

MARCELA LUMI MIYASAKI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIO DE
BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO
SUPLEMENTADO COM HEXAMETAFOSFATO DE
SÓDIO SOBRE A DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE.
ESTUDO *IN VITRO*.**

**ARAÇATUBA – SP
2011**

MARCELA LUMI MIYASAKI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIO DE
BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO
SUPLEMENTADO COM HEXAMETAFOSFATO DE
SÓDIO SOBRE A DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE.
ESTUDO *IN VITRO*.**

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Co-orientadora: Prof^a Dra. Kikue Takebayashi Sassaki

**ARAÇATUBA – SP
2011**

Dedicatória

Dedico em especial a Deus que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida e sei que sem ele não chegaria a lugar algum. “Buscai primeiro o reino de Deus e a sua Justiça e tudo mais vos será acrescentado” (Mateus 6, 33-34).

Aos meus queridos e amados pais, Hayato e Célia, que são o meu alicerce e meu apoio para não desistir nunca de vencer. Muito obrigada pela dedicação, carinho, amor e exemplo de vida que me passam. Graças a vocês hoje estou aqui rumo à uma das minhas maiores conquistas e por isso dedico esta nova etapa da minha vida à vocês.

Aos meus queridos irmãos, Ricardo e Andressa, obrigada pelo amor, compreensão, apoio, conselhos, amizade. Enfim pelo exemplo de esforço e dedicação que me trouxeram até aqui.

A toda minha família, avôs(ós), tios(as) e primos (as), madrinhas, padrinhos que sempre me incentivaram e me ajudaram.

Paz e harmonia: Eis a verdadeira riqueza de uma família.

(Benjamim Franklin)

E a todos os meus amigos que passaram pela minha vida deixo agora meu imenso agradecimento pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” (Charles Chaplin)

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem,
Muito obrigada pela oportunidade de realizar projetos de iniciação científica. Agradeço seu exemplo de dedicação à pesquisa, disponibilidade, paciência e apoio durante a realização do meu trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki, além de ter sido uma ótima coorientadora, só tenho a agradecer-lá pela oportunidade do estágio e início das atividades de pesquisa científica. Muito obrigada pelo carinho, paciência, dedicação, disponibilidade que me ajudaram a concluir e conhecer os projetos de iniciação científica.

Fica aqui minha admiração, respeito e eterna gratidão pela aprendizagem durante esta caminhada.

À doutoranda Danielle Mendes da Camara,
Foi uma grande companheira e amiga que esteve comigo em todos os momentos me ajudando, apoiando, ensinando, com muito esforço, dedicação, carinho, paciência e disponibilidade.

Muito obrigada por tudo Dani.

À doutoranda Marcelle Danellon,
Uma pessoa super querida, amiga, iluminada sempre disposta a ajudar, ensinar, aconselhar em tudo que lhe for preciso. Sem você e as meninas da pediatria meus dias não seriam tão alegres como foram. Obrigada por tudo.

A funcionária da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos F. Fernandes, Obrigada por todo o auxílio no laboratório. Obrigada pela atenção, paciência e disposição.

Ao Rafael Gonçalves Mazini,

Pelas ajudas de idas e vindas a Odontopediatria, pela ajuda, compreensão prestada. Meus sinceros agradecimentos.

À todos os professores e amigos incluindo meu amigo José Antônio,

que pela presença, pela palavra, pelo sorriso ou pela simples lembrança, me deram coragem e determinação para traçar um caminho em busca dos meus ideais.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade da graduação.

À Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC),
pela concessão da bolsa de Iniciação científica do 2ª ao 4º ano para realização das pesquisas.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho,
meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

TEMPO PARA TUDO

Tudo neste mundo tem seu tempo;

cada coisa tem sua ocasião.

Há um tempo de nascer e tempo de morrer;

tempo de plantar e tempo de arrancar;

tempo de matar e tempo de curar;

tempo de derrubar e tempo de construir;

Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar:

tempo de chorar e tempo de dançar;

tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las;

tempo de abraçar e tempo de afastar;

Há tempo de procurar e tempo de perder;

tempo de economizar e tempo de desperdiçar;

tempo de rasgar e tempo de remendar;

tempo de ficar calado e tempo de falar.

Há tempo de amar e tempo de odiar

tempo de guerra e tempo de paz.

(Eclesiaste 3, 1-8)

MIYASAKI, L.M. **Avaliação da eficácia de dentifrício de baixa concentração de fluoreto suplementado com hexametáfosfato de sódio sobre a desmineralização de esmalte. Estudo *in vitro*.** 2011. (Trabalho de conclusão de curso - Graduação). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

RESUMO

A ingestão involuntária de dentifrício por crianças menores de seis anos de idade tem sido considerada como um fator de risco para o desenvolvimento da fluorose dentária. O uso de dentifrícios com concentrações reduzidas de fluoreto (F) contribui para diminuir a ingestão do íon por crianças que ainda não têm controle total da expectoração. Estudos recentes mostraram que dentifrícios contendo 500 µgF/g suplementados com hexametáfosfato de sódio (HMP) apresentaram eficácia equivalente a de um dentifrício de 1100 µg F/g na redução da desmineralização do esmalte, *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de dentifrícios com 250 µgF/g suplementados com diferentes concentrações de HMP sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino, através do modelo de ciclagem de pH. Blocos de esmalte foram obtidos a partir de dentes bovinos, a microdureza da superfície foi medida e, em seguida, os blocos foram submetidos à ciclagens de pH alternadas com tratamentos diários com dentifrícios contendo 250 µg F/g e entre 0 e 3% de HMP; foram utilizados também um dentifrício sem adição de F e HMP (placebo) e um comercial (Crest®, de 1100 µg F/g). Após as ciclagens determinou-se a microdureza de superfície, calculando-se a porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%SMH). Os resultados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey, estabelecidos 5% o nível de significância ($p < 0,05$). Observou-se que o grupo 250 µgF/g com 0,5% de HMP apresentou menor porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%SMH), seguido do grupo de 250 µgF/g com 1,0% de HMP que ficou semelhante ao Crest® ($p < 0,05$). A adição de 0,5% de HMP a um dentifrício sem F promoveu uma menor porcentagem de alteração de microdureza de superfície em comparação ao placebo. Conclui-se que é possível reduzir a concentração de F a 250 µgF/g e se obter uma ação semelhante a de um dentifrício padrão sobre a desmineralização do esmalte bovino, através da suplementação com hexametáfosfato nas concentrações de 0,5 e 1%.

Palavras-chave: Desmineralização dentária, esmalte dentário, dentifrício, fluoreto de sódio, fosfatos.

MIYASAKI, L.M. **Evaluation of the efficacy of low fluoride concentration dentifrice supplemented with sodium hexametaphosphate on the enamel demineralization. *In vitro* study.** 2011. (Completion of course work - Undergraduate). Faculty of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

ABSTRACT

The involuntary ingestion of dentifrice by children under six years of age has been considered a risk factor for the development of dental fluorosis. The use of dentifrices with low concentrations of fluoride (F) helps to decrease the ion intake by children who do not yet have full control of expectoration. Recent studies have shown that dentifrice containing 500 µgF/g supplemented with sodium hexametaphosphate (HMP) present similar efficacy of a dentifrice with 1100 µgF/g in the reduction of enamel demineralization *in vitro*. The objective of this study was to evaluate the efficacy of dentifrices with lower concentrations of F supplemented with different concentrations of HMP on the bovine tooth enamel demineralization through pH cycling model. Enamel blocks were prepared from bovine teeth, surface microhardness was measured and then the blocks were subjected to repeated cycling of alternated pH with daily treatments with dentifrices containing 250 µgF/g between 0 and 3% HMP; A dentifrice without the addition of F and HMP (placebo) and a commercial (Crest®, the 1100 µgF/g) were also used. After the pH cycling it was determined the surface microhardness, calculating the percentage change of surface microhardness (% SMH). The results were submitted to ANOVA and Tukey tests and the level of significance was set at 5% ($p < 0.05$). It was observed that the group 250 µgF/g with 0.5% HMP showed lower percentage of surface microhardness change (% SMH), followed by the group of 250 µgF/g with 1.0% HMP that was similar to that Crest®. The addition of 0.5% HMP to a dentifrice without F promoted a lower percentage of surface microhardness change compared to placebo. We conclude that it is possible to reduce the concentration of F to 250µgF/g to obtain comparable action of a commercial dentifrice on the demineralization of bovine enamel through the supplementation with hexametaphosphate at concentrations of 0.5 and 1%.

Keywords: dental demineralization, dental enamel, dentifrice, sodium fluoride, phosphates

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DCPD	Dicálcio fosfato dihidratado
dp	Desvio padrão
epm	Erro padrão da média
F	Fluoreto
HCl	Ácido clorídrico
HMP	Hexametafosfato
KCl	Cloreto de potássio
KHN	Unidade de dureza Knoop
L	Litro
MFP	Monoflúorfosfato
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mol L ⁻¹	Mol por litro
mmol L ⁻¹	Milimol por litro
n	Número de amostra
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
P	Fosfato
SMH ₁	Microdureza de superfície inicial
SMH ₂	Microdureza de superfície final
%SMH	Porcentagem de perda de dureza da superfície
TISAB	Tampão ajustador de força iônica total
µg	Micrograma
µm	Micrometro

Sumário

1- Introdução	11
2-Objetivo	14
3-Material e Método	15
4-Resultados	19
5-Discussão	22
6-Conclusão	24
Referências Bibliográficas	
Anexos	

1-INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença causada por vários fatores, dentre os quais se destacam como principais: o hospedeiro (saliva e dentes), a microbiota bucal e o substrato (dieta cariogênica), todos interagindo em condições críticas em um determinado espaço de tempo. A prática odontológica foi direcionada à prevenção e promoção da saúde bucal através do reconhecimento da cárie dentária como uma infecção de origem bacteriana, transmissível, multifatorial e controlável. É importante a caracterização individual de possíveis fatores de risco envolvidos na etiologia da cárie dentária, não só os já anteriormente citados como também exposição a fluoretos, hábitos de higiene bucal e a influência de aspectos sócio-econômicos e culturais (Mascarenhas *et al.*, 1998; Kunzel *et al.*, 2000; Vrbic, 2000; Castro *et al.*, 2000).

Um dos marcos mais importantes da Odontologia relacionado à prevenção da cárie dentária foi à descoberta das propriedades anticariogênicas do F, o qual passou a ser adicionado à água de abastecimento público e utilizado em diversas formas e diferentes concentrações: prescrição de suplementos, aplicação tópica de géis e soluções, vernizes fluoretados e ainda pela ampla utilização dos dentifrícios fluoretados (Van Rijkom, H. M.; Van't Hof, 1998; Cury, 2001; Marinho *et al.*, 2003a, Marinho *et al.*, 2003b, Marinho *et al.*, 2004).

O F por ser uma substância farmacologicamente ativa deve ter seu uso racionalizado em termos de benefício e toxicidade (Ekstrand *et al.*, 1988). Acredita-se que a interação pós-eruptiva com o esmalte seja mais relevante e há consenso de que o F importante é aquele mantido constante na cavidade bucal, o qual é capaz de interferir diretamente no desenvolvimento e progressão da lesão de cárie, reduzindo a quantidade de minerais perdidos, inibindo a desmineralização e aumentando a quantidade reposta, desta forma, a remineralização (Ten Cate, 1990).

No entanto, a fluorose torna-se uma questão relevante em saúde pública, porque em suas formas moderada ou severa, provoca alterações funcionais e estéticas que interferem na formação da personalidade, na inserção no mercado de trabalho e exige tratamento odontológico de alta complexidade em casos mais graves (Cangussu *et al.*, 2002).

A fluorose origina-se da exposição do germe dentário, durante o seu processo de formação, a altas concentrações do íon fluoreto (F) resultando em defeitos na mineralização do esmalte, cuja severidade está diretamente associada à quantidade ingerida. Geralmente, o aspecto clínico é de manchas opacas no esmalte, em dentes homólogos, até regiões

amareladas ou castanhas em casos de alterações mais graves (DenBesten, 1999; Fejerskov, 1994).

O aumento da fluorose dentária tem sido associado ao uso precoce de dentifrícios fluoretados, uso indiscriminado de suplementos fluoretados na dieta e consumo prolongado de fórmulas infantis (Martins *et al.*, 2002). Segundo Martins *et al.* (2002), os primeiros três anos de vida são o período de maior risco para o desenvolvimento de fluorose dentária, por ser esta, a fase de formação (secreção) e maturação do esmalte dentário. Assim, em crianças durante o período de desenvolvimento dentário, do nascimento aos 6 anos de idade, o uso de dentifrícios fluoretados tem sido considerado como um fator de risco para a fluorose dentária (Mascarenhas, A. K.; Burt, B. A.; 1998)

Formulações de dentifrícios de reduzida concentração de F têm sido estudadas com o objetivo de diminuir a ingestão do íon por crianças e prevenir a fluorose dentária (Wong *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2010). Através de relatos na literatura demonstra-se que a associação de F com sais de fosfato e/ou cálcio pode levar a um aumento da eficácia anti-cariogênica (Schemehorn *et al.*, 1999; Kardos *et al.*, 1999; Hicks e Flaitz, 2000; Takeshita *et al.*, 2009).

O principal produto responsável pela ação anticariogênica de agentes tópicos de F é o CaF_2 e que a sua formação aumenta à medida que se reduz o pH do meio (Saxegaard & Rolla, 1988; Ogaard, 1988). Negri & Cury (2002) relataram que um dentifrício de pH 5,5 contendo 550 μg F/g foi comparável ao dentifrício neutro padrão de 1100 μg F/g (Crest), em termos de formação de CaF_2 . Brighenti *et al.* (2006) observaram que após ciclagens de pH *in vitro*, houve uma redução da microdureza do esmalte de dente bovino com o tratamento de dentifrício acidulado com 550 μg F/g em relação ao dentifrício neutro de 1100 μg F/g.

Outro recurso que poderia ser empregado para aumentar a efetividade de um dentifrício fluoretado é suplementá-lo com cálcio e/ou fosfato, uma vez que o processo da remineralização, embora seja intensificado pelo F, depende primariamente da presença desses íons na saliva (Schemehorn *et al.*, 1999 a,b).

Estudos comparando os dentifrícios suplementados e os não-suplementados mostram vantagens na associação com o cálcio e fosfato. Estudos *in vitro* mostraram que os dentifrícios (1100–1500 μg F/g) com cálcio solúvel (MFP/DCPD) aumentavam a incorporação de F e a remineralização de lesões cariosas artificiais, quando comparados aos dentifrícios convencionais (Moreno 1993). Outros estudos mostram que os dentifrícios que utilizam complexos de cálcio e fosfato, para promover uma suplementação, tornam-se mais efetivos em prevenir a desmineralização (Hicks & Flaitz, 2000; Kardos *et al.*, 1999; Schemehorn *et*

al., 1998), melhoram a capacidade remineralizadora (Hicks & Flaitz, 2000), aumentam a incorporação de flúor (Schemehorn *et al.*, 1999a) e aumentam a biodisponibilidade de F quando comparado a um dentifrício padrão testado clinicamente (NaF/sílica) (Schemehorn *et al.*, 1998; Schemehorn *et al.*, 1999b). Estas propriedades são de grande vantagem em populações com alto índice de cárie, pois a capacidade em diminuir a desmineralização e promover a remineralização é maior.

Assim, um dentifrício suplementado tem a função de suprir não somente F como agente ativo, mas também cálcio solúvel e fosfato, garantindo a disponibilidade desses íons para a remineralização, permanecendo por um período prolongado na saliva e na placa residual (Kardos *et al.*, 1999). O trimetafosfato de sódio (TMP), o hexametafosfato (HMP), o ortofosfato de sódio e o citrato de cálcio são alguns dos produtos que podem ser utilizados como suplementação (Tung & Eichmiller, 1999).

O HMP é um polifosfato linear com 10 a 12 repetições desta subunidade (Baig *et al.*, 2005), sendo uma variante de cadeia mais longa do pirofosfato. Em comparação a este, apresenta maior resistência ao desafio hidrolítico no ambiente oral (Winston *et al.*, 2007) e maior afinidade e retenção à superfície do esmalte graças aos múltiplos sítios de ligação. Devido apresentar cadeia mais longa, os polipirofosfatos têm maior possibilidade de se ligar à superfície do esmalte, tendo efetivos agentes sequestrantes, principalmente dos íons cálcio. (FDA, 1975).

A literatura relata a ação do HMP na prevenção da formação de cálculos (Schiff *et al.*, 2005), remoção de manchas dentárias (Baig *et al.*, 2005), proteção contra a formação de novas manchas, tendo uma boa cobertura e retenção na superfície do dente (Sensabaugh *et al.*, 2009), também é utilizado na indústria como um agente anti-microbiano devido à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana externa (Vaara, 1992) e dispersar o biofilme microbiano (Van der Meie *et al.*, 2002; Khammar *et al.*, 2004). Stookey *et al.* (2004). Além dessas propriedades, baixos danos erosivos foram observados com o uso de dentifrícios contendo fluoreto estanhoso e HMP (Hopper *et al.*, 2007).

Assim, sabendo-se que a eficácia anticariogênica de dentifrícios de alta concentração de F é aumentada com a adição do HMP, portanto um estudo avaliando uma nova formulação de dentifrício de reduzida concentração de F suplementado com HMP seria importante para verificar sua efetividade sobre a redução da desmineralização. Esse estudo seria de grande valor clínico na odontopediatria, uma vez que a concentração de F que a criança vier a ingerir seria menor e desta forma diminuiria o risco de intoxicação e desenvolvimento de fluorose dentária.

2-OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a eficácia de dentifrícios com concentração reduzida de F (250 µgF/g), suplementados com concentrações de 0 a 3,0% de hexametáfato de sódio sobre a desmineralização do esmalte bovino.

3-MATERIAL E MÉTODO

3.1-Delineamento Experimental

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol a 2% neutra em temperatura ambiente. As superfícies de esmalte dos blocos foram sequencialmente polidas e aqueles com microdureza (baseline) de 330-380 KHN (SMH₁) foram selecionados e divididos em grupos experimentais (n=12) de acordo com a média de microdureza da população total de blocos e seu intervalo de confiança. Os blocos de esmalte bovino foram submetidos num período de sete dias a cinco ciclagens de pH e ao tratamento duas vezes ao dia com dentifrício, permanecendo dois dias em uma solução remineralizadora denominada de renova. As formulações de dentifrícios apresentaram concentrações de F de zero e 250 µg F/g e concentrações de HMP de 0 a 3%. Foi utilizado o dentifrício comercial Crest® (“Gold Standard”- 1100 µg F/g) para fins de comparação. Após as ciclagens de pH a microdureza superficial do esmalte final (SMH₂) foi medida para cálculo da porcentagem de perda de dureza da superfície (%SMH).

3.2-Preparação dos Blocos de Esmalte

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes 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 foram selecionados, as coroas dentárias foram 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). As coroas dentárias foram limpas e lavadas em água destilada/deionizada, secas com papel absorvente e, então, fixadas em placas de acrílico (medindo 4x4 cm e 4 mm de espessura) com cera pegajosa (Horus – Herpo Prod. Dent. Ltda) pela sua face proximal. As placas foram montadas em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração com água destilada/deionizada e 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 4x4mm 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 de acordo com a seguinte seqüência: lixa de granulação 600, 2 pesos, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 800, 2 pesos, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 2 pesos, 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram imergidos em água deionizada e submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210) durante 2 minutos. Na seqüência 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 foram lavados em jatos de água deionizada durante 30 segundos, e após, conservados em ambiente úmido, prontos para análise da microdureza superficial inicial (SMH_1) do esmalte.

3.3- Formulação e Dosagem de F dos Dentifrícios Experimentais

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório de Odontopediatria da FOA-UNESP e continham 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. O F foi acrescido às formulações para obter uma concentração final de 250 μg F/g (na forma de NaF) e o HMP, nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1, 2 e 3%. Foram utilizados também um dentifrício sem F e sem HMP (placebo), dentifrícios sem adição de F, mas com as mesmas concentrações de HMP acima descritas e o dentifrício comercial Crest® (“Gold Standard”, 1100 μg F/g), para fins de comparação. 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. Foram pesados 100-110 mg de cada dentifrício ao qual foi adicionada água deionizada até um volume final de 10,0 mL em tubo de polipropileno graduado para centrífuga. Após homogeneização, para a dosagem do F total (FT), foi pipetado 0,25 mL da suspensão em tubo de ensaio de polipropileno ao qual foi acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Esta solução permaneceu sob agitação durante 1h a 45°C, após o qual foi adicionado 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0mL de TISAB II. Para a dosagem de F iônico (FI), a suspensão de dentifrício foi submetida à centrifugação a 906xg durante 20 minutos. Pipetou-se 0,25 mL do sobrenadante e acrescentou-se 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II (Delbem *et al.*, 2002).

3.4- Determinação da Microdureza do Esmalte

A microdureza de superfície inicial (SMH₁) foi determinada antes da ciclagem de pH utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 gramas por 10 segundos. Foram realizadas inicialmente cinco impressões a 100 μm umas das outras, na região central do esmalte.

3.5- Ciclagem de pH (Des>Re)

Os blocos foram submetidos em frascos individuais, durante sete dias, a cinco ciclagens de pH, à temperatura de 37°C, permanecendo os últimos dois dias em solução remineralizadora (Vieira *et al.*, 2005). Os blocos foram imersos sob agitação constante, duas vezes ao dia durante um minuto, em suspensões de dentifrícios em água destilada/deionizada (1:3 – peso:peso) quando removidos das soluções desmineralizadora (6 horas – Ca e P 2,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 μg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm²) e

remineralizadora (18 horas – Ca 1,5 mmol L⁻¹, P 0,9 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mol L⁻¹ em tampão cacodilato de sódio 0,02 mol L⁻¹, 0,05 µg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/ mm²). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos, após serem removidos das soluções Des-Re e dentifrício/água.

3.6- Determinação da Microdureza do Esmalte após ciclagem de pH

A microdureza de superfície foi determinada antes (SMH₁) e após as ciclagens de pH (SMH₂) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 gramas por 10 segundos. Foram realizadas inicialmente cinco impressões a 100 µm uma da outra, na região central do esmalte e após as ciclagens, outras cinco a 100 µm em relação às impressões iniciais, sendo calculada a porcentagem de perda da microdureza de superfície (%SMH), [%SMH = ((SMH₂ – SMH₁) / SMH₁) x 100].

3.7- Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias com a utilização do programa Bioestat versão 5.0, estabelecendo-se em 5% o nível de significância. A seguir, os dados foram submetidos a análise estatística ANOVA e seguida pelo teste de Tukey para as variáveis SMH₁, SMH₂ e porcentagem de perda da microdureza de superfície (%SMH).

4-Resultados

As concentrações de F designadas como fluoreto total (FT) e iônico (FI) dos dentifrícios estão apresentadas na tabela 1. As concentrações observadas de FI estão dentro da faixa de variação de 10% do valor esperado. A adição de HMP nos dentifrícios de 250 µg F/g nas concentrações utilizadas não causou alteração na concentração de FI nem de FT.

Tabela 1. Concentração média e desvio-padrão (DP) das medidas do F (µg/g) total (FT) e iônico (FI) nos dentifrícios experimentais (n=3)

Dentifrícios	FT (µg/g)	FI (µg/g)
Placebo	5,8 (1,0)	5,5 (3,0)
250 µg F/g	258,1 (13,7)	254,3 (7,2)
250 µg F/g +0,25% HMP	296 (3,4)	248,7 (16,8)
250 µg F/g + 0,5% HMP	254,4 (7,2)	254,1 (11,1)
250 µg F/g + 1% HMP	247,7 (3,4)	245,3 (7,2)
250 µg F/g + 2 HMP	250,7 (2,3)	252,2 (1,8)
250 µg F/g + 3% HMP	247,2 (3,8)	246,4 (3,2)
0,25% HMP	10,4 (0,7)	9,3 (0,1)
0,5% HMP	5,6 (0,3)	7,4 (0,3)
1% HMP	5,9 (0,2)	6,8 (0,3)
2% HMP	6,9 (0,6)	7,4 (1,6)
3% HMP	6,2(0,2)	6,7 (0,4)
CREST	1107,9 (13,5)	1163,7 (3,3)

As médias $\pm$ dp de SMH₁ (kg/mm²) do esmalte dos grupos variaram de $370,0 \pm 8,2$ a $376,3 \pm 5,7$ e não houve diferença significativa entre elas (Tabela 15). Com os valores de SMH₂ (kg/mm²) medida após os blocos serem submetidos às ciclagens de pH e tratamento com dentifrícios foi observada a maior perda de microdureza no grupo placebo e naqueles com HMP sem F, com exceção do grupo 0,5% HMP o qual foi similar ao grupo 250 µg F/g. O grupo 0,5% HMP, por sua vez, foi o que mostrou o maior valor de SMH₂ entre todos os grupos, seguido do 1,0% HMP que mostrou microdureza semelhante ao Crest ($p < 0,05$). Em concentrações maiores de HMP, entretanto, houve maior perda de microdureza e no grupo 250F+2,0 o resultado foi semelhante ao do placebo. A microdureza final do grupo 250F foi maior que a do placebo e menor que o Crest ($p < 0,001$), mostrando uma relação direta entre a concentração de F no dentifrício e SMH₂

Tabela 2. Valor médio (n=13) da microdureza inicial e final (SMH₁ e SMH₂), desvio padrão das medidas (DP) e porcentagem da perda de microdureza de superfície (%SMH) nos dentifrícios experimentais de acordo com a análise

Dentifrício	Análise de Microdureza		
	*SMH ₁	SMH ₂	%SMH
Placebo	374,4 (5,70)	55,6 (15,1) ^{a,c}	-85,2 (3,9) ^a
250 µg F/g	371,7 (6,8)	148,2 (17,6) ^{b,d}	-60,2 (5,1) ^b
250 µg F/g + 0,25%HMP	372,0 (6,9)	160,3 (34,1) ^d	-57,0 (8,8) ^b
250 µg F/g + 0,5%HMP	370,0 (11,0)	239,5 (18,1) ^e	-35,2 (4,3) ^c
250 µg F/g + 1%HMP	370,1 (9,3)	216,3 (12,0) ^f	-41,5 (3,5) ^c
250 µg F/g + 2%HMP	370,2 (10,7)	69,4 (32,6) ^c	-81,1 (8,3) ^{a,d}
250 µg F/g + 3%HMP	373,1 (7,6)	93,3 (38,5) ^g	-75,0 (9,6) ^d
0,25%HMP	371,7 (7,3)	50,8 (15,2) ^a	-86,3 (3,9) ^a
0,5%HMP	372,4 (7,6)	139,9 (24,1) ^b	-62,4 (6,1) ^b
1,0%HMP	373,0 (6,5)	70,4 (23,8) ^c	-81,1 (6,5) ^a
2,0%HMP	376,3 (5,7)	46,8 (28,9) ^a	-87,6 (7,7) ^a
3,0%HMP	370,1 (9,4)	58,6 (18,4) ^{a,c}	-84,1 (5,1) ^a
CREST	370,0 (8,2)	224,4 (20,9) ^h	-39,7 (1,8) ^c

Letras distintas mostram diferença estatística entre os tratamentos em cada análise (Tukey, $p < 0,05$).

* As médias de SMH₁ não apresentam diferença significante entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A figura 1 mostra os valores da porcentagem de perda da microdureza de superfície (%SMH) com a concentração de HMP e F no dentifrício medida após os blocos serem submetidos às ciclagens de pH e tratamento com dentifrícios. Observa-se que o grupo 250 $\mu\text{gF/g}$ com 0,5% de HMP apresentou menor porcentagem de perda da microdureza de superfície, seguido do grupo de 250 $\mu\text{gF/g}$ com 1,0% de HMP que ficaram semelhantes ao Crest[®]. Além disso, a adição de 0,5% de HMP a um dentifrício sem F causou uma menor porcentagem de perda da microdureza de superfície em comparação ao placebo. Já o grupo 0,25%; 1,0%; 2,0%; 3,0% HMP sem adição de F ao dentifrício apresentaram resultados semelhantes ao placebo.

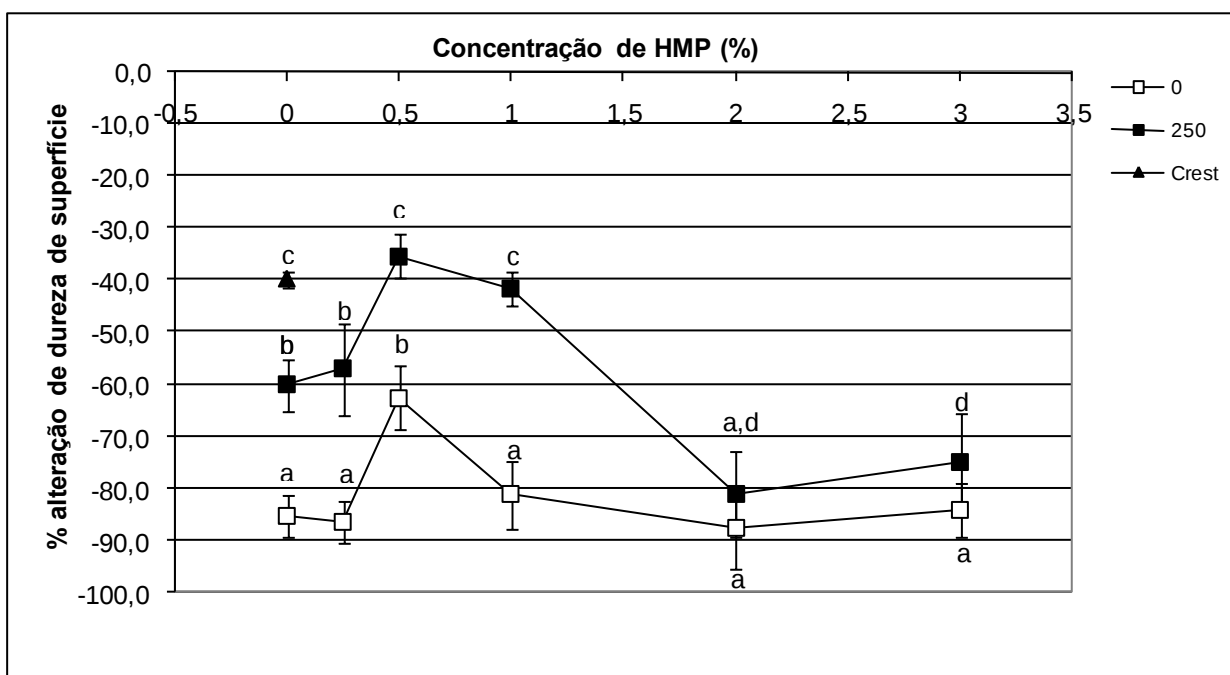


Figura 1. Valores da porcentagem de perda da microdureza de superfície (%SMH) com a concentração de HMP e F no dentifrício. Letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). As barras verticais indicam erro padrão da média (epm)

5-Discussão

Estudos laboratoriais sob condições controladas e padronizadas são importantes para avaliar o potencial anticariogênico de novas formulações de dentifrícios antes de realizar um estudo *in situ* ou clínico.

Na literatura observa-se que a suplementação com sais de fosfato em dentifrícios de baixa concentração de F tem demonstrado uma ação anticariogênica semelhante e/ou superior quando comparado a um dentifrício padrão de 1100 µgF/g.

Takeshita *et al.* (2009) observaram que a adição de fosfato na forma de trimetafosfato (TMP), um polifosfato cíclico, na concentração de 1% a um dentifrício de 500 µgF/g resulta numa eficácia similar a de um dentifrício padrão de 1100 µgF/g, *in vitro*, sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino. Dessa forma, a adição de fosfato compensaria a redução da ação anticariogênica causada pela menor concentração de F.

Pfarrer *et al.* (2002) observaram num estudo *in vitro* utilizando ciclagem de pH que o tratamento com dentifrício de 1100 µgF/g (NaF) suplementado com 7% HMP resultou em perda mineral integrada equivalente ao do Crest®. Num estudo *in situ*, Wefel *et al.* (2002) reportaram que dentifrícios contendo NaF 0,243% com HMP 7% ou SnF₂ 0,454% com HMP 13% mostraram resultados semelhantes aos dos respectivos controles sem HMP com relação à lesão de esmalte analisada por microscopia de luz polarizada, mas que o SnF₂ suplementado com HMP foi superior em prevenir a desmineralização de superfícies de raiz. Baseando-se nesses trabalhos, a proporção mais adequada para um dentifrício de 250 µgF/g, seria 1,59 a 2,95% de HMP, entretanto nessa faixa de concentração, no presente trabalho, a microdureza final de superfície foi próxima à do placebo. Nessa comparação, contudo, deve-se considerar que aqueles autores não avaliaram outras concentrações de HMP. Além disso, é possível que na presença de alta concentração de F (1100 µg/g) o efeito do HMP não seja tão evidente quanto na de 250 µgF/g.

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.

O presente trabalho *in vitro* avaliou a eficácia de dentifrícios contendo 250 µg F/g associados ao HMP nas concentrações de 0,25 a 3,0%, mostrando que em determinadas proporções essa associação tem eficácia similar a de um dentifrício padrão de 1100 µg F/g em reduzir a desmineralização do esmalte, o que possibilitaria reduzir a concentração de F e dessa forma, diminuir a ingestão do íon pelas crianças, prevenindo a fluorose dentária.

O HMP mostra uma grande afinidade à apatita do esmalte como resultado da ligação dos grupos fosfatos aos sítios de cálcio da superfície, o que explica sua alta eficiência na remoção de pigmentos do dente. Os pigmentos adsorvidos ao esmalte ou ligados à película são substituídos pela ligação dos fosfatos do HMP e enquanto ligados previnem a adsorção posterior de outros pigmentos (Baig *et al.*, 2002). Através dessas múltiplas ligações, as moléculas de HMP formam uma camada de fosfatos condensados alterando a permeabilidade seletiva do esmalte (Van Dijk *et al.*, 1980), podendo estar relacionado ao processo de mineralização do esmalte nas concentrações de 0,5% e 1,0% de HMP associados a 250 µgF/g.

Através da concentração média e desvio-padrão de F designadas como fluoreto total (FT) e iônico (FI) dos dentifrícios apresentados na tabela 1 observa-se que a adição de HMP 0,25% a 3,0% nos dentifrícios de 250 µg F/g nas concentrações utilizadas não causou alteração na concentração de FI nem de FT. A adição de qualquer composto ao dentifrício fluoretado não deve interferir na biodisponibilidade do F.

Os dados da SMH₂ (tabela 1) mostra que existe uma proporção adequada entre as concentrações de F e HMP para se obter respostas semelhantes aos dos dentifrícios de 1100 µgF/g. Para uma concentração de F de 250 µg F/g, os melhores resultados foram obtidos com 0,5 e 1,0% de HMP.

Os modelos de ciclagem de pH modernos tornaram-se métodos de eleição para muitas pesquisas de cárie, aplicando técnicas *in vitro*, pois os mesmos oferecem uma melhor simulação do processo de cárie, fornecendo informações acerca da sua dinâmica e da eficácia de agentes preventivos (TEN CATE; MUNDORFFSHRESTHA, 1995; WHITE, 1995). Vieira *et al.* (2005) padronizaram a metodologia da ciclagem de pH para esmalte bovino e obtiveram relação dose-resposta e, portanto, esse modelo foi utilizado no presente trabalho.

Poderão ser realizados em futuros estudos avaliação da análise de concentração de F nos dentifrícios com uma comparação entre aqueles submetidos e não submetidos ao envelhecimento acelerado, análise de F, P e luz polarizada, utilizada para avaliar alterações em lesões de esmalte, uma vez que permite reconhecer mudanças definidas, em várias partes do tecido adamantino (MJÖR; FEJERSKOV, 1979). Portanto, o fenômeno de remineralização de lesões cariosas incipientes em esmalte tem sido estudado por intermédio da microscopia de luz polarizada.

6-Conclusão

Conclui-se com base nos resultados obtidos, que a associação de HMP, na concentração de 0,5 a 1,0% a um dentifrício de 250 µgF/g proporciona uma eficácia equivalente a de um dentifrício padrão de 1100 µgF/g na ação inibidora da desmineralização do esmalte, *in vitro*. Essas propriedades físico-químicas do HMP junto com sua ação antimicrobiana poderão resultar em maior ação anticariogênica em estudos no ambiente oral.

Referências Bibliográficas

1. BAIG, A.; HE, T.; BUISSON, J.; SAGEL, L.; SUSZCZYNSKY-MEISTER, E.; WHITE, D.J. Extrinsic whitening effects of sodium hexametaphosphate--a review including a dentifrice with stabilized stannous fluoride. **Compend Contin Educ Dent.**, v.26, n.9, suppl.1, p.47-53, 2005.
2. BRATTHALL, D.; HANSEL-PETERSSON, G.; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? **Eur J Oral Sci.** Aug; 104 (4 (Pt 2)): p. 416-22; discussion p.423-5, 430-2, 1996.
3. BRIGHENTI, F.L.; DELBEM, A.C.B.; BUZALAF, M.A.R.; OLIVEIRA, F.A.L.; RIBEIRO, D.B.; SASSAKI, K.T. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. **Caries Res**, v.40, p.239-244, 2006.
4. CANGUSSU, M.T.C.; NARVAI, P.C.; FERNANDEZ, R.C.; DJEHIZIAN, V. A fluorose dental no Brasil uma revisão crítica. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 7-15, 2002.
5. CASTRO, A.M. Streptococcus mutans na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. **Rev Cons Reg Odontol Minas Gerais**, v.6, n.1, p.24-7, jan./abr. 2000.
6. CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades**. Sao Paulo: Santos, p. 31-68, 2001.
7. DELBEM ACB, Vieira AE, Cury JA: Avaliação do potencial cariostático do dentifrício brasileiro de maior participação no mercado. **Rev Bras Odontol.** v.59; p.14-18, 2002.
8. DENBESTEN. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.27, p.41-7, 1999.
9. DENBESTEN. Mechanism and timing of fluoride effects on developing enamel. **J Public Health Dent**; v.59 n.4: p. 247-251, 1999.
10. EKSTRAND, J.; FEJERSKOV, O.; SILVERSTIONE, L.M. Fluoride in dentistry. Copenhagen: Munksagaard, p.294, 1988.
11. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Evaluation of the health aspects of phosphates as food ingredients. **NTIS document no. Spring. eld, VA: NTIS**, . p. 262-651, 1975.

12. FEJERSKOV, O.; MANJ, F.; BAEUM, V.; MOLLER, I.J. Fluorose dentária: um manual para profissionais da saúde. **São Paulo, Ed. Santos**; P. 122, 1994.
13. HICKS, M. J.; FLAITS, C.M. Enamel caries formation and lesion progression with a fluoride dentifrice and a calcium phosphate containing fluoride dentifrice: a polarized light microscopic study. **J Dent Child**, v. 67, p. 21-8, 2000.
14. HOOPER, S.M.; NEWCOMBE, R.G.; FALLER, R; EVERSOLE, S.; ADDY, M.; WEST, N.X. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. **J Dent**. v. 35, p.476–81, 2007.
15. KARDOS, S.; SHI, B; SIPOS, T. The in vitro demineralization potencial of a sodium fluoride, calcium and phosphate ion-containing dentifrice under various experimental conditions. **J Clin Dent**, v. 10, Spec. n. 1, p. 22-5, 1999.
16. KASHKET, S. Historical review of remineralization research. **J Clin Dent**, v. 10, n. 2, p. 56-64, 1999.
17. KOO, R.H; CURY, J.A. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. **Am J Dent**, v. 11, p. 173-6, 1998.
18. KUNZEL, W. Decline of caries prevalence after the cessation of water fluoridation in the former East Germany. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.28, n.5, p. 382-9, 2000.
19. KHAMMAR, N; MALHAUTIER, L; DEGRANDE, V; LENS, R; LENS, R; FANLO, J.L. Evaluation of dispersion methods for enumeration of microorganisms from peat and activated carbon biofilters treating volatile organic compounds. **Chemosphere**; v. 54, p.243-54, 2004.
20. LYMA, Y.B.O; CURY J.A. Fluoride intake by children from water and dentifrice. **Rev. Saúde Pública [online]**. v. 35, n. 6, p. 576-8, 2001.
21. MARINHO, V.C.C. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. **J. Dent. Educ.**, v.67, n. 4, p. 448-58, Apr. 2003a.
22. MARINHO, V.C.C. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, n.4, CD002782, Oct. 2003b.
23. MARINHO, V.C.C. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, n.1, CD002781. 2004.

24. MARTINS, C.C; PINHEIRO, N.R.; PAIVA S.M. Perfil das Crianças Portadoras de Fluorose Dentária Quanto às Diversas Formas de Acesso ao Flúor. **J. Bras. Odontoped Odonto Bebê, Curitiba.** v.5, n.27, p. 396-402, set/out., 2002.
25. MASCARENHAS, A.K; BURT, B.A; Mascarenhas, A. K.; Burt, B. A. Fluorosis risk from early exposure to fluoride toothpaste. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.26, p.241-8, 1998.
26. MASCARENHAS, A.K. Oral hygiene as a risk indicator of enamel and dentin caries. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v.26, p. 331-9, 1998.
27. MELLBERG, J.R.; CHOMICKI, W.G. Effect of soluble calcium on fluoride uptake by enamel from sodium monofluorophosphate. **J Dent Res**, v. 61, n. 12, p. 1394-6, 1982.
28. MORENO, E.C. Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. **Int Dent J**, v. 43, p. 71-80, 1993.
29. NEGRI, H.M.D.; CURY, J.A. Efeito dose-resposta de uma formulação de dentifício com concentração reduzida de fluoreto – estudo in vitro. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 4, p. 361-5, 2002.
30. OGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. **Caries Res**, v. 22, p. 302-5, 1988.
31. PFARRER, A.M.; WHITE, D.J., RAPOZO-HILO, FEATHERSTONE, I.D.: Anticaries and hard tissue abrasion effects of a “dual action” whitening, sodium hexametaphosphate tartar control dentifrice. **J Clin Dent.**;v.13(1):p.50-54, 2002.
32. SAXEGAARD, E.; ROLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scand. J. Dent.**, v. 96, n. 6, p. 523-35, Oct. 1988.
33. SHEMEHORN, B.R.; WOOD, G.D.; WINSTON, A.E. Bio-availability' of fluoride in remineralizing toothpaste containing calcium salt. **J Dent Res**, v. 77, p. 188, 1998.
34. SHEMEHORN, B.R.; WOOD, G.D.; WINSTON, A.E. Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamel on dentifrice. **J Clin Dent**, v. 10, Spec. n. 1, p. 9-12, 1999a.
35. SHEMEHORN, B.R.; ORBAN, J.B.; WOOD, G.D.; FISHER, G.M.; WINSTON, A.E. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. **J Clin Dent**, v. 10, Spec. n. 1, p. 13-6, 1999b.

36. SCHIFF, T.; SALETTA, L.; BAKER, R.A.; WINSTON, J.L.; HE, T. Desensitizing effect of a stabilized stannous fluoride/Sodium hexametaphosphate dentifrice. **Compend Contin Educ Dent.** v.26, n.1, suppl. 1, p.35-40, Sep.2005.
37. SENSABAUGH, C.; SAGEL, M.E. Stannous fluoride with sodium hexametaphosphate: review of laboratory, clinical and practice-based data. **J Dent Hyg.** v. 83, p.70-8, 2009.
38. STOOKEY, M.S.; MAU, R.L.; ISAACS, C.; GONZALEZ-GIERBOLINI, R.D.; BARTIZEK, R.D.; BERSBROCK, A.R. The Relative Anticaries Effectiveness of Three Fluoride-Containing Dentifrices in Puerto Rico. **Caries Research**, v.38, p.542-50, 2004.
39. TAKESHITA, E.M. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. **Caries Res.**, v. 43, n. 1, p. 50-6. Jan. 2009.
40. TEN CATE, J. M. In vitro studies on the effects of fluoride on de-and remineralization. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 2, p. 614-619, Feb. 1990.
41. TEN CATE, J. M.; MUNDORFF-SHRESTHA, S.A. Working group report 1: laboratory models for caries (in vitro and animal models). **Adv. Dent. Res.**, v.9, n.3, p.332-4, 1995.
42. TUNG, M.S.; EICHMILLER, F.C. Dental applications of amorphous calcium phosphates. **J. Clin. Dent.**, v.6, p.135-8, 1999.
43. VAN DER MEI, H.C.; WHITE, D.J.; COX, E.R.; GEERTSEMA-DOORNCUSCH, G.I.; BUSSCHER, H.I.; Van der Mei, H.C.; White, D.J.; Cox, E.R.; Geertsema-Doornbusch, G.I.; Busscher, H.I. Bacterial Detachment from salivary conditioning films by dentifrice supernates. **J Clin Dent**, p.13:44-9, 2002.
44. VAN RIJKOM, H.M.; TRUIN, G.J.; VAN'T HOF, M.A. A meta-analysys of clinical studies on caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. **Caries Res**, v. 32, n. 2, p. 83-92, Jan. 1998.
45. VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol Rev**; v.56, p.395-411, 1992.
46. VIEIRA, A.E.M.; DELBEM, A.C.B.; SASSAKI, K.T.; RODRIGUES, E.; CURY, J.A.; CUNHA, R.F. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, v.39, n.6, p.514-20, 2005.
47. VRBIC, V. Reasons for the caries decline in Slovenia. **Comm Dent Oral Epidemiol**, v.28, p.126-32, 2000.

48. WALSH, T.; WORTHINGTON, H.V.; GLENNY, A.M.; APPELBE,P.; MARINHO, V.C.; SHI, X. Fluoride toothpaste of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescent. **Cochrane Database Syst Rev**; jan20:CDOO7868, 2010.
49. WEFEL, J.S.; STANFORD, C.M.; AMENT, D.K. HOGAN, M.M.; HARLESS, J.D.; PFARRER, A.M.; RAMSEY, L.L, LEUSCH, M.S.; BIESBROCK, A.R.: In situ evaluation of sodium hexametaphosphate-containing dentifrices. **Caries Res**; v.36:p.122-128, 2002.
50. WINSTON, J.L.; FIEDLER, S.K.; SCHIFF, T.; BAKER, R. An anticalculus dentifrice with sodium hexametaphosphate and stannous fluoride: a six-month study of efficacy. **J Compend Dent Pract**.v.8, p.1-8, 2007.
51. WHITE, D. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv. Dent. Res.** v.9, n.2, p.175-93, 1995.
52. WHITE D.J.; GERLACH R.W.Anticalculus effects of a novel dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical, mechanism, and clinical response. **J Comtemp Dent Prate**. v.1, p.1-19, 2000.
53. WHITE D.J.; COX, E.R.; SUSZCYNKYMEISTER, E.M.; BAIG, A.A. In vitro studies of the anticalculus efficacy of a sodium hexametaphosphate whitening dentifrice. **J Clin Dent**, v.13, p.33-37, 2002.
54. WONG, M.C.; GLENNY, A.M.; ISANG, B.W.; LO, E.C.; WORTHING, H.V.; MARINHO, V.C. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. **Cochrane Database Syst Rev**; jan20:CDOO7693, 2010.

ANEXOS

ANEXO A- CONFECCÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO (4X4mm)



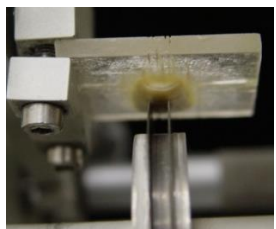
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz por meio de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



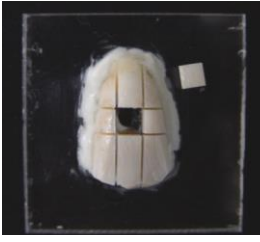
2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.

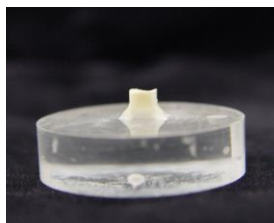


4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond -n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida, foi realizado o corte no sentido transversal.
-



5. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.
-

ANEXO B- PLANIFICAÇÃO DA DENTINA E POLIMENTO DO ESMALTE



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 11 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.
-

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz Beta – Grinder – Polisher e Vector Power Head (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e lixas de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler), durante 30 s sob baixa rotação e refrigeração.



3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima para serem polidos.
-

Sequência do polimento de esmalte:

- ✓ Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
- ✓ Lixas de granulação 600 (20 s) e 1200 (30 s) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 min, entre cada lixa;
- ✓ Acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) durante 1 min com suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
- ✓ Lavagem durante 30 s com jato de água deionizada;
- ✓ Limpeza em lavadora ultrassônica Modelo 2110 (Branson, Danbury CT, EUA) com água destilada/ deionizada (2min).

ANEXO C- ANÁLISE DA DUREZA DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE

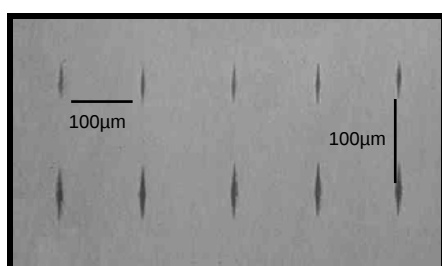


1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMSWIN (NewAge Industries, EUA).

-
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 g e tempo de 10 s.

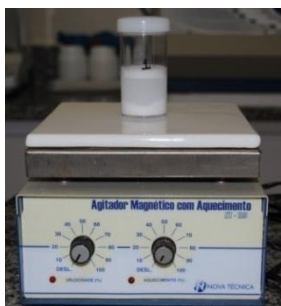


3. Fotomicrografia das impressões (SHi). (Aumento: 100x)



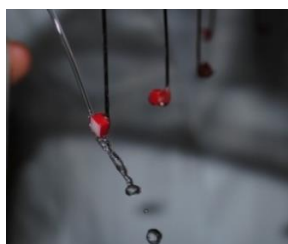
4. Fotomicrografia das impressões (SHi, SHf). (Aumento: 100x)
-

ANEXO D- CICLAGEM DE pH (Des>Re)



1. Agitador Magnético com Aquecimento TE – 081 (Piracicaba, SP - Brasil) utilizado para agitar o dentifrício com velocidade de 50% durante 15 min.

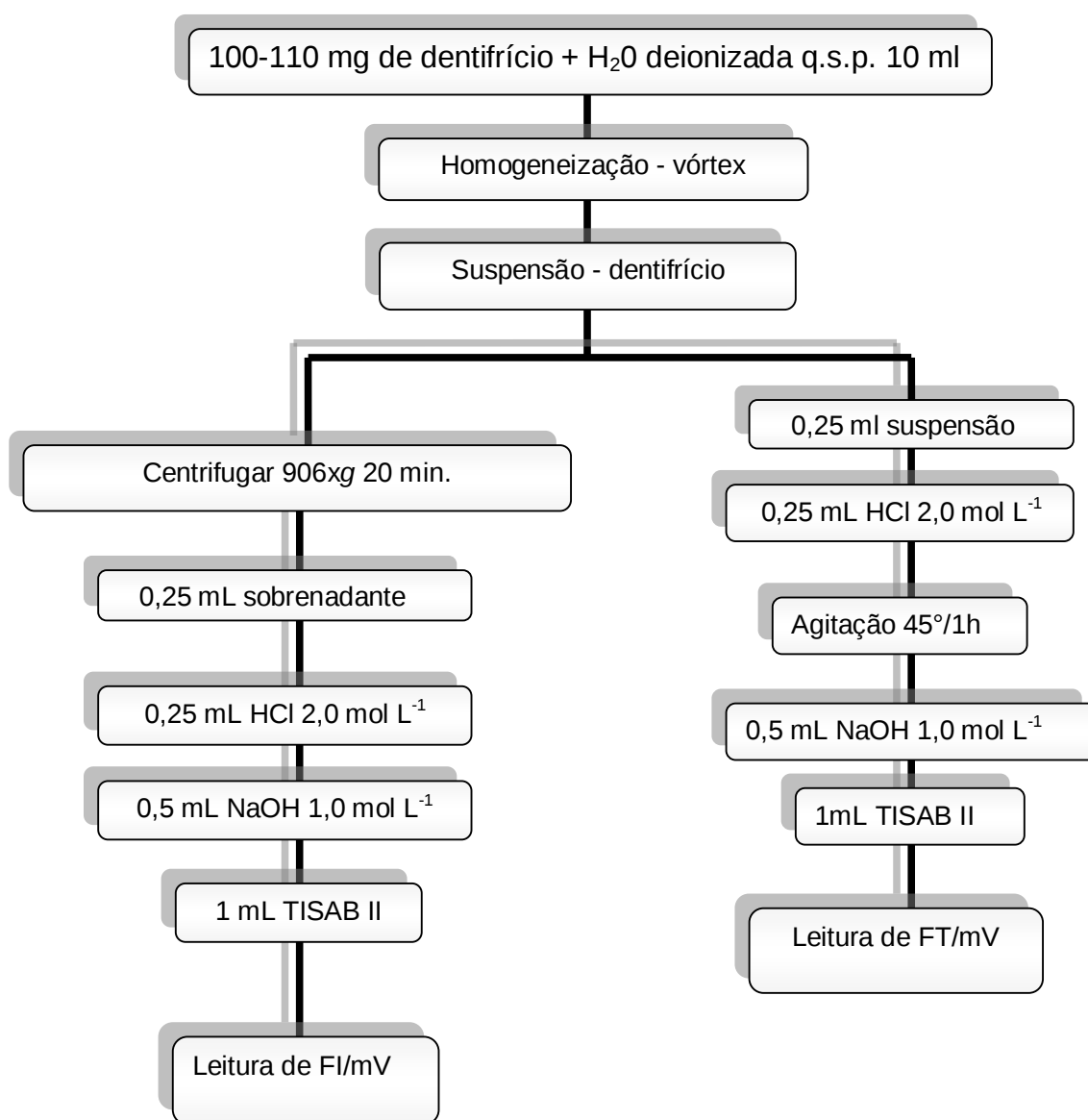
2. Mesa Agitadora TE - 141-Orbital (Tecnal, Piracicaba - SP, Brasil) utilizada para tratamento dos blocos de esmalte, em rotação 7 durante 1 min.

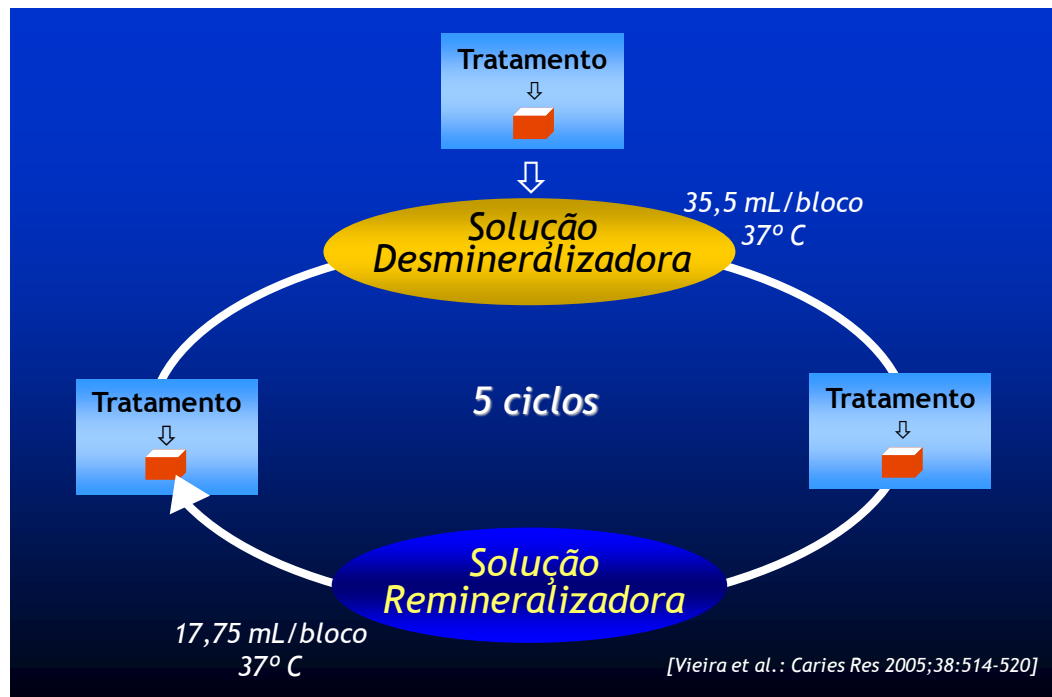


3. Lavagem dos blocos de esmalte antes e após os tratamentos, durante 30 s com água deionizada.

4. Estufa para cultura bacteriológica (Olidef cz Ribeirão Preto – SP, Brasil) utilizada para manter os blocos de esmalte nas soluções de Des e Re em temperatura 37°C, durante o período da ciclagem.



ANEXO E- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DE F DOS DENTIFRÍCIOS

ANEXO F- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CICLAGEM DE pH (Des>Re)

ANEXO G- Médias das durezas iniciais e finais

Dureza inicial (SH _i)						Dureza final (SH _f)						
Placebo												
Blocos	média					média						
1	377	370	375	368	370	372,0	31	45	38	44	40	39,6
2	373	375	375	375	377	375,0	62	81	76	136	26	76,2
3	380	377	380	380	380	379,4	73	62	49	49	55	57,6
4	380	373	380	377	373	376,6	94	85	76	67	45	73,4
5	380	373	375	370	370	373,6	45	41	34	43	26	37,8
6	380	380	380	380	380	380,0	102	98	74	50	46	74,0
7	380	380	375	380	380	379,0	45	34	50	57	62	49,6
8	380	375	380	375	375	377,0	67	69	79	77	77	73,8
9	380	380	377	380	380	379,4	48	43	44	40	49	44,8
10	361	361	365	361	361	361,8	44	45	58	50	57	50,8
11	375	375	373	373	375	374,2	44	53	58	55	57	53,4
12	365	368	365	365	365	365,6	45	40	30	33	35	36,6
média = 374,467						média = 55,6						
dp = 5,69742						dp = 15,16						
Grupo 0F+0,25												
Blocos	média					média						
1	370	375	373	370	375	372,6	77	79	86	81	89	82,4
2	375	373	373	373	373	373,4	33	38	37	37	41	37,2
3	377	375	375	375	373	375,0	59	52	48	50	57	53,2
4	380	377	375	377	377	377,2	40	45	40	41	50	43,2
5	380	375	377	380	375	377,4	32	36	30	31	31	32,0
6	361	365	361	365	363	363,0	45	56	57	57	52	53,4
7	361	361	365	361	361	361,8	53	47	53	40	48	48,2
8	380	377	375	375	375	376,4	55	60	46	44	41	49,2
9	370	375	375	375	373	373,6	42	40	38	38	43	40,2
10	380	377	375	375	380	377,4	68	80	84	68	76	75,2
11	354	356	356	356	356	355,6	35	33	52	38	30	37,6
12	380	377	375	377	377	377,2	65	52	53	70	50	58,0
média = 371,72						média = 50,8						
dp = 7,38						dp = 15,23						
Grupo 0F+0,5												
Blocos	média					média						
1	370	375	373	370	370	371,6	98	86	111	108	104	101,4
2	361	361	365	361	361	361,8	110	123	113	110	115	114,2
3	356	356	356	359	359	357,2	123	145	146	130	147	138,2
4	377	380	380	377	370	376,8	171	104	153	229	212	173,8
5	370	373	375	377	375	374,0	145	156	170	168	139	155,6
6	380	380	380	380	380	380,0	167	149	173	161	127	155,4
7	380	375	370	370	373	373,6	80	130	161	168	168	141,4
8	380	380	375	377	377	377,8	133	141	152	162	139	145,4
9	380	373	377	380	380	378,0	148	156	152	151	127	146,8
10	361	363	361	361	365	362,2	112	94	104	118	95	104,6
11	380	380	375	380	375	378,0	144	127	148	129	92	128,0
12	377	380	377	375	377	377,2	173	187	182	167	160	173,8
média = 372,35						média = 139,88						
dp = 7,65						dp = 24,12						

Grupo 0F+1,0												
Blocos	média						média					
1	380	377	375	375	375	376,4	82	77	88	89	87	84,6
2	377	375	375	373	375	375,0	87	73	87	84	73	80,8
3	373	373	375	377	375	374,6	81	96	100	93	104	94,8
4	380	380	380	375	380	379,0	55	46	46	38	52	47,4
5	361	365	365	361	361	362,6	80	97	99	82	89	89,4
6	380	380	377	377	375	377,8	106	85	89	80	90	90,0
7	380	377	377	377	380	378,2	50	67	52	45	50	52,8
8	370	373	375	373	375	373,2	24	32	24	26	27	26,6
9	361	361	363	361	363	361,8	106	99	100	99	104	101,6
10	365	361	361	365	365	363,4	33	48	44	39	46	42,0
11	380	375	377	375	377	376,8	81	76	73	70	62	72,4
12	380	375	380	375	375	377,0	63	60	62	66	63	62,8
média =						373,0	média =					
dp =						6,5	dp =					

Grupo 0F+2,0												
Blocos	média						média					
1	380	375	375	380	377	377,4	22	20	24	24	20	22,0
2	380	375	380	380	380	379,0	102	92	90	90	90	92,8
3	380	380	380	380	380	380,0	21	21	27	20	20	21,8
4	380	380	375	380	380	379,0	68	62	62	70	60	64,4
5	380	375	377	380	377	377,8	20	28	29	24	22	24,6
6	380	380	380	380	375	379,0	81	82	70	84	70	77,4
7	377	380	380	377	375	377,8	75	65	79	53	52	64,8
8	377	377	375	380	375	376,8	96	85	98	95	84	91,6
9	377	375	377	377	373	375,8	15	19	21	36	30	24,2
10	375	377	380	375	380	377,4	21	23	30	25	28	25,4
11	380	375	377	375	375	376,4	23	27	30	27	25	26,4
12	361	356	363	352	361	358,6	25	27	29	25	25	26,2
média =						376,25	média =					
dp =						5,69	dp =					

Grupo 0F+3,0												
Blocos	média						média					
1	377	373	377	370	375	374,4	81	79	69	70	95	78,8
2	377	377	375	377	380	377,2	43	47	43	45	46	44,8
3	356	352	356	354	356	354,8	35	39	35	28	37	34,8
4	380	375	380	380	377	378,4	55	47	42	31	40	43,0
5	380	375	375	373	375	375,6	72	69	57	57	69	64,8
6	380	377	375	375	380	377,4	31	30	30	30	32	30,6
7	375	370	373	373	370	372,2	67	71	80	80	90	77,6
8	380	377	377	377	377	377,6	41	45	41	48	46	44,2
9	361	361	365	361	365	362,6	65	61	75	66	65	66,4
10	363	359	356	354	354	357,2	65	86	102	90	84	85,4
11	380	375	375	375	380	377,0	74	65	79	79	60	71,4
12	356	356	356	360	356	356,8	54	53	66	67	69	61,8
média =						370,10	média =					
dp =						9,36	dp =					

Grupo 250F												
Blocos	média						média					
1	370	375	373	377	377	374,4	106	113	118	108	102	109,4
2	365	363	363	367	368	365,2	119	136	131	137	132	131,0
3	380	377	377	375	375	376,8	138	158	149	158	158	152,2
4	377	370	377	370	375	373,8	149	168	145	142	154	151,6
5	370	368	375	370	370	370,6	126	135	153	135	152	140,2
6	375	370	375	375	373	373,6	171	171	180	184	161	173,4
7	350	356	350	359	356	354,2	142	180	189	168	164	168,6
8	370	365	370	370	370	369	167	160	148	167	156	159,6
9	380	375	375	377	380	377,4	128	134	131	142	141	135,2
10	377	380	380	377	377	378,2	151	140	138	152	138	143,8
11	370	368	368	370	373	369,8	161	157	160	157	153	157,6
12	380	375	377	380	375	377,4	160	185	164	132	140	156,2
média =						371,70	média =					
dp =						6,80	dp =					

Grupo 250F+0,25												
Blocos	média						média					
1	361	365	365	363	365	363,8	113	118	123	121	125	120,0
2	380	377	377	380	377	378,2	208	216	218	225	215	216,4
3	380	377	375	377	377	377,2	214	225	216	220	225	220,0
4	368	370	375	370	375	371,6	202	182	192	195	200	194,2
5	380	380	375	377	375	377,4	150	140	137	137	141	141,0
6	375	373	377	377	377	375,8	164	185	170	160	173	170,4
7	356	361	359	363	363	360,4	123	132	146	134	125	132,0
8	377	375	377	377	377	376,6	156	154	167	157	150	156,8
9	365	368	365	365	365	365,6	141	144	142	137	145	141,8
10	361	365	361	361	365	362,6	140	137	146	132	142	139,4
11	380	375	375	375	375	376,0	165	154	162	176	177	166,8
12	380	375	380	377	380	378,4	123	113	115	134	140	125,0
média =						371,97	média =					
dp =						6,87	dp =					

Grupo 250F+0,5												
Blocos	média						média					
1	380	380	380	380	380	380,0	254	268	274	241	252	257,8
2	380	375	380	380	380	379,0	254	227	220	211	234	229,2
3	370	365	361	359	361	363,2	227	212	254	220	234	229,4
4	370	370	377	377	370	372,8	260	241	239	282	263	257,0
5	375	373	377	380	377	376,4	263	236	222	249	263	246,6
6	377	377	380	377	377	377,6	212	244	252	254	252	242,8
7	380	380	377	380	380	379,4	257	246	254	249	258	252,8
8	354	352	352	352	350	352,0	229	211	202	210	214	213,2
9	352	352	354	352	354	352,8	202	203	208	211	200	204,8
10	380	377	377	370	373	375,4	257	257	257	268	257	259,2
11	380	373	375	373	380	376,2	231	234	231	222	229	229,4
12	356	352	356	359	352	355,0	249	260	241	246	263	251,8
média =						369,98	média =					
dp =						11,01	dp =					

Grupo 250F+1,0												
Blocos	média						média					
1	373	375	370	363	368	369,8	205	206	229	231	223	218,8
2	370	375	370	373	365	370,6	184	227	213	218	206	209,6
3	377	373	363	368	380	372,2	184	217	188	188	216	198,6
4	380	375	380	380	377	378,4	214	220	184	168	234	204,0
5	380	375	380	380	377	378,4	268	254	266	177	222	237,4
6	377	373	373	377	375	375,0	185	204	206	206	214	203,0
7	377	373	370	370	375	373,0	225	227	222	229	222	225,0
8	375	377	376	377	377	376,4	239	227	239	229	236	234,0
9	361	355	354	359	361	358,0	227	222	205	193	210	211,4
10	352	352	354	356	354	353,6	208	202	218	222	214	212,8
11	380	380	380	380	380	380,0	216	210	222	229	227	220,8
12	356	350	359	361	352	355,6	204	218	220	227	229	219,6
média =						370,1	média =					
dp =						9,3	dp =					

Grupo 250F+2,0												
Blocos	média						média					
1	380	380	380	375	377	378,4	103	105	90	91	74	92,6
2	380	380	377	380	380	379,4	85	103	145	92	115	108,0
3	359	352	350	352	359	354,4	52	44	50	59	70	55,0
4	380	375	373	375	375	375,6	130	110	94	90	90	102,8
5	376	377	375	376	375	375,8	37	29	32	22	23	28,6
6	370	375	373	373	375	373,2	37	25	36	44	43	37,0
7	377	375	375	375	375	375,4	132	133	111	115	135	125,2
8	370	368	368	368	365	367,8	80	85	77	87	74	80,6
9	370	373	370	370	370	370,6	50	58	61	67	71	61,4
10	370	373	370	373	370	371,2	37	30	35	35	36	34,6
11	380	377	375	377	375	376,8	50	41	55	69	41	51,2
12	345	345	341	343	343	343,4	62	70	66	57	61	63,2
média =						370,17	média =					
dp =						10,73	dp =					

250F+3,0													
Dureza inicial (SH _i)							Dureza final (SH _f)					%ASH	
blocos	média						média						
1	380	380	375	375	373	376,6	171	132	93	87	84	113,4	-69,6
2	380	380	380	377	373	378,0	120	136	135	129	147	133,4	-64,2
3	375	380	375	375	377	376,4	98	96	100	106	102	100,4	-73,4
4	375	380	380	380	375	378,0	179	168	164	167	171	169,8	-54,7
5	375	380	375	375	380	377,0	121	117	106	119	112	115,0	-69,7
6	365	370	370	368	365	367,6	60	76	59	50	50	59,0	-83,8
7	380	380	375	375	375	377,0	123	104	106	115	124	114,4	-69,5
8	361	365	365	365	363	363,8	58	61	62	76	70	65,4	-82,0
9	352	354	354	356	354	354,0	56	67	72	71	53	63,8	-82,0
10	377	375	377	377	375	376,2	69	58	62	58	62	61,8	-83,5
11	380	380	375	380	380	379,0	65	60	63	79	77	68,8	-81,9
12	370	375	375	375	373	373,6	50	45	55	54	67	54,2	-85,5
média = 373,1							média = 93,3					média = -75,0	
dp = 7,6							dp = 38,56					dp = 9,6	

Crest													
Dureza inicial (SH _i)							Dureza final (SH _f)					%ASH	
blocos	média						média						
1	377	368	377	377	370	373,8	209	264	190	241	193	219,4	-40,7
2	375	370	377	377	377	375,2	236	258	193	209	238	226,8	-39,8
3	363	361	377	356	361	363,6	222	228	193	209	274	225,2	-37,6
4	380	375	370	370	373	373,6	198	226	216	234	227	220,2	-41,0
5	375	373	373	375	375	374,2	249	229	246	194	225	228,6	-39,0
6	380	375	375	375	373	375,6	249	220	239	234	200	228,4	-38,8
7	380	373	373	380	373	375,8	236	287	227	198	241	237,8	-36,2
8	380	380	380	375	377	378,4	200	214	236	252	212	222,8	-40,9
9	377	377	375	373	377	375,8	207	210	239	210	224	218,0	-42,2
10	356	356	359	361	361	358,6	208	202	198	210	227	209,0	-42,1
11	363	359	363	363	361	361,8	228	228	227	212	214	221,8	-38,6
12	352	352	356	352	356	353,6	219	204	220	214	218	215,0	-39,6
média = 370,0							média = 224,4					média = -39,7	
dp = 8,2							dp = 20,93					dp = 1,8	

ANEXO H- Comitê de ética na experimentação animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

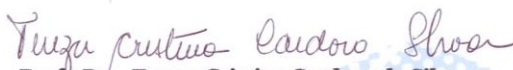


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DENTIFRÍCIO DE BAIXA CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO SUPLEMENTADO COM FOSFATO SOBRE O PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE. ESTUDO IN VITRO"** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki** e colaboração de **Danielle Mendes da Camara** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 27/03/2009 de acordo com o protocolo 2009-002506.

Araçatuba, 27 de Março de 2009



Prof.^a Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP