



*Flávia Campos Nantes de Castilho*

Ação anticárie de dentifrícios com reduzida  
concentração de fluoreto associado à  
nanopartículas de trimetafosfato de sódio

Araçatuba-SP

2014

*Flávia Campos Nantes de Castilho*

**Ação anticárie de dentifrícios com reduzida  
concentração de fluoreto associado à  
nanopartículas de trimetafosfato de sódio**

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.<sup>o</sup> Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem

**Araçatuba-SP**

**2014**

## Dedicatória

Dedico este trabalho,

**Aos meus pais, Rosely e José Nantes,**

Pela confiança que depositaram em mim não somente nesta jornada acadêmica, mas também em toda minha vida. Agradeço por toda dedicação e cuidado que tiveram comigo.

Nada seria tão especial se não fosse com o apoio de vocês. Foram alguns anos longes, mas as palavras de incentivo e força nunca faltaram para que eu pudesse concluir meu sonho.

Amo vocês!

*“Se Deus me desse uma chance de viver outra vez,  
eu só queria se tivesse vocês...”*

## Agradecimentos Especiais

A Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando meus passos. Devo a Ele minhas vitórias.

Aos meus avós (*In Memoriam*),

Como gostaria que estivessem presente comigo nessa etapa da minha vida! Sei que esse diploma significaria muito pra vocês também. Tenho certeza que estão orgulhosos por me ver formar! Muito do que sou, devo a vocês! Obrigada por ensinar-me os verdadeiros valores da vida.

Vó Têra, obrigada por todo incentivo e apoio que me deu desde a fase do vestibular até o começo do quinto ano de faculdade. Faltou pouco tempo para a senhora ver o nosso sonho se concretizar! Mas tenho certeza que o céu estará em festa nesse dia.

Sinto muita falta sua!

**À minha madrinha Mariza,**

Que fez a escolha dessa universidade juntamente comigo e a Mãe Maria. Jamais esquecerei o dia em que fomos à Igreja Matriz São Sebastião, e lá tive a certeza de que meu lugar fosse exatamente onde estive. Faltava-me um empurrão e uma palavra de força para que fosse feita a escolha entre razão e coração. E através da nossa simpatia arrepiante e fé, eu senti onde eu deveria escolher. Obrigada por isso e por tudo! Pelos conselhos, pelos puxões de orelha, pelas palavras de confiança e pelo seu amor. Sou eternamente agradecida por tê-la em minha vida. Amo você minha segunda mãe!

**Às minhas irmãs, Sarama e Fernanda,**

Obrigada por estarem junto comigo em todos os momentos da minha vida! Deus presenteou-me ao ter dado irmãs maravilhosas. Só tenho a agradecer por ter vocês junto comigo. Carregarei pra sempre no meu coração.

**Ao meu namorado Murillo,**

Posso dizer que encontrá-lo durante minha faculdade, aos meios de tantos problemas e conflitos, foi o maior presente que recebi de Deus. Hoje entendo porque meu caminho se desviou à Araçatuba. Eu precisava te encontrar. Eu precisava te conhecer. Obrigada por toda paciência, por todas as conversas, por todo carinho, apoio e preocupação que teve comigo. Você foi essencial para que essa minha felicidade fosse completa. Te amo!

*“Amar não é olhar um para o outro, é olhar juntos na mesma direção.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

**Aos meus tios ,tias e primos,**

Tia Bill, Tio Nilton, Tia Grace, Tio Nata, Tia Jú, Tio Valdeci, Tia Soraya, Tio Paulinho, Tia Iza, Gil, Tio Marcio, Rejane, Fabrícia, Paulo, Gabriel, Sheila, Gabi, Antonella, Kleber, Túlio, Gian, Cacá, Kamilla, Carol, Karina e Clarinha.

Pelos momentos de alegria, de família e de confraternização. É sempre muito bom quando nos reunimos todos e colocamos em prática o que temos de melhor, a união. Aprendi com vocês, o verdadeiro significado de família.

Minha admiração por vocês é imensa, assim como a alegria de tê-los sempre por perto.

**Ao meu professor orientador,**

Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Obrigada pela confiança, pelo reconhecimento e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e poder assim conhecer um pouco da parte científica da nossa profissão.

*“Tudo que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado” (Roberto Shinyashiki)*

**À minha querida amiga Marcelle Danelon,**

Pela ajuda incondicional nos trabalhos que participei. Obrigada pela paciência e por todo ensinamento que me deu. Muito do que aprendi, foi com você. Admiro sua dedicação, seu esforço e sua luta! Você é um exemplo a ser seguido!

**À doutoranda Maria Daniela,**

Por proporcionar-me o conhecimento e dividir comigo a ansiedade de cada resultado da pesquisa.

**À 11ª Turma de Odontologia Noturno,**

Pela convivência extremamente prazerosa. Amigos que fiz ao longo dessa caminhada e que com certeza levarei por toda a vida. Vocês foram minha família nestes seis anos. Agradeço a Deus pela turma que tive, foi exatamente a que sonhava e pedia a Ele!

“Como não lembrar de vocês, como não chorar outra vez...”

**À minha amiga Isadora Leão,**

Que foi como uma irmã! Esteve comigo em todas as horas, sempre compartilhando meus momentos de alegria e também os de fraqueza. Sem você nada seria tão legal e divertido! Obrigada pela amizade e companheirismo.

*“A única amizade que vale é aquela que nasce sem nenhum motivo”.*

*(Van Shendel)*

**Aos meus queridos veteranos Tropeço e Sobá,**

Pelos ensinamentos de vivência com extrema alegria. A pupila ama vocês!

**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba,** na pessoa dos professores Dr<sup>a</sup> Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Diretora e Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Vice-Diretor.

**Aos Pacientes,**

Para aqueles que muitas vezes depositaram tantas esperanças em nossas mãos inexperientes e, com tamanho desprendimento, confiaram a nós a sua própria saúde, na certeza de que o pouco que poderíamos oferecer seria de grande valor. Mesmo percebendo nossa insegurança tiveram paciência com os erros porventura cometidos e também vibraram de felicidade com os nossos acertos. Com um singelo sorriso demonstraram tamanha satisfação perante o nosso trabalho, fazendo-nos sentir vitoriosos e orgulhosos por termos aprendido a lição. Ao se entregarem aos



nossos cuidados permitiram que deixássemos de ser apenas acadêmicos para que nos tornássemos cirurgiões-dentistas. A todos eles o meu mais profundo agradecimento.

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

**A todos meus professores, por todos os ensinamentos ministrados, tornando-se importantes tanto em minha formação profissional como em meu amadurecimento pessoal.**

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

**Minha eterna gratidão...**

## Epígrafe

*“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe. O destino não é freqüentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.”*

*Augusto Cury*

**Castilho, F.C.N. Ação anticárie de dentifrícios com reduzida concentração de fluoreto associado à nanopartículas de trimetafosfato de sódio.** 2014. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto contendo ou não diferentes concentrações de TMP micrométrico ou nanométrico sobre a desmineralização do esmalte, utilizando um modelo de ciclagem de pH. Blocos de esmalte bovino foram divididos em doze grupos (n = 12), de acordo com os dentifrícios: placebo (sem F/TMP/TMPnano); 1100 ppm F; 250 ppm F; 250 ppm F associado ao TMP micrométrico (TMP-250), TMP nanométrico moído durante 24 horas (250 TMPnano24) ou TMP-nanométrico moído durante 48 horas (250 TMPnano48) em concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,25%. Os blocos foram submetidos à de ciclagem de pH e tratamento 2x/dia, com slurry de dentifrícios. Para avaliar a perda mineral, a dureza de superfície final (SHf) e a porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foram avaliadas e as concentrações de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e a relação molar Ca/P no esmalte. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Todas as concentrações de TMPnano reduziram a %SH ( $p < 0,05$ ). O TMPnano apresentou o maior conteúdo de F, Ca, P e Ca/P no esmalte apenas à 0,05% ( $p < 0,05$ ). O 250-0,05%TMPnano48 apresentou os melhores resultados considerando todos os parâmetros ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que o efeito anticárie do dentifrício de 250 ppm F com TMPnano foi semelhante à formulação convencional.

**Palavras-chave:** Dentifrícios, Esmalte dental, Fluoreto, Nanopartícula, Fosfatos, Desmineralização.

**Castilho, F.C.N. Ação anticárie de dentífricos com reduzida concentração de fluoreto associado à nanopartículas de trimetafosfato de sódio.** 2014. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

## **ABSTRACT**

This study evaluated the effect of low-fluoride dentifrices containing or not different concentrations of micrometric or nano-sized TMP on enamel demineralization, using a pH cycling model. Bovine enamel blocks were allocated into twelve groups (n = 12), according to the dentifrices: placebo (without F/TMP/TMPnano); 1,100 ppm F; 250 ppm F; 250 ppm F plus micrometric TMP (250-TMP), nano-sized TMP milled for 24h (250-TMPnano24) or nano-sized TMP milled for 48h (250-TMPnano48) at concentrations 0,05% 0,1% and 0,25%. Blocks were subjected to pH-cycling and treatment 2x/day with slurries of dentifrices. To evaluate mineral loss, final surface hardness (SHf) and percentage of surface hardness loss (%SH) were analyzed. Fluoride (F), calcium (Ca), phosphorus (P) and Ca/P molar ratio concentrations were determined in enamel. Data were submitted to Kruskal-Wallis test, followed by Student-Newman-Keuls' test ( $p < 0.05$ ). All TMPnano concentrations reduced %SH ( $p < 0.05$ ). The TMPnano showed higher F, Ca, P and Ca/P content in enamel only at 0.05% ( $p < 0.05$ ). The 250-0.05%TMPnano48 resulted in better results considering all parameters ( $p < 0.05$ ). It was concluded that the anticaries effect of the 250 ppm F toothpaste containing nano-sized TMP was similar to a conventional formulation.

**Keywords:** Dentifrices, Dental enamel, Fluoride, Nano-sized, Phosphates, Demineralization.

## Lista de Figuras

- Figura 1** Gráfico dos padrões de raios-x para o TMP micrométrico e TMP nanométrico após moagem de 24 horas e 48 horas. 24
- Figura 2** Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte após ciclagem de pH de acordo com a concentração de fluoreto e TMP nos dentifrícios bem como do tamanho das partículas de TMP. Letras minúsculas distintas mostram diferença estatística entre as médias. Barras verticais denotam o erro padrão da média. 26
- Figura 3** Representação gráfica dos valores médios de cálcio (a), fósforo inorgânico (b), fluoreto (c) e proporção Ca/P (d) presente no esmalte após ciclagem de pH de acordo com a concentração de fluoreto e TMP nos dentifrícios bem como do tamanho das partículas de TMP. Letras minúsculas distintas mostram diferença estatística entre as médias. Barras verticais denotam o erro padrão da média. 27

## Lista de Tabela

<b>Tabela 1</b>	<b>Valores de fluoreto iônico (FI) e fluoreto total (FT) (média ± dp) nos dentifrícios experimentais.</b>	<b>25</b>
-----------------	---	-----------

## Lista de Abreviaturas

A	Ampère
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
Ca <sup>++</sup>	Íon cálcio
CaF <sup>+</sup>	Íon Fluoreto de cálcio
CaHPO <sub>4</sub> <sup>0</sup>	Fosfato de cálcio neutro
CaF <sub>2</sub>	Fluoreto de Cálcio
DP	Desvio padrão
F	Fluoreto
g	Grama
h	Hora
HF <sup>0</sup>	Fluoreto de hidrogênio neutro
KHN	Unidade de dureza Knoop
L	Litro
M	Molar
<i>n</i>	Número de amostra
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
P	Fósforo
pH	Potencial de Hidrogênio
s	Segundo
SHi	Dureza de superfície inicial
SHf	Dureza de superfície final
%SH	Porcentagem de perda de dureza de superfície
FI	Fluoreto iônico
FT	Fluoreto total
TISAB	Tampão ajustador de força iônica total
TMP	Trimetafosfato de sódio micrométrico
TMPnano	Trimetafosfato de sódio nanométrico
mg	Miligrama

mL Mililitro

mL/mm<sup>2</sup> Mililitro por milímetro ao quadrado

mm Milímetro

mm<sup>2</sup> Milímetro quadrado

mol/ L Mol por litro

nmnanométrico

PO<sup>4-</sup> Íon fosfato

vol% min Porcentagem de volume mineral

µg Micrograma

µg F/mL Micrograma de fluoreto por mililitro

µg Ca/mL Micrograma de cálcio por mililitro

µm Micrômetro



## Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	30
7	AGRADECIMENTOS	31
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
9	ANEXOS	37

## 1. INTRODUÇÃO

Formulações dentífricas com reduzida concentração de fluoreto (F) têm sido estudadas com o objetivo de diminuir a ingestão do íon pelas crianças e reduzir a fluorose dentária [Wong et al., 2010; Walsh et al., 2010], entretanto, o efeito preventivo dos mesmos foi considerado inconclusivo na literatura [Moraes et al., 2007; Queiroz et al., 2008; Lima et al., 2008]. Numa recente revisão sistemática [Walsh et al., 2010], os autores concluíram que dentífricos com baixa concentração de F (550 ppm F) não apresentaram efeito preventivo contra a cárie dentária.

Uma forma de aumentar a eficácia anticariogênica de um dentífrico é a suplementação com fosfatos, pois quando supersaturado no biofilme dentário durante os períodos de desafio cariogênico, tornam o F mais efetivo, podendo diminuir ou até mesmo inibir a dissolução do esmalte [Pearce, 1982; Sullivan et al., 1997; Larsen, Fejerskov, 1989; Margolis, 1990; Schemehorn; Wood; Winston, 1999; Gaffar, Blake-Haskins, Mellberg, 1993; Whitford et al., 2005]. Dentre os sais de fosfatos o trimetafosfato de sódio (TMP), parece ser o mais ativo [Harris et al., 1967] apresentando capacidade de reduzir a dissolução da hidroxiapatita [McGaughey; Stowell, 1977; Roberts, 1995]. Takeshita et al. [2009] observaram que a adição de fosfato na forma de trimetafosfato, um polifosfato cíclico, na concentração de 1% à um dentífrico de 500 ppm F resultou numa eficácia similar a de um dentífrico padrão de 1100 ppm F, *in vitro*, sobre a desmineralização do esmalte de dente bovino. Para um dentífrico com 250 ppm F, o TMP a 0,25% foi capaz de inibir a desmineralização do esmalte *in vitro*, similar a um dentífrico padrão (1100 ppm F) [Missel, 2010]. Dessa forma, a adição de fosfato compensaria a redução da ação anticárie causada pela menor concentração de F.

Além dos fosfatos, outra possibilidade de aumentar a ação remineralizante ou o efeito inibidor da desmineralização de um suplemento seria utilizá-lo na forma de nanopartículas. As propriedades especiais das nanopartículas derivam de sua elevada proporção entre área superficial e seu volume, além de possuírem uma porcentagem consideravelmente mais

alta de átomos em sua superfície quando comparadas com partículas maiores, podendo torná-las mais reativas.

Assim, com o objetivo de otimizar o efeito dos dentifrícios sobre o processo de des/remineralização dentária, estudos têm analisado o impacto de fosfatos nanoparticulados no processo de desmineralização e remineralização do esmalte [Karlinsky e Zero, 2006]. A adição de nanopartículas de fosfato tri-cálcio em dentifrícios fluoretados reduziu o processo de desmineralização em esmalte em comparação a um dentifrício convencional (1100 ppm F) [Karlinsky et al., 2007]. Nanocompósitos contendo fosfato de cálcio amorfo (ACP),  $\text{CaF}_2$  e clorexidina têm mostrado ação na atividade metabólica do biofilme e, conseqüentemente, uma redução da produção de ácidos [Cheng et al., 2012]. Ainda, Segundo Xu et al. [2010], compósitos contendo nanopartículas possuem a vantagem em impedir a desmineralização dentária, por apresentarem melhores propriedades físicas e mecânicas quando comparadas a compósitos tradicionais.

Uma vez que trabalhos anteriores [Takeshita et al., 2009; Missel et al., 2010] mostraram que dentifrícios de baixas concentrações de F (500 e 250 ppm F, respectivamente) apresentam eficácia semelhante à de um dentifrício padrão (1100 ppm F) quando suplementados com TMP, e considerando a ação de nanopartículas de fosfatos, seria interessante avaliar a ação do TMP na forma de nanopartículas adicionado à dentifrícios com 250 ppm F sobre a desmineralização do esmalte bovino. A hipótese nula é a de que o dentifrício de baixa concentração de F associado à TMPnano apresentaria um efeito anticárie semelhante ao seu homólogo sem TMP e com TMP micrométrico.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de dentifrícios de baixa concentração de fluoreto (250 ppm F) associado a nanopartículas de TMP, em diferentes tamanhos e concentrações na inibição da desmineralização do esmalte utilizando um modelo de ciclagem de pH.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### *Delineamento Experimental*

Blocos de esmalte bovino (4 mm × 4 mm x 3 mm,  $n = 144$ ) foram obtidos a partir de incisivos bovinos. Superfícies de esmalte foram polidas e os blocos seqüencialmente selecionados através da dureza da superfície inicial (SHi) (326 à 376 KHN,  $p = 0,403$ ). Os blocos foram divididos aleatoriamente em 12 grupos experimentais ( $n = 12$ ), de acordo com os dentifrícios: sem F/TMP/TMPnano (Placebo), 250 ppm F, 250 ppm F associado a TMP micrométrico (250-TMP) ou TMPnano moído por 24h (250 TMPnano24h) e 48h (250 TMPnano48h) em concentrações de 0,05, 0,1 e 0,25% e 1100 ppm F. Os blocos foram submetidos a ciclagem de pH durante sete dias, e tratamentos com slurry de dentifrícios 2x/dia. Em seguida, a dureza da superfície final (SHf), porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte e razão molar entre Ca/P, foram determinadas.

### *Preparação dos Blocos de Esmalte*

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos em frigoríficos e mantidos em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês [Delbem et al., 2002; Takeshita et al., 2009]. Blocos de esmalte bovino (4 mm

x4 mm x 3 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Em seguida, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura  $\pm 2$  mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada ( $\pm 3$  cm de diâmetro por  $\pm 8$  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 BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). Para o desgaste foram utilizadas lixas de granulação 320 (CARBIMET PaperDiscs, 30-5108-320, BUEHLER), peso de 2lbs, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração.

Os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima e a seguir polidos de acordo com a seguinte seqüência: lixa de granulação 600, 4lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 800, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 4 lbs, 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), em água deionizada 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 1micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 4 lbs, 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. Durante todos os procedimentos e entre as etapas, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com formol 2% e pH 7,0 [Delbem et al., 2002; Takeshita et al., 2009].

### *Síntese e Caracterização do TMP nanoparticulado*

Para preparar as nanopartículas de TMP, 70g de trimetafosfato de sódio puro (micrométrico,  $\text{Na}_3\text{O}_9\text{P}_3$ , Aldrich, pureza  $\geq 95\%$  CAS 7785-84-4) foi moído usando 500g de esferas de zircônia (diâmetro de 2mm) em um litro de

isopropanol. Após 24h (para TMPnano 24h) ou 48h (para TMPnano 48h), o pó foi separado do meio alcoólico e moído em um almofariz [Danelon et al.,2013a]. A cristalinidade do pó foi caracterizada por difração de raios-X (DRX), utilizando um RigakuDmax 2500 PC difratômetro gama de 10 a  $2\theta$  80° com uma taxa de varrimento de 2°/min. Os domínios cristalinos coerentes (tamanho de cristalito) foram estimados usando a equação de Scherrer:

$$L = \frac{K\lambda}{B \cos \theta_B}$$

onde L é a dimensão linear de uma nanopartícula monocristalina,  $\lambda$  é o comprimento de onda incidente de raios-X, B é a largura da linha de difração do pico dedifração,  $\theta_B$  é o ângulo de Bragg obtido a partir do padrão de DRX, e K é uma constante numérica cujo valor é de 0,9.

#### *Formulação e Dosagem de F e P nos Dentifrícios Experimentais*

As formulações dos dentifrícios experimentais continham os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarinato de sódio, óleo de menta, glicerina, sílica hidratada, lauril sulfato de sódio e água [Takeshita et al., 2009]. TMP micrométrico (TMP, Sigma<sup>TM</sup> - AldrichCo., USA) e TMP nanométrico foi adicionado aos dentifrícios de 250 ppm F nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,25%. O F foi acrescido às formulações na forma de NaF (Merck<sup>®</sup>, Alemanha). Dentifrícios sem F/TMP (Placebo), com 1100 ppm F (sem TMP) foram preparados utilizando a mesma formulação que os demais. Para a dosagem de F utilizou-se um eletrodo específico para íon F (9409 BN – Orion) e microeletrodo de referência (Analyser) acoplados ao analisador de íons (Orion 720 A<sup>+</sup>), previamente calibrado com cinco padrões. Foram pesados 100-110 mg de cada dentifrício, em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais acrescentou-se água deionizada até volume final de 10 mL. Após a homogeneização, para a dosagem do FT, 0,25 mL dessa suspensão foi mantida sob agitação durante 1h a 45°C com 0,25 mL de HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH mol L<sup>-1</sup> 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 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<sup>-1</sup>, 0,5 mL de NaOH mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mL de TISAB II e o FI dosado da mesma forma que o FT [Delbem et al., 2009].

#### *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 nova solução remineralizadora [Vieira et al., 2005]. Os blocos foram imersos sob agitação constante, duas vezes ao dia durante 1 min, em slurry de dentifrícios em água destilada/deionizada (1:3 – peso:peso) quando removidos das soluções desmineralizadora (6 horas – Ca e P 2,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão acetato 0,075 mol L<sup>-1</sup>, 0,04 mg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm<sup>2</sup>) e remineralizadora (18 horas – Ca 1,5 mmol L<sup>-1</sup>, P 0,9 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 0,15 mol L<sup>-1</sup> em tampão cacodilato de sódio 0,02 mol L<sup>-1</sup>, 0,05 mg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/mm<sup>2</sup>). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30s, após serem removidos das soluções Des-Re e dentifrício/água.

#### *Determinação da dureza de superfície do esmalte*

A dureza de superfície inicial (SHi) (Knoop) foi determinada utilizando-se o microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) e o software BuehlerOmniMet (Buehler, Lake Bluff, USA) sob carga de 25 g por 10 s (aumento de 500 vezes) sendo realizadas cinco impressões a 100 µm uma da outra, na região central do esmalte [Takeshita et al., 2009]. Após as ciclagens de pH foram feitas outras cinco impressões equidistantes entre si e a 100 µm em relação às impressões iniciais, obtendo-se a dureza de superfície final (SHf). A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foi calculada através da seguinte fórmula: (SH% = [(SHf-SHi)/SHi] × 100).

### *Determinação de F, Ca e P no esmalte*

Blocos (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 ( $50,0 \pm 0,05$ ) 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 disco de lixa auto adesiva (13 mm de diâmetro) de carbureto de sílica e granulação 400 (Buelher), fixado em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Os frascos, após a adição de 1,0 mL de HCl  $1,0 \text{ mol/L}^{-1}$ , foram mantidos sob agitação constante durante 1 h e a seguir adicionado 1,0 mL de NaOH  $1,0 \text{ mol/L}^{-1}$  [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<sup>+</sup>, 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 500  $\mu\text{L}$  da solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mm}^3$ . O cálcio foi determinado pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, como descrito por Vogel et al. [1983]. Para calibração, foram utilizados padrões contendo 40 a 200  $\mu\text{g Ca/mL}$ . Alíquotas de 3  $\mu\text{L}$  (duplicata) foram dispostas em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 – TPP, Switzerland) acopladas em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), utilizando comprimento de onda de 650 nm. O P foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske, Subbarow [1925]. As leituras em duplicata foram realizadas em placas de 96 poços da mesma forma que na dosagem de Ca, utilizando-se espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) no comprimento de onda de 660 nm.



### Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%. Foram considerados como variáveis os valores de %SH e concentração de F, Ca, P e proporção molar Ca/P no esmalte e como fator de variação os dentifrícios. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias.

## 4. RESULTADOS

O processo de moagem reduziu o tamanho das partículas dos pós de TMP, sem afetar a estrutura cristalina do material. A difração de raios-X (DRX), mostra os padrões de TMPnano após 24h e 48h de moagem (Figura 1) identificando picos mais largos devido aos cristais menores, podendo ser utilizados para estimar um tamanho médio de partícula de 24 nm para o pó moído durante 24h e 22,7 nm para o pó moído durante 48h.

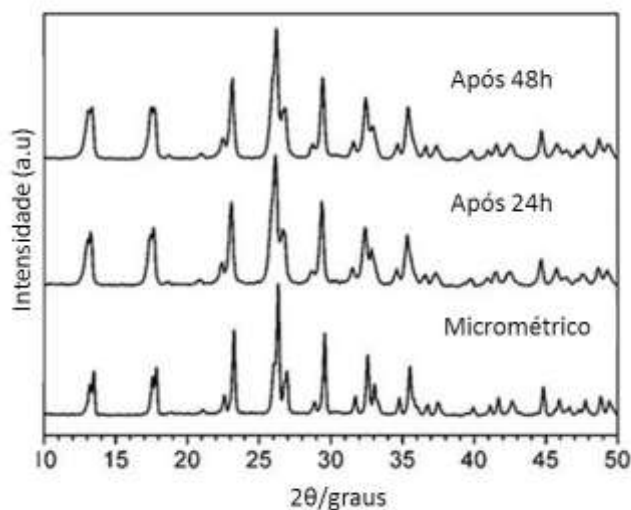


Figura 1: Gráfico dos padrões de raios-x para o TMP micrométrico e TMP nanométrico após moagem de 24 horas e 48 horas.

As concentrações de flúor designadas como fluoreto total (FT) e fluoreto iônico (FI) do dentifrício Placebo foram respectivamente 8,8 (0,5) e 10,7 (2,1) ppm F. Para os dentifrícios com 250 ppm F, os valores médios (DP) entre os grupos foram 267,1 (7,3) (variando de 260,2-288,7) e 269,5 (3,7)(variando de 263,9-282,2). Para o dentifrício com 1100 ppm F, os valores médios (DP) foram 1.184,2 (41,4) e 1,178.6 (10,3) [Delbem et al., 2009].

Tabela 1: Valores de fluoreto iônico (FI) e fluoreto total (FT) (média  $\pm$  dp) nos dentifrícios experimentais

Dentifrício	Análise	
	FT (ppm F)	FI (ppm F)
Placebo	8,8 $\pm$ 0,5 (n=3)	10,7 $\pm$ 2,1 (n=3)
250	267,1	269,5
250 + 0,05% TMP	260,2	268,9
250 + 0,05% TMPnano24	274,1	270,8
250 + 0,05% TMPn 48h	261,7	263,9
250 + 0,1% TMP	275,35	273,45
250 + 0,1% TMPnano24	283,1	271,4
250 + 0,1% TMPnano48	275,7	276,7
250 + 0,25% TMP	268,7	269,4
250 + 0,25% TMPnano24	269,3	275,1
250 + 0,25% TMPnano48	262,5	268,2
1100	1184,2	1178,6

Uma relação dose-resposta foi observada entre %SH e concentração de fluoreto nos dentifrícios sem TMP (Placebo, 250 ppm F e 1100 ppm F) (Figura 2). A adição de TMP micrométrico reduziu a perda mineral quando comparado ao seu homólogo sem TMP, mostrando uma relação dose-resposta (Figura 2). O efeito máximo foi observado com o dentifrício 250-0,25%TMP sendo semelhante ao dentifrício 1100 ppmF ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Ambos dentifrícios 250-TMPnano24h e 250-TMPnano48h foram capazes de reduzir a perda mineral em todas as concentrações utilizadas. O efeito máximo foi atingido, nas concentrações de 0,05% e 0,1%, semelhante ao dentifrício 1100 ppm F. Aumentando a concentração para 0,25%, o dentifrício 250-TMPnano48h levou a uma maior perda mineral quando comparado com o dentifrício de 1100 ppm F ( $p < 0,05$ ) (figura 2).

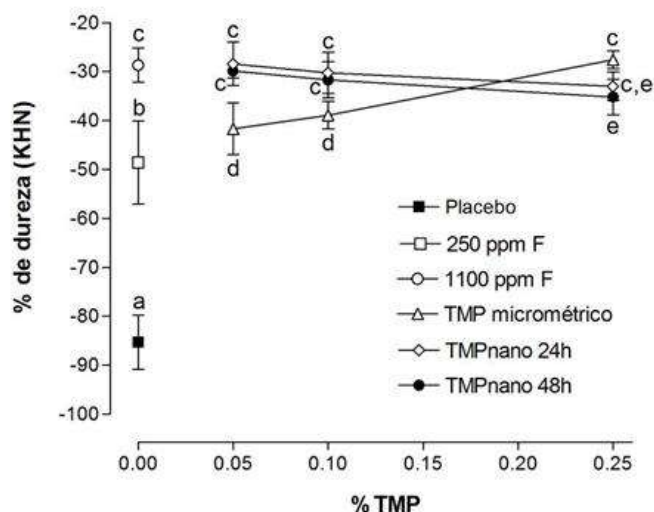


Figura 2: Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte após ciclagem de pH de acordo com a concentração de fluoreto e TMP nos dentífrícios bem como do tamanho das partículas de TMP. Letras minúsculas distintas mostram diferença estatística entre as médias (Kruskal-Wallis, teste de Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ). Barras verticais denotam o erro padrão da média.

A Figura 3 mostra a composição mineral do esmalte de acordo com os grupos de tratamento. O maior conteúdo de F no esmalte foi observado para o dentífrício 1100 ppm de F (figura 3 c). O TMP micrométrico a 0,25% promoveu incorporação de F, mas em níveis significativamente menores do que o dentífrício 1100 ppm de F ( $p < 0,05$ ) (figura 3 c). Ambos 250-TMPnano24h e 250-TMPnano48h mostraram concentração de cálcio, fluoreto e de Ca/P no esmalte próximo dos valores encontrados no dentífrício 1100 ppm F (em comparação com o dentífrício de 250 ppm F), mas apenas quando TMPnano foi usado na menor concentração (0,05%) (Figuras 3 a, 3 c e 3 d). O conteúdo máximo de cálcio foi obtido com o dentífrício 250-TMPnano24h (figura 3 d). Uma maior concentração de TMPnano comprometeu a incorporação de cálcio e de fluoreto, bem como a proporção Ca/P (Figuras 3 c, 3 a e 3 d). O conteúdo de fósforo (P) foi aumentado pela adição de TMPnano (0,05%) e de TMP micrométrico (0,25%), em níveis semelhantes aos do 1100 ppm F (figura 3 b). A concentração de fósforo foi reduzida quando foram usadas concentrações mais elevadas de TMPnano (figura 3 b).

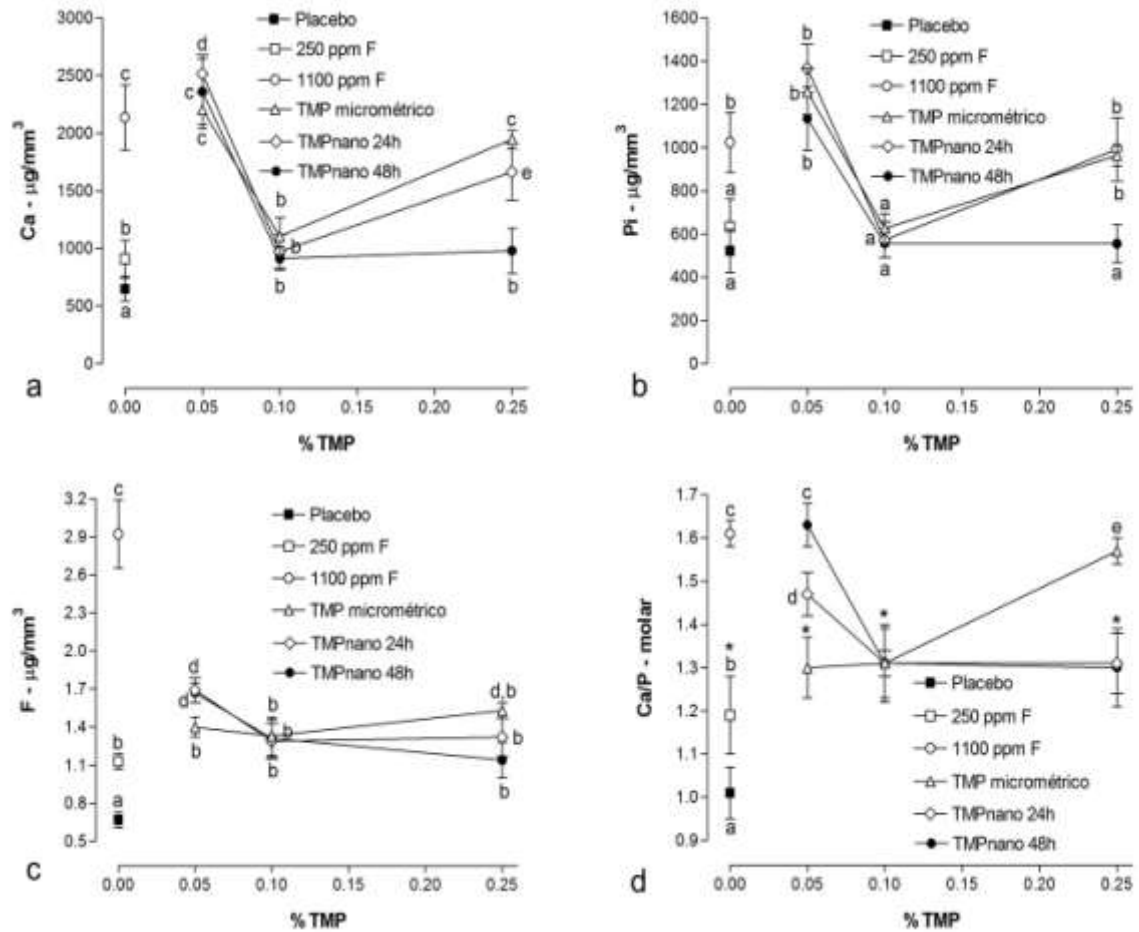


Figura 3: Representação gráfica dos valores médios de cálcio (a), fósforo inorgânico (b), fluoreto (c) e proporção Ca/P (d) presente no esmalte após ciclagem de pH de acordo com a concentração de fluoreto e TMP nos dentífricos bem como do tamanho das partículas de TMP. Letras minúsculas distintas mostram diferença estatística entre as médias (Kruskal-Wallis, teste de Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ). Barras verticais denotam o erro padrão da média.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a habilidade do dentifrício 250 ppm F suplementado com TMP nanométrico (TMPnano), em diferentes tamanhos e concentrações, na inibição da desmineralização do esmalte, utilizando um modelo de ciclagem de pH. Os resultados mostraram que a adição de TMPnano ao dentifrício com 250 ppm F levou à efeitos anticárie superiores quando comparado com o seu equivalente sem TMP, atingindo o mesmo nível do dentifrício convencional na superfície do esmalte. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

Em todas as concentrações de TMP, apenas a adição de 0,25% ao dentifrício de 250 ppm F resultou em um decréscimo na SH% semelhante à do 1100 ppm F, confirmando observações anteriores [Missel et al., 2010]. A adição de 0,25% de TMP ao dentifrício de 250 ppm de F dentifrício promoveu retenção de F no esmalte. No entanto, esta foi 48% menor quando comparado com 1100 ppm F, e 35% maior quando comparado ao 250 ppm F, como observado anteriormente [Missel et al., 2010]. Os dados mostram que o efeito do TMP está relacionado principalmente ao conteúdo de Ca e P presente no esmalte. A relação molar Ca/P confirma esta hipótese uma vez que foi observada uma perda de mineral menor quanto maior a relação Ca/P.

Como observado anteriormente [Missel et al., 2010] e comprovado por este estudo, a adição de TMP para um dentifrício de 250 ppm F não produziu um efeito superior quando comparado com 1100 ppm F. A adição de 0,25% TMPnano não levou a um efeito anticárie superior quando comparado com 1100 ppm de F. Apesar de todas as concentrações de TMPnano terem promovido elevados valores de %SH (alguns semelhante ao de 1100 ppm de F), os dados de outras variáveis (F, Ca, P e de Ca/P no esmalte) mostram que o TMPnano melhorou o efeito da formulação apenas com a concentração mais baixa. Isto sugere que o processamento usado para sintetizar o TMPnano a partir do TMP micrométrico 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 [Danelon et al., 2013a]. Em 0,05%,

tanto 250-TMPnano24h e 250-TMPnano48h foram semelhantes ao dentífrico 1100 quanto à dureza da superfície de esmalte. Isto pode estar relacionado com a concentração de F no esmalte que foi 50% superior em relação ao dentífrico 250 ppm F, embora significativamente mais baixo do que o 1100 ppm F). Outros estudos também mostraram que o TMP aumenta retenção de F e Ca no esmalte quando comparado com o homólogo sem TMP [Missel et al., 2010; Takeshita et al., 2009, 2010]. Dados da porcentagem de perda de dureza de superfície mostraram menor desmineralização quando os blocos foram tratados com dentífrico contendo TMP. Em menor concentração (0,05%), isto parece justificar o uso do TMPnano triturado por 48h e não o TMP micrométrico [Missel et al., 2010].

O mecanismo de ação de TMPnano foi semelhante ao do TMP. Quando TMPnano em 0,05% adsorve sobre o esmalte, essa interação pode ter alterado a permeabilidade seletiva e a difusão de íons no esmalte [Takeshita et al., 2009, 2011; Favretto et al., 2013; Souza et al., 2013; van Dijk et al., 1980; Danelon et al., 2013b; Danelon et al., 2014; Manarelli et al., 2014]. No entanto, os dados do presente estudo mostraram que o efeito do TMP está relacionado principalmente ao conteúdo de cálcio e fosfato no esmalte, confirmados pela proporção molar Ca/P. Assim, o TMPnano possivelmente retém íons carregados positivamente de  $\text{CaF}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , substituindo o  $\text{Na}^+$  da estrutura cíclica e promovendo a redução na difusão de ácido [Takeshita et al., 2011; Manarelli et al., 2013; Danelon et al., 2013b; Danelon et al., 2014.; Manarelli et al., 2014], bem como durante os processos des-remineralização levando à formação e ao fluxo de espécies neutras ( $\text{CaHPO}_4^0$  e  $\text{HF}^0$ ) no esmalte, as quais apresentam o coeficiente de difusão mil vezes maior do que os seus homólogos carregados [Cochrane et al., 2008]. Além disso, a elevada porcentagem de átomos na superfície do TMPnano quando usado em concentração mais elevada pode sequestrar uma quantidade maior de  $\text{Ca}^{2+}$  (bem como  $\text{CaF}^+$ ), influenciando negativamente a incorporação destes íons para o esmalte, o que prejudica o efeito da formulação [da Camara et al., 2014]. A capacidade de complexação de um fosfato condensado é proporcional ao número total de átomos de fósforo [van Wazer, Campanella, 1950].

O presente estudo mostrou que o TMPnano sintetizado [Danelon et al., 2013a] aumentou o efeito anticárie do dentifrício de 250 ppm F, o qual teve um efeito significativamente menor no controle da cárie em comparação com um de formulação convencional (1100 ppm F). Além disso, a maior reatividade do TMPnano provou-se vantajoso uma vez que permitiu uma redução em 5 vezes da concentração do sal e inibiu a desmineralização do esmalte de forma comparável àquela obtida quando 0,25%TMP foi adicionado a um dentifrício de 250 ppm F [Missel et al., 2010]. A formulação experimental desenvolvida promoveu um efeito máximo na inibição da desmineralização do esmalte, semelhante ao dentifrício 1100 ppmF, a qual pode ser utilizada para as pessoas em geral. Além disso, em uma abordagem de saúde pública, a redução em quatro vezes da concentração de flúor em comparação com os dentifrícios convencionais faz com que o dentifrício 250-0,05%TMPnano48h seja uma alternativa segura para as crianças menores de seis anos de idade, cuja ingestão de flúor a partir desta fonte é, de fato, um problema em relação a fluorose dental. Uma vez que, o modelo *in vitro* não reproduz as condições intra-orais, os resultados devem ser avaliados com cautela e posteriormente avaliados usando um modelo de cárie *in situ*. Além disso, o estudo da composição inorgânica e orgânica de biofilme pode contribuir para a compreensão do mecanismo do TMPnano na desmineralização do esmalte.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo *in vitro*, a adição TMPnano para um dentifrício de 250 ppm F promoveu maior inibição da desmineralização do esmalte quando comparado com o seu homólogo TMP micrométrico. Também promoveu a inibição da desmineralização do esmalte semelhante a um dentifrício de 1100 ppm F.

## 7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Maria Fernandes por sua assistência técnica laboratorial. Os autores também agradecem LIEC-Departamento de Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, para a síntese e caracterização das nanopartículas de trimetafosfato de sódio. Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq (bolsa # 305650 / 2010-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / CAPES (bolsa # 23.038,033495 / 2008-97).



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves K. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. **Caries. Res.** v: 41, n: 4, p: 263-268. 2007.

da Camara D. M. et al. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. **J. Dent.** v: 42, n:3, p: 256-262. 2014.

Cheng L. et al. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with Chlorhexidine. **Dent.Mater.** v: 28, p: 573-583. 2012.

Cochrane H. J. et al. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphor peptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. **Caries. Res.** v: 42, n:2, p: 88-97. 2008.

Danelon M, et al. Avaliação in vitro de dentifícios suplementados com nanopartículas de trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização dentária. **Braz. Oral. Res.** v: 27, p: 234. 2013a.

Danelon, M. et al. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel re-mineralization. **Am. J. Dent.** v: 26, p:15-20; 2013b.

Danelon M. et al. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. **Clin.Oral.Investig.** v: 18, n: 4, p: 1119-1127. 2014.

Delbem A. C. B., 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.** v: 15, p: 169-172. 2002.

Delbem A. C. B. et al. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. **Caries. Res.** v: 43, p: 359-365. 2009.

Favretto C. O. et al. In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. **Caries. Res.** v: 47, n:5, p:532-538. 2013.

Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** v:66, p: 375-400. 1925.

Gaffar A., Blake-Haskins J., Mellberg J. In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. **Int. Dent. J.** v: 43, p: 81-88. 1993.

Harris R. S., Niizel A. E., Walsh B. N. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. **J. Dent. Res.** v: 46, p: 290-294. 1967.

Karlinsey R., Zero D. T. Application of a nanocomposite formulation for remineralization of lesioned enamel. [http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract\\_82052.html](http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract_82052.html).

Karlinsey R. L. et al. Antimicrobial and Anticariogenic Effect of a Unique Nanomaterial on Human Enamel. **Caries. Res.** v: 41, p: 330. 2007.

Larsen M. J., Fejerskov O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. **Scand. J. Dent. Res.** v: 97, n: 4, p: 285-296. 1989.

Lima T. J. et al. Low-fluoride toothpaste and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical trial. **Caries. Res.** v: 42, p:46-50. 2008.

Manarelli M. M. et al. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion. **Am. J. Dent.** v:26, n:6, p:3-7-312. 2013.

Manarelli M. M. et al. In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. **Caries. Res.** v: 48, p:299-305. 2014.

Margolis H. C. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. **J. Dent. Res.** v: 69, n: 6, p:1337-1342, 1990.

McGaughey C., Stowell E. C. Effects of Polyphosphates on the solubility and mineral of HA: relevance of a rationale for anticarie activity. **J. Dent. Res.** v: 56, p: 579-587. 1977.

Missel E. M. C. et al. Avaliação de dentifícios com concentração reduzida de fluoreto associada ao trimetafosfato de sódio na desmineralização do esmalte. **Braz. Oral. Res.** v: 24, n: 1, p: 247-283. 2010.

Moraes S. M. et al. Fluoride intake from regular and low fluoride toothpastes by 2-3-year-old children: influence of the toothpaste flavor. **Braz. Oral. Res.** v: 21, n:3, p: 234-240. 2007.

Pearce E. Effect of plaque mineralization on experimental dental caries. **Caries. Res.** v: 16, n: 6, p: 460-471. 1982.

Queiroz C. S. et al. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride toothpaste on enamel de- and remineralization. **Braz. Dent. J.** v: 19. n:1. p: 21-27. 2008.

Roberts A. J. Role of models in assessing new agents for caries prevention—non-fluoride systems. **Adv. Dent. Res.** v: 9, p: 304-311. 1995.

Schemehorn B. R., Wood G. D., Winston A. E. Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from an amelon dentifrice. **J.Clin. Dent.** v: 10, p: 9-12. 1999.

Souza J. A. et al. Effect of sodium trimetaphosphate on hydroxyapatite solubility: an in vitro study. **Braz. Dent. J.** v: 24, n: 3, p: 235-240. 2013.

Sullivan R. J. et al. In vivo detection of calcium from dicalcium phosphate dihydrate dentifrices in demineralized human enamel and plaque. **Adv. Dent. Res.** v: 11, n: 4, p: 380-387. 1997.

Takeshita E. M. et al. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. **Caries. Res.** v: 43, p: 50-56. 2009.

Takeshita E. M. et al. Evaluation of toothpaste with fluoride content supplemented trimetaphosphate on biofilm and enamel demineralization in an in situ study. **Caries Res.** n: 44, p. 171-247. 2010.

Takeshita E. M. et al. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. **Caries. Res.** v:45, n: 5, p: 494-497. 2011.

van Wazer J. R., Campanella D. A. Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions. **J. American Chemical Society.** v: 72. p: 665-673. 1950.

van Dijk J. W., Borggreven J. M., Driessens F. C. The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel. **Arch. Oral. Biol.** v: 25, p: 591-595. 1980.

Vieira A. E. et al. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries. Res.** v: 39, n: 6, p: 514-520. 2005.

Vogel G. L., Chow L. C., Brown W. E. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. **Caries. Res.** v:17, p:23-31. 1983.

Walsh T. et al. Fluoride toothpaste of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev.** 20: CD007868. 2011.

Weatherell J. A. et al. Micro-sampling by abrasion. **Caries. Res.** v:19, n: 2, p: 97-102. 1985.

Whitford G. M. et al. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. **Caries. Res.** v:39, n: 2, p: 100-107. 2005.

Wong M. C. et al. Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. **J. Dent. Res.** v: 90, n:5, p: 573-579. doi: 10.1177/0022034510393346 2011.

Xu H. H. et al. Strong nanocomposites with Ca, PO<sub>4</sub> and F release for caries inhibition. **J. Dent. Res.** v: 89, p: 19-28. 2010.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A

#### OBTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

*Confeção dos blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm)*



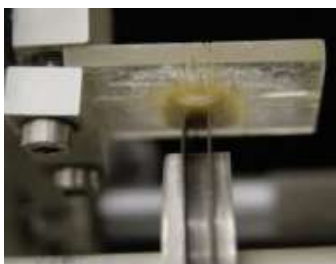
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



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.

### Planificação da dentina e polimento do esmalte



6. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada ( $\pm 3$  cm de diâmetro por  $\pm 8$  mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.



7. 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, USA) e lixas de granulação 320 (CarbimetPaperDiscs, 30-5108-320, Buehler), por 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



8. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual foi polida para análise de dureza.

## Seqüência do polimento de esmalte

- 1- Profilaxia com pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação;
- 2- Polimento empregando lixas de granulação 600 (20 segundos), 800 (30 segundos) e 1200 (30 segundos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
- 3- Acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (BuehlerPolishingCloth) durante 1 minuto com suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
- 4- Lavagem durante 30 segundos com jato de água deionizada;
- 5- Limpeza em lavadora ultrassônica Modelo 2110 (Branson, Danbury CT,USA) com água destilada/ deionizada (2minutos);
- 6- Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

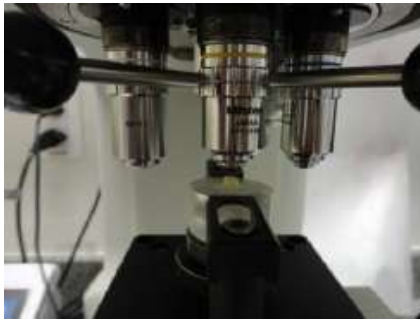


## ANEXO B

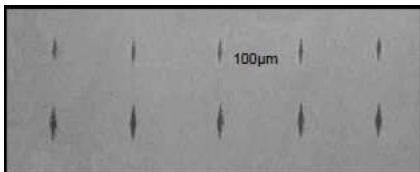
### ANÁLISE DE DUREZA SUPERFICIAL



1. Microdurômetro Micromet 5114 Hardness Tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem Buehler OminMet (Buehler, Lake Bluff, USA).



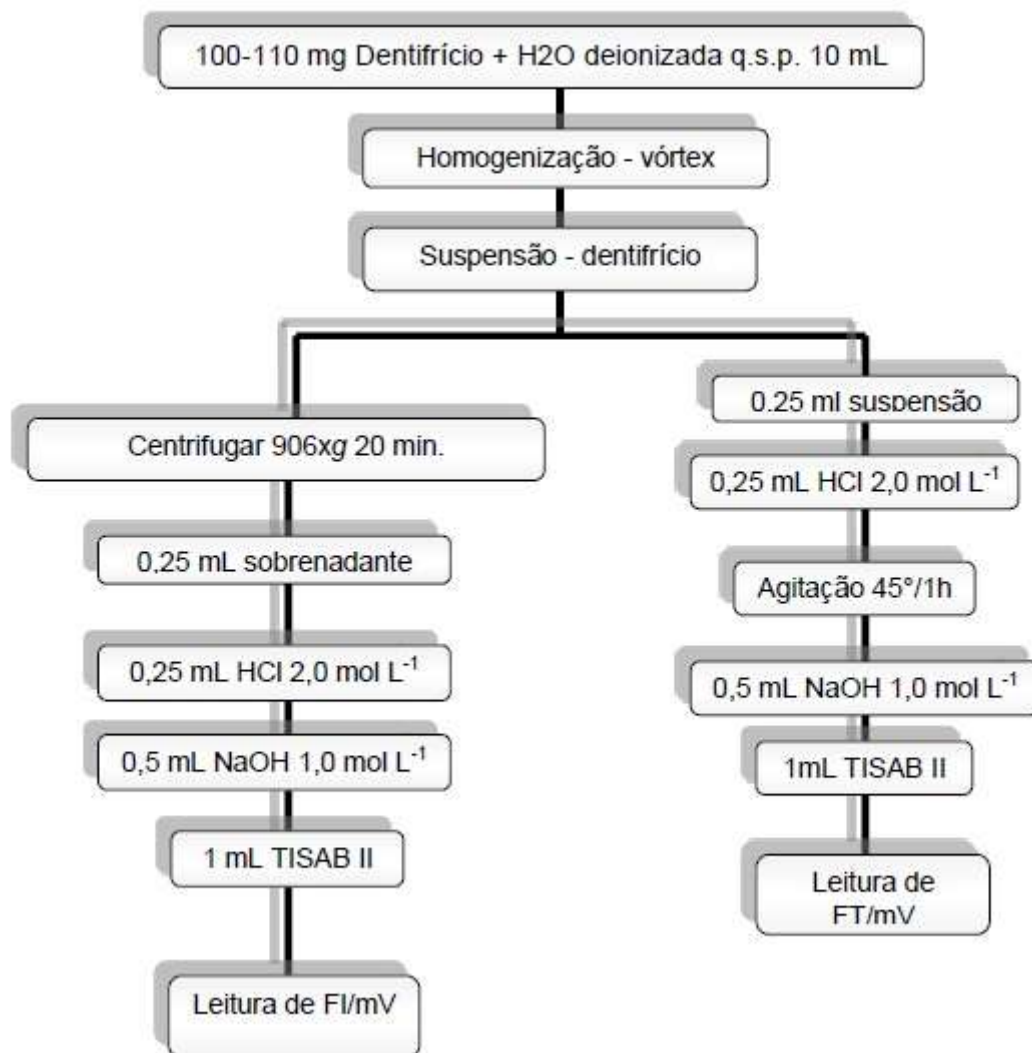
2. Bloco de esmalte sendo submetido à determinação de dureza no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da dureza de superfície.



3. Fotomicrografia das impressões para análise de dureza de superfície inicial e final (SHi, SHf) - (Aumento: 100x).

## ANEXO C

Esquema representativo da dosagem de fluoreto dos dentífricos



## ANEXO D

Tabela 1: Valores de fluoreto iônico (FI) e fluoreto total (FT) (média  $\pm$  dp) nos dentifrícios experimentais

Dentifrício	Análise	
	FT (ppm F)	FI (ppm F)
Placebo	8,8 $\pm$ 0,5 (n=3)	10,7 $\pm$ 2,1 (n=3)
250	267,1	269,5
250 + 0,05% TMP	260,2	268,9
250 + 0,05% TMPnano24	274,1	270,8
250 + 0,05% TMPn 48h	261,7	263,9
250 + 0,1% TMP	275,35	273,45
250 + 0,1% TMPnano24	283,1	271,4
250 + 0,1% TMPnano48	275,7	276,7
250 + 0,25% TMP	268,7	269,4
250 + 0,25% TMPnano24	269,3	275,1
250 + 0,25% TMPnano48	262,5	268,2
1100	1184,2	1178,6

## ANEXO E

### CICLAGEM DE pH



1. Agitador Magnético com Aquecimento TE – 081 (Piracicaba, SP - Brasil) utilizado para agitar o dentífrico 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.

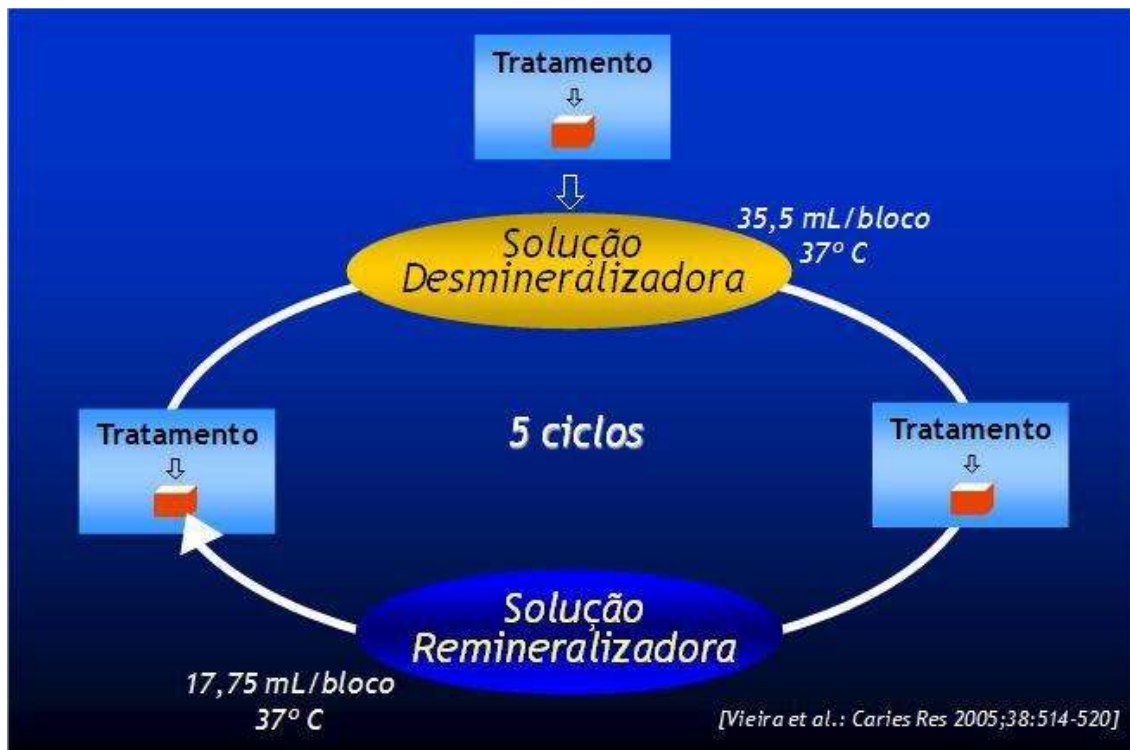


3. Lavagem dos blocos de esmalte antes e após os tratamentos, durante 30 s com água deionizada.



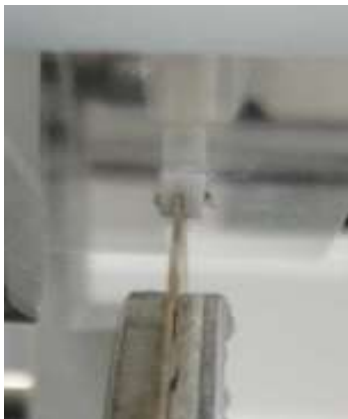
4. Estufa para cultura bacteriológica (Olidefcz Ribeirão Preto – SP, Brasil) utilizada para manter os blocos de esmalte nas soluções de Des e Re em temperatura 37°C, durante o período da ciclagem.

#### ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CICLAGEM DE pH



## ANEXO F

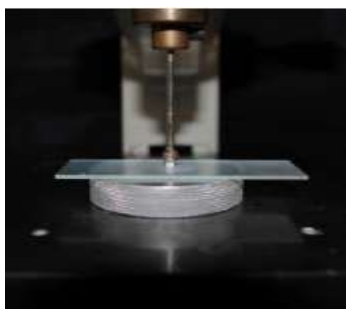
### Preparo dos blocos para a análise de F, Ca e P no esmalte



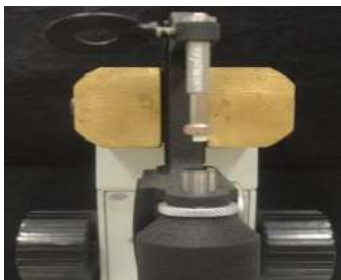
1. Secção longitudinal dos blocos utilizando-se disco diamantado (Diamond Wafering Blade, Extec –n. 12200), montado em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada. Em seguida, uma das metades obtida foi novamente seccionada em duas metades, e uma delas foi utilizada para a microabrasão.



2. Micrômetro eletrônico digital com saída (Starrett, São Paulo – SP) acoplado a uma base de microscópio.



3. Fixação do bloco (superfície de esmalte voltada para baixo) em mandril para peça reta estabelecendo paralelismo com superfície plana.



4. Conjunto bloco/mandril fixado ao micrômetro.



5. Bloco de esmalte sendo submetido à microabrasão, com desgaste de 50  $\mu\text{m}$ , para posterior análise do conteúdo de F, Ca e P no esmalte.



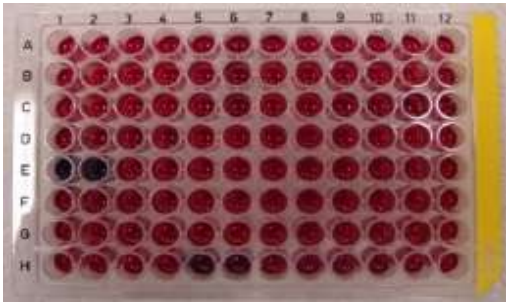
6. Pó de esmalte presente na lixa adaptada em frascos de poliestireno cristal (J - 10, Injeplast, Brasil), após o desgaste.



7. Para análise do conteúdo de F no esmalte utilizou-se: Eletrodo específico Orion 9409-BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, EUA).  
Microeletrodo de referência (Analyser Comércio e Indústria LTDA, São Paulo, SP).



8. Espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EONC Biotek, Winooski, USA) utilizado para as dosagens de cálcio e fósforo.



9. Dosagem de cálcio. Método colorimétrico Arsenazzo III. Placa de 96 poços com água deionizada + amostra + Arsenazo III.



10. Dosagem de fósforo. Método colorimétrico. Placa de 96 poços com água deionizada + amostra + molibdato + reativo redutor.