

*Lenara Queiroz Chaves Oliveira*

**Avaliação *in vitro* da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio**

ARAÇATUBA – SP

2018

*Lenara Queiroz Chaves Oliveira*

**Avaliação *in vitro* da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica – Área Saúde Bucal da Criança.*

Orientadora: Profa. Adjunto Denise Pedrini

Coorientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

ARAÇATUBA – SP

2018

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a

Oliveira, Lenara Queiroz Chaves.

Avaliação in vitro da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio / Lenara Queiroz Chaves Oliveira. - Araçatuba, 2018  
57 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Denise Pedrini

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Dentina 2. Fluoretos 3. Fosfatos I. Título

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

## Dados Curriculares

### LENARA QUEIROZ CHAVES OLIVEIRA

<b>Nascimento</b>	10/01/1990 Iturama – Minas Gerais
<b>Filiação</b>	Cireneu Chaves Oliveira Luciene Maria Martins Queiroz Chaves
<b>2009/2015</b>	Curso de graduação em Odontologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
<b>2016/Atual</b>	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica - área Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
<b>Associações</b>	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

# Dedicatória

---

Lenara Queiroz Chaves Oliveira

*Dedico este trabalho*

### **À minha mãe, Luciene**

*Meus mais sinceros agradecimentos, por tudo que é e representa na minha vida. Muito obrigada pelo amor, compreensão e paciência em todos os momentos. Você é uma das principais pessoas responsáveis pela realização de todos os meus sonhos. Obrigada por me incentivar, dar força nos momentos difíceis, por abrir mão das suas vontades e desejos para que os meus fossem realizados. Você é meu porto seguro. Palavras não são suficientes para demonstrar o que sinto por você.*

### **Ao meu namorado, Jorge**

*À você minha eterna gratidão por ter tido paciência comigo nesse período e por ter suportado minha ausência inúmeras vezes, também por ser suporte, amigo, confiante e conselheiro. Obrigada por me fazer sentir que sou especial. Espero que algum dia possa retribuir tudo que fez e faz por mim. Agradeço à Deus por ter colocado você na minha vida e sou feliz por pensar que é com você que irei dividi-la. Amo muito você!*

### **À minha irmã, Larissa**

*Obrigada por estar comigo em todos os momentos da minha vida, por fazer dos meus sonhos os seus e sempre acreditar em mim, por dividir sua filha comigo. Minha melhor amiga. Amor de irmã é para sempre mesmo que o sempre não exista. Te amo muito.*

### **À minha sobrinha, Maria Fernanda**

*Quando você nasceu eu entendi que me tornar uma pessoa melhor a cada dia não era só para mim, mas porque eu agora era exemplo e espelho. Você ajuda a me tornar um ser humano melhor. Obrigada por entender as vezes que não estive presente em momentos importantes da sua vida, e não ter acompanhado seu crescimento de pertinho. Você é um pedacinho meu fora de mim!*

**Ao meu pai, Cireneu**

*Obrigada pelo seu amor incondicional, por dar suporte e acreditar nos meus sonhos. Tudo que sou devo também a você. Obrigada por todos conselhos e valores que me ensinou.*

**À minha avó Dionésia (in memoriam)**

*Obrigada por ser amor, exemplo, cuidado e carinho. A senhora me ensinou que para estar presente não é preciso estar entre as pessoas que amamos, mas vivos no coração delas. Tenho saudades e vou te amar para sempre.*

# Agradecimentos Especiais

---

## **À Deus**

*Pela minha vida e família. Por me deixar sentir seu cuidado em todos os momentos e por sempre me guiar pelos melhores caminhos.*

## **À minha família**

*Por serem tão presentes mesmo que distantes, por me fazerem sentir que tinha com quem contar o tempo todo. Não poderia ter nascido em família melhor.*

## **A minha orientadora Denise Pedrini**

*Meu mais sincero agradecimento por ser a melhor orientadora que eu poderia ter, por ser amiga e principalmente me tratar como uma filha, sempre ajudando, ouvindo, sendo suporte e apoio. Professora eu admiro muito a senhora e tenho eterna gratidão.*

## **Ao meu coorientador Alberto Carlos Botazzo Delbem**

*Agradeço pelo conhecimento transmitido, pela paciência ao me ensinar. Pelas inúmeras vezes que entrei em sua sala e ali sentia que meu projeto iria dar certo ou que meus dados faziam sentido. Você é uma pessoa inspiradora!*

## **Ao meu amigo José Antônio Santos Souza**

*Agradeço pela paciência em me ensinar grande parte dos protocolos que aprendi, pelo empenho com fazer dar certo, por todas as planilhas, contas e correções, pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos de desespero. Tenho certeza que está no caminho certo pois será um ótimo orientador.*

# *Agradecimentos*

---

Lenara Queiroz Chaves Oliveira

**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**

*na pessoa de seu diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.*

**Ao atual coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**

*Prof. Adj. Luciano Tavares Ângelo Cintra, competência e trabalho.*

**Ao Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**

*pela oportunidade da realização do meu mestrado e aos professores e funcionários pelo convívio tão agradável.*

**Às funcionárias da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**

*Valéria, Cristiane e Lilian, pela presteza e suporte durante todo esse tempo.*

**Aos queridos pós-graduandos do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**

# *Epígrafe*

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

# Resumo

---

OLIVEIRA, L.Q.C. **Avaliação *in vitro* da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a energia livre de superfície ( $\gamma_s$ ) da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio (TMP) associado ou não ao fluoreto (F), exposto ou não ao cálcio (Ca), bem como, a adsorção de TMP, F e Ca na dentina. Blocos de dentina bovino (4 mm x 4 mm, n=12 blocos/grupo) foram tratados por meio da imersão em soluções contendo TMP nas concentrações: 0%; 1%; 3% e 9% seguido da aplicação ou não de Ca. Estas concentrações de TMP foram associadas ou não ao F na concentração de 1100 ppm F. Foram determinadas as concentrações de F, Ca e TMP nas soluções antes e após o tratamento para calcular a adsorção destes a dentina. Para analisar a energia livre de superfície ( $\gamma_s$ ) da dentina, os componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) eram determinados após os tratamentos por meio da medida do ângulo de contato. Os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O TMP reduziu a  $\gamma_s$  da dentina e aumentou os sítios doadores de elétrons ( $\gamma_s^-$ ). Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e os valores de  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=0,801$ ;  $p < 0,001$ ). Maiores valores de  $\gamma_s^-$  levou a maior adsorção de Ca ( $p < 0,001$ ). A associação F/TMP não alterou a  $\gamma_s$  e  $\gamma_s^{LW}$  e reduziu os valores de  $\gamma_s^-$ , entretanto houve maior adsorção de Ca. Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e F (Pearson's  $r=0,871$ ;  $p < 0,001$ ). Concluiu-se que o TMP aumentou a  $\gamma_s^-$  e adsorção de Ca, e reduziu a  $\gamma_s$ . A associação com o F aumentou a adsorção de TMP sem aumentar a  $\gamma_s^-$ , porém houve maior adsorção de Ca.

Palavras Chave: Dentina, Fluoretos, Fosfatos, Energia.

# *Abstract*

---

Lenara Queiroz Chaves Oliveira

---

OLIVEIRA, L.Q.C. ***In vitro* evaluation of free surface energy of dentin after treatment with sodium trimetaphosphate associated or not to fluoride, exposed or not to calcium.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

### Abstract

The objective of this study was to evaluate *in vitro* the free surface energy ( $\gamma_s$ ) of dentin after treatment with sodium trimetaphosphate (TMP) associated or not to fluoride (F), exposed or not to calcium (Ca), as well as the adsorption of TMP, F and Ca in dentin. Bovine dentin blocks (4 mm x 4 mm, n=12 blocks/group) were treated by immersion in solutions containing TMP at concentrations: 0%; 1%; 3% and 9% followed or not by the application of Ca. These concentrations of TMP were or not associated with F at the concentration of 1100 ppm F. Concentrations of F, Ca and TMP were determined in the solutions before and after the treatment to calculate the adsorption to the dentin. To analyze the free surface energy ( $\gamma_s$ ) of the dentin, the apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ) and polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) components were determined after the treatments by means of the contact angle measurement. Data were submitted to analysis of variance at two criteria followed by the Student-Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). The results showed that TMP reduces  $\gamma_s$  of dentin and increases electron donor sites ( $\gamma_s^-$ ). There was a positive correlation between the adsorption of TMP and the values of  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=0.801$ ;  $p < 0.001$ ). Higher values of  $\gamma_s^-$  led to higher adsorption of Ca ( $p < 0.001$ ). The F/TMP association did not change  $\gamma_s$  and  $\gamma_s^{LW}$  and reduced the values of  $\gamma_s^-$ , but the adsorption of calcium was higher. There was a positive correlation between the adsorption of TMP and F (Pearson's  $r=0.871$ ,  $p < 0.001$ ). TMP increased  $\gamma_s^-$  and Ca adsorption, and reduced  $\gamma_s$ . The association with F increased the adsorption of TMP without increasing  $\gamma_s^-$ , however there was higher adsorption of Ca.

Keywords: Dentin, Fluorides, Phosphates, Energy.

## *Lista de Figuras*

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** Fluxograma da divisão dos grupos de acordo com os tratamentos dos blocos de dentina. 30
- Figura 2** Valores médios (DP) da adsorção de TMP (A) e Ca (B) na superfície da dentina de acordo com a porcentagem de TMP nas soluções de tratamento contendo (1100 ppm F + TMP) ou não F (TMP). Letras minúsculas distintas significam diferença considerando os fatores % TMP e a presença ou ausência de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). C: Valores médios (DP) da adsorção de F na superfície da dentina de acordo com a % TMP nas soluções de tratamento contendo 1100 ppm F. Letras minúsculas distintas significam diferença entre as % de TMP (One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). 38

## Lista de Tabelas

---

---

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** Valores médios (DP) da energia livre de superfície ( $\gamma_s$ ) após 33  
tratamento da dentina com soluções contendo diferentes  
porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou  
não do tratamento com cálcio (n=12)
- Tabela 2** Valores médios (DP) da energia apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ) após 34  
tratamento da dentina com soluções contendo diferentes  
porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou  
não do tratamento com cálcio (n=12)
- Tabela 3** Valores médios (DP) da energia polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) após 35  
tratamento da dentina com soluções contendo diferentes  
porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou  
não do tratamento com cálcio (n=12)
- Tabela 4** Valores médios (DP) do componente doador de elétrons 37  
( $\gamma_s^-$ ) da energia polar após tratamento da dentina com  
soluções contendo diferentes porcentagens de TMP  
associado ou não ao F seguidos ou não do tratamento com  
cálcio (n=12)

## Sumário

---

## SUMÁRIO

RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	50

**Avaliação *in vitro* da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio\***

Lenara Queiroz Chaves Oliveira<sup>1</sup> • Alberto Carlos Botazzo Delbem<sup>1</sup> • Leonardo Antônio Morais<sup>1</sup> • José Antônio Santos Souza<sup>1</sup> • Denise Pedrini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Campus de Araçatuba

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - CEP 16015-050 – Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Campus de Araçatuba

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - CEP 16015-050 – Brasil

**Título curto:** Efeito do trimetafosfato na energia de superfície da dentina.

**Correspondência**

Denise Pedrini

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Rua José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP, Brasil

CEP 16015-050

Tel. +55 18 3636 3201

Fax +55 18 3636 3332

Email: pedrini@foa.unesp.br

\*De acordo com as instruções aos autores do periódico Clinical Oral Investigations ([http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?detailsPage=plctci\\_1060698](http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?detailsPage=plctci_1060698)).

## **Avaliação *in vitro* da energia livre de superfície da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio**

### **Resumo**

*Objetivo* Avaliar *in vitro* a energia livre de superfície ( $\gamma_s$ ) da dentina após tratamento com trimetafosfato de sódio (TMP) associado ou não ao fluoreto (F), exposto ou não ao cálcio (Ca), bem como, a adsorção de TMP, F e Ca na dentina.

*Materiais e métodos* Blocos de dentina bovina (n=12 blocos/grupo) foram tratados com soluções contendo TMP nas concentrações: 0%, 1%, 3% e 9% seguidos ou não da aplicação de Ca. Estas soluções foram associadas ou não a 1100 ppm F. Foram determinadas as concentrações de F, Ca e TMP nas soluções antes e após o tratamento para o cálculo da adsorção destes a dentina. A  $\gamma_s$  da dentina e os componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) foram determinados pela medida do ângulo de contato. Os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios seguidos pelo teste Student-Newman-Keuls.

*Resultados* O TMP reduz a  $\gamma_s$  da dentina e aumenta os sítios doadores de elétrons ( $\gamma_s^-$ ). Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e os valores de  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=0,801$ ;  $p<0,001$ ). Maiores valores de  $\gamma_s^-$  levou a maior adsorção de Ca ( $p<0,001$ ). A associação F/TMP não alterou a  $\gamma_s$  e  $\gamma_s^{LW}$  e reduziu os valores de  $\gamma_s^-$ , entretanto houve maior adsorção de Ca. Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e F (Pearson's  $r=0,871$ ;  $p<0,001$ ).

*Conclusão* O TMP aumentou a  $\gamma_s^-$  e adsorção de Ca, e reduziu a  $\gamma_s$ . A associação com o F aumentou a adsorção de TMP sem aumentar a  $\gamma_s^-$ , porém há maior adsorção de Ca.

*Relevância clínica* O TMP apresenta capacidade de alterar a energia de superfície da dentina levando a maior adsorção de Ca e F dando suporte aos dados obtidos nos estudos *in vitro*, *in situ* e clínico.

**Palavras Chave:** Dentina • Fluoretos • Fosfatos • Energia

## INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica muito comum e o uso de fluoretos tem um papel muito importante no seu controle. A adição de fosfatos inorgânicos a produtos fluoretados tem sido sugerida com objetivo de aumentar o efeito anticárie do fluoreto [1, 3, 4]. Estudos recentes *in vitro* [3] e *in situ* [4] demonstraram que a adição de trimetafosfato de sódio (TMP) a 3% em dentifrícios contendo 1100 ppm F reduz a desmineralização e aumenta a remineralização do esmalte, respectivamente. Esse efeito seria devido a capacidade dos ciclotrifosfatos em se ligar aos grupos hidroxila da hidroxiapatita e favorecer a maior deposição de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) [1, 6], bem como, levar a maior incorporação de fluoreto no interior do esmalte [3, 4, 18]. Entretanto, o mecanismo de como isto ocorreria na superfície do esmalte e, principalmente na superfície da dentina, não foi testada.

Um estudo em dentina mostrou que formulações dentifrícias fluoretadas (1100 ppm F) com TMP a 3% apresentam maior capacidade de obliterar os túbulos dentinários e aumentar o conteúdo mineral da dentina [7]. Grupos aniônicos, como os presentes nos ciclotrifosfatos, podem se ligar aos sítios amino do colágeno [13, 14] ou hidroxila [1, 6, 17] da hidroxiapatita presentes na dentina. Isto promoveria uma superfície com capacidade de atrair cálcio através da força eletrostática atuando como agentes nucleadores para cristais de apatita [13, 14]. A hipótese seria que o TMP altera as propriedades de superfície do substrato, favorecendo a deposição de apatita na superfície da dentina. As propriedades da superfície de um substrato podem ser analisadas pela energia livre de superfície. Esta e os seus componentes apolar e polar são

calculados a partir do ângulo de contato de líquidos sondas com as superfícies testadas [10, 19]. Estas análises podem mostrar se o composto testado promove uma superfície mais doadora ou receptora de elétrons, o que pode alterar sua reatividade com o meio.

O tratamento com fosfatos cíclicos altera a energia livre de superfície do esmalte devido ao aumento dos sítios doadores de elétrons e, como consequência, leva a maior adsorção de cálcio e fosfato no esmalte [16]. Entretanto, na dentina este mecanismo precisa ser elucidado, pois este substrato apresenta um conteúdo orgânico ao redor de 30%, diferindo do esmalte. Somando-se a isto, o estudo prévio que observou maior precipitação de fosfato de cálcio e maior obliteração dos túbulos dentinários [7] utilizou fosfato (TMP a 3%) associado ao fluoreto (1100 ppm F). Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* a energia livre de superfície da dentina após tratamento com TMP associado ou não ao fluoreto, exposto ou não ao cálcio (Ca), bem como, a adsorção de TMP, F e Ca na dentina. A hipótese nula do estudo foi que a energia livre de superfície da dentina não se altera após exposição ao TMP associado ou não ao F e/ou ao cálcio, e estes não são adsorvidos na dentina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Preparo dos blocos de dentina***

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos. Estes foram previamente esterilizados com auxílio de um forno de micro-ondas, a 650 w, por 3 minutos (Micro-ondas

Electrolux MEV41, Curitiba, PR, Brasil) [23]. Os blocos (4 mm x 4 mm, n=12/grupo) foram obtidos das raízes na região abaixo do limite amelodentinário, na face proximal, sendo um bloco por raiz. A face proximal permite a obtenção de um bloco mais plano necessário para uma boa padronização do experimento. Para isto, foram utilizados discos diamantados (Extec XL 12205 série 15 HC, Extec Corporation, Enfield, CT, USA) montados em cortadeira elétrica (Isomet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), sob refrigeração com água deionizada. Estes blocos foram fixados em bases de resina acrílica pré-fabricadas ( $\pm 3$  cm de diâmetro por  $\pm 8$  mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (New Wax, Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com a dentina da câmara pulpar (dentina interna) voltada para cima. A seguir, esta superfície foi planificada com auxílio da politriz BETA - grinder polisher (Buehler) e de lixa de carbureto de sílica com granulação 600 (Extec Corporation), peso de 4 lbs, durante 10 segundos sob baixa rotação e refrigeração a água para obtenção de superfícies paralelas com a dentina externa.

A seguir, os blocos de dentina foram removidos das bases, limpos em ultrassom (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brasil) a 40 Hz em água deionizada, durante 20 minutos e novamente fixados nas bases com a superfície da dentina externa voltada para cima. Esta superfície foi planificada com as lixas de granulações 800 e 1200 (Extec Corporation) por 20 segundos, seguido de feltro (Lapmaster International LLC, METS- PADS-FNL- A008, Mount Prospect, IL, USA) por 1 minuto, peso de 4 lbs, sob baixa rotação e refrigeração a água. Após a utilização de cada lixa, os blocos foram descolados

e submetidos ao ultrassom, em água deionizada, durante 20 minutos (Anexo A). Os blocos foram estocados em ambiente umedecido com água deionizada a 4°C durante o preparo dos blocos.

### **Formulação das soluções e tratamento**

Foram preparadas soluções contendo TMP (Sigma-Aldrich Co., CAS 7785-84-4, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 0% (água deionizada), 1%, 3% e 9%, e as mesmas concentrações com adição de F na concentração de 1100 ppm F sob a forma de NaF (Merck, CAS 7681-49-4, Darmstadt, Alemanha). Outra solução contendo cálcio (1,25 mmol; lactato de cálcio, Sigma-Aldrich) foi preparada [15] (Anexo B) (Figura 1). Os blocos (n=12/grupo) foram imersos em frascos individualmente contendo 1 mL das soluções de tratamentos, sob agitação constante por um período de 2 minutos (Mesa agitadora TE-420 Orbital, Tecnal, Brasil) definindo-se os seguintes grupos: 0% TMP, 1% TMP, 3% TMP, 9% TMP, 1100 ppm F + 0% TMP, 1100 ppm F + 1% TMP, 1100 ppm F + 3% TMP e 1100 ppm F + 9% TMP, com ou sem aplicação de Ca (Anexo C). Após cada tratamento, os blocos foram lavados com água deionizada durante 30 segundos e secos suavemente com papel toalha.

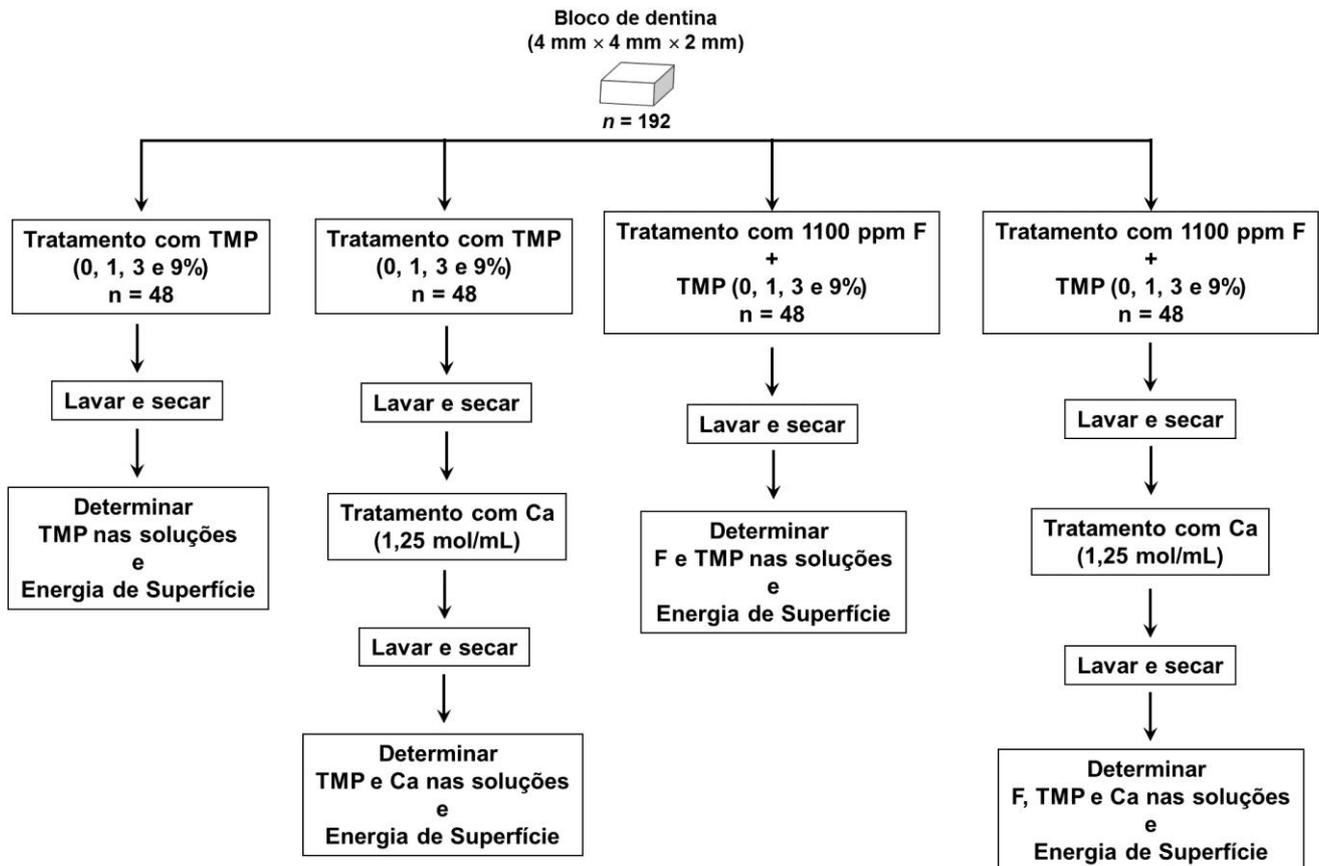


Figura 1 – Fluxograma da divisão dos grupos de acordo com os tratamentos dos blocos de dentina.

### Análise de F, Ca e TMP das soluções

O TMP foi dosado após hidrólise em meio ácido por meio da determinação do fósforo (P) liberado. Para tanto, alíquotas de 0,2 mL das amostras foram acrescidas de 0,2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol/L e aquecidas em banho fervente, a 100°C, por 1 hora. Na sequência, a concentração de P liberado foi determinada usando uma alíquota de 100 µL das amostras e dos padrões (1,5; 3; 6; 12 e 24 µg P/mL), 50 µL de molibdato e 20 µL de reativo redutor através do método colorimétrico [8], em placas de 96 poços (Anexo D). Para dosagem de F foi utilizado o eletrodo específico e eletrodo de referência acoplado a um analisador de íons. Foi utilizada uma alíquota de 0,5 mL da

amostra que foi acrescida de 0,5 mL TISAB II. O eletrodo foi previamente calibrado com padrões contendo 1 a 16  $\mu\text{g F/mL}$ , nas mesmas condições das amostras [3, 4]. Os valores foram expressos em  $\mu\text{g F/mm}^2$  (Anexo E). A análise do Ca foi realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 650 nm de acordo com o método colorimétrico do Arsenazo III [24]. Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  foram coletadas das amostras e 50  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 50  $\mu\text{L}$  de Arsenazo foram adicionados (Anexo F). Amostras (duplicatas) foram coletadas das soluções antes e após o tratamento da superfície da dentina. A adsorção à dentina foi calculada pela diferença entre as concentrações de F, Ca e TMP final e inicial nas soluções de tratamentos, obtendo valores negativos que indicam a diminuição nas soluções devido à adsorção.

### **Análise da energia livre de superfície**

A energia livre de superfície ( $\gamma_s$ ) e seus componentes apolar ( $\gamma^{LW}$ : Lifshitz van der Waals) e polar ( $\gamma^{AB}$ : ácido/base) na superfície da dentina, após os tratamentos, foram determinados pelas medidas de ângulo de contato. Para a determinação do ângulo de contato, os blocos tratados foram mantidos em ambiente a 22°C por 45 minutos para obter estabilidade da película formada [19]. Os parâmetros de  $\gamma^{LW}$  e  $\gamma^{AB}$  e os componentes ácido ( $\gamma^+$ , componente receptor) e base ( $\gamma^-$ , componente doador) da energia livre de superfície (mN/m), foram calculados de acordo com o modelo de van Oss, Chaudhery e Good para determinação da energia livre de interação dos substratos [10, 12, 19, 22]. As medições foram realizadas através de um goniômetro automático (DSA 100S, Krüss, Hamburg, Germany), utilizando três líquidos sondas com os

parâmetros de energia de superfície conhecidos: água (polar), diiodometano (apolar) e etilenoglicol (polar com componente ácido e base). Para a determinação do ângulo de contato, um volume de 0,5  $\mu\text{L}$  de cada líquido foi dispensado automaticamente em diferente quadrante da superfície da dentina de cada bloco utilizando uma seringa de vidro (500  $\mu\text{L}$ ) e uma agulha com calibre de 0,5 mm. Após 1 segundo do gotejamento, os ângulos de contato (direito e esquerdo) foram medidos utilizando uma câmera CCD para captura das imagens e o método da tangente (Drop Shape Analysis DSA4 Software, version 2.0-01, Krüss). Cada gota foi medida cinco vezes durante 5 segundos a uma temperatura de 22°C e umidade relativa do ar de  $44 \pm 6$  [10, 19] (Anexo G).

### **Análise estatística**

Para análise dos dados foi considerada como fatores de variação a % de TMP, concentração de F (0 ou 1100 ppm F), e exposição ou não ao Ca. Como variáveis, os valores de adsorção de TMP, Ca e F, e os valores de  $\gamma_s$ ,  $\gamma_s^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_s^{\text{AB}}$ ,  $\gamma_s^+$  e  $\gamma_s^-$ . Os dados de  $\gamma_s$ ,  $\gamma_s^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_s^{\text{AB}}$ ,  $\gamma_s^+$  e  $\gamma_s^-$  foram submetidos à ANOVA a 2 critérios seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para isto, fixou-se o fator Exposição ou não ao Ca para análise entre os fatores % de TMP e concentração de F, e fixou-se o fator Concentração de F para análise entre os fatores % de TMP e exposição ou não ao Ca. Os dados de adsorção de TMP e Ca foram submetidos à ANOVA a 2 critérios, e os dados de adsorção de F foi submetido à ANOVA a 1 critério. O teste de Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparação entre as médias. Correlação de Pearson foi

realizada entre as variáveis analisadas. Foi utilizado o programa estatístico SigmaPlot versão 12.0, com significância ao nível de 5%.

## Resultados

O tratamento da dentina com 1100 ppm F levou a menores valores de  $\gamma_s$  quando comparado a 0 ppm F ( $p < 0,001$ ), sem influência da exposição ao cálcio ( $p > 0,234$ ) (Tabela 1). O tratamento com TMP levou a uma redução na  $\gamma_s$  da dentina ( $p < 0,005$ ), porém quando o TMP foi associado a 1100 ppm F os valores de  $\gamma_s$  não mostraram diferenças quando comparado ao grupo 1100 ppm F sem TMP ( $p > 0,473$ ); exceto o grupo 1% TMP sem Ca ( $p < 0,001$ ).

Tabela 1: Valores médios (DP) da energia livre de superfície ( $\gamma_s$ , mN/m) após tratamento da dentina com soluções contendo diferentes porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou não do tratamento com cálcio (n=12)

Tratamentos		% TMP			
		0%	1%	3%	9%
0 ppm F	Sem Ca	39,0 <sup>a,A</sup> (9,6)	24,6 <sup>b,A</sup> (7,3)	23,7 <sup>b,A</sup> (4,6)	11,8 <sup>c,A</sup> (7,3)
	Com Ca	35,7 <sup>a,A</sup> (1,8)	27,9 <sup>b,A</sup> (7,9)	23,5 <sup>b,A</sup> (5,8)	25,2 <sup>b,A</sup> (5,6)
1100 ppm F	Sem Ca	30,5 <sup>a,B</sup> (3,7)	19,1 <sup>b,B</sup> (7,3)	28,1 <sup>a,A</sup> (3,1)	29,3 <sup>a,B</sup> (4,0)
	Com Ca	29,1 <sup>a,B</sup> (4,5)	29,0 <sup>a,A</sup> (4,9)	28,2 <sup>a,B</sup> (7,4)	30,8 <sup>a,B</sup> (2,8)

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as % de TMP na linha (comparação entre as % de TMP) e coluna (comparação com ou sem cálcio) dentro de cada concentração de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-

Keuls,  $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os valores com ou sem F em cada % de TMP, sem ou com exposição ao Ca (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

A energia apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ) da superfície da dentina foi menor quando tratado com TMP e/ou quando exposto a solução contendo Ca (Tabela 2), sem a presença de fluoreto nas soluções. O grupo 1100 ppm F + 0% TMP reduziu a  $\gamma_s^{LW}$  quando comparado ao grupo 0 ppm F + 0% TMP ( $p < 0,035$ ). Nos grupos com 1100 ppm F + TMP não houve alteração da energia  $\gamma_s^{LW}$  ( $p > 0,247$ ). Quando exposto ao cálcio a energia  $\gamma_s^{LW}$  somente o grupo 1% TMP apresentou valores menores ( $p < 0,001$ ).

Tabela 2: Valores médios (DP) da energia apolar ( $\gamma_s^{LW}$ , mN/m) após tratamento da dentina com soluções contendo diferentes porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou não do tratamento com cálcio ( $n=12$ )

Tratamentos		% TMP			
		0%	1%	3%	9%
0 ppm F	Sem Ca	36,8 <sup>a,A</sup> (7,9)	33,8 <sup>a,A</sup> (3,3)	29,8 <sup>b,A</sup> (3,5)	27,3 <sup>b,A</sup> (4,0)
	Com Ca	31,3 <sup>b,c,A</sup> (2,0)	30,1 <sup>b,c,A</sup> (2,1)	29,8 <sup>b,c,A</sup> (2,0)	32,2 <sup>c,A</sup> (3,3)
1100 ppm F	Sem Ca	33,3 <sup>a,B</sup> (2,7)	32,4 <sup>a,A</sup> (2,8)	33,3 <sup>a,B</sup> (2,5)	35,2 <sup>a,B</sup> (1,9)
	Com Ca	32,6 <sup>a,c,A</sup> (3,2)	21,3 <sup>b,B</sup> (5,8)	33,0 <sup>a,c,B</sup> (3,7)	31,4 <sup>c,A</sup> (2,2)

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as % de TMP na linha (comparação entre as % de TMP) e coluna (comparação com ou sem

cálcio) dentro de cada concentração de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os valores com ou sem F em cada % de TMP, sem ou com exposição ao Ca (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

O tratamento com TMP levou a uma energia polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) mais negativa e, o tratamento com TMP seguido da exposição ao cálcio produziu uma  $\gamma_s^{AB}$  menos negativa (Tabela 3). O grupo 1100 ppm F + 0% TMP apresentou  $\gamma_s^{AB}$  negativa e diferiu do grupo 0 ppm F + 0% TMP ( $p < 0,024$ ). Nos grupos com 1100 ppm F + TMP a  $\gamma_s^{AB}$  foi mais negativa no grupo com 1% de TMP ( $p < 0,001$ ). O tratamento com Ca manteve os valores negativos para  $\gamma_s^{AB}$  e próximos entre os grupos, exceto o grupo 1100 ppm F + 1% TMP.

Tabela 3: Valores médios (DP) da energia polar ( $\gamma_s^{AB}$ , mN/m) após tratamento da dentina com soluções contendo diferentes porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou não do tratamento com cálcio (n=12)

Tratamentos		% TMP			
		0%	1%	3%	9%
0 ppm F	Sem Ca	2,2 <sup>a,A</sup> (2,2)	-9,3 <sup>b,A</sup> (7,4)	-6,2 <sup>b,A</sup> (4,1)	-15,4 <sup>c,A</sup> (6,9)
	Com Ca	4,4 <sup>a,A</sup> (2,2)	-2,4 <sup>d,A</sup> (7,8)	-6,3 <sup>b,d,A</sup> (5,0)	-6,8 <sup>d,A</sup> (4,8)
1100 ppm F	Sem Ca	-2,8 <sup>a,B</sup> (4,1)	-13,3 <sup>b,A</sup> (7,8)	-5,1 <sup>a,A</sup> (3,1)	-5,9 <sup>a,B</sup> (4,0)
	Com Ca	-3,5 <sup>a,d,B</sup> (2,7)	7,7 <sup>c,B</sup> (4,8)	-4,9 <sup>a,d,A</sup> (8,1)	-0,6 <sup>d,B</sup> (2,3)

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as % de TMP na linha (comparação entre as % de TMP) e coluna (comparação com ou sem

cálcio) dentro de cada concentração de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os valores com ou sem F em cada % de TMP, sem ou com exposição ao Ca (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Houve uma relação dose-resposta ( $p < 0,001$ ) entre a % de TMP e os valores do componente doador de elétrons ( $\gamma_s^-$ ) da energia polar nos grupos 0 ppm F + TMP (Tabela 4). Quando os tratamentos com 0 ppm F + TMP foram seguidos da exposição ao cálcio houve redução dos valores de sítios  $\gamma_s^-$  ( $p < 0,022$ ). Os grupos 1100 ppm F + TMP apresentaram diminuição dos valores de  $\gamma_s^-$  com o aumento da % de TMP. Após a exposição ao cálcio, estes valores foram menores e diferiram daqueles sem exposição ao cálcio ( $p < 0,014$ ). As análises dos sítios receptores de elétrons ( $\gamma_s^+$ ) demonstraram que os valores estiveram próximo a zero e que não houve diferenças entre os grupos testados ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4: Valores médios (DP) do componente doador de elétrons ( $\gamma_s^-$ , mN/m) da energia polar após tratamento da dentina com soluções contendo diferentes porcentagens de TMP associado ou não ao F seguidos ou não do tratamento com cálcio (n=12)

Tratamentos		% TMP			
		0%	1%	3%	9%
0 ppm F	Sem Ca	3,4 <sup>a,A</sup> (3,5)	19,3 <sup>b,A</sup> (6,8)	34,2 <sup>c,A</sup> (8,9)	58,4 <sup>d,A</sup> (20,6)
	Com Ca	5,9 <sup>a,f,A</sup> (4,0)	28,5 <sup>e,A</sup> (8,9)	26,0 <sup>e,A</sup> (7,1)	12,6 <sup>f,A</sup> (6,6)
1100 ppm F	Sem Ca	10,3 <sup>a,A</sup> (7,3)	31,7 <sup>b,B</sup> (10,4)	24,0 <sup>c,B</sup> (6,4)	16,8 <sup>a,B</sup> (7,5)
	Com Ca	15,4 <sup>a,c,B</sup> (6,8)	13,4 <sup>a,c,B</sup> (6,7)	17,3 <sup>a,B</sup> (13,5)	8,3 <sup>c,A</sup> (4,1)

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as % de TMP na linha (comparação entre as % de TMP) e coluna (comparação com ou sem cálcio) dentro de cada concentração de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os valores com ou sem F em cada % de TMP, sem ou com exposição ao Ca (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Maior adsorção de TMP foi observada com o aumento da porcentagem nas soluções de tratamento (Figura 2A) com ou sem fluoreto. Houve relação dose-resposta entre a adsorção de Ca pela dentina e a % de TMP (Figura 2B) e correlação positiva entre a adsorção de TMP e Ca na dentina com (Pearson's  $r = 0,602$ ;  $p < 0,001$ ) ou sem fluoreto (Pearson's  $r = 0,619$ ;  $p < 0,001$ ). A adsorção de TMP e F apresentou relação dose-resposta com a % de TMP nas soluções (Figura 2A e 2C). Houve correlação positiva entre os valores de adsorção de TMP e os valores de adsorção de F na superfície da dentina (Pearson's  $r = 0,871$ ;  $p < 0,001$ ) e entre F e Ca (Pearson's  $r = 0,586$ ;  $p < 0,001$ ).

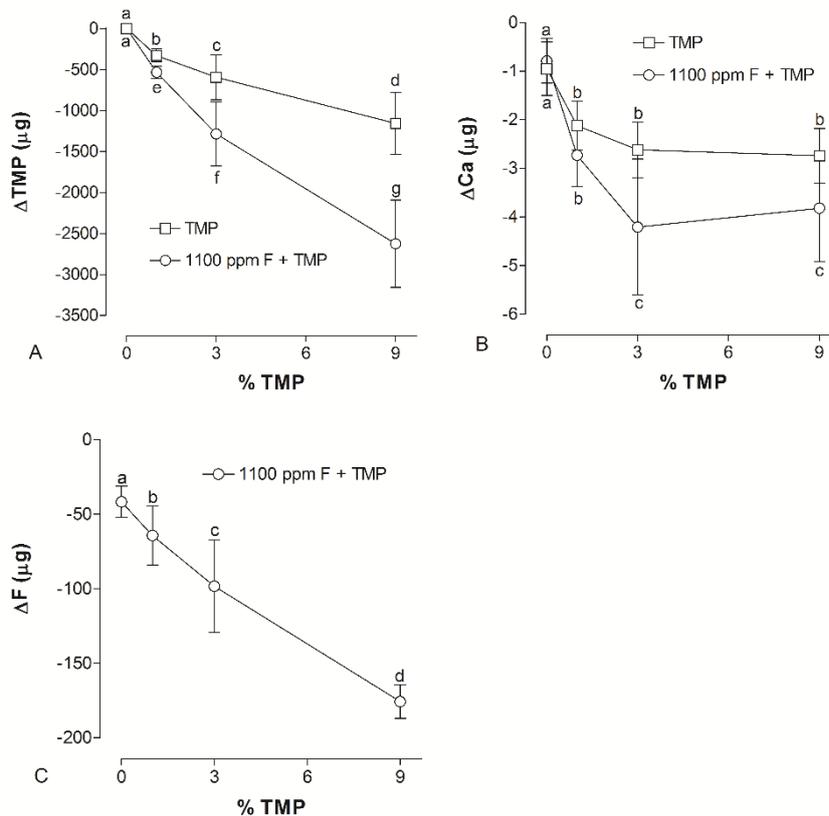


Figura 2 - Valores médios (DP) da adsorção de TMP (A) e Ca (B) na superfície da dentina de acordo com a porcentagem de TMP nas soluções de tratamento contendo (1100 ppm F + TMP) ou não F (TMP). Letras minúsculas distintas significam diferença considerando os fatores % TMP e a presença ou ausência de F (Two-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). C: Valores médios (DP) da adsorção de F na superfície da dentina de acordo com a % TMP nas soluções de tratamento contendo 1100 ppm F. Letras minúsculas distintas significam diferença entre as % de TMP (One-way ANOVA, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e os valores de  $\gamma_s^{AB}$  (Pearson's  $r=0,617$ ;  $p < 0,001$ ). Houve correlação positiva entre a adsorção de TMP e os valores de  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=0,801$ ;  $p < 0,001$ ). Houve correlação

positiva entre a adsorção de Ca e os valores de  $\gamma_s^{AB}$  (Pearson's  $r=0,478$ ;  $p<0,001$ ), e negativa entre adsorção de Ca e  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=-0,308$ ;  $p<0,033$ ). Não houve correlação significativa entre a adsorção de TMP e F e os valores de  $\gamma_s^{AB}$  (Pearson's  $r=-0,019$ ;  $p>0,895$ ; Pearson's  $r=-0,059$ ;  $p>0,686$ , respectivamente) e os valores de  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=0,043$ ;  $p>0,771$ ; Pearson's  $r=0,022$ ;  $p>0,882$ , respectivamente) (Figura 2). Não houve correlação significativa entre a adsorção de Ca e os valores de  $\gamma_s^{AB}$  (Pearson's  $r=0,015$ ;  $p>0,918$ ) e  $\gamma_s^-$  (Pearson's  $r=-0,074$ ;  $p>0,616$ ) para os grupos tratados com associação TMP/F.

## Discussão

Este estudo avaliou o efeito do TMP associado ou não ao F, exposto ou não ao Ca, na energia livre de superfície da dentina. Apesar de estudos prévios mostrarem que o efeito em reduzir a desmineralização do esmalte [3, 4] e obliterar túbulos dentinários [7] ocorre com 1100 ppm F + 3% TMP, outras concentrações de TMP foram utilizadas para compreender melhor o mecanismo de ação do TMP. Os resultados mostraram uma relação dose-resposta entre a quantidade de TMP nas soluções e a energia polar ( $\gamma_s^{AB}$  = componente ácido-base de Lewis) e  $\gamma_s^-$  (base de Lewis, doador de elétrons). Estes dados foram correlacionados a maior adsorção de TMP e a maior adsorção de cálcio à dentina. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

A dentina, por si só, não favorece a adsorção de cálcio. A menor adsorção de cálcio para o grupo 0 ppm F e 0% de TMP (Figura 2B), indica pouca ligação com os íons fosfatos na superfície da hidroxiapatita [9, 20], já

que os valores do componente polar ( $\gamma_S^{AB}$ ) e seus parâmetros ( $\gamma_S^+$ ;  $\gamma_S^-$ ) não alteraram (Tabela 3 e Tabela 4). A adsorção de cálcio sem alteração na carga da superfície provavelmente ocorreu pelo deslocamento de dois  $H^+$  da superfície por um  $Ca^{2+}$  [9]. *In vivo*, a adsorção de proteínas ricas em prolina e tirosina (película adquirida) à dentina têm a habilidade de se ligar ao cálcio e fosfato proveniente da saliva [2]. Como a base teórica (ácido-base) para o cálculo da  $\gamma_S$  utilizada no presente estudo [10, 21, 22] envolve a decomposição em  $\gamma_S^{LW}$  e  $\gamma_S^{AB}$ , e este último em ácido ( $\gamma_S^+$ ) e base ( $\gamma_S^-$ ), os valores da  $\gamma_S$  sofre forte influência da  $\gamma_S^{AB}$  e os resultados podem diferir da literatura que utilizaram outra abordagem para a determinação da  $\gamma_S$  [5]. Os valores mais negativos da  $\gamma_S^{AB}$ , resultado do aumento da adsorção de TMP à dentina, são devido aos maiores valores da  $\gamma_S^-$  (componente básico: sítios doadores de elétrons) (Tabela 4). Os valores de  $\gamma_S^{AB}$  podem ser positivos ou negativos e dependerá dos valores de  $\gamma_S^+$  e  $\gamma_S^-$  do líquido e do sólido [21]. De acordo com a abordagem utilizada no presente estudo, são as forças ácido ( $\gamma_S^+$ )/base ( $\gamma_S^-$ ) que irão indicar se uma superfície é mais hidrofóbica ou hidrofílica, pois as forças dispersivas estarão sempre presentes [10, 22]. A maior  $\gamma_S$  da dentina (39,0 mN/m), se comparado ao esmalte (28,8 mN/m) utilizando a mesma metodologia [16], se deve a energia apolar ( $\gamma_S^{LW}$ : Tabela 2) e muito pouco a positiva energia polar ( $\gamma_S^{AB}$ : Tabela 3), e está relacionada aos componentes orgânicos [5] presente na dentina. A  $\gamma_S^{LW}$  das superfícies biológicas raramente excede 45 mN/m e apresentam valores de  $\gamma_S^+$  menores do que 0,6 mN/m [10, 21, 22]. São consideradas superfícies monopolares básicas [10, 21, 22].

Mesmo na presença da película adquirida, a deposição de fosfato de cálcio na dentina é menor se comparado a dentina exposta a saliva humana e ao tratamento com TMP [7]. Ao tratar a dentina com as soluções contendo diferentes % de TMP, a  $\gamma_S$  reduziu em 37% com 1% TMP, 40% com 3% TMP e 70% com 9% TMP, principalmente devido aos valores de  $\gamma_S^{AB}$  mais negativos (Tabela 3) do que uma diminuição da  $\gamma_S^{LW}$  (Tabela 2). A redução pequena da  $\gamma_S^{LW}$  está relacionada à adsorção de TMP (Tabela 2 e Figura 2A) que forma uma película cobrindo a dentina que é rica em ligações de hidrocarbonetos [5]. Assim, os valores de  $\gamma_S^-$  maiores do que 28,5 mN/m e os valores de  $\gamma_S^+$  próximo a zero indicam uma superfície hidrofílica [21, 22] após o tratamento com TMP. A superfície com maiores valores de  $\gamma_S^-$  apresenta grande afinidade por cátions podendo se tornar hidrofóbica [21, 22]. Como a superfície da dentina mostrou-se com larga quantidade de sítios doadores de elétrons (Tabela 4) devido à adsorção de TMP (Figura 2A), esta foi capaz de adsorver mais cálcio (Figura 2B). O mesmo fenômeno foi observado para esmalte quando este foi tratado com hexametáfosfato de sódio [16]. Estes resultados explicam em parte os prévios estudos que mostram redução da desmineralização do esmalte [3, 4, 18] e maior deposição de fosfato de cálcio e obliteração dos túbulos dentinários quando foram utilizados dentifrícios fluoretados contendo TMP [7]. Em resumo, os sítios aniônicos do TMP se ligam aos grupos amino do colágeno e hidroxila, presentes na dentina, formando uma película na superfície com sítios doadores de elétrons (maiores valores de  $\gamma_S^-$ ). Com a maior adsorção de cálcio ocorre uma redução dos valores de  $\gamma_S^-$  (<28,5

mN/m; Tabela 4) indicando que a superfície ficou muito hidrofóbica principalmente com 9% de TMP.

Quando o TMP foi associado ao fluoreto (1100 ppm F), observou-se redução da  $\gamma_s$  e  $\gamma_s^{LW}$ , valores negativos da  $\gamma_s^{AB}$  e alteração da  $\gamma_s^-$ , e maiores valores de adsorção de TMP e Ca à dentina. Assim, a hipótese nula foi rejeitada também para associação 1100 ppm F + TMP. Considerando a abordagem acima, a adição de F às soluções contendo TMP, a superfície da dentina permanece mais hidrofóbica ( $\gamma_s^- < 28,5$  mN/m), principalmente com o aumento da % de TMP nas soluções (Tabela 4). Isto pode ser devido à deposição de fluoreto de cálcio, já que há uma relação dose-resposta entre a % de TMP e o F adsorvido a dentina (Figura 2A e 2C). Provavelmente, o fluoreto reage com a hidroxiapatita da dentina deixando o cálcio mais superficial com a formação do fluoreto de cálcio [11]. Entretanto, o arranjo estrutural da molécula de fluoreto de cálcio na superfície da dentina faz com que os valores de  $\gamma_s^{AB}$  sejam negativos e seu componente  $\gamma_s^-$  aumente 3 vezes (1100 ppm F + 0% TMP, com e sem Ca), provavelmente devido a maior eletronegatividade do F e o tamanho dos átomos de Ca [11]. Este efeito é observável mesmo quando o TMP está associado ao F (Tabela 4). Assim, o TMP sozinho produz uma superfície mais hidrofílica ( $\gamma_s^- > 28,5$  mN/m;  $\gamma_s^+ \cong 0$ ) e a associação F/TMP deixa a superfície hidrofóbica devido a precipitação de fluoreto de cálcio. O TMP favorece a deposição de  $CaF_2$  quando aplicado a hidroxiapatita [1, 6] quando associado a concentrações de F com 500 ppm F ou 1100 ppm F. Provavelmente, o aumento na adsorção do fluoreto na forma de fluoreto de cálcio e as possíveis ligações do TMP com íons  $CaF^+$  [3, 4, 18] justifiquem

estes resultados. Isto porque, a  $\gamma_s^{AB}$  nas concentrações de 3% e 9% não diferiu do grupo contendo apenas 1100 ppm F (Tabela 3) e os valores dos sítios doadores de elétrons ( $\gamma_s^-$ ) foram menores (Tabela 4) se comparado aos tratamentos com somente TMP (Figura 2A).

Entretanto, os resultados do grupo com 1100 ppm F + 1% TMP não segue a hipótese descrita anteriormente. Como a adsorção de TMP foi 2 vezes maior na presença do F (Figura 2A), isto levou uma energia polar com valores mais negativos (-13,3 mN/m) e o seu componente  $\gamma_s^-$  (31,7 mN/m) foi maior do que os grupos com 1100 ppm F + 3% TMP e 1100 ppm F + 9% TMP. O grupo 1100 ppm F + 1% TMP tem menos fluoreto adsorvido (Figura 2C) em relação aos grupos 1100 ppm F + 3% TMP e 1100 ppm F + 9% TMP, porém mais TMP adsorvido (Figura 2A) em relação ao grupo com 1% de TMP. Isto explica os menores valores de  $\gamma_s$  (Tabela 1) já que a energia apolar  $\gamma_s^{LW}$  não diferiu entre os grupos (Tabela 2). Provavelmente, a reatividade do fluoreto com a hidroxiapatita da dentina deixa o colágeno mais exposto e reativo ao TMP que se liga com maior facilidade aos grupos amino da proteína. Esta hipótese se baseia na presença de correlação entre a adsorção de TMP e fluoreto, e está em concordância com estudos utilizando hidroxiapatita [1, 6]. A hidroxiapatita tratada com 1100 ppm F apresentou maior formação de fluoreto fracamente ligado ( $CaF_2$ ) e redução na formação de fluoreto fortemente ligado (FA) com o aumento da % de TMP [1].

O produto formado na superfície da dentina com os tratamentos TMP/F aumentou em ~43% a adsorção de cálcio quando comparado aos tratamentos somente com TMP (Figura 2B). Apesar dos valores de  $\gamma_s^{AB}$  e  $\gamma_s^-$ , antes do

tratamento com cálcio, não serem maiores do que os grupos com TMP (Tabelas 3 e 4), a presença de fluoreto nesta camada leva a um aumento na adsorção de cálcio a dentina. Entretanto, não só o fluoreto influenciou neste resultado, mas o TMP adsorvido é importante para dar início à nucleação do cálcio à superfície, já que na sua ausência, a adsorção de cálcio é similar quando nem o fluoreto e o TMP estão presentes no tratamento. Este fato reforça a hipótese previamente descrita da formação de uma camada de TMP ligado ao íon  $\text{CaF}^+$ . A dentina passa a apresentar uma superfície mais hidrofóbica ( $\gamma_s^{\text{AB}} \sim 40 \text{ mN/m}$ ;  $\gamma_s^- < 28,5 \text{ mN/m}$ ;  $\gamma_s^+ < 0,6 \text{ mN/m}$ ), porém mais propícia à adsorção de cálcio. Isto significaria maior precipitação de fosfato de cálcio e obliteração dos túbulos dentinários, como observado em estudo prévio [7]. Apesar de ser um indicativo do mecanismo de ação do TMP, os resultados obtidos neste estudo *in vitro* deve ser considerado com cuidado. Por exemplo, diferentemente do que ocorre *in vivo*, o tratamento foi realizado uma vez com soluções contendo apenas TMP e/ou F para evitar o efeito de outros reagentes na energia de superfície e seus componentes. Ainda, o tempo de dois minutos de tratamento refere-se ao uso do dentifrício utilizado pelo menos duas vezes ao dia durante 1 minuto.

### **Conclusões**

O tratamento com TMP apresenta dose-resposta para a adsorção destes ciclofosfatos na dentina, aumentando os sítios doadores de elétrons ( $\gamma_s^-$ ) e diminuindo a  $\gamma_s$  da dentina. Estas características levam a maior adsorção de cálcio à superfície da dentina com consequente diminuição dos sítios doadores

de elétrons e aumento da  $\gamma_s$ . O F associado ao TMP leva a maior adsorção deste com dose-resposta entre a concentração de TMP e a adsorção de fluoreto na dentina. F/TMP apresenta menor quantidade de sítios doadores de elétrons ( $\gamma_s^-$ ), porém maior adsorção de cálcio.

## Referências

1. Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB (2018) Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res Part B* DOI: 10.1002/jbm.b.34072
2. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT (2012) Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci* 20:493–502
3. de Castro LP, Delbem AC, 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
4. Danelon M, Pessan JP, Souza Neto FN, Camargo ER, Delbem ACB (2015) Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 43:806–813
5. David R, Neumann AW (2014) Contact angle patterns on low-energy surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 206:46–56
6. Delbem ACB, Souza JAS, Zaze ACSF, Takeshita EM, Sasaki KT, Moraes JCS (2014) Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Braz Dent J* 25:479–484
7. Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, Toledo PTA, Pedrini D (2018) Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Invest* DOI: 10.1007/s00784-018-2384-3

8. Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400
9. Harding IS, Rashid N, Hing KA (2005) Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. *Biomaterials* 26:6818–6826
10. Harnett EM, Alderman J, Wood T (2007) The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Coll Surf B: Biointerfaces* 55:90–97
11. Janicki MJ, Drzymala J, Kowalczyk PB (2016) Structure and surface energy of both fluorite halves after cleaving along selected crystallographic planes. *Physicochem Probl Miner Process* 52:451–458
12. Knorr SD, Combe EC, Wolff LF, Hodges JS (2005) The surface free energy of dental gold-based materials. *Dent Mater* 21:272–277
13. Leone G, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R (2008) New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol* 19:824–830
14. Li X, Chang J (2008) Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *J Biomed Mater Res A* 85:293–300
15. Nauntofte B, Tenovou JO, Lagerlöf F (2003) Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O, Kidd E (Eds). *Dental caries: the disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard. pp. 7–28
16. Neves JG, Danelon M, Figueiredo LR, Souza JAS, Pessan JP, Delbem ACB (2016) Análise da energia livre de superfície no esmalte dentário após

- tratamento com hexametáfosfato de sódio, cálcio e fosfato: estudo in vitro. *Braz Oral Res* 30(Suppl 1):416–416. (Resumo PN 1076)
17. Souza JA, Amaral JG, Moraes JC, Sasaki KT, Delbem AC (2013) Effect of sodium trimetaphosphate on hidroxyapatite solubility: an in vitro study. *Braz Dent J* 24:235–240
18. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB (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
19. van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ (2002) Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 110:434–438
20. Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C (2005) Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high resolution force spectroscopy. *Biomaterials* 26:271–283
21. van Oss CJ (1993) Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 78:1–49
22. van Oss CJ (1995) Hydrophobicity of biosurfaces – origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 5:91–110

23. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE (2010) Microwave irradiation disinfection of bovine enamel. *Caries Res* 44:349–357
24. Vogel GL, Chow LC, Brown WE (1983) A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 17:23–31

## **Anexos**

---

## Anexo A

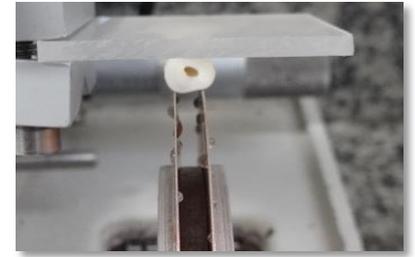
### Preparo dos blocos



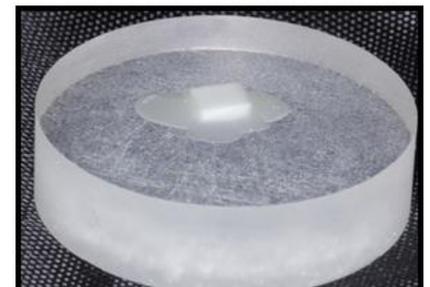
*Incisivos centrais inferiores bovinos*



*Cortadeira elétrica sob refrigeração*



*Blocos obtidos abaixo do limite amelodentinário, na face proximal da raiz*



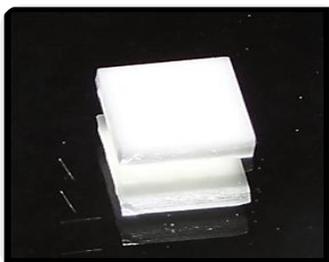
*Bloco fixado com cera pegajosa em base de resina acrílica*



*Polimento da dentina em politriz com lixas 600, 800, 1.200 e feltro*



*Após utilização de cada lixa, os blocos foram submetidos ao ultrassom, em água deionizada, durante 21 minutos*



*Foram obtidos 192 blocos*

**ANEXO B****Formulações das soluções de tratamento**

*Soluções contendo TMP nas concentrações de 0%, 1%, 3% e 9%*



*Soluções contendo TMP nas concentrações de 0%, 1%, 3% e 9% com 1100 ppm F sob a forma de NaF*



*Solução de lactato de cálcio contendo 1,25 mmol Ca/mL ( $C_6H_{10}CaO_6$ )*

## ANEXO C

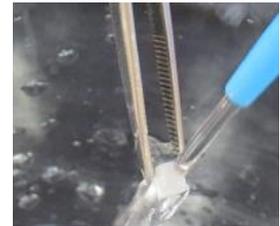
### Tratamento dos blocos de dentina com as soluções experimentais



*Blocos imersos individualmente em frascos contendo 1 mL das soluções de tratamento*



*Mesa agitadora por 2 minutos*



*Lavados por 30 segundos e secos com papel absorvente*

## ANEXO D

### Análise de TMP nas soluções



## ANEXO E

### Análise de F nas soluções



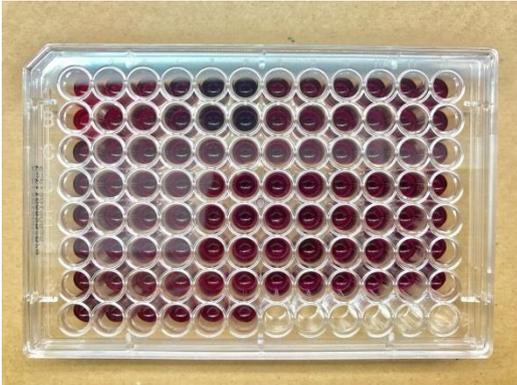
*Amostras diluídas  
100 vezes*



*Eletrodo específico e eletrodo de  
referência acoplado a analisador de  
íons*

**ANEXO F**

**Análise de Ca nas soluções**



*5  $\mu$ L das amostras +  
50  $\mu$ L de água deionizada +  
50  $\mu$ L de Arsenazo III*



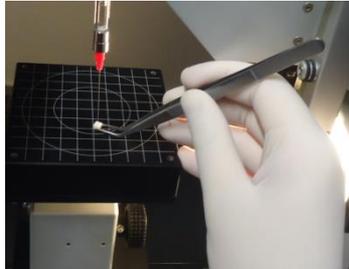
*Espectrofotômetro de microplaca com  
comprimento de onda de 650 nm*

## ANEXO G

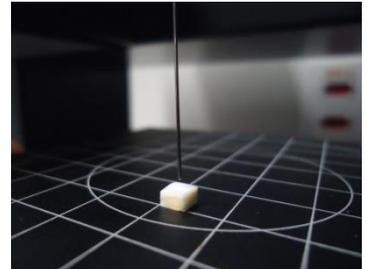
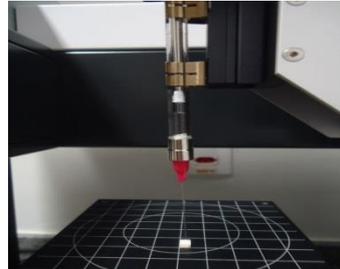
### Análise da energia livre de superfície



*Goniômetro automático*



*Três líquidos sondas: água, diiodometano e etilenoglicol*



*Para determinação do ângulo de contato, volume de 0,5  $\mu$ L de cada líquido foi dispensado sobre a amostra*