis showed phosphate bands with higher intensity for the fluoridated groups when compared with the placebo. Peaks were less pronounced in the groups 1,100 and 500 TMP 1%. The association of TMP 1% or 3% to 500 µg F/mL solution increased CaF_2 formation 4 and 2-fold, respectively when compared to groups 500 and 1,100 ($p<0,05$). Groups 1,100, 500 TMP 1% and 500 TMP 3% presented Ca/P molar ratios closer to pure HA. It was concluded that the association of fluoride and TMP increased the concentration of F (CaF_2) in the HAp structure and promoted the precipitation of more stable HA.

Keywords: Hydroxyapatite. Trimetaphosphate. Demineralization. Fluoride.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – (A) Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp) e hidroxiapatita da base de dados CRYSTMET. (B) Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp), HA sem tratamento (HA_{desm}) e HAp tratada com 1100 µg F/g (1100). 27
- Figura 2** – Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp), HA tratada com TMP a 1% (TMP 1%) e HA tratada com 500 µg F/g associado ao TMP 1% (500 TMP 1%). 28
- Figura 3** – Representação gráfica do espectro no infravermelho transformado de Fourier de acordo com os grupos após a ciclagem de pH: A= HAp; B= HA_{desm}; C= TMP 1%; D= TMP 3%; E= 500 µg F/g; F= 1100 µg F/g; G= 500 TMP 1%; H= 500 TMP 3%. 29
- Figura 4** – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos (PO_4^{3-}) e hidroxila (OH^-) em relação a HA submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HA_{desm}). 30
- Figura 5** – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos (CO_3^{2-}) e água (H_2O) em relação à HA submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HA_{desm}). 31
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios ($\pm$ DP, n=5) das concentrações (mg/g) de fluoreto ligado fracamente (CaF_2) e fortemente a HA (FHA) de acordo com os grupos. 32

Tabela 2 – Valores médios ($\pm$ DP, n=5) das concentrações (mg/g) de cálcio e fósforo e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos. 32

LISTA DE ABREVIATURAS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ	Micro
$\mu\text{g F/g}$	Microgramas de fluoreto por grama
μm	Micrometros
Ca	Cálcio
CaF_2	Fluoreto de Cálcio
cm^{-1}	Centímetro
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
dp	Desvio padrão
DRX	Difração de Raios-X
F	Fluoreto
FA	Fluorapatita
FHA	Flúor-hidroxiapatita (Fluoreto fortemente ligado)
FTIR	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy
g	Gravidade
HA	Hidroxiapatita
HAp	Hidroxiapatita preparada
HAdesm	Hidroxiapatita sem tratamento (Controle Negativo)
HCl	Ácido Clorídrico
H_2O	Água
HPO_4^{2-}	Hidrogeno fosfato
KOH	Hidróxido de potássio
mL	Mililitros
mol/L	Molaridade
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OH^-	Íon hidroxila
P	Fósforo
PO_4^{3-}	Íon fosfato

pH =	Potencial hidrogeniônico
s =	Segundos
TISAB =	Total Ionic Strenght Adjustment Buffer
TMP =	Trimetafosfato de sódio
u.a =	Unidade Aleatória
v_1 =	Estiramento simétrico
v_2 =	Vibração angular
v_3 =	Estiramento assimétrico
v_4 =	Vibração angular
α =	Alfa
KV =	Kilovolt
mA =	Miliamper
θ =	Teta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Síntese da Hidroxiapatita.....	22
3.2 Ciclagem de pH e tratamento.....	22
3.3 Difração de Raios-X.....	23
3.4 Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier.....	23
3.5 Análise de Cálcio e Fósforo na Hidroxiapatita.....	23
3.6 Análise de Fluoreto ligado fracamente (CaF ₂) e fortemente (FHA) a Hidroxiapatita.....	24
3.7 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os fosfatos de cálcio sintéticos e naturais são amplamente empregados na medicina e na odontologia para a reparação de perdas de tecidos ósseos devido à sua alta compatibilidade. Dentre estes fosfatos, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – HA) possui grande importância, pois é o que apresenta maior estabilidade termodinâmica próxima da temperatura ambiente (Andrade *et al.*, 1999). Um grande número de técnicas tem sido desenvolvido para a síntese do pó de HA devido as crescentes aplicações (Gonzalez, 1971). Um dos métodos mais utilizados é a técnica da precipitação, que envolve reações via úmida entre percussores de cálcio (Ca) e fósforo (P) com controle de temperatura e pH da solução.

O esmalte dentário pode estar susceptível a dois tipos de desmineralização: provocada por ácidos provenientes do biofilme dentário (microrganismos), denominada de cárie dentária, ou por ácidos advindos da alimentação, medicamentos, meio ambiente ou ácidos gástricos, chamada de erosão dentária (Imfeld, 1996; Wiegand *et al.*, 2007). Isto produz lesões diferentes na estrutura do esmalte e que respondem de formas diferentes aos tratamentos. Observa-se que os dentifrícios fluoretados com 1100 µg F/g apresentam efeito anticárie, porém mostram efeito limitado sobre a erosão dentária (Magalhães *et al.*, 2007; Moretto *et al.*, 2010; Ponduri *et al.*, 2005).

A cárie dentária é, ao nível de estrutura dura, a simples dissolução do esmalte dentário na saliva. O componente estrutural inorgânico do esmalte na qual constitui 95% é predominantemente HA. Portanto, manter esse componente na estrutura dentária, diminuindo a sua dissolução, seria uma das formas de se diminuir a progressão da cárie dentária. O uso de produtos fluoretados tem sido apontado como o principal responsável pelo declínio na prevalência da cárie (Cury *et al.*, 2004; Stookey *et al.*, 2004) bem como do aumento na incidência da fluorose (Cochran *et al.*, 2004; Mascarenhas, 2000). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas diretrizes para a promoção da saúde bucal e o reparo das lesões cariosas, sem causar danos aos indivíduos.

Alguns trabalhos têm demonstrado que sais de fosfato têm ação anticariogênica. A suplementação com sais de fosfato teve início através da adição em dietas e gomas de mascar (Larson *et al.*, 1972; Vogel *et al.*, 2000). Dentre os vários sais de fosfato com atividade anticariogênica (Gonzalez, 1971; Gonzalez *et al.*, 1973; Harris *et al.*, 1967; Ständtler *et al.*, 1996), o trimetafosfato de sódio (TMP) parece ser o mais ativo (Harris *et al.*, 1967).

O TMP é um composto cíclico que pode ser hidrolisado através de uma base ou um ácido forte (Gonzalez, 1971). Sugere-se que o TMP atue predominantemente sob forma inalterada, através da deposição na superfície e/ou pela sua incorporação ao esmalte. Quando incorporado à HA altera as trocas de minerais com o meio (MacGaughey e Stowell, 1977), diminuindo a solubilidade tornando a deposição de fosfatos de cálcio na superfície do esmalte mais lenta (MacGaughey, 1983), favorecendo a formação de compostos químicos mais semelhantes à HA e fluorapatita (FA) (Gonzalez, 1971).

Roberts (1995) demonstrou o efeito do pré-tratamento com TMP sobre a solubilidade da HA, associado ou não ao fluoreto de sódio (F) em diferentes concentrações que variaram de 0 a 5 µg F/g, e concentração de TMP de 5 mmol/L. A HA tratada foi exposta a solução tampão acetato 0,1 mol/L pH 5,0. Após 5 minutos, as amostras foram filtradas e a análise de Ca foi realizada através da espectroscopia de absorção atômica. O efeito do pré-tratamento da HA com F em baixos níveis foi reduzir sua solubilidade rapidamente. Acima de 1 µg F/g, o efeito do F formou um platô. Com TMP, na concentração de 5,0 mmol/L e ausência de F, foi observada uma diminuição na solubilidade da HA. Quando F foi adicionado à solução de pré-tratamento, a dose-resposta foi semelhante àquela na ausência de TMP. Como a diminuição da solubilidade devido à presença de TMP foi mantida mesmo quando a dose-resposta do F foi máxima, pôde-se concluir que o efeito do TMP foi adicionado ao do F.

A adição de TMP a dentifrícios fluoretados de baixa concentração de F (500 µg F/g) apresentou ação anticariogênica semelhante a um dentifrício padrão de 1100 µg F/g (Takeshita *et al.*, 2009a). Esta associação aumenta o F e o Ca presente no esmalte, apresentando resultados semelhantes ao dentifrício padrão. Em um estudo *in situ*, Takeshita *et al.* (2009b) demonstraram que o dentifrício com 500 µg F/g associado ao TMP 1% apresentou menor perda mineral quando comparado ao padrão 1100 µg F/g. As concentrações de F e Ca presente no esmalte foram semelhantes ao dentifrício 1100 µg F/g, ao mesmo tempo que promoveu menor concentração de polissacarídeos insolúveis no biofilme dentário. Entretanto, a quantidade de P no esmalte e no biofilme dentário não aumentou com a suplementação de TMP no dentifrício de baixa concentração de F. O TMP é um sal de fosfato inorgânico, solúvel em água, mas não sofre hidrólise no biofilme dentário; além disso, a hidrólise químico-física não produz a liberação de fosfato ao meio (Delbem, 2009). O desenvolvimento de dentifrícios com baixa concentração de F tem impacto direto na redução da toxicidade

crônica (Fluorose dentária) que causa uma redução na mineralização do esmalte/dentina de dentes permanentes durante sua mineralização (Mascarenhas, 2000).

Considerando-se que o mecanismo de ação do TMP adicionado ao dentifrício sobre o esmalte dentário ainda não está bem esclarecido, a análise do efeito do TMP sobre a HA seria importante para verificar as alterações que podem ocorrer na combinação dos dois elementos e o efeito do TMP sobre a deposição de CaF_2 e FHA.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente trabalho foi analisar a ação do Trimetafosfato de Sódio (TMP) sobre a HA preparada pelo método de precipitação quando submetida à ciclagem de pH através da análise de Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) e dosagem de F, Ca e P presentes na HA.

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Síntese da Hidroxiapatita (ANEXO A)

A síntese da HA foi realizada baseando-se no estudo de Qu e Wei (2005). Para isto, soluções de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich Co., USA) 1 mol/L (300 mL) e de fosfato de amônio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma-Aldrich Co., USA) 0,3 mol/L (600 mL) foram preparadas. O pH de ambas as soluções foi ajustado entre 10-12 utilizando hidróxido de amônia (29,5%). A solução de fosfato de amônio dibásico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio lentamente (2 a 5 mL/minuto), sob agitação constante e à temperatura de 37 °C, para facilitar a precipitação de HA bem cristalizadas. A maturação dos precipitados ocorreu durante 7 dias à temperatura de 37 °C, mantendo o pH da solução ao redor de 10, em Becker, para o crescimento dos cristais e a formação única de fase HA. O precipitado foi separado por filtração utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mmHg), lavado repetidamente com água deionizada (250 mL/0,5 g de HA) e seco em estufa por 24 horas a 80 °C. Decorrido esta fase, o precipitado foi triturado utilizando um almofariz de ágata e grãos entre 75 e 53 µm de diâmetro foram selecionados utilizando peneiras granulométricas. Duas alíquotas de aproximadamente 0,5 g foram separadas para caracterização pela análise de DRX, FTIR e análise de F, Ca e P na HA.

3.2 Ciclagem de pH e tratamento (ANEXO A)

Cinco ciclagens de pH foram realizadas para cada grupo testado. Para tanto, soluções (100 mL) de TMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, Sigma-Aldrich Co., USA) nas concentrações de 1,0 e 3,0% (Takeshita *et al.*, 2009) foram preparadas, associadas ou não ao fluoreto de sódio (500 µg F/g). Uma solução com 1100 µg F/g (NaF, Merck, Alemanha) foi utilizada como controle positivo (CP). O pó da HA (0,5 g) produzido foi suspenso em cada solução de TMP e/ou F preparada (n=5), durante 18 horas, mantendo pH 7,0. Cinco alíquotas de HA também foram suspensas em água destilada/deionizada, considerando-as como controle negativo (CN).

Após este período, o pH das soluções foi reduzido lentamente até 4,0, utilizando ácido nítrico (HNO_3 , Merck, Alemanha) 1 mol/L. Decorrido 30 minutos, o pH de cada solução foi elevado para 7,0, adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH, Merck, Alemanha) 1 mol/L. O processo de ciclagem de pH foi repetido 3 vezes, à temperatura de 37 °C (Qu e Wei, 2005). A

maturação dos precipitados foi realizada durante um dia a temperatura de 37 °C. Após a ciclagem de pH, o precipitado foi filtrado utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mmHg) e lavado subsequentemente cinco vezes com água deionizada para eliminar resíduos remanescentes de sódio na solução (Wei *et al.*, 2003). O precipitado foi seco em estufa por 24 horas a 80 °C, triturado utilizando almofariz e pistilo de ágata e os grãos com 53 µm de diâmetro foram selecionados utilizando peneiras granulométricas, para análise de DRX, FTIR e determinação de F, Ca e P no pó de HA.

3.3 Difração de Raios-X (DRX)

Duas amostras da HA obtida, que foram submetidas à ciclagem de pH e tratamento, foram preparadas e acondicionadas em porta amostra para a análise de DRX. Os dados da DRX da amostra de HA foram obtidos de um difratômetro da marca HGZ/4, com um gerador Seifert ID 3000, usando-se a radiação de CuK α , com monocromador de grafite, sendo a tensão e a corrente utilizadas 40 KV e 40 mA, respectivamente. As amostras foram examinadas de 10° a 80°, varredura angular 2 θ variando de 10 a 100°, com o passo de 0,02° e o tempo de 1 s.

3.4 Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) (ANEXO B)

Duas amostras da HA ciclada de cada grupo foram preparadas e acondicionadas em porta amostra para a análise de FTIR. Os espectros das amostras foram obtidos por meio de refletância difusa, utilizando espectrofotômetro da Marca Nicolet, modelo Magna 760, varredura espectral de 64, com frequência entre 4500 a 450 cm⁻¹ e resolução de 2 cm⁻¹. Após a obtenção dos espectros, estes foram normalizados e as alturas dos picos dos grupos experimentais foram comparadas com as do grupo HA_{desm}.

3.5 Análise de Cálcio e Fósforo na Hidroxiapatita (ANEXO C)

Para a determinação de Ca e P, 10 mg de HA ciclada das cinco amostras de cada grupo foi pesada em balança analítica, em frascos de poliestireno cristal (J-7, Injeplast, PR, Brasil) e foi adicionado ao frasco 0,5 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol/L. Após agitação durante 1 hora (Mesa Agitadora Orbital, TE-141, Tecnal), foi acrescido ao frasco 0,5 mL de TISAB II (Total Ionic Strength Adjustment Buffer, pH 5,0) modificado com 20 g NaOH/L.

A concentração de Ca foi analisada através do método colorimétrico (espectrofotômetro – HITACHI U-2000) da cresolfaleína (Kit Bioclin). Para isso, a amostra foi diluída 10 vezes utilizando 0,1 mL das amostras e 0,9 mL de água deionizada. Desse volume foi coletado 0,1 mL e acrescentou-se 1,0 mL do reagente de trabalho (tampão + reagente de cor) e após 20 minutos, iniciou-se o teste colorimétrico no espectrofotômetro. O zero do aparelho foi ajustado com água deionizada e a leitura das amostras foi realizada em duplicata. O P foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow (1925).

3.6 Análise de Fluoreto ligado fracamente (CaF_2) e fortemente (FHA) a Hidroxiapatita (ANEXO C)

Para análise do CaF_2 e FHA, 10 mg do pó de HA ciclada das cinco amostras de cada grupo foi pesado em microtubos de polipropileno (1,5 mL) e acrescentou-se 0,5 mL de KOH 1,0 mol/L para extração do CaF_2 , seguindo o método de Caslavská *et al.* (1975). Após 24 horas de agitação (Mesa Agitadora Orbital, TE-141, Tecnal), a suspensão foi centrifugada a 2900xg por 20 minutos. Uma alíquota de 0,3 mL do sobrenadante foi neutralizada com 0,3 mL de TISAB II modificado com HCl 1,0 mol/L e o CaF_2 foi determinado, como descrito anteriormente, utilizando 80 μL da amostra em duplicata. A FHA foi mensurada após descartar o sobrenadante restante e o precipitado foi lavado 3 vezes em água destilada/deionizada e uma vez em metanol. Após evaporação do metanol, 0,25 mL de solução de HCl 1,0 mol/L foi adicionado ao microtubo, agitado durante 1 hora e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL de TISAB II modificado com 20 g NaOH/L. As amostras (80 μL) foram analisadas, em duplicata, para determinação da FHA como descrito anteriormente.

Para dosagem de F (CaF_2 e FHA) foi utilizado o eletrodo específico (Orion 9409) e eletrodo de referência invertido (Orion 900100) acoplado a um analisador de íons (Orion 720A+). O eletrodo foi previamente calibrado com padrões contendo 0,045 a 0,720 $\mu\text{g F/g}$, nas mesmas condições das amostras. Foi pipetado uma alíquota de 80 μL da amostra e a leitura foi realizada em duplicata. Os resultados foram expressos em mg F/g.

3.7 Análise Estatística

Os dados da espectrometria no infravermelho foram descritos em função da presença e intensidade (%) das bandas de acordo com os grupos submetidos à ciclagem de pH em relação

à HA sem tratamento (HA_{desm}). Os resultados da concentração (mg/g) de F (CaF₂ e FHA), Ca e P na HA foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Os dados de Ca apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados de F e P foram submetidos à análise paramétrica, como descrita anteriormente, após transformação logarítmica. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GMC versão 2003 com limite de significância de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

O padrão da DRX obtido para a hidroxiapatita preparada (HAp) está apresentado na figura 1. Este padrão foi comparado com o padrão da hidroxiapatita da base de dados CRYSTMET, confirmando que o material obtido pelo método descrito neste estudo é somente HA (Figura 1A). A Figura 1B mostra o difratograma obtido para os grupos HAp, HA sem tratamento (*HAdesm*) e 1100. O padrão da DRX do grupo *HAdesm* é semelhante ao da HAp (Figura 1B). O grupo 1100 apresentou os picos mais definidos do que os grupos HAp e *HAdesm*, indicando que a cristalinidade da HAp aumentou na presença de F.

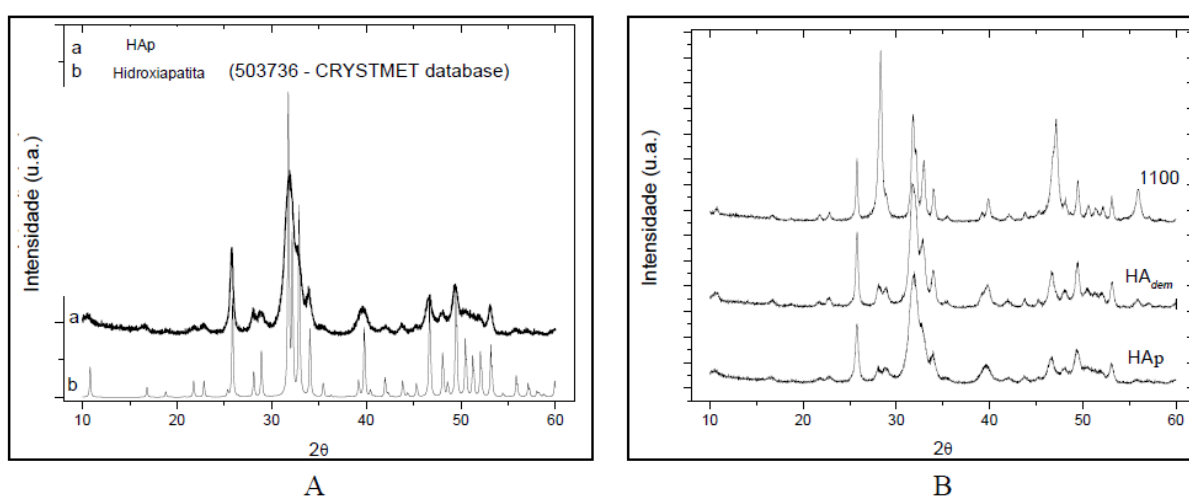


Figura 1 – (A) Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp) e hidroxiapatita da base de dados CRYSTMET. (B) Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp), HA sem tratamento (*HAdesm*) e HAp tratada com 1100 µg F/g (1100).

O padrão da DRX dos grupos TMP 1% e TMP 3% apresentaram-se similares e não foram diferentes da HAp, assim como o tratamento com 500 µg F/g associado ao TMP a 1% ou a 3% produziu picos mais definidos do que a HAp, TMP 1% e TMP 3% indicando uma melhora na cristalinidade da HA. Os padrões da DRX para os grupos TMP 3% e 500 TMP 3% foram exemplificados na figura 2 com os grupos TMP 1% e 500 TMP 1%.

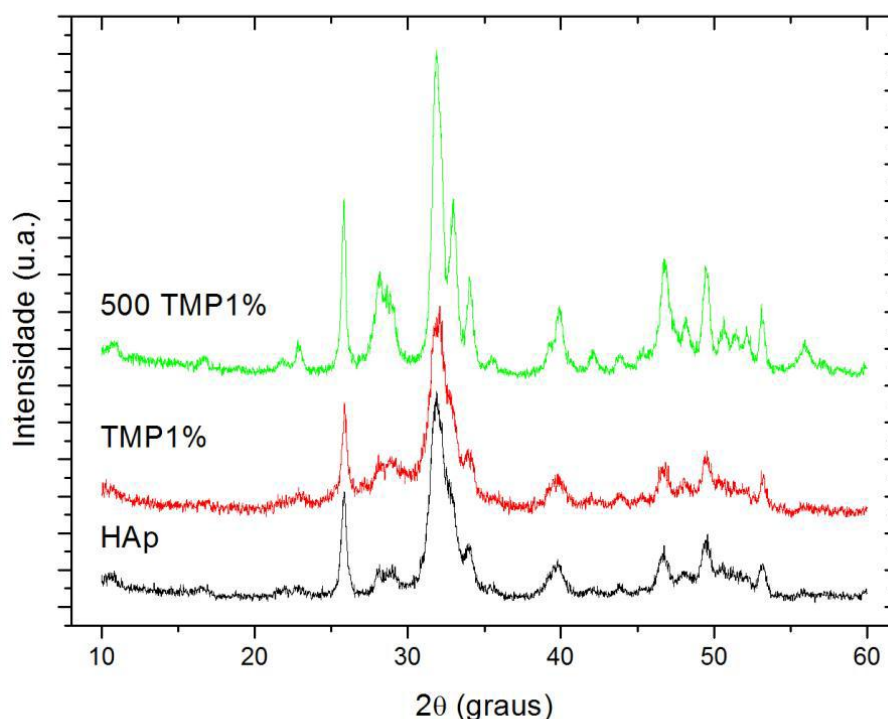


Figura 2 – Padrão da DRX da hidroxiapatita preparada (HAp), HA tratada com TMP a 1% (TMP 1%) e HA tratada com 500 µg F/g associado ao TMP 1% (500 TMP 1%).

As bandas características da HA correspondente aos grupos funcionais dos fosfatos (PO_4^{3-}), hidroxilas (OH^-) e água (H_2O) foram observadas confirmando a obtenção da fase sólida (Figura 3). O grupo fosfato apresentou 2 bandas: uma nas regiões de 1086-1088 (ν_1) e 1166-1217 cm^{-1} (ν_3) e outra nas regiões de 584-598 (ν_2) e 619-638 cm^{-1} (ν_4). As bandas da OH^- foram observadas nas regiões de 642-663 e 3568-3572 cm^{-1} (Figura 3).

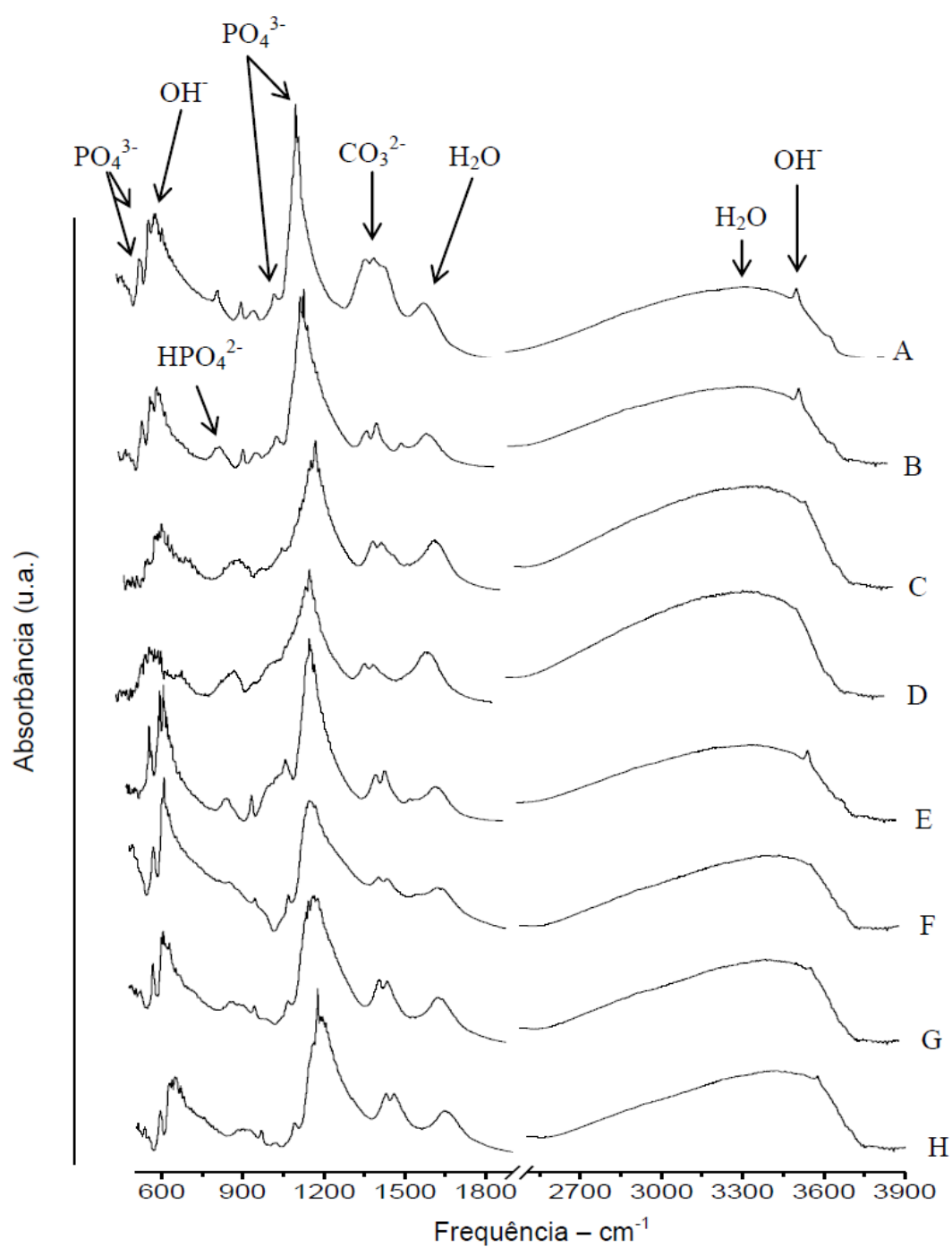


Figura 3 – Representação gráfica do espectro no infravermelho transformado de Fourier de acordo com os grupos após a ciclagem de pH: A= HAp; B= HA_{desm}; C= TMP 1%; D= TMP 3%; E= 500 μg F/g; F= 1100 μg F/g; G= 500 TMP 1%; H= 500 TMP 3%.

A espectrometria no infravermelho mostrou alteração na intensidade das bandas (cm^{-1}) de PO_4^{3-} (584-598, 619-638, 1086-1088 e 1166-1217) e OH^- (642-663 e 3568-3572) em

relação a *HAdesm*. A intensidade das bandas de PO_4^{3-} (584-598, 619-638 e 1086-1088) foi maior nos grupos fluoretados (500, 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3%) quando comparado ao grupo *HAdesm* (Figura 4). Menores intensidades das bandas de PO_4^{3-} nas regiões 584-598, 619-638 e 1166-1217 cm^{-1} foram observadas nas HA tratadas com TMP 1 e 3% (Figura 4). Apenas a HA tratada com a solução de 500 μg F/g associado ao TMP 3% apresentou maior intensidade da banda de PO_4^{3-} na região de 1166-1217 cm^{-1} comparado aos demais grupos. As bandas OH^- nas regiões 642-663 e 3568-3572 cm^{-1} apresentaram menor intensidade nos grupos tratados (Figura 4).

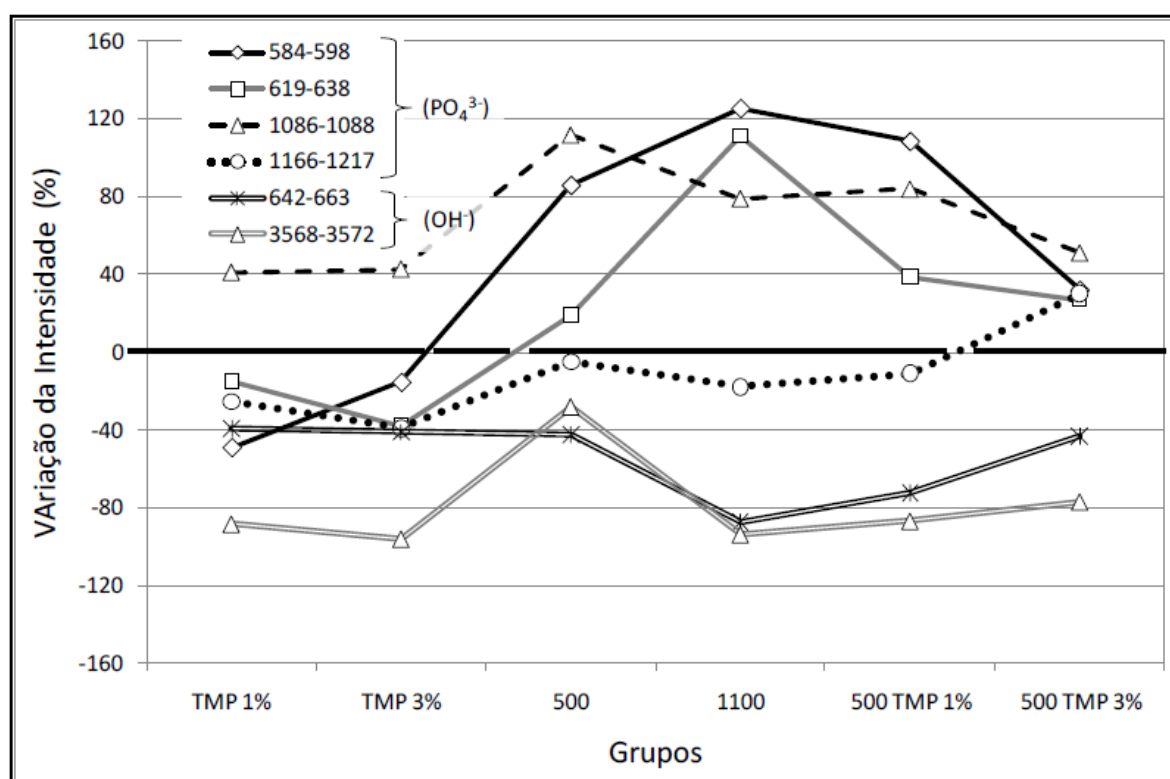


Figura 4 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos (PO_4^{3-}) e hidroxila (OH^-) em relação a HA submetida à ciclagem de pH sem tratamento (*HAdesm*).

As bandas nas regiões 1421-1427 e 1452-1458 cm^{-1} referem-se ao grupo carbonato (CO_3^{2-}) que apresentaram menor intensidade nos grupos tratados (Figura 5). Menor intensidade foi observada nos grupos 1100 e 500 TMP 1%. As bandas nas regiões de 1639-1651 e 3350-3454 cm^{-1} correspondem a traços de H_2O na estrutura dos cristais de HA. Sua intensidade foi menor nos grupos com F (Figura 5).

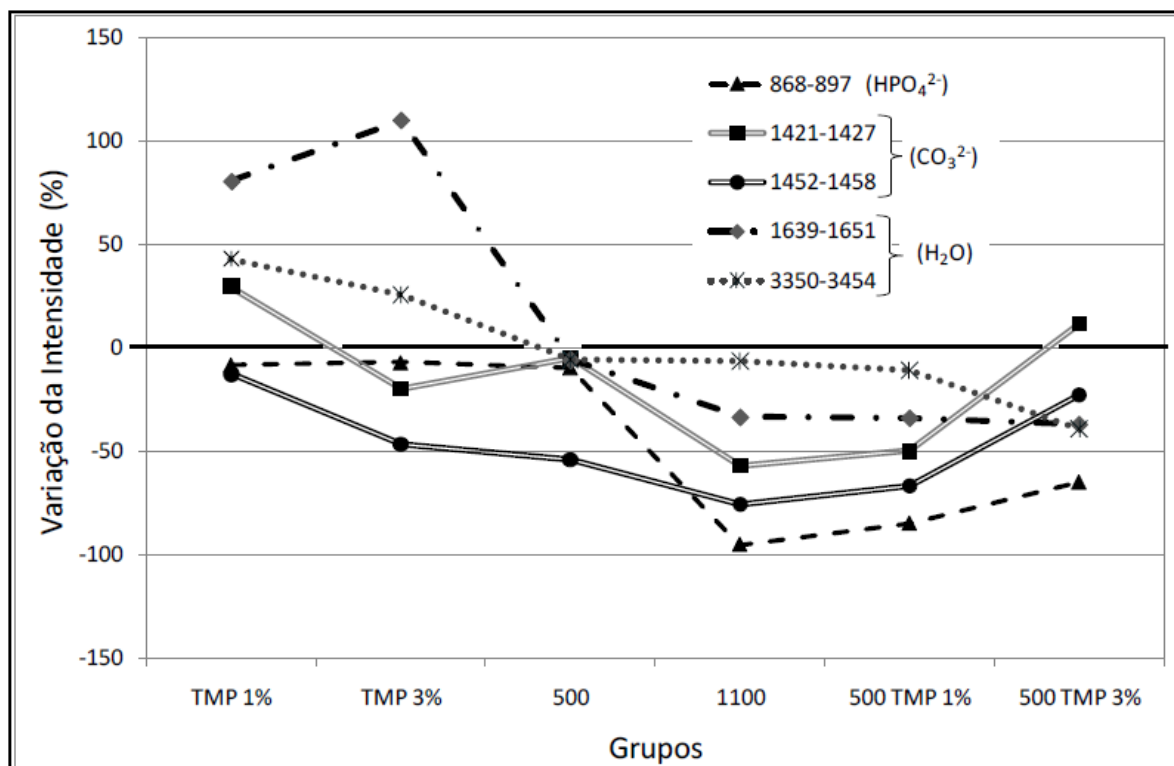


Figura 5 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos (CO_3^{2-}) e água (H_2O) em relação à HA submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HA_{desm}).

As concentrações de F na HA, fracamente (CaF_2) e fortemente (FHA) ligado, são apresentadas na Tabela 1. Os grupos com F apresentaram maiores valores de CaF_2 ou FHA do que os grupos sem F ($p < 0,05$). Os grupos 500 TMP 1% e 500 TMP 3% apresentaram valores de CaF_2 semelhantes entre si e maiores do que os grupos 500 e 1100. A associação TMP 1% ou 3% à solução de 500 aumentou quatro vezes a formação de CaF_2 quando comparada ao grupo 500 e duas vezes em relação ao 1100 ($p < 0,05$). O grupo 1100 apresentou valores maiores de FHA dentre os grupos ($p < 0,05$). Os grupos 500 e 500 TMP 1% apresentaram valores de FHA semelhantes ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Valores médios ($\pm$ DP, n=5) das concentrações (mg/g) de fluoreto ligado fracamente (CaF_2) e fortemente a HA (FHA) de acordo com os grupos

Grupos	Análise - Fluoreto (mg/g)	
	" CaF_2 "	FHA
HAp	$8,4 \pm 1,8^a$	$1,2 \pm 0,2^a$
HA_{desm}	$5,0 \pm 1,4^b$	$1,2 \pm 0,3^a$
500	$7.719,1 \pm 374,3^d$	$5.580,3 \pm 688,2^d$
1100	$12.518,7 \pm 717,7^e$	$9.871,5 \pm 1.717,2^e$
TMP 1%	$3,1 \pm 0,9^c$	$1,6 \pm 0,1^b$
TMP 3%	$5,2 \pm 1,1^b$	$2,3 \pm 0,5^c$
500 TMP 1%	$29.386,6 \pm 999,2^f$	$5.521,2 \pm 1.921,2^d$
500 TMP 3%	$29.064,3 \pm 4.255,5^f$	$2.926,9 \pm 716,2^f$

Valores seguidos por letras distintas em cada análise mostram diferenças estatísticas entre os grupos (Bonferroni; $p < 0,05$).

As concentrações de Ca e P na HA são apresentadas na Tabela 2. Os grupos 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3% apresentaram concentrações similares de Ca ($p > 0,05$) e maiores que os demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3% apresentaram relação Ca/P molar mais próxima a da HA (HAp) hígida (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios ($\pm$ DP, n=5) das concentrações (mg/g) de cálcio e fósforo e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos

Grupos	Análise - Cálcio e Fósforo (mg/g)		Ca/P molar
	Cálcio	Fósforo	
HAp	$373,9 \pm 27,1^a$	$202,4 \pm 12,3^a$	$1,56 \pm 0,09^{a,c}$
HA_{desm}	$237,5 \pm 21,6^b$	$194,2 \pm 7,3^{a,d}$	$1,15 \pm 0,08^b$
TMP 1%	$334,6 \pm 20,5^c$	$153,6 \pm 14,1^b$	$1,61 \pm 0,07^a$
TMP 3%	$268,5 \pm 9,9^d$	$137,3 \pm 8,1^c$	$1,49 \pm 0,08^{a,c}$
500 $\mu\text{g F/g}$	$317,0 \pm 4,4^c$	$184,9 \pm 12,8^d$	$1,43 \pm 0,08^c$
1100 $\mu\text{g F/g}$	$362,9 \pm 8,8^a$	$147,0 \pm 11,5^{b,c}$	$1,68 \pm 0,08^a$
500 TMP 1%	$395,2 \pm 59,3^a$	$172,2 \pm 7,6^e$	$1,60 \pm 0,01^a$
500 TMP 3%	$362,9 \pm 19,6^a$	$171,8 \pm 16,9^e$	$1,57 \pm 0,02^{a,c}$

Valores seguidos por letras distintas em cada análise mostram diferenças estatísticas entre os grupos (Bonferroni; $p < 0,05$).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os achados dos estudos de Takeshita *et al.* (2009a) mostram que a adição de TMP a dentifrícios fluoretados de baixa concentração de F (500 $\mu\text{g F/g}$) apresentam ação anticariogênica semelhante a um dentifrício padrão de 1100 $\mu\text{g F/g}$. A eficácia do TMP pode estar associada à adsorção a superfície do esmalte e a redução da desmineralização (MacGaughey e Stowell, 1977) e a maior presença de F e Ca no esmalte quando associado ao F (Takeshita *et al.*, 2009), mas sua ação sobre a estrutura do esmalte não está bem estabelecida. No presente estudo foi utilizado pó de HA e um modelo *in vitro* para simular dissolução e precipitação para verificar como o TMP age sobre a HA.

Os fosfatos de cálcio sintéticos e naturais são amplamente empregados na medicina e na odontologia para a reparação de perdas de tecidos ósseos devido à sua alta compatibilidade. Dentre estes fosfatos, a HA possui grande importância, pois é o que apresenta maior estabilidade termodinâmica próxima da temperatura ambiente (Andrade *et al.*, 1999). Um grande número de técnicas tem sido desenvolvido para a síntese do pó de HA devido as crescentes aplicações (Gonzalez, 1971). Um dos métodos mais utilizados é a técnica da precipitação, que envolve reações via úmida entre percussores de Ca e P com controle de temperatura e pH da solução.

De acordo com Rintoul *et al.* (2007) e Sundaram *et al.* (2008), a presença do grupo funcional OH^- na frequência 642-663 cm^{-1} indica a precipitação de HA. Apesar do modelo de ciclagem de pH produzir uma redução na concentração de Ca e na proporção molar Ca/P no grupo HAdesm (Tabela 2), não houve alteração no arranjo cristalino básico (Figura 1B). Ishikawa *et al.* (1993) mostraram que HAp deficiente em Ca apresentou o mesmo arranjo cristalino que a HAp estequiométrica.

A incorporação de íons F a estrutura da apatita aumenta a cristalinidade e a proporção Ca/P (van der Hoek, 1980). O grupo 1100 apresentou uma maior cristalinidade (Figura 1B) e uma maior concentração de Ca (Tabela 2) do que o grupo HAdesm , de acordo com Jha *et al.* (1997) e Sundaram *et al.* (2008). A redução dos grupos funcionais OH^- pode significar que o F está ligado ao íon OH^- sem substituí-lo, indicando a precipitação de uma HA fluoretada com alta proporção molar Ca/P e cristalinidade. A substituição parcial e completa ocorre quando se observa a presença de um pico na região 745-747 cm^{-1} (Caslavaska *et al.*, 1975; Sundaram *et al.*, 2008), o qual não foi observado nos grupos fluoretados. Porém, estes grupos apresentam fluoreto fortemente ligado a estrutura da HAp correlacionando-se ($r = -0,836$; $p = 0,038$) com

as variações da intensidade do grupo funcional OH^- na região $642\text{-}663\text{ cm}^{-1}$ (Figuras 3 e 4; Tabela 1). Já o fluoreto fracamente ligado (CaF_2) não apresentou correlação com as bandas OH^- .

A associação F ($500\text{ }\mu\text{g F/g}$) e TMP (1 e 3%) propiciou a formação de CaF_2 duas e quatro vezes maiores quando comparado aos grupos 1100 e 500, respectivamente (Tabela 1). Isto é um dos fatores que podem explicar os resultados obtidos por Takeshita *et al.* (2009) quando mostraram resultados semelhantes ou superiores utilizando dentifrícios com $500\text{ }\mu\text{g F/g}$ associado ao TMP (1 e 3%) comparado ao dentifrício com $1100\text{ }\mu\text{g F/g}$.

De acordo com Antonakosa *et al.* (2007) e Coates. (2000), os modos vibracionais dos PO_4^{3-} se mostram mais intensos em apatitas mais mineralizadas. No presente estudo, o aumento das bandas de PO_4^{3-} ($584\text{-}598\text{ (}\nu_2\text{)}$, $619\text{-}638\text{ (}\nu_4\text{)}$ e $1086\text{-}1088\text{ (}\nu_1\text{)}\text{ cm}^{-1}$) e a diminuição das bandas de CO_3^{2-} (ν_3) observado nos grupos com F (500, 1100, 500 TMP 1%, 500 TMP 3%; Figuras 3, 4 e 5) estão relacionados a uma apatita bem mineralizada (Antonakosa *et al.*, 2007; Coates. 2000). Embora o FTIR indique um aumento na intensidade das bandas de PO_4^{3-} , a análise química mostrou redução na concentração de P, principalmente, para os grupos fluoretados 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3%, sendo em maior grau no grupo 1100 (Tabela 2). Esta redução pode estar relacionada à ocorrência de P na forma de hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) ($868\text{-}897\text{ cm}^{-1}$) ocupando os sítios de PO_4^{3-} (Qu e Wei, 2005; Ögaard, 2001; Vilorio *et al.*, 2000), que corresponde à banda que mostrou uma redução maior na intensidade nos grupos fluoretados 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3% quando comparados aos grupos TMP 1% e TMP 3% (Figuras 3 e 5).

A adsorção de TMP a HA alterou o processo de desmineralização pela redução da perda de Ca para o meio. Durante a ciclagem de pH, o TMP reduziu a perda de Ca da estrutura da HA (Tabela 2). Quando associado ao F ($500\text{ }\mu\text{g F/g}$), a concentração de Ca presente na HA foi mantida similar aos grupos 1100 e HAp. A redução de P e a menor perda de Ca na HA podem explicar a melhor proporção molar Ca/P observada nos grupos 1100, 500 TMP 1% e 500 TMP 3%. Isto é outro fator que pode explicar os resultados obtidos por Takeshita *et al.* (2009).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o TMP associado a 500 µg F/g reduz a desmineralização da HA, diminuindo a perda de Ca, favorecendo a precipitação de um cristal com menor quantidade de impurezas como CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} . Assim, uma HA menos solúvel. Também, aumenta a formação de CaF_2 adsorvido à estrutura do cristal, mas não o fluoreto fortemente ligado ao cristal.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, M. C.; FIGUEIRAS, M. R. T.; OGASAWARA, T. Nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium pretreated in NaOH solution: Experiments and thermodynamic explanation. **J Biomed Mater Res.**, v. 46, p. 441-6, 1999.
 2. ANTONAKOSA, A.; LIAROKAPISA, E.; LEVENTOURI, T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. **Biomaterials.**, v. 28, p. 3043-3054, 2007.
 3. BARINOV, S. M. et al. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 17, p. 597-604, 2006.
 4. CAMPOS GM: GMC 2003 (computer program). Ribeirão Preto, School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.htm#gmc>, 2003.
 5. CASLAVSKA, V.; MORENO, E. C.; BRUDEVOLD, F. Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions. **Arch Oral Biol.**, v. 20, p. 333-9, 1975.
 6. COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. **In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of analytical chemistry.** New York: John Wiley & Sons., p. 10815-37, 2000.
 7. COCHRAN, J. A. et al. Development of a standardized method for comparing fluoride ingested from toothpaste by 1,5-3,5-year-old children in seven European countries. Part 2: ingestion. **Community Dent Oral Epidemiology.**, v.32, p. 47-53, 2004.
 8. CRUZ, R.; OGAARD, B.; RØLLA, G. Acquisition of alkalisoluble fluoride by enamel through treatment with NaF-containing toothpastes *in vitro*. **Scand J Dent Res.**, v. 100, p. 81-87, 1992.
 9. CURY, J. A. et al. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Braz Dent J.**, v. 15, p.167-274, 2004.
 10. DELBEM, A. C. B. Avaliação *in situ* da ação anticariogênica de dentifrícios com baixa concentração de fluoreto suplementados com fosfato. **Relatório Científico – FAPESP 2009.**, n. 2, Processo 2007/03660-0.
 11. FISKE, C. H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.
 12. GONZALEZ, M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. **J Dent Res.**, v. 50, p. 1056-1064, 1971.
-

13. GONZALEZ, M.; JEANSONNE, B. G.; FEAGIN, F. F. Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. **J Dent Res.**, v. 52, p. 261-266, 1973.
 14. HARRIS, R. S.; NIZEL, A. E.; WALSH, B. N. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. **J Dent Res.**, v. 46, p. 290-294, 1967.
 15. IMFELD, T. Dental erosion: Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci.**, v. 104, p. 151-155, 1996.
 16. JHA, L. J. et al. Preparation and characterization of fluoride-substituted apatites. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 8, p. 185-191, 1997.
 17. LARSON, R. H. et al. Continuous versus intermittent feedings of different levels of trimetaphosphate in relation to caries development in the rat. **Arch Oral Biol.**, v. 17, p. 1537-1541, 1972.
 18. MACGAUGHEY, C. Binding of polyphosphates and phosphates to hydroxyapatite, subsequent hydrolysis, phosphates exchange and effects on demineralization, mineralization and microcrystal aggregation. **Caries Res.**, v. 17, n. 3, p. 229-241, 1983.
 19. MACGAUGHEY, C.; STOWELL, E. C. Effects of Polyphosphates on the Solubility and Mineralization of HA: Relevance to a Rationale for Anticaries Activity. **J Dent Res.**, v. 56, n. 6, p. 579-587, 1977.
 20. MAGALHÃES, A. C. et al. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an *in situ/ex vivo* study. **Caries Res.**, v. 41, p. 77-79, 2007.
 21. MASCARENHAS, A. K. Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. **Pediatr Dent.**, v. 22, p. 267-277, 2000.
 22. MORETTO, M. J. et al. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. **Caries Res.**, v. 44, p. 135-140, 2010.
 23. ÖGAARD, B. CaF₂ formation: Cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res.**, v. 35, p. 40-44, 2001.
 24. PONDURI, S.; MACDONALD, E.; ADDY, M. A study *in vitro* of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. **Int J Dent Hyg.**, v. 3, p. 7-12, 2005.
 25. QU, H.; WEI, M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 16, p. 129-133, 2005.
-

26. RINTOUL, L. et al. FT-IR spectroscopy of fluoro-substituted hydroxyapatite: strengths and limitations. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 18, p. 1701-1709, 2007.
 27. ROBERTS, J. Role of models in assessing new agents for caries prevention-non-fluoride systems. **Adv Dent Res.**, v. 9, p. 304-311, 1995.
 28. SAXEGAARD, E.; ROLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application *in vitro*. **Scand J Den Res.**, v. 96, 523-535, 1988.
 29. STÄNDTLER, P. et al. The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. **Caries Res.**, v. 30, p. 418-422, 1996.
 30. STOOKEY, G. K. et al. The relatives anticaries effectiveness of three fluoride-containing dentifrices in Puerto Rico. **Caries Res.**, v. 38, p. 542-550, 2004.
 31. SUNDARAM, C. S.; VISWANATHAN, N.; MEENAKSHI, S. Defluoridation chemistry of synthetic hydroxyapatite at nano scale: equilibrium and kinetic studies. **J Hazard Mater.**, v. 155, p. 206-215, 2008.
 32. TAKESHITA, E. M. et al. *In vitro* Evaluation of Dentifrice with Low Fluoride Content Supplemented with Trimetaphosphate. **Caries Res.**, v. 43, n. 1, p. 50-56, 2009a.
 33. TAKESHITA, E. M. et al. *In situ* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. **Caries Res.**, v. 43, p. 219-220, 2009b.
 34. VIGNOLES, M. et al. Influence of preparation conditions on the composition of Type-B carbonated hydroxyapatite and on the localization of the carbonate ions. **Calcif Tissue Int.**, v. 43, p. 33-40, 1988.
 35. VILORIA, I. L.; YANAGIGUCHI, K.; HAYASHI, Y. Structure and chemical composition of an experimentally formed apical barrier after the application of calcium glicerophosphate. **J Endod.**, v. 26, p. 605-609, 2000.
 36. VOGEL, G. L. et al. Composition of plaque and saliva following use of an α -tricalcium-phosphate-containing chewing gum and a subsequent challenge. **J Dent Res.**, v. 79, p. 58-62, 2000.
 37. WEI, M. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 14, p. 311-320, 2003.
 38. WIEGAND, A.; KOWING, L.; ATTIN, T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. **Arch Oral Biol.**, v. 52, p. 1043-1047, 2007.
-

Anexos

ANEXO A

SÍNTESE E CICLAGEM DE pH DA HIDROXIAPATITA



1. A solução de fosfato de amônio dibásico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio lentamente (2 a 5 mL/ minuto), por meio de um funil de separação, à 37 °C.

2. Os precipitados foram separados por filtração, utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (- 600 mmHg).



3. Gral e pistilo de ágata utilizado para triturar o pó de hidroxiapatita.
-
-

-
4. Peneiras granulométricas para obtenção de grãos com 53 μm de diâmetro.



5. Esquema da ciclagem de pH realizada com 0,5 g de HA sintetizada com 100 mL das soluções de tratamento (água deionizada, 1100 μg F/g, TMP 1%, TMP 3%, 500 TMP 1% e 500 TMP 3%).

-
6. Béquer contendo pó de hidroxiapatita e solução de tratamento sob agitação constante, a 37° C, utilizado na ciclagem de pH.



ANEXO B

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)



1. Espectrofotômetro modelo Magna 760 (Nicolet, Madison, USA).

-
2. Amostras da hidroxiapatita acondicionadas em porta amostra para análise de FTIR.



3. Porta amostra para a análise de FTIR acoplado ao espectrofotômetro.
-

ANEXO C
ANÁLISE DE FLUORETO, CÁLCIO E FÓSFORO NA
HIDROXIAPATITA

