



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de Araçatuba

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Amanda Passarinho

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

Araçatuba-SP

2016

Amanda Passarinho

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

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

Orientador: Prof°. Titular. Alberto Carlos
Botazzo Delbem

Araçatuba-SP

2016

Dedico este trabalho, **aos meus país, Lucila Dias e Leonildo Passarinho Junior**, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha jornada acadêmica. Agradeço pela confiança e carinho que sempre depositaram em mim, por acreditarem no meu sonho e por permitir que ele se tornasse realidade, sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por sempre guiar meus caminhos e me proteger. Tudo que conquistei devo a Ele.

Aos meus avós,

Agradeço a vocês pelo apoio por terem sido tão presentes em minha vida. Sem vocês do meu lado tudo teria sido mais difícil, sei o quanto torceram por mim e estão felizes por essa conquista.

Vô Renato (em memória), obrigada por me ensinar todos seus valores por estar sempre a disposição nos momentos que mais precisei, por ser esse homem de coragem e de muita força que tanto me espelhou. Sei que aí do céu estará sempre torcendo por mim e orgulhoso por mais essa conquista.

À minha irmã Náthali,

Que sempre foi um exemplo para mim, mais que uma irmã foi uma companheira e amiga, obrigada por todo cuidado e apoio que tem por mim e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado André,

Apesar da distância e dos momentos difíceis sempre estive ao meu lado, compreensivo e paciente. Agradeço a Deus por ter te conhecido! Obrigada por cuidar de mim, e ser tão atencioso comigo. Amo você.

Ao meu professor orientador,

Prof. Titular. Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Obrigada por confiar em mim, pelos ensinamentos que me foi passado, e pela oportunidade de poder trabalhar e aprender mais sobre a parte de pesquisa científica que nossa faculdade oferece.

A minha querida amiga e professora Marcelle Danelon,

Obrigada pelos ensinamentos, por estar sempre à disposição para me ajudar, pela paciência, pelos trabalhos que tive oportunidade de participar graças a sua ajuda e orientação. Admiro-te muito como pessoa e profissional que é.

As minhas amigas Adriana, Taís e Nádia,

Sempre estiveram comigo durante toda essa jornada de estudos e trabalhos. Amigas que conheci na faculdade mais que vou levar pra vida toda, obrigada pela amizade e parceria.

A turma XIII de Odontologia,

Obrigada pelo companheirismo nessa longa jornada acadêmica, pelos amigos que fiz e pela união. Vou levar comigo lembranças de todos vocês que foram como uma segunda família para mim. Vou sentir saudades.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

Aos Pacientes,

Agradeço por depositarem tanta confiança em meu trabalho mesmo sabendo de nossa inexperiência, sempre dispostos a colaborar e pacientes conosco, graças a vocês adquirimos experiências e sabedoria não só pela parte prática da odontologia, mas também a como lidar com o ser humano.

A nossa maior satisfação está quando terminamos um trabalho e olhamos para o paciente e ele apresenta um sorriso aberto e feliz pelo resultado. Vocês foram fundamentais para que hoje tornássemos cirurgiões-dentistas. Muito obrigada.

Ao Frigorífico Friboi, que permitiu a coleta dos dentes bovinos.

A todos os professores pelos ensinamentos que foram ministrados e pela dedicação, contribuindo para minha formação profissional.

E a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin.

Passarinho, A. Efeito da adição de nanopartículas de hexametáfosfato de sódio em dentifrícios fluoretados sobre a remineralização dentária: estudo *in situ*. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ* o potencial remineralizador de dentifrícios convencionais (1100 ppm F) suplementados com nanopartículas de hexametáfosfato de sódio (HMPnano) em lesões artificiais de cárie. Este estudo foi cego e cruzado, realizado em 4 fases experimentais com duração de 3 dias cada, e washout de 7 dias. Voluntários (n=12) utilizaram dispositivos palatinos, contendo 4 blocos de esmalte bovino com lesão de cárie artificial. Os regimes de tratamentos foram: Sem F/HMP/HMPnano (Placebo); 1100 ppm F (1100F), 1100 ppm F suplementado com 0,5% de HMP micrométrico e nanoparticulado (1100F/HMP, 1100F/HMPnano). Os voluntários foram orientados a escovar os dentes naturais com os dispositivos palatinos na cavidade bucal, sendo os blocos tratados com o slurry dos dentifrícios por 1 minuto (3x/dia). Após cada fase, a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) e concentração de fluoreto no esmalte (F) foram determinados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). A superfície do esmalte tornou-se 68% mais remineralizada quando tratada com 1100F/HMPnano em relação ao 1100F ($p < 0,001$). 1100F/HMPnano reduziu em ~ 33% o corpo da lesão em relação ao 1100F ($p < 0,001$). A absorção de F no esmalte foi semelhante entre grupos, exceto para o Placebo ($p > 0,001$) o qual apresentou a menor concentração. Conclui-se que a adição de 0,5% HMPnano a um dentifrício convencional, promoveu um efeito remineralizador significativamente mais elevado quando comparado ao 1100 ppm F.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoreto, Fosfato, Desmineralização, Dentifrício, Nanopartículas.

Passarinho, A. Effect of adding sodium hexametaphosphate nanoparticles fluoride dentifrice on dental remineralization: an *in situ* study. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in situ* the remineralization potential of conventional toothpaste (1100 ppm F) supplemented with nano-sized of sodium hexametaphosphate (HMPnano) in artificial caries lesions. This blind, crossover study was conducted on 4 experimental phases with each lasting 3 days, and 7 days washout. Volunteers (n = 12) palatal appliances containing 4 enamel blocks with bovine artificial caries lesion. Treatment regimens were: No F/HMP/HMPnano (Placebo); 1100 ppm F (1100F), 1100 ppm F supplemented with 0.5% HMP micrometer and nano-sized (1100F/ HMP, 1100F/HMPnano). The volunteers were instructed to brush their teeth with natural palatal devices in the oral cavity, the blocks treated with the slurry of dentifrice for 1 minute (3x/day). After each phase, the percentage of surface hardness recovery (%SH_R), integrated loss of hardness subsurface (Δ KHN) and the concentration of fluoride in the enamel (F) were determined. The results were submitted to analysis of variance and Student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). The enamel surface treated with 1100F/HMPnano remineralized 68% more when treated with in relation to 1100F ($p < 0.001$). 1100F/HMPnano reduced ~ 33% in the body of the lesion relative to 1100F ($p < 0.001$). The absorption F enamel is similar between groups, except for Placebo ($p < 0.001$), which showed the lowest concentration. It was concluded that the addition of 0.5%HMPnano a conventional toothpaste, promoted significantly higher remineralizing effect compared to 1100 ppm F.

Keywords: Dental enamel, Fluoride, Phosphate, Demineralization, Toothpaste, Nano-sized.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráficos dos padrões de raios-x para o HMP micrométrico e HMP nanoparticulado após moagem de 48 horas.	26
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de fluoreto (FI) e (FT) (média $\pm$ dp, n=3) nos dentifrícios experimentais	25
Tabela 2 - Valores de pH (média $\pm$ dp, n=3) nos dentifrícios experimentais	26
Tabela 3 - Valores de porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) e concentração de fluoreto no esmalte (F) de acordo com os dentifrícios experimentais	27

LISTA DE ABREVIATURAS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Ca	Cálcio
Ca^{++}	Íon cálcio
CaF^{+}	Íon Fluoreto de cálcio
CaHPO_4^0	Fosfato de cálcio neutro
CaF_2	Fluoreto de Cálcio
dp	Desvio padrão
F	Fluoreto
g	Gramma
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
HF^0	Fluoreto de hidrogênio neutro
KCl	Cloreto de potássio
KHN	Unidade de dureza Knoop
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
M	Molar
n	Número de amostra
Na^{+}	Íon sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
P	Fósforo
Pi	Fósforo inorgânico
pH	Potencial de Hidrogênio
s	Segundo
SH	Dureza de superfície inicial
SH_1	Dureza de superfície pós-desmineralização
SH_2	Dureza de superfície pós-remineralização
FI	Fluoreto iônico

FT =	Fluoreto total
TISAB =	Tampão ajustador de força iônica total
HMP =	Hexametafosfato de sódio microparticulado
HMPnano =	Hexametafosfato de sódio nanoparticulado
mg =	Miligrama
mL =	Mililitro
mL/mm ² =	Mililitro por milímetro ao quadrado
mm =	Milímetro
mm ² =	Milímetro quadrado
mol/L =	Mol por litro
mmol/L =	Milimol por litro
mV =	Milivolts
nm =	nanométrico
PO ⁴⁻ =	Íon fosfato
µg =	Micrograma
µg/mm ³ =	Micrograma por milímetro cúbico
µg F/ml =	Micrograma de fluoreto por mililitro
µm =	Micrômetro

SUMÁRIO

1 Introdução	16
2 Objetivo	18
3 Metodologia	18
3.1 Delineamento Experimental	18
3.2 Preparação dos Blocos de Esmalte	19
3.3 Síntese e caracterização do Hexametáfosfato de sódio nanoparticulado (HMPnano)	21
3.4 Formulação, determinação do pH e concentração de F nos dentifrícios experimentais.....	21
3.5 Indução das lesões de desmineralização artificial nos blocos de esmalte	22
3.6 Descrição da fase clínica dos grupos experimentais	23
3.7 Análise da dureza do esmalte	23
3.8 Análise da concentração de fluoreto (F) presente no esmalte	24
3.9 Análise estatística	25
4 Resultados.....	25
5 Discussão	28
6 Conclusão	31
7 Agradecimentos	31
Referências Bibliográficas.....	32
Anexos	38

1 Introdução

A cárie dentária é uma doença multifatorial que tem acompanhado a humanidade ao longo da história. Resulta da colonização da superfície do esmalte por microrganismos, especialmente os *Streptococcus mutans* que, metabolizando carboidratos fermentáveis, principalmente sacarose, produzem ácidos, que desmineralizam a superfície dentária [Forssten et al., 2010]. Os dentifrícios fluoretados têm apresentado uma importante contribuição na redução de cárie dentária em muitos países industrializados [Rølla et al., 1991], principalmente naqueles em que se observa o fenômeno da polarização da doença [Narvai et al., 2000], e veem sendo utilizado como o melhor método tópico, visto que ao mesmo tempo em que a placa dental é desorganizada periodicamente pelo ato da escovação, o fluoreto (F) é utilizado de forma frequente e regular [Bratthall et al., 1996]. Assim, sabendo-se que os dentifrícios se destacam dentre as formas de administração tópica mais utilizadas pela população e que contribuem para a redução da cárie dentária [Rølla et al., 1991], seria interessante aumentar a eficácia dos mesmos, proporcionando um aumento na diminuição dos índices da doença.

Desenvolvimento de novas formulações de dentifrícios para diminuir o risco a cárie dentária veem sendo pesquisadas como a adição de fosfatos inorgânicos às formulações [Takeshita et al., 2009; Takeshita et al., 2011; do Amaral et al., 2013]. Dentre os fosfatos inorgânicos, o hexametáfosfato de sódio microparticulado (HMP) apresenta afinidade e retenção à superfície do esmalte graças aos múltiplos sítios de ligação, propriedade comum entre os fosfatos inorgânicos [Baig et al., 2005]. A utilização de HMP nos dentifrícios iniciou-se a partir do ano 2000 [White & Gerlach, 2000], devido à sua capacidade de prevenir a formação de cálculos [White et al., 2002; Schiff et al., 2005] e remover e reduzir a adsorção de pigmentos ao dente [Baig et al., 2002; Gerlach et al., 2002; Baig et al., 2005], mostrando boa cobertura e retenção na superfície do dente [Busscher et al., 2002]. Em relação à ação

cariostática, o estudo *in vitro* de da Camara et al. [2014] mostrou que a adição de fosfato na forma de 0,5 e 1,0% HMP em um dentifrício de baixa concentração de F (250 ppm F) apresentou perda mineral reduzida, semelhante ao dentifrício convencional (1100 ppm F). Ainda, da Camara et al. [2015], em um estudo *in situ*, associaram 1,0% de HMP em dentifrícios com 1100 ppm F, mostrando que essa associação reduziu em superioridade a perda mineral em relação ao dentifrício 1100 ppm F.

Alguns estudos também têm avaliado o impacto de fosfatos nanoparticulados no processo de desmineralização e remineralização do esmalte [Karlinsky e Zero, 2006; Danelon et al., 2014; Danelon et al., 2015]. A adição de nanopartículas de fosfato tri-cálcio em dentifrícios fluoretados reduziram o processo de desmineralização em esmalte em comparação a um dentifrício convencional [Karlinsky et al., 2007]. Nanocompósitos de fosfato de cálcio amorfo, fluoreto de cálcio e clorexidina tem mostrado ação na atividade metabólica do biofilme e consequentemente redução da produção ácida [Cheng et al., 2012]. Danelon et al. [2014] e Danelon et al. [2015] também avaliaram a ação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) em dentifrícios convencionais (1100 ppm F) no processo de desmineralização *in vitro* e remineralização *in situ*, comprovando o melhor desempenho desse sal na forma nanoparticulada quando associado ao dentifrício de 1100 ppm F. Esse melhor desempenho das nanopartículas se deve principalmente às propriedades físico-químicas que as tornam melhores quando comparadas aos fosfatos micrométricos (convencionais) [Xu et al., 2010].

Sabendo-se das propriedades do HMP, bem como a ação das nanopartículas de fosfatos, seria interessante a realização de estudos que avaliem novas formulações dentifrícias contendo 1100 ppm F suplementadas com HMP nanoparticulado, sobre a remineralização dentária, principalmente quando se trata de populações com alto índice de cárie, bem como qual a proporção molar produziria o melhor efeito.

2 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ* o potencial remineralizador de dentifrícios convencionais (1100 ppm F) suplementados com nanopartículas de hexametáfosfato de sódio (HMPnano) em lesões artificiais de cárie.

A hipótese nula do estudo foi a de que, a suplementação do dentifrício fluoretado com nanopartículas de hexametáfosfato de sódio na concentração de 0,5% promoveria o mesmo efeito protetor sobre o processo de remineralização do esmalte dentário bovino, quando comparado ao dentifrício 1100 ppm F.

3 Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

O estudo foi cego e cruzado consistindo em quatro fases com duração de 3 dias cada e washout de 7 dias entre uma etapa e outra, para eliminar possíveis efeitos residuais dos tratamentos [Delbem et al., 2010; Afonso et al., 2013; Danelon et al., 2015]. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pela Plataforma Brasil (Processo: 45716715.0.0000.5420) (ANEXO A). Doze voluntários com idade entre 20 e 30 anos e boa saúde geral e bucal e com fluxo salivar normal foram selecionados. Blocos de esmalte (4 mm x 4 mm) obtidos de dentes incisivos bovinos foram mantidos em solução de formol a 2%, pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [Delbem & Cury, 2002]. Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida, permitindo sua seleção através da determinação da dureza de superfície inicial (SH: 370,0 a 377,0 KHN; $p = 0,080$). Os blocos foram desmineralizados e

submetidos ao teste de dureza de superfície pós-desmineralização (SH_1). Foram confeccionados dispositivos para a arcada superior com quatro espaços (4 mm x 4 mm), nos quais fixaram-se quatro blocos de esmalte bovino desmineralizados. Os grupos consistiram em quatro tratamentos: 1) Sem F/HMP/HMPnano (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado à 0,5% de HMP microparticulado (1100F/HMP) e 4) 1100 ppm F associado à 0,5% de HMP nanoparticulado (1100F/HMPnano). Após três dias do período de remineralização os quatro blocos foram removidos do dispositivo para análise da dureza de superfície pós-remineralização (SH_2) e a seguir calculado a porcentagem de recuperação de dureza de superfície dureza ($\%SH_R$), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) e concentração de fluoreto (F) no esmalte.

3.2 Preparação dos Blocos de Esmalte

Dentes incisivos centrais inferiores permanentes (n=192) foram obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês. Os dentes sem defeito foram selecionados e as coroas dentárias separadas das raízes, através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni) mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada). Com o auxílio de uma cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração com água destilada/deionizada as coroas seccionadas, utilizando disco diamantado (11-4244 série 15 HC - Diamond BUEHLER) separando a superfície vestibular da lingual. As faces vestibulares foram fixadas nas placas de acrílicos e seccionadas tanto no sentido longitudinal quanto transversal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (11-4243 série 15HC – Diamond BUEHLER) montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Os blocos dentários

medindo 4 mm x 4 mm foram limpos com jato de água e bicarbonato de sódio e examinados com lupa estereoscópica (Citoval). Aqueles que apresentaram defeitos tais como trincas e áreas hipoplásicas de esmalte foram excluídos do experimento. Durante todos os procedimentos e entre cada etapa, os blocos foram mantidos em ambiente úmido (recipientes plásticos e gaze embebida em formol a 2% pH 7,0). Após a obtenção dos blocos de esmalte, realizou-se o ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Cera Bastão Kerr ou Cera em Bastões Horus), com a superfície dentinária voltada para cima, sendo este conjunto levado à politriz APL-4 AROTEC. Para o desgaste foram utilizadas lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), 2 pesos, durante 15 segundos sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima a qual foi polida com lixas de diferentes granulações durante 2 minutos. Na sequência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER 40-7618) e suspensão de diamante (METADI Diamond Suspension 1 micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 2 pesos, 1 minuto. A seguir, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada durante 30 segundos e submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), durante 2 minutos, imersos em solução de limpeza (ULTRAMET Sonic Cleaning Solution, BUEHLER) diluída na proporção 20:1 em água destilada. Finalmente, os corpos de provas serão lavados em jatos de água deionizada durante 30 segundos, e após, conservados em ambiente úmido, prontos para análise da dureza de superfície inicial (SH) do esmalte. (ANEXO B)

3.3 Síntese e caracterização do Hexametáfosfato de sódio nanoparticulado (HMPnano)

A síntese do hexametáfosfato de sódio nanoparticulado (HMPnano) foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O HMP foi primeiramente pesado na quantidade necessária para o estudo, e a seguir, armazenado em frascos de polietileno. Bolas de zircônia foram adicionadas ao HMP em associação com isopropanol até recobrir as bolas. Os frascos foram vedados com fita veda rosca, ao redor da rosca da tampa do frasco de polietileno. Em seguida os frascos foram levados ao moinho de bolas sendo submetidos à moagem por 48 horas. Após o processo de moagem do HMP, o mesmo foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua separação das bolas de zircônia. O frasco de polietileno contendo o HMP foi lavado com isopropanol e o material filtrado e vedado com papel alumínio sendo a seguir submetido à secagem em estufa a temperatura de 85°C para evaporação do solvente (isopropanol). Após a secagem do HMP, o mesmo foi triturado até atingir partículas com diâmetro médio de 91,0 nm, em almofariz de ágata, pesado e armazenado em frasco de polietileno. A difração de raios-X (DRX) foi utilizada para a identificação da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio do HMP moído por 48 horas. (ANEXO C)

3.4 Formulação, determinação do pH e concentração de F nos dentifrícios experimentais

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório de Odontopediatria da FOA-UNESP, com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foram

preparados dentifrícios contendo HMP e HMPnano (Aldrich Chemistry, CAS 68915-31-1, Reino Unido) na concentração de 0,5%, com adição F na concentração de 1100 ppm F sob a forma de NaF (Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Dentifrícios sem F/HMP/HMPnano (Placebo), com 1100 ppm F (sem HMP/HMPnano) foram preparados utilizando a mesma formulação que os demais.

O F dos dentifrícios foi dosado de acordo com o método descrito por Moretto et al. [2010]. Foram pesados 100-110 mg de cada dentifrício, em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais foram acrescentadas água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do fluoreto total (FT), 0,25 mL dessa suspensão foi mantido sob agitação durante 1h a 45°C com 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Em seguida foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e acrescentado 1,0 mL de TISAB II (Tampão ajustador de força iônica total). Para a dosagem de F foi utilizado um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A), previamente calibrado com cinco padrões (1, 2, 4, 8 e 16 µg F/mL). Para a dosagem de fluoreto iônico (FI), o restante da suspensão de dentifrício foi submetido à centrifugação a 906g durante 20 min. Foi pipetado 0,25 mL do sobrenadante e acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II e o F dosado da mesma forma que o FT [Takeshita et al., 2009]. Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 (peso:peso) e foi realizada a leitura através do eletrodo de pH (Orion 290A, Orion Research Inc., Boston, EUA), sob agitação constante. (ANEXO D)

3.5 Indução das lesões de desmineralização artificial nos blocos de esmalte

Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha com exceção da superfície externa de esmalte, para a indução das lesões de cárie artificial [Queiroz et al., 2008] e colocados individualmente em solução desmineralizadora (1,3 mmol.L⁻¹ Ca,

0,78 mmol.L⁻¹ P em tampão acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03 ppm F; 32 mL/bloco) por um período de 16 h, a 37°C. Após, foi determinada a dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁). (ANEXO E)

3.6 Descrição da fase clínica dos grupos experimentais

Uma semana antes do início do experimento e durante todo o experimento, os voluntários utilizaram dentifrício sem F (Placebo). Não foi dada qualquer instrução com relação à técnica de escovação. O dispositivo palatino e os blocos foram escovados três vezes ao dia. Foram realizados quatro regimes experimentais: 1) Sem F/HMP/HMPnano (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado à 0,5% de HMP microparticulado (1100F/HMP) e 4) 1100 ppm F associado à 0,5% de HMP nanoparticulado (1100F/HMPnano). Transcorridos três dias, para promover a remineralização das lesões de cárie artificiais, os dispositivos foram removidos e os blocos retirados dos mesmos [Afonso et al., 2013; Danelon et al., 2015]. Os blocos foram limpos utilizando gaze e água deionizada.

3.7 Análise da dureza do esmalte

A dureza de superfície foi determinada utilizando-se o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 s, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA). Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 µm, foram realizadas na região central de cada bloco (SH). Após a indução de lesão de desmineralização, foram realizadas outras cinco impressões (SH₁) distantes a 100 µm das impressões de SH e outras cinco para análise de SH₂. A seguir a porcentagem de recuperação de dureza de superfície foi calculada [%SH_R = ((SH₂ – SH₁) / SH – SH₁) * 100]. Para a análise da dureza em secção

longitudinal, uma secção foi realizada no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Foi utilizado microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 14 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos [Spiguel et al., 2009]. A área integrada da dureza (KHN x μm) da lesão até o esmalte hígido será calculada utilizando a regra trapezoidal (Graph Pad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN). (ANEXO E)

3.8 Análise da concentração de fluoreto (F) presente no esmalte

Blocos ($n=3/\text{fase}/\text{voluntário}$, 2 mm x 2 mm) foram obtidos a partir de uma das metades dos blocos (4 mm x 4 mm) seccionados no sentido longitudinal e fixados com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte ($\sim 50 \mu\text{m}$) foi removida [Takeshita et al., 2009, Weatherell et al., 1985]. Foi utilizado um micrômetro eletrônico digital com saída (Starrett, São Paulo – SP) acoplado a uma base de microscópio. O desgaste foi realizado com um disco de lixa autoadesiva (13 mm de diâmetro) de carbureto de sílica de granulação 400 (Buehler), fixado em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Os frascos, após a adição de 0,5 mL de HCl 1,0 mol/L⁻¹, foram mantidos sob agitação constante durante 1 h [Takeshita et al., 2009, Alves et al., 2007]. Para análise de F foi utilizado eletrodo específico 9409BN (ThermoScientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, ThermoScientific, Beverly, MA, EUA). Os eletrodos foram previamente calibrados com padrões contendo 0,125 a 2,00 $\mu\text{g F/mL}$, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas com alíquotas de 250 μL da solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II modificado com NaOH. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. (ANEXO F)

3.9 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%. Os valores de %SH_R, ΔKHN e F no esmalte mostraram distribuição normal e homogênea (ANOVA) e a seguir foram submetidos ao teste Student-Newman-Keuls.

4 Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados da determinação de fluoreto na forma iônica (FI) e total (FT) nos dentifrícios experimentais, manipulados previamente ao ensaio experimental. Os valores médios apresentaram-se dentro do esperado.

Tabela 1. Valores de fluoreto (FI) e (FT) (média ± dp, n = 3) nos dentifrícios experimentais

Dentifrício	FI (ppm F)	FT (ppm F)
Placebo	10,0 (1,2)	10,5 (0,1)
1100F	1102,4 (28,5)	1186,0 (33,2)
1100F/HMP	1136,5 (42,6)	1168,3 (5,9)
1100F/HMPnano	1100,9 (27,1)	1156,6 (19,7)

A Tabela 2 apresenta os valores médios de pH de cada dentifrício experimental previamente ao ensaio. Os valores variaram entre 6,8 a 7,7, com pH neutro.

Tabela 2. Valores de pH (média $\pm$ dp, n = 2) nos dentifrícios experimentais

Dentifrícios	pH
Placebo	7,7 (0,3)
1100F	7,3 (0,2)
1100F/HMP	7,2 (0,3)
1100F/HMPnano	6,8 (0,3)

A figura 1 mostra os padrões de raios-x para o HMP microparticulado e HMP nanoparticulado após moagem de 48 horas.

O processamento de moagem reduziu o tamanho das partículas dos pós de HMPnano, sem afetar a estrutura cristalina do material. A difração de raios-X (DRX), mostra os padrões de HMPnano após 48 h de moagem (Figura 1) identificando picos mais largos devido aos cristais menores, que podem ser utilizados para estimar um tamanho de partícula médio de 91,0 nm.

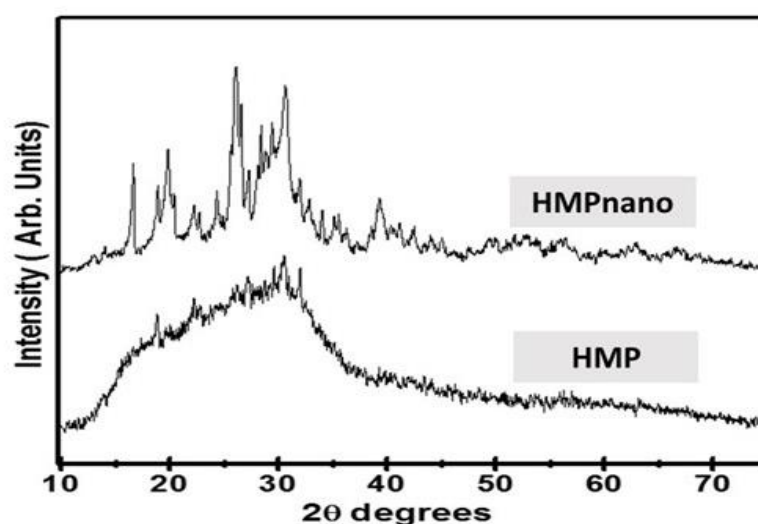


Figura 1. Gráficos dos padrões de raios-x para o HMP microparticulado e HMP nanoparticulado após moagem de 48 horas

A tabela 3 apresenta os valores da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) e concentração de fluoreto no esmalte (F) de acordo com os dentifrícios experimentais. A associação de 0,5%HMPnano em um dentifrício convencional aumentou a %SH_R em 68% (Tabela 3) quando comparado ao dentifrício contendo apenas 1100F ($p < 0,001$). Com 0,5%HMP, a remineralização foi semelhante ao dentifrício 1100F e superior quando comparada ao Placebo ($p < 0,001$). A perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) para os grupos 1100F/HMP e 1100F/HMPnano foi inferior em ~ 8% e ~ 33% em relação ao dentifrício 1100F ($p < 0,001$). Foram observadas quantidades similares de F para todos os grupos, exceto para o Placebo, o qual apresentou a menor concentração ($p < 0,001$).

Tabela 3: Valores de porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) e concentração de fluoreto no esmalte (F) (média $\pm$ dp, n=12) de acordo com os dentifrícios experimentais

Dentifrícios	Variáveis		
	%SH _R (KHN)	Δ KHN (KHN x μ m)	F (μ g/mm ³)
Placebo	19,0 (3,5) ^a	7699,2 (1066,0) ^a	0,2 (0,1) ^a
1100F	31,7 (2,0) ^b	6531,1 (277,2) ^b	0,4 (0,1) ^b
1100F/HMP	32,0 (3,8) ^b	5975,5 (347,9) ^c	0,4 (0,1) ^b
1100F/HMPnano	53,3 (2,4) ^c	4402,3 (585,0) ^d	0,4 (0,1) ^b

Letras distintas sobrescritas minúsculas indicam diferença estatística entre os Grupos Experimentais em cada variável (Anova-1 critério, Student-Newman-Keuls test, $p < 0,001$).

5 Discussão

O presente estudo avaliou o potencial de remineralização de um dentifrício com 1100 ppm F suplementado com 0,5% HMP nanoparticulado, comparando-o com um dentifrício padrão (1100 ppm F), utilizando um modelo *in situ*. Os resultados mostram que na concentração de 0,5% de HMPnano essa associação apresentou eficácia superior à de um dentifrício padrão de 1100 ppm F em promover a remineralização do esmalte, levando à rejeição da hipótese nula do estudo.

A concentração de HMPnano testada neste estudo foi baseada na proporção F/HMP dos estudos de da Camara et al. [2014], da Camara et al. [2015], Dalpasquale et al. [2015] e da Camara et al. [2016] os quais demonstraram que a adição de 0,5 ou 1,0% HMP microparticulado e nanoparticulado aumentou significativamente o efeito anticárie de um dentifrício de baixa F (250 ppm F) e de concentração convencional (1100 ppm F). A moagem do HMP microparticulado promoveu partículas mais reativas com um aumento da adsorção ao esmalte, devido à redução do tamanho e do aumento na área de superfície (proporcionalmente ao seu volume), o que levou a uma alta porcentagem de átomos na superfície. Provavelmente, assim como para o HMP microparticulado, altas concentração de HMPnano sequestram em maior proporção uma grande quantidade de Ca^{2+} e CaF^+ , influenciando a incorporação destes íons no esmalte e na perda mineral [da Camara et al., 2016; Dalpasquale et al., 2015].

Ainda, verificar a relação dose-resposta é um passo importante na avaliação da eficácia de qualquer suplemento adicionado ao dentifrício, como também validar o protocolo experimental utilizado [tem Cate & Mundorff-Shrestha, 1995]. Os resultados obtidos para os grupos Placebo e 1100F mostram uma relação dose-reposta e validam o modelo *in situ* de remineralização (Tabela 3). Anbar et al. [1979] mostrou que a adsorção de

um polifosfato sobre a superfície do esmalte é muito rápida e pode competir com a absorção de FI, o que poderia reduzir a difusão íons F ao esmalte levando a uma maior perda mineral. Entretanto, foi possível observar, que a adição de HMPnano na concentração de 0,5% não alterou a concentração de FI nos dentifrícios de 1100 ppm F, indicando que não houve alteração na disponibilidade do F, bem como manteve o efeito anticárie.

O efeito mais pronunciado do HMPnano na concentração de 0,5% em ΔKHN sugere que sob condições clínicas, uma lesão de subsuperfície levaria mais tempo para se desenvolver quando comparada a um dentifrício convencional. Isto é extremamente desejável em uma perspectiva clínica, considerando que uma cavidade poderia demorar mais tempo para ocorrer, ou até mesmo, não ocorrer quando se usa a formulação testada no presente estudo. A utilização de nanopartículas de fosfatos cíclicos neste estudo, e os bons resultados, também estão de acordo com o estudo de Danelon et al. [2015], que avaliou a adição de um fosfato nanoparticulado, também cíclico, o trimetafosfato de sódio (TMP), em promover a remineralização de lesões iniciais de cárie, *in situ*, encontrando ótimos e superiores resultados, quando comparado a um dentifrício fluoretado convencional.

Os achados obtidos no presente estudo também podem ser justificados pelo aumento da formação de espécies neutras ($CaHPO_4^0$ e HF^0) durante os ciclos de desmineralização e remineralização, os quais segundo Cochrane et al. [2008], apresentam maior coeficiente de difusão para o esmalte em comparação a espécies carregadas, bem como as particularidades do sal. O HMP não pode ser considerado como uma fonte de fosfato que reage espontaneamente com o esmalte dentário, uma vez que não é um composto hidrolisável [Choi et al., 1993; Castellini et al., 2005]. Esta forma de fosfato cíclico forma fortes complexos com íons metálicos [Kura et al., 1974; Changgen & Yongxin, 1983; Andreola et al., 2004; Cochrane et al., 2008] no ambiente oral, que adsorve- e à superfície do esmalte e retém os íons carregados CaF^+ e Ca^{2+} através da substituição de Na^+ na estrutura cíclica, levando a uma formação [van Wazer et al., 1950] reticular através da ligação

de Ca^{2+} a uma ou mais moléculas de HMP. Essa retenção torna-se ainda maior, quando o fosfato se encontra na forma nanoparticulada, e isto pode ser explicado devido às propriedades das nanopartículas, o que as tornam mais reativa.

É também possível que HMPnano retenha H^+ em sua estrutura com maior eficácia, o que também reduz a difusão de ácido no esmalte, minimizando assim a perda de mineral e favorecendo a remineralização de lesões de cárie. Em sua forma nanoparticulada, o HMP, adsorvido ao esmalte parece ser mais reativo e reter uma maior quantidade de Ca^{2+} e CaF^+ na sua estrutura carregada negativamente, o que pode levar à uma série de acontecimentos que conduzem finalmente à formação de espécies neutras, como mencionado acima, as quais apresentam um coeficiente de difusão mais elevado para o esmalte [Cochrane et al., 2008]. Este fenômeno pode facilitar a difusão de íons que favorecem o processo de remineralização, ocorrendo em todo o corpo da lesão e em maior grau na parte mais profunda da lesão.

Além disso, a adição de HMPnano (0,5%) não aumentou a incorporação de F no esmalte, uma vez que, seu efeito foi semelhante ao dentifrício 1100F. A incorporação de F nas áreas de lesão artificialmente desmineralizada pode ser uma indicação positiva de atividade anticárie do dentifrício, mas não é a única razão pela qual um composto pode inibir a desmineralização ou aumentar a remineralização do esmalte [Pfarrer et al., 2002]. A análise do conteúdo de F no esmalte revelou que, os níveis de F (Tabela 3) após o tratamento com dentifrícios 1100F suplementado, foram semelhantes ao dentifrício 1100F sem HMPnano. Isto sugere que a presença de HMPnano não interfere na incorporação de F.

Embora saiba-se que os modelos de estudo *in situ* são adequados para a avaliação do impacto de novos ingredientes ativos em produtos fluoretados, bem como sua associação com outros tratamentos anticárie, os protocolos *in situ* apresentam limitações. Nesse estudo não foi abordado o impacto do biofilme sobre a interação do HMPnano com o esmalte. Além

disso, o estudo da composição inorgânica e orgânica de biofilme após a utilização do sal em sua forma nanoparticulada, pode ser uma forma para se estudar seu mecanismo de ação. Assim, dentifrícios com 1100 ppm F associados ao HMPnano devem ser uma questão de ensaios clínicos.

6 Conclusão

Com base no exposto, conclui-se que a adição de HMP nanoparticulado em dentifrício convencional promoveu um efeito remineralizador significativamente maior quando comparado com dentifrício de mesma concentração de F, sem HMPnano, podendo ser uma alternativa para pacientes que apresentam alto índice de lesões de cárie, sem a necessidade de aumentar a concentração de F no dentifrício.

7 Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Emerson Rodrigues de Camargo e aos alunos de Pós-Doutorado Francisco Nunes Souza Neto e Luis Fernando Gorup, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, pela síntese e caracterização das nanopartículas de hexametáfosfato de sódio, assim como, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/PIBIC (ID: 34948) pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa.

Referências Bibliográficas

- 1) Afonso RL, Pessan JP, Igreja BB, Cantagalo CF, Danelon M, Delbem ACB. In situ protocol for the determination of dose response effect of low-fluoride dentifrices on enamel remineralization. *J Appl Oral Sci* 2013;21:525-532.
- 2) Alves KMRP, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FAL, Buzalaf MAR, Sasaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices *Caries Res* 2007;41:263-267.
- 3) Andreola F, Castellini E, Manfredini T, Romagnoli M. The role of sodium hexametaphosphate in the dissolution process of kaolinite and kaolin. *The Journal of the European Ceramic Society* 2004;24:2113-2124.
- 4) Baig AA, Kozak KM, Cox ER, Zoladz JR, Mahony L, White DJ. Laboratory studies on the chemical whitening effects of a sodium hexametaphosphate dentifrice. *J Clin Dent* 2002;13:19-24.
- 5) Baig A, et al. Extrinsic whitening effects of sodium hexametaphosphate--a review including a dentifrice with stabilized stannous fluoride. *Compend Contin Educ Dent* 2005;26:47-53.
- 6) Bratthal D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the Caries Decline: What Do the Experts Believe? *Eur J Oral Sci* 1996;104:416-422.
- 7) Busscher HJ, White DJ, Van der Mei H, Baig AA, Kozak KM. Hexametaphosphate effects on tooth surface conditioning film chemistry- In vitro and in vivo studies. *J Clin Dent* 2002;13:38-43.

- 8) Castellini E, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L. Thermodynamic aspects of the adsorption of hexametaphosphate on kaolinite. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005;292:322-329.
- 9) Changgen L, Yongxin L. Selective flotation of scheelite from calcium minerals with sodium oleate as a collector and phosphates as modifiers. II. The mechanism of the interaction between phosphate modifiers and minerals. *Int J Miner Process* 1983;10:219-235.
- 10) Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Kraigsley AM, et al. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with Chlorhexidine. *Dent Mater* 2012;28:573-583.
- 11) Choi IK, Wen WW, Smith RW. Technical note the effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. *Miner Eng* 1993; 6:1191-1197.
- 12) Cochrane HJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008;42:88-97.
- 13) da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sassaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent* 2014;42:256-262.
- 14) da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent* 2015;43:1249-1254.
- 15) da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate

reduces enamel demineralization in vitro. Clin Oral Investig 2016. [Epub ahead of print]

- 16) Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, Camargo ER, Percinoto C, Delbem ACB. Estudo in situ de dentifrícios fluoretados suplementados com nanopartículas de trimetafosfato de sódio sobre a remineralização do esmalte. Braz Oral Res 2014;28:64-64.
- 17) Dalpasquale G, Danelon M, Pessan JP, Nunes GP, Camargo ER, Souza-Neto FN, Percinoto C, Delbem ACB. Ação de nanopartículas de hexametafosfato de sódio em dentifrícios fluoretados sobre a desmineralização dentária: estudo in vitro. Braz Oral Res 2015;29:336-336.
- 18) Delbem ACB; Cury, J.A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. Am J Dent 2002;15:169-172.
- 19) Delbem ACB; Danelon M; Sasaki KT; Vieira AEM; Takeshita EM; Brighenti FL; Rodrigues E. Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: an in situ study. Arch Oral Biol 2010;55:913-918.
- 20) Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. J Dent 2015;43:806-813.
- 21) do Amaral JG, Sasaki KT, Martinhon CCR, Delbem ACB. Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization in situ. Am J Dent 2013;26:75-80.
- 22) Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. Nutrients 2010;2:290-298.

- 23) Gerlach RW, Ramsey LL, Baker RA, White DJ. Extrinsic stain prevention with a combination dentifrice containing calcium phosphate surface active builders compared to two marketed controls. *J Clin Dent* 2002; 13:15-18.
- 24) Karlinsey RL, Zero DT. Application of a nanocomposite formulation for remineralization of lesioned enamel 2006; http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract_82052.htm
- 25) Karlinsey RL, Fontana MR, Gonzalez-Cabezas C, Haider A, et al. Antimicrobial and Anticariogenic Effect of a Unique Nanomaterial on Human Enamel. *Caries Res* 2007;41:330.
- 26) Kura G, Ohashi S, Kura S. Complex formation of cyclic phosphate anions with bivalent cations. *J Inorg Nucl Chem* 1974;36:1605-1609.
- 27) Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem AC et al. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44:135-140.
- 28) Narvai PC, Castellanos RA, Frazão P. Prevalência de cárie em dentes permanentes de escolares no Município de São Paulo, SP, 1970-1996. *Rev Saúde Pública* 2000;34:196-200.
- 29) Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J* 2008;18:21-27.
- 30) Rølla G, Ogaard B, Cruz RA. Clinical effect and mechanism cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J* 1991;41: 171-174.

- 31) Schiff T, Saletta L, Baker RA, Winston JL, He T. Desensitizing effect of a stabilized stannous fluoride/Sodium hexametaphosphate dentifrice. *Compend Contin Educ Dent* 2005;26:35-40.
- 32) Spiguel MH; Tovo MF; Kramer PF; Franco KS; Alves KM; Delbem AC. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res* 2009;43:302-307.
- 33) Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Re* 2009;43:50-56.
- 34) Takeshita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM. Evaluation of Different Fluoride Concentrations Supplemented with Trimetaphosphate on Enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res* 2011;45:494-497.
- 35) ten Cate, JM, Mundorff-Shrestha, SA: Working group report 1: laboratory models for caries (in vitro and animal models). *Adv Dent Res* 1995;9:332-334.
- 36) van Wazer JR, Campanella DA. Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions. *Journal of the American Chemical Society* 1950;72:655-63.
- 37) Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki, H. Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
- 38) White DJ, Cox ER, Suszcynskymeister EM, Baig AA. In vitro studies of the anticalculus efficacy of a sodium hexametaphosphate whitening dentifrice. *J Clin Dent* 2002;13:33-37.

- 39) White DJ, Gerlach RW. Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical basis, mechanism, and clinical response. *J Contemp Dent Pract* 2000;1:1-19.
- 40) Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al. Strong nanocomposites with Ca, PO₄ and F release for caries inhibition. *J Dent Res* 2010; 89:19-28.

Anexos

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO EM DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS SOBRE A REMINERALIZAÇÃO DENTÁRIA: ESTUDO IN SITU

Pesquisador: Alberto Carlos Botazzo Delbem

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45716715.0.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.235.101

Apresentação do Projeto:

O estudo será duplo-cego e cruzado consistindo em três fases com duração de 3 dias cada e washout de 7 dias entre uma etapa e outra, para eliminar possíveis efeitos residuais dos tratamentos [Delbem et al., 2010; Afonso et al., 2013; Danelon et al., 2014]. O projeto será submetido pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos pela Plataforma Brasil. Doze voluntários com idade entre 18 e 33 anos e boa saúde geral e bucal e com fluxo salivar normal serão selecionados. Blocos de esmalte (4 mm × 4 mm, n = 144) serão obtidos de dentes incisivos bovinos e mantidos em solução de formol a 2%, pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [Delbem e Cury, 2002]. Esses blocos terão sua superfície de esmalte polida, permitindo sua seleção através da determinação da dureza de superfície inicial (SH). Os blocos serão desmineralizados e submetidos ao teste de dureza de superfície pós-desmineralização (SH1). Serão confeccionados dispositivos para a arcada superior com quatro espaços (4 mm × 4 mm), nos quais serão fixados quatro blocos de esmalte bovino desmineralizados. Os grupos consistirão em três tratamentos: 1) sem F/HMP nano (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100 ppm F), 3) 1100 ppm F associado à 0,5% HMP

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE**



Continuação do Parecer: 1.235.101

nanoparticulado. Após três dias do período de remineralização os quatro blocos serão removidos do dispositivo para análise da dureza de superfície final (SH2) e porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR), dureza em secção longitudinal para o cálculo da perda integrada de dureza de subsuperfície (KHN), microtomografia computadorizada (gHApcm-3), e da concentração de F presente no esmalte após o período de remineralização. Para análise estatística, serão considerados como variáveis os valores de %SHR, KHN, gHApcm-3 e o conteúdo de F no esmalte e, como fator de variação, os dentifrícios experimentais.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste subprojeto será avaliar in situ o efeito da adição de hexametáfosfato de sódio (HMP) nanoparticulado em dentifrícios com 1100 ppm F no processo de remineralização do esmalte dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mínimos. O voluntário poderá sofrer algum desconforto com o uso do dispositivo palatino.
Benefícios: Desenvolvimento de um produto, o qual será mais eficiente no controle da cárie dentária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo de pesquisa está bem elaborado e a metodologia é adequada. Os resultados trarão contribuição área de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193		CEP: 16.015-050
Bairro: VILA MENDONCA		
UF: SP	Município: ARACATUBA	
Telefone: (18)3636-3200	Fax: (18)3636-3332	E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



continuação do Parecer: 1.235.101

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP o protocolo e informa que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção 1.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 18/03/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto CEP.docx	17/05/2015 18:24:36		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto CEP.pdf	26/05/2015 09:22:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 1.pdf	03/08/2015 09:10:29		Aceito
Outros	CV.pdf	24/08/2015 20:40:36	Alberto Carlos Botazzo Delbem	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO 518446.pdf	26/08/2015 09:38:47		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 18 de Setembro de 2015

Assinado por:
André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

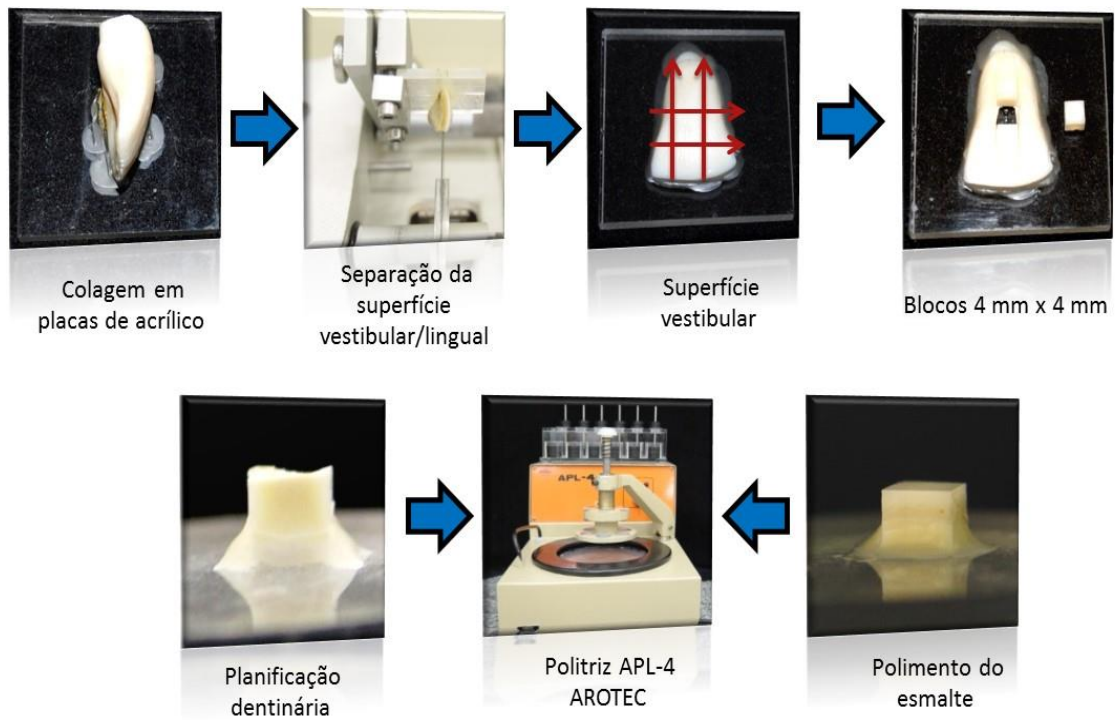
UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

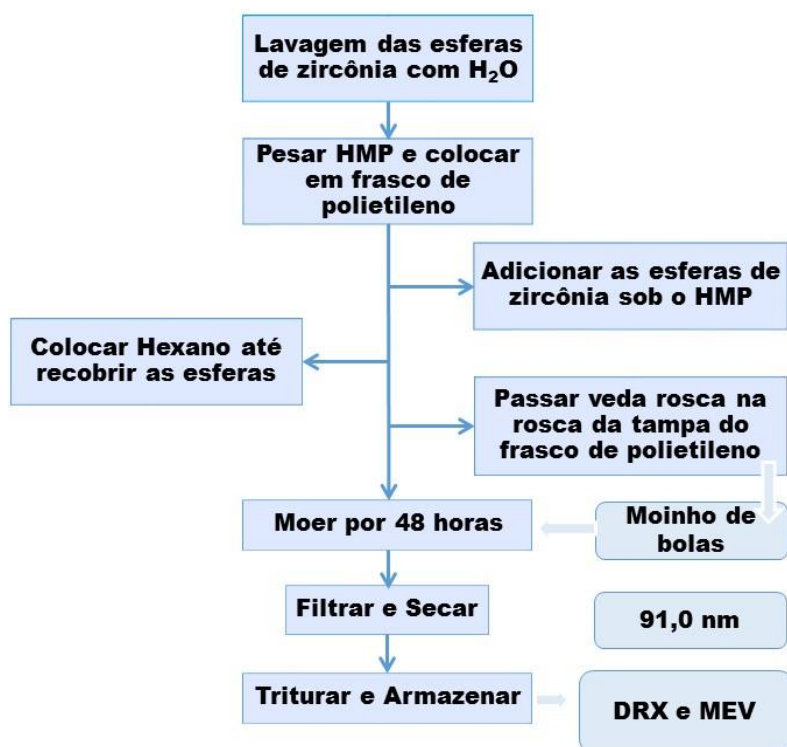
Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

ANEXO B**PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE**

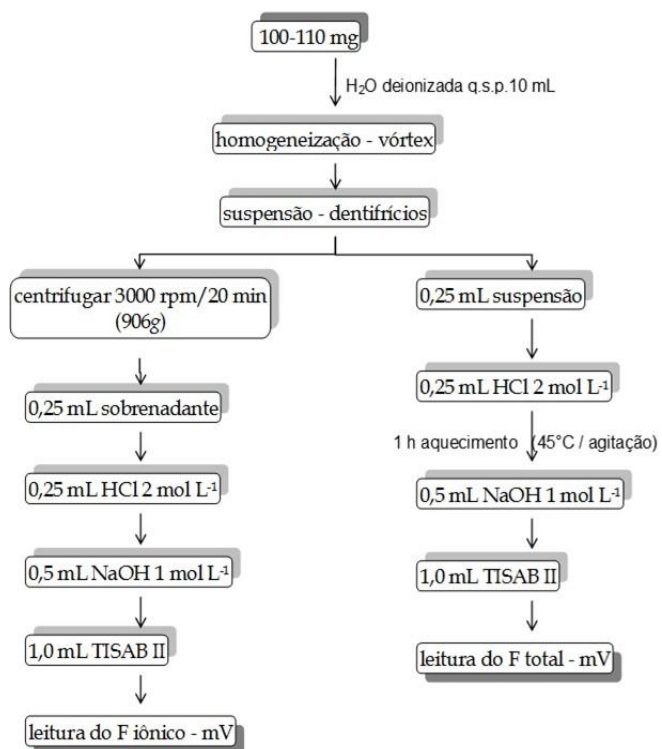
ANEXO C

SÍNTESE DO HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO NANOPARTICULADO



ANEXO D

DOSAGEM DE FLUORETO NOS DENTIFRÍCIOS EXPERIMENTAIS



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

ANEXO E

ANÁLISE DA DUREZA SUPERFICIAL DO ESMALTE E LONGITUDINAL



SH₂
SH₁
SH



Secção dos blocos de esmalte no sentido longitudinal

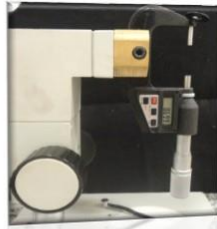


Embutimento dos blocos de esmalte com resina acrílica

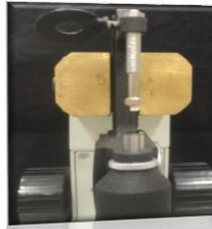


Aspecto final dos blocos de esmalte



ANEXO F**ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO (F) NO ESMALTE**

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



Desgaste 50 μm Lixa 400 (CARBIMET – BUEHLER)



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

Agitação por 1 hora



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