

Márjully Eduardo Rodrigues da Silva

*Efeito de dentifrício fluoretado contendo
hexametáfosfato de sódio na erosão inicial
do esmalte*

ARAÇATUBA - SP
2019

Márjully Eduardo Rodrigues da Silva

*Efeito de dentifrício fluoretado contendo
hexametáfosfato de sódio na erosão inicial
do esmalte*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Profa. Assoc. Denise Pedrini
Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

**ARAÇATUBA - SP
2019**

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e Silva, Márjully Eduardo Rodrigues da.
Efeito de dentifrício fluoretado contendo hexametáfosfato de sódio na erosão inicial do esmalte / Márjully Eduardo Rodrigues da Silva. - Araçatuba, 2019
54 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Denise Pedrini

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Esmalte dentário 2. Fluoretos 3. Fosfatos 4. Erosão dentária 5. Dentifrícios I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

Márjully Eduardo Rodrigues da Silva

Nascimento	27.06.1990 – Paranaíba - MS
Filiação	César Rodrigues da Silva Marlene Eduardo Ferreira
2008/2012	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO.
2013/2015	Curso de Pós Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
2015/2016	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Especialização, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
2015/2019	Cursando Pós Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IAPD – International Association of Pediatric Dentistry IADR – International Association for Dental Research ABONAM - Associação Brasileira de Odontologia Neonatal e Aleitamento Materno

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Marlene e César (in memorian)

Meus mais sinceros agradecimentos, por tudo que são e representam na minha vida. Muito obrigada pelo amor, paciência, compreensão e sabedoria em todos os momentos. Vocês são os principais responsáveis pela realização de todos os meus sonhos. Agradeço o incentivo, a constante preocupação com meu bem estar, pela dedicação e por muitas vezes abdicar do seu sonho para realização dos meus.

Meu pai não está mais aqui fisicamente me assistindo, mas sei que, em algum lugar, ele torce e me guia para que tudo em minha vida dê certo.

Agradeço mais uma vez à você MÃE, por todos os momentos em que estivemos juntas e pelas palavras de conforto que sempre trouxeram segurança, tranquilidade e confiança. Tudo que acontece em minha vida é fruto do que me ensinou, para poder ir atrás do meu futuro, agradeço sempre pelo seu apoio constante, e mesmo depois de muitos acontecimentos, problemas com sua saúde, foi uma forma de estarmos mais ainda ligadas o tempo todo, sempre me dizendo palavras de apoio, sempre me escutando, desabafando, em muitos momentos pensei em desistir, em me dedicar somente a você, mas foi você quem se mostrou mais forte mesmo com tantas dificuldades, se hoje estamos aqui, é porque nós duas conseguimos juntas. Você é meu porto seguro, minha maior fonte de amor, alegria, cumplicidade, amizade e esperança. Não existem palavras que expressem o meu sentimento por você. Te amo.

Ao meu sobrinho Kaique (in memorian)

Meu anjinho, você passou pelas nossas vidas tão depressa, que veio para demonstrar o que é um amor de verdade, o que é viver momentos de alegrias, felicidades, demonstrou que todos devemos lutar e viver o hoje.

Você foi o maior guerreiro que já vi em minha vida, você lutou dia após dia, uma simples criança que em poucos meses nos deu a maior lição da vida, o amor.

A sua lembrança continua viva, presente latente em minha vida e de todos da nossa família. Deus agora tem você em seus braços como um anjo, mas eu terei você eternamente em meu coração.

Titia te ama, saudades eternas.

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando meus passos nesse longo caminho. Ele me proporcionou sabedoria, dedicação, persistência, calma, estímulo e paciência para chegar até aqui. Agradeço as pessoas especiais que o Senhor colocou no meu caminho durante essa etapa da minha vida. Muito obrigada pela companhia.

A minha avó Geraldina

Agradeço todos os dias a Deus por tê-la colocado em minha vida. Minha querida avó, uma mulher sábia, honesta, guerreira. Obrigada por estar junto de mim, em todos os momentos de minha vida. Você é muito especial. Sua simplicidade nos mostra que com fé podemos tornar tudo realidade, e que sem Deus nada seríamos.

Te amo vó!

Aos meus sobrinhos Jhonatan, Kauã e Felipe

Ter sobrinhos é dádiva recebida por Deus que nos permite retornar a infância e partilhar de momentos únicos e intensos. Ter sobrinhos é receber a oportunidade de amar sem limites um novo ser que acabara de nascer e se permitir todas as loucuras e excessos sem culpa, por ter a certeza que só por hoje nada fará mal. É fazer vista grossa, permitir as brincadeiras, as manhas e as “traquinagens” apenas para ter o prazer de vê-los sorrir e dizer titia ama muito vocês.

Ao meu irmão Juliano e à minha cunhada Kátia

Agradeço a cumplicidade, o companheirismo, amizade, paciência e o apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis, pela preocupação, pelo incentivo constante e por todos os momentos que compartilhamos até hoje. Agradeço também por fazer dos meus sonhos os seus, por celebrar cada conquista minha como se fosse sua. Amo vocês!

A cada dia que passa percebo que ter família, é dom de Deus. Sou grata por fazer parte da nossa. Amo todos vocês.

Ao meu namorado Adolfo Mariano

Há pouco menos de dois anos a minha vida teve inúmeras mudanças, e hoje eu sei que Deus prepara muitas surpresas em nossas vidas, uma delas foi você, que apareceu e me apeguei, me dedico a fazer o que esta ao meu alcance para te fazer feliz em todos os momentos.

Quando estávamos nos conhecendo, alguns problemas em minha vida surgiram, e você esteve sempre me estendendo às mãos, pedindo para seguir em frente e que eu fosse forte, juntos superamos esses momentos.

Em alguns momentos me senti desesperada, momentos que achei que não iria mais conseguir caminhar, e simplesmente você assumiu um papel muito importante em minha vida, não sei descrever hoje palavras e nem sentimentos o quanto é importante em minha vida, você faz muito além do que se espera de um namorado, suas atitudes demonstram como é um homem maravilhoso, de caráter, honesto, humilde, você é e sempre será um eterno companheiro, eterno amigo.

*Você assumiu responsabilidades que outra pessoa jamais teria feito, cuidou de mim, da minha mãe, das crianças (Mylla e o Neguinho) é assim que chamamos nossos cachorros, da minha casa, esteve todo o tempo preocupado em ajudar, e além de tudo cuidou do mais importante, cuidou do **amor** que sentimos um pelo outro, não sei como e não sei se um dia poderei retribuir tudo que faz por mim.*

Agradeço muito pela sua paciência, pelo seu carinho, respeito, dedicação, perseverança, por todo amor que retribui sempre, você é muito especial, te admiro como homem, como namorado, como amigo.

Minha eterna gratidão por você, Te amo!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Denise Pedrini

Agradeço muito pela orientação, paciência, compreensão e por todo carinho dedicado durante esses anos de Doutorado. Obrigada pela confiança que depositou em mim, pelo incentivo e dedicação. Obrigada por estar disposta em todos os momentos difíceis em que precisei de sua orientação, pelos momentos de desabafo, obrigada pela sua amizade, que se não fosse essa amizade e cumplicidade não conseguiria ter tornado nosso ambiente de trabalho tão agradável, onde se tornou possível à realização de todo esse trabalho.

Obrigada por ser esse exemplo de pessoa, dedicada ao trabalho, a família, isso demonstra a pessoa bondosa, generosa, íntegra e profissional que é.

Desculpe-me pelos atrasos, pelas ausências, pelos experimentos que não deram certo, eu tentei, fiz o que estava ao meu alcance, mas graças a você, que não desistiu de mim, hoje estamos

aqui para finalizar essa grande e sonhada etapa de minha vida. Muito obrigada, serei eternamente grata por tudo que fez por mim.

Ao meu coorientador Prof^o Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Prof Albert, sou eternamente grata por toda colaboração e empenho para que este trabalho pudesse ser realizado. Admiro-o pela competência, inteligência, humildade e acessibilidade. Obrigada pela convivência, paciência e dedicação. O senhor é um exemplo de pessoa, professor, clínico e pesquisador. Muito, muito obrigada.

Agradecimientos

A minha família, tios, tias, primos, primas, agradeço o carinho e o amor que transmitem para mim e para minha mãe, pela presença em nossas vidas, pelas orações de cada dia. E foi com a ajuda de palavras de conforto e sabedoria que cada um nos transmitiu que nos fortaleceram e hoje estou aqui concluindo mais uma etapa de minha vida. Obrigada.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP,

Prof. Dr. Célio Percinoto, obrigada por seus conselhos e palavras para que eu não desistisse e continuasse caminhando, ainda que tivesse dificuldades. Você terá toda minha admiração e gratidão para sempre.

Prof. Dr. Robson Federico Cunha, por seu exemplo de dedicação ao ensino da Odontopediatria. Obrigado pelos momentos valiosos de aprendizado durante as disciplinas teóricas e também durante os atendimentos na Bebê Clínica e no Estágio Docência.

Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan, por todo ensinamento e pelo convívio agradável durante as disciplinas, nas clínicas e no laboratório.

Profª. Drª. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar pelo conhecimento transmitido, pelas orientações constantes e pela convivência diária durante a Especialização, Bebê Clínica e Clínicas de graduação. Agradeço imensamente pelo carinho e pela nossa amizade, uma grande amiga especial que estará sempre em meu coração.

Profª Draª Cristiane Duque, por sua amizade, paciência, conselhos, desde minha chegada sempre se preocupou para que tudo estivesse bem comigo. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você faz por mim e com certeza a nossa amizade será eterna. Minha eterna gratidão à você e à sua família, em especial ao Felipe que tenho carinho por ele como meu sobrinho.

Profª. Dra. Rosângela Nery, por todo ensinamento e pelo convívio agradável durante a Bebê Clínica, é uma grande amiga, exemplo de pessoa.

As minhas japas Mariana Nagata e Thayse Hosida

Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, sempre me ajudando, dando conselhos, me socorrendo nos momentos mais difíceis, me apoiando para que nunca desistisse.

Acredito que as terei não só como amigas, mas sim como grandes irmãs. Agradeço pelas amizades, preocupações, compreensões, conversas e muitas risadas que demos ao longo desses anos. Obrigada por me ensinarem o que é ter uma amizade verdadeira, e por fazerem muito por mim. Amo muito vocês.

Às minhas amigas Carla Favretto e Liliana Carolina

Seus conselhos foram fundamentais para o meu crescimento. Sempre me animaram com suas palavras “doces”, “meigas” e sábias, que chegavam na hora certa. Não tenho palavras para agradecer todo carinho, amor e respeito que tiveram por mim. Por tudo o que já fizeram por mim, minha eterna gratidão. Minha admiração por vocês é imensa, assim como a alegria de tê-las sempre por perto. Amo vocês.

Ao meu amigo Kevin

Obrigada por existir em minha vida e dar a ela um novo sentido. Com você compartilhei momentos inesquecíveis durante dois anos de mestrado, e que não esteve presente mais em Araçatuba, mas nunca deixou de estar presente na minha vida. Espero que volte sempre para podermos compartilhar momentos únicos de risadas e alegrias! Saudades, amigo.

À minha grande amiga Gabriela Herrera

Agradeço a você pelo imenso amor e carinho, uma amizade desde infância que conforme se passa os anos, o nosso amor e carinho só aumenta. Você dividiu comigo, muitos momentos, alguns foram de lágrimas, mas você minha amiga, sempre que precisei me deu conselhos sábios, palavras para me acalmar, sempre me confortou com suas palavras de ânimo, me fazendo dar altas risadas.

Te amo e obrigada pela amizade sincera e verdadeira minha amiga.

Ao meu amigo José Antônio

José se pudesse descrever você aqui, iriam existir infinitas páginas. Para resumir, você me ensinou a fazer um pouquinho de tudo nessa vida de pós-graduação. Acredito que você será um grande pesquisador, você é um homem brilhante, inteligente, amigo, fiel a Deus.

Obrigada por toda sua paciência, compreensão, pelas palavras de sabedoria. Sou muito grata a tudo que faz por mim. Obrigada Zé!

Aos amigos Caio Sampaio e Leonardo Morais

Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelo companheirismo na pós-graduação. São dois homens iluminados por Deus, e que tem um futuro brilhante, torço pelo sucesso de vocês, e saibam que vocês têm uma grande amiga aqui. Muito obrigada por tudo meninos.

À minha amiga Marcelle Danelon

Agradeço por todos os momentos que tive dúvidas, pelos e-mails, pelas mensagens bem tarde da noite, nos finais de semana, por responder com todo carinho, de estar disposta a ajudar sempre. Minha amiga, agradeço a Deus por tê-la conhecido, ter colocado você em meu caminho, por ser um exemplo de pessoa que se dedica muito à pesquisa. Você nunca mediu esforços para me ajudar, sempre ali disposta quando precisei. Conte sempre comigo, muito obrigada.

Às minhas amigas Karina Caiaffa e Jaqueline Canova

Vocês sempre estiveram presentes em momentos importantes, nos divertimos, choramos, brigamos muito, mas sempre estivemos juntas, e sempre estarei aqui para o que vocês precisarem. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Te amo amigas.

Aos amigos que fiz ao longo da vida das cidades de Paranaíba-MS, Fernandópolis-SP e Araçatuba-SP, que não estiveram diretamente envolvidos neste trabalho, mas cujo apoio e estímulo foram essenciais para que eu prosseguisse na caminhada.

Aos colegas de Mestrado, Doutorado, Pós-Doutorado, Iniciação Científica e Pibic Jr: Alana, Alessandra, Amanda, Ana Paula, Caio, Carla Mendes, Douglas, Emanuele, Francynne, Gabriel, Gabriela, Giovanna, Heitor, Ígor, Isabel, Isabela, Jackeline Amaral, Jesse, Jorge, Laís, Leonardo, Luhana, Mayra, Nayara, Priscila, Sara, Silvio, Suellen, Vanessa, Karollyne, Vitória, Maisa, Thamires. Obrigada pelos momentos agradáveis, pela amizade de cada um e pela colaboração dos que me ajudaram e que foram essenciais para a conclusão desta pesquisa. Obrigada, sucesso a todos!

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Prof. Tit. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado nesta instituição.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Prof. Adj. Luciano Tavares Angelo Cintra e vice-coordenador Prof. Ass. Dr. Juliano Pelim Pessan.

Ao Prof. Dr. João Carlos Silos Moraes e ao Técnico de laboratório Elton José Souza da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira, por ceder gentilmente o aparelho de Microscopia de Varredura. Agradeço a dedicação, receptividade, o convívio agradável e os ensinamentos.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Mario, Luiz e Ricardo, pela ajuda durante esta caminhada.

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Valéria Zagato, Cristiane Lui e Lillian Mada pelo profissionalismo e atenção sempre educadas e atenciosas.

Ao Frigorífico FRIBOI da cidade de Andradina-SP, que permitiram a coleta dos dentes bovinos.

A CAPES do Programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, pela concessão de bolsa que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

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

Minha eterna gratidão. Obrigada.

Epígrafe

*Deus nos concede, a cada dia,
uma página de vida nova no livro
do tempo. Aquilo que colocamos
nela corre por nossa conta.*

Chico Xavier

Silva, Márjully Eduardo Rodrigues. Efeito de dentifrício fluoretado contendo hexametáfosfato de sódio na erosão inicial do esmalte [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2019.

RESUMO

Este estudo *in vitro* avaliou o efeito de dentifrício fluoretado (F) contendo ou não hexametáfosfato de sódio (HMP) em inibir ou reparar a erosão inicial do esmalte. Blocos de esmalte bovino hígido (n=48) e desmineralizado (n=48) foram selecionados por dureza superficial inicial e submetidos a 4 grupos experimentais (12 blocos/grupo): Placebo (sem F e HMP), 1100 ppm F, 1% HMP e 1100 ppm F + 1% HMP. Para a análise do efeito protetor, os blocos de esmalte hígido foram imersos uma única vez em solução de dentifrícios com saliva humana por 2 minutos. Em seguida, os blocos foram submetidos a 4 desafios erosivos com ácido cítrico (0,75%, pH 3,5) por 1 minuto, sob agitação. A percentagem de variação da dureza superficial (%SH) foi calculada após os tratamentos e pós desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Para a análise do efeito reparador, o esmalte desmineralizado foi tratado e submetido aos mesmos desafios erosivos, como descritos anteriormente. A partir de então, %SH foi calculada após a desmineralização, tratamentos e desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Experimento adicional foi realizado para análise da deposição de precipitados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em esmalte desmineralizado. Os dados foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que o grupo placebo apresentou a menor capacidade de inibir e reparar a erosão do esmalte ($p < 0,001$). A perda de dureza aumentou durante repetidos desafios ácidos para todos os grupos; no entanto, o efeito contra a erosão do dentifrício com F/HMP mostrou-se mais resistente. Dentifrícios contendo 1100 ppm F + 1% HMP apresentou maior capacidade de inibir e reparar a erosão do esmalte seguido pelos grupos 1% HMP e 1100 ppm F ($p < 0,001$). Na MEV observou-se deposição de precipitado no esmalte para todos os grupos, formando uma camada mais espessa e

homogênea nos grupos com HMP. Concluiu-se que o dentifrício contendo 1100 ppm F e 1% HMP teve um efeito superior quando comparado ao 1100 ppm F em inibir a erosão inicial do esmalte, reparar o esmalte previamente erodido e resistir aos repetidos desafios erosivos.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoretos, Fosfatos, Erosão dentária, Dentifrícios.

Silva, Márjully Eduardo Rodrigues. Effect of fluoride toothpaste containing sodium hexametaphosphate on initial enamel erosion [thesis]. Araçatuba: State University of São Paulo; 2019.

ABSTRACT

This *in vitro* study evaluated the effect of fluoride (F) toothpaste containing or not sodium hexametaphosphate (HMP) in inhibit or repair initial enamel erosion. Sound (n=48) and demineralized (n=48) bovine enamel blocks were selected by initial surface hardness and subjected to 4 experimental groups (12 blocks/group): Placebo (without F and HMP), 1100 ppm F, 1% HMP and 1100 ppm F + 1% HMP. For the analysis of the protective effect, sound enamel were immersed in toothpaste slurry in human saliva once for 2 minutes. Hereafter, enamel blocks were submitted to 4 erosive challenges in citric acid (0.75%, pH 3.5) by 1 minute, under stirring. Percentage of surface hardness change (%SH) was calculated after treatments and 1, 2, 3 and 4 minutes. For the analysis of the repair effect, demineralized enamel were treated and submitted to erosive challenges as describe previously. Hereafter, %SH was calculated after demineralization, treatments and 1, 2, 3 and 4 minutes. Additional experimental was performed to analysis the deposition of precipitates by scanning electronic microscopy (SEM) on demineralized enamel. Variables were submitted to two-way repeated measures analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). The results showed that the Placebo group had the lowest capacity to inhibit and repair enamel erosion ($p < 0.001$). Hardness loss increased during repeated acid challenges for all groups; however the effect against erosion of F/HMP toothpaste proved to be more resistant. Toothpaste containing 1100 ppm F and 1% HMP presented greatest ability to inhibit and repair enamel erosion followed by 1% HMP and 1100 ppm F groups ($p < 0.001$). There were deposition of precipitated on enamel for all groups, forming a thicker layer and homogeneous HMP groups. It was conclude that toothpaste containing 1100 ppm F and 1% HMP had a superior effect when compared to

1100 ppm F to inhibit the initial erosion on sound enamel, repair the eroded enamel and to resist to the repeated erosive challenges.

Key-words: Dental enamel, Fluorides, Phosphates, Dental erosion, Toothpastes.

LISTA DE TABELAS

- Table 1.** Means values (SD) of percentage of the surface hardness (%SH) 33 according to toothpastes and time of acid challenge in the sound enamel (n=12).
- Table 2.** Means values (SD) of percentage of the surface hardness according 34 to toothpastes and challenge in the previously demineralized enamel (n=12).

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Illustration of the hardness analysis in the Protective (A) and Repair 31 (B) experiment after preparer of the enamel block (SHi), demineralization (SH Demin), treatment (SH Post-treated) and SH after erosive challenge during 1, 2, 3 e 4 min.
- Figure 2.** SEM images of a representative specimen in different groups: (A) 35 Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 1% HMP and (D) 1100 ppm F + 1% HMP. Black asterisk indicates eroded enamel. White asterisk indicates precipitated formed after the treatments. Arrow indicates the limit between eroded enamel and precipitated formed after treatments.

SUMÁRIO

Abstract.....	26
1. Introduction.....	27
2. Material and methods	29
2.1. Preparation of enamel blocks and experimental groups	29
2.2. Toothpaste formulation and fluoride assessment.....	29
2.3. Collect of the human saliva.....	30
2.4. Toothpaste treatment and erosive protector effect.....	30
2.5. Toothpaste treatment and erosive repairer effect.....	31
2.6. Scanning electron microscopy (SEM)	32
2.7. Statistical analysis	32
3. Results	33
4. Discussion	36
5. Conclusion.....	38
6. References	39
ANEXOS	42

Effect of fluoride toothpaste containing sodium hexametaphosphate on initial enamel erosion

Short title: Hexametaphosphate toothpaste on enamel erosion

Márjully Eduardo Rodrigues da Silva¹, Alberto Carlos Botazzo Delbem¹, Denise Pedrini²

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Department of Pediatric Dentistry and Public Health, São Paulo, Brazil.

² São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Department of Surgery and Integrated Clinic, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Profa. Dra. Denise Pedrini

Disciplina de Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, UNESP

Rua José Bonifácio 1193, CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil. Phone: +55-18-3636-3201 Fax: +55-18-3636-3332. E-mail: denise.pedrini@unesp.br

Keywords: Dental enamel, Fluorides, Phosphates, Dental erosion, Toothpastes.

***De acordo com as instruções aos autores do periódico Journal of Dentistry**

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/30441?generat
epdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/30441?generat
epdf=true)

Abstract

Objectives: This *in vitro* study evaluated the effect of fluoride (F) toothpaste containing or not sodium hexametaphosphate (HMP) in inhibit or repair initial enamel erosion.

Methods: Sound (n=48) and demineralized (n=48) bovine enamel blocks were selected by surface hardness (SH) and treated with experimental toothpastes (12 blocks/group): Placebo, 1100 ppm F, 1% HMP and 1100 ppm F + 1% HMP. For the analysis of the protective effect, sounds enamel were immersed in toothpaste/human saliva slurry once for 2 minutes followed by 4 erosive challenges in citric acid (pH 3.5, 0,75%, 1 minute, under stirring). Percentage of surface hardness change (%SH) was calculated after treatment and 1, 2, 3 and 4 minutes. For the analysis of the repair effect demineralized enamel were treated and submitted to erosive challenges as describe previously. Hereafter, %SH was calculated after demineralization, treatment and 1, 2, 3 and 4 minutes. Data were submitted to 2-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$).

Results: Placebo group showed the lowest capacity to inhibit and repair enamel erosion ($p<0.001$). Hardness loss increased during repeated acid challenges for all groups; however the effect against erosion of F/HMP toothpaste proved to be more resistant. Toothpaste containing 1100 ppm F and 1% HMP presented greatest ability to inhibit and repair enamel erosion followed by 1% HMP and 1100 ppm F groups ($p<0.001$).

Conclusions: Toothpaste containing 1100 ppm F and 1% HMP had a superior effect when compared to 1100 ppm F to inhibit the initial erosion on sound enamel, repair the eroded enamel and to resist to the repeated erosive challenges.

Clinical significance: Toothpaste containing F and HMP could be an advantage in patients affected by dental erosion, due to its higher preventive potential, mainly those who make frequent use of acidic beverages.

Keywords: Dental enamel, Fluorides, Phosphates, Dental erosion, Toothpastes.

1. Introduction

Dental erosion is a multifactorial condition resulting from the cumulative chemical and mechanical effects on the hard tissues of the teeth without the involvement of bacteria. Erosive tooth wear is increasingly recognized as a common condition in pediatric dentistry; its prevalence has been reported to range from 10 to 80%, mostly diagnosed in its initial stages, and increases significantly with age [1,2]. Advanced stages of this condition can impair aesthetics and function, affecting the patient's quality of life [3]. Therefore, it is necessary to establish effective preventive and therapeutic approaches focused on the etiopathogenicity of the lesion. Preventive measures should begin early and involve causal measures, such as dietary advice, to reduce erosive challenges [4,5].

Fluoride (F) has been used as a complementary preventive approach to prevent tooth erosion. However, moderate or low concentrations of F are not capable of promoting significant preventive effects against erosion [6]. Although F may have a protective effect under conditions in which erosive factors are not excessive [7], some studies have shown a limited effect of toothpaste containing 1000 ppm F when compared to F-free toothpastes on dentin and enamel abrasion eroded [8-10]. The addition of inorganic phosphate, such as sodium trimetaphosphate, shows that it is possible to increase the anti-erosive potential of fluoride toothpastes [11,12]. According to a recent study, sodium trimetaphosphate would block acid diffusion by reducing enamel softening in depth [12].

Another phosphate with a strong affinity for hydroxyapatite is sodium hexametaphosphate (HMP) [13,14]. The presence of six anionic groups in the ring of its molecule increases the possibility of binding to the amino and hydroxyl groups of collagen [15,16]. Fluoride toothpaste containing HMP shows an effect on the reduction of mineral enamel loss [17-19]. This effect may be due to the capacity of HMP adsorption on the enamel surface and consequent increase in calcium and phosphate adsorption and diffusion into the enamel [14]. *In vitro* [19] and *in situ* [18] studies showed that the enamel depth lesions were 53% and 25% lower, respectively, using toothpastes containing 1100 ppm F and 1% HMP when compared to the 1100 ppm F toothpaste and without

HMP. However, these toothpastes were tested in models that simulate the dental caries process and are different from the dental erosion process characterized by acidic challenges with pH below 4.0 in unsaturated medium in relation to hydroxyapatite [20,21]. Under these conditions, the dissolution pH of calcium fluoride, fluorapatite or calcium phosphate precipitate is exceeded during the erosive challenge. Even though solution containing 1% HMP and 1100 ppm F decreases hydroxyapatite dissolution rate during repeated acid (pH 3.2) challenges [21], this effect needs to be tested in erosive model utilizing tooth enamel and toothpaste formulation. Also, to verify the capacity of F-toothpaste containing HMP in inhibiting the enamel erosion or repairs demineralized enamel as well as resist to the repeated erosive challenges.

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of the F-toothpaste (1100 ppm F) containing 1% HMP in inhibits or repair initial enamel erosion. The null hypothesis of the study was that the toothpaste containing F and HMP has similar capacity to the F-toothpaste without HMP to repair the demineralized enamel and to resist to the repeated erosive challenges.

2. Material and methods

2.1. Preparation of enamel blocks and experimental groups

Enamel blocks (4 mm × 4 mm) were obtained from bovine incisors and were serially polished with water-cooled silicon carbide paper discs (600, 800 and 1200 grades; Extec, Enfield, CT, USA) to remove ~200 µm from the enamel surface [11,22] (ANEXO A). Sample size of 12 blocks was calculated based on a pilot study, considering as primary result the surface hardness (KHN), the mean difference between the groups and standard deviation of 12 KHN and 6 KHN, respectively, α -error of 0.05 and a power (1- β) of 0.85, using the statistical program Sigma Plot version 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Surface hardness (SH) was determined in the following way: one reference indentation was made to 1000 µm (Knoop diamond, 500 g, 10 seconds, Shimadzu HMV-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) from the central region of the enamel block (Figure 1). Hereafter, initial SH (SHi) after 200 µm of the vertex of that greater indentation, five indentations separated by a distance of 100 µm were made (Knoop diamond, 25 g, 10 seconds, Shimadzu HMV-2000) (ANEXO B) [23]. Blocks with average SHi between 350.0 to 380.0 KHN [11,19,22], flat enamel surfaces, without cracks, scratches or hypoplasia were selected. All surfaces of the blocks were covered with nail polish, except enamel surface. Enamel blocks (n=96) were randomly distributed according to the average of SH of the total of blocks and the trust interval among four treatments with experimental toothpastes: Placebo (without F and HMP), 1100 ppm F, 1100 ppm F + 1% HMP and 1% HMP.

2.2. Toothpaste formulation and fluoride assessment

The toothpastes were handled with the following components: titanium dioxide, carboxymethyl cellulose, methyl-phydroxybenzoate sodium, saccharin, mint oil, glycerin, abrasive silica, sodium lauryl sulfate, and deionized water [11,24]. HMP (CAS 68915-31-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added

at a concentration of 1% to the toothpaste containing 1100 ppm F as NaF (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brazil) [18,19]. Toothpastes without F and HMP (Placebo), containing 1100 ppm F or 1%HMP were also prepared (ANEXO C). Total F (TF) and ionic F (IF) concentrations (ppm F, mean [SD]) of the all toothpastes were checked [25] prior to the beginning of the experiment using a fluoride specific electrode (9409 BN, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA): Placebo (18.9 [7.5] and 18.2 [2.7]); 1100 ppm F (1,373.9 [33.4] and 1,212.1 [69.9]); 1100 ppm F + 1% HMP (1,342.9 [77.4] and 1,215.5 [37.2]); and 1% HMP (20.6 [0.5] and 17.5 [1.3]) (ANEXO D).

2.3. Collect of the human saliva

Human saliva paraffin-stimulated was collected in the morning 1 h after breakfast from healthy volunteers of both genders (aged 22-28 years, n=6) according to protocol approved by the Research Ethics Committee (CAAE: 03226118.6.0000.5420) (ANEXO E). Immediately after collection, saliva samples were pooled and centrifuged for 10 min at 4°C and 2.000×g. The supernatants were stored at -72°C into 50 mL bottles [26] (ANEXO F). The pooled of saliva contained 24.0 (3.7) µg Ca/mL and 12.3 (0.1) µg P/mL at pH 7.4 (0.2).

2.4. Toothpaste treatment and analysis erosive protector effect

The enamel blocks (n=48; 12/group) were immersed (2 mL/block) in suspension of toothpaste and human saliva (1:3 – wt:wt) once for 2 minutes, and then washed in deionized water for 30 seconds (ANEXO G). The erosive challenge consisted of individual immersion of each enamel block into 4 mL of citric acid (0.75%, pH 3.5, Synth, Brazil) under agitation (100 rpm) for 1 minute at room temperature 25°C, followed by washing with water deionized for 30 s [27,28]. In total, the erosive challenges were performed four times, after the treatments with the experimental toothpastes.

The final surface hardness (SHf) measurements were performed after toothpaste treatment and each erosive challenge at 400, 600, 800, 1000 and 1200 μm of the right apex of the largest impression (Figure 1A) to calculate the percentage of surface hardness change ($\%SH = [(SHf - SHi) / (SHi)] \times 100$) post-treated, and 1, 2, 3 and 4 minutes of the acid challenge, respectively (ANEXO H).

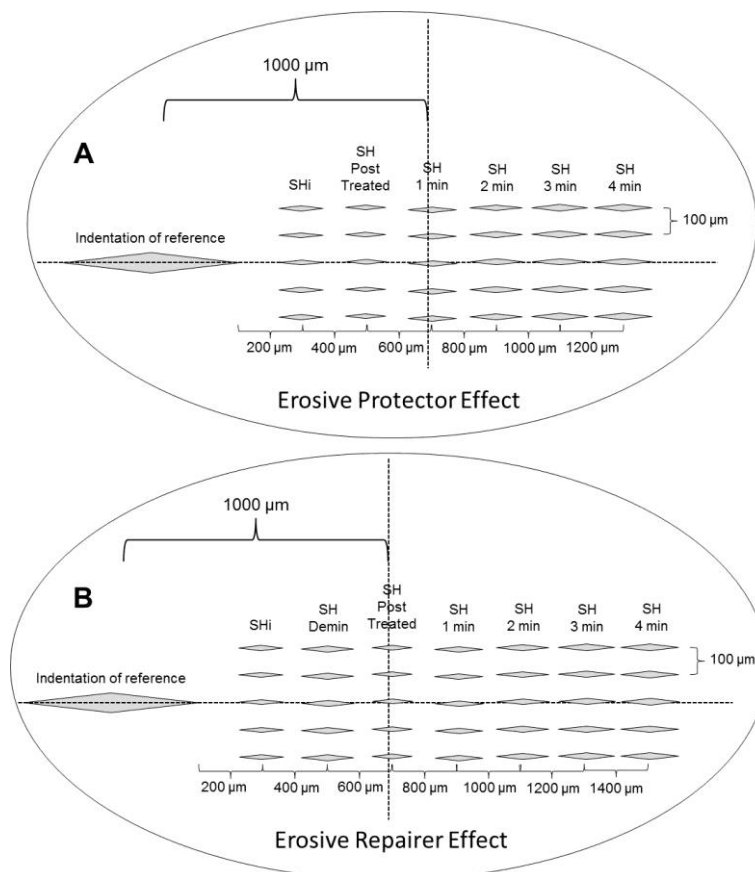


Figure 1 – Illustration of the hardness analysis in the Protective (A) and Repair (B) experiment after preparation of the enamel block (SHi), demineralization (SH Demin), treatment (SH Post-treated) and SH after erosive challenge during 1, 2, 3 e 4 min.

2.5. Toothpaste treatment and analysis erosive repairer effect

Sound enamel blocks were immersed in 4 mL of citric acid (0.75%, pH 3.5, Synth, Brazil), under agitation (100 rpm) for 1 minute at room temperature, to produce an initial erosive lesion, and washed with deionized water for 30 s. After determination of the surface hardness of the demineralized enamel (SH Demin), the blocks were treated with toothpaste/human saliva slurry. The blocks

were washed and surface hardness (SH Post-Treated) performed again (Figure 1B) for calculating the percentage of repair of eroded enamel ($\%SHR = [(SH_{\text{post-treated}} - SH_{\text{Demin}}) / (SH_i - SH_{\text{Demin}})] \times 100$). Next, the blocks were submitted to four erosive challenges, as previously described, in order to verify the residual effect of the treatments. Final surface hardness measurements (SH_f) were performed after each erosive challenge to calculate $\%SH$ and the difference between $\%SHR$ and $\%SH$ was calculated obtaining $\Delta\%SH$ for each time (ANEXO I).

2.6. Scanning electron microscopy (SEM)

In order to verify the capacity of toothpastes produce precipitates on the enamel surface, demineralized enamel blocks ($n=3/\text{group}$) were prepared as previously described. Half of the surface was then insulated with nail polish and the blocks were treated with toothpaste slurry in human saliva for 2 minutes and washed in deionized water for 30 s. Thereafter, the nail polish was removed with a scalpel blade and acetone and the blocks were again washed and dried with absorbent paper. After that, enamel blocks were mounted on stubs using carbon double - sided tape and taken to a spray coating machine (Quorum - Q150T E) and covered with a thin layer of gold. The images of each sample were obtained by MEV (Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Germany), with a magnification of 10,000 \times at 20 kv, and the presence or not of precipitate on the enamel surface was evaluated (ANEXO J).

2.7. Statistical analysis

Experimental groups (Placebo, 1100 ppm F, 1% HMP and 1100 ppm F + 1% HMP) and challenge (Demineralization, Post-treated, 1 min, 2 min, 3 min and 4 min) were considering as fixed factors and $\%SH$ as variable. Data showed normal (Shapiro-Wilk test) and homogeneous (Cochran test) distributions and thus were submitted to two-way repeated measures analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls test. The analysis was performed by SigmaPlot software (version 12.0, SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, USA) and significance level of 5%.

3. Results

Starting from sound enamel (Table 1), it was clear for all toothpastes that at each erosive challenge there was an increase of surface hardness loss ($p < 0.001$), however toothpastes with F or/and HMP led to lower hardness loss than Placebo ($p < 0.001$). HMP toothpastes led to higher gain of hardness post treatment and lower hardness loss after 1 and 2 min of erosive challenge than 1100 ppm F ($p < 0.05$). The association F/HMP reduced hardness loss in all times compared to the others ($p < 0.001$).

Table 1. Means values (SD) of percentage of the surface hardness (%SH) according to toothpastes and time of acid challenge in the sound enamel (n=12)

Challenge	Toothpastes			
	Placebo	1100 ppm F	1% HMP	1100 ppm F + 1% HMP
Post-treated	0.5 ^{a,A} (0.2)	2.2 ^{a,B} (0.7)	9.2 ^{a,C} (1.9)	11.5 ^{a,D} (0.8)
1 min	-12.8 ^{b,A} (0.6)	-8.7 ^{b,B} (0.6)	-6.8 ^{b,C} (1.1)	-4.0 ^{b,D} (0.7)
2 min	-24.9 ^{c,A} (0.9)	-14.3 ^{c,B} (1.0)	-12.8 ^{c,C} (1.5)	-9.1 ^{c,D} (0.7)
3 min	-37.0 ^{d,A} (1.1)	-18.2 ^{d,B} (1.2)	-18.7 ^{d,B} (1.6)	-13.8 ^{d,C} (1.3)
4 min	-49.4 ^{e,A} (1.7)	-32.5 ^{e,B} (1.1)	-32.7 ^{e,B} (1.6)	-28.9 ^{e,C} (1.0)

Distinct lowercase show significant difference among time challenge for each toothpastes. Distinct uppercase letters show difference among toothpastes in each time challenge (two-way ANOVA repeated measures, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

After initial demineralization, surface hardness loss showed no difference among toothpaste treatment ($p < 0.05$). Following the toothpaste treatment, there was repair and gain of surface hardness for all groups, however with difference among them ($p < 0.001$), with higher value for 1100 ppm F + 1% HMP group (Table 2). After the four acidic challenges, there was an increase in the

hardness loss for all groups ($p < 0.05$), but lower in the 1100 ppm F + 1% HMP ($p < 0.001$).

Table 2. Means values (SD) of percentage of the surface hardness according to toothpastes and challenge in the previously demineralized enamel ($n=12$)

Challenge	Toothpastes			
	Placebo	1100 ppm F	1% HMP	1100 ppm F + 1% HMP
Demin (%SH Demin)	-10.4 ^{a,A} (0.4)	-11.0 ^{a,A} (0.7)	-11.1 ^{a,A} (0.7)	-11.4 ^{a,A} (0.8)
Post-treated (%SHR)	4.9 ^{b,A} (0.9)	32.5 ^{b,B} (1.7)	47.7 ^{b,C} (1.4)	76.2 ^{b,D} (2.2)
1 min ($\Delta\%SH$)	-7.4 ^{c,A} (0.8)	23.7 ^{c,B} (1.8)	32.9 ^{c,C} (2.5)	64.2 ^{c,D} (4.5)
2 min ($\Delta\%SH$)	-20.3 ^{d,A} (1.0)	16.9 ^{d,B} (2.3)	18.0 ^{d,B} (2.1)	55.2 ^{d,C} (3.1)
3 min ($\Delta\%SH$)	-36.2 ^{e,A} (1.5)	1.3 ^{e,B} (2.1)	9.3 ^{e,C} (2.2)	42.8 ^{e,D} (4.1)
4 min ($\Delta\%SH$)	-44.9 ^{f,A} (1.4)	-9.2 ^{f,B} (2.2)	5.5 ^{f,C} (2.4)	39.1 ^{f,D} (3.7)

Distinct lowercase show significant difference among time challenge for each toothpastes. Distinct uppercase letters show difference among toothpastes in each time challenge (two-way ANOVA repeated measures, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

Distinct precipitates were evident by SEM on the treated demineralized enamel surfaces by the different toothpastes (Figure 2). In contrast, apatite crystals expose and fish-scale “keyhole” or honeycomb structure appeared on the untreated demineralized surface. For Placebo and 1100 ppm F, the precipitated produced a thinner layer, more homogeneous with fluoride toothpaste (Figure 2B). A precipitated thicker layer and homogeneous was observed with toothpastes containing HMP (Figure 2C and 2D).

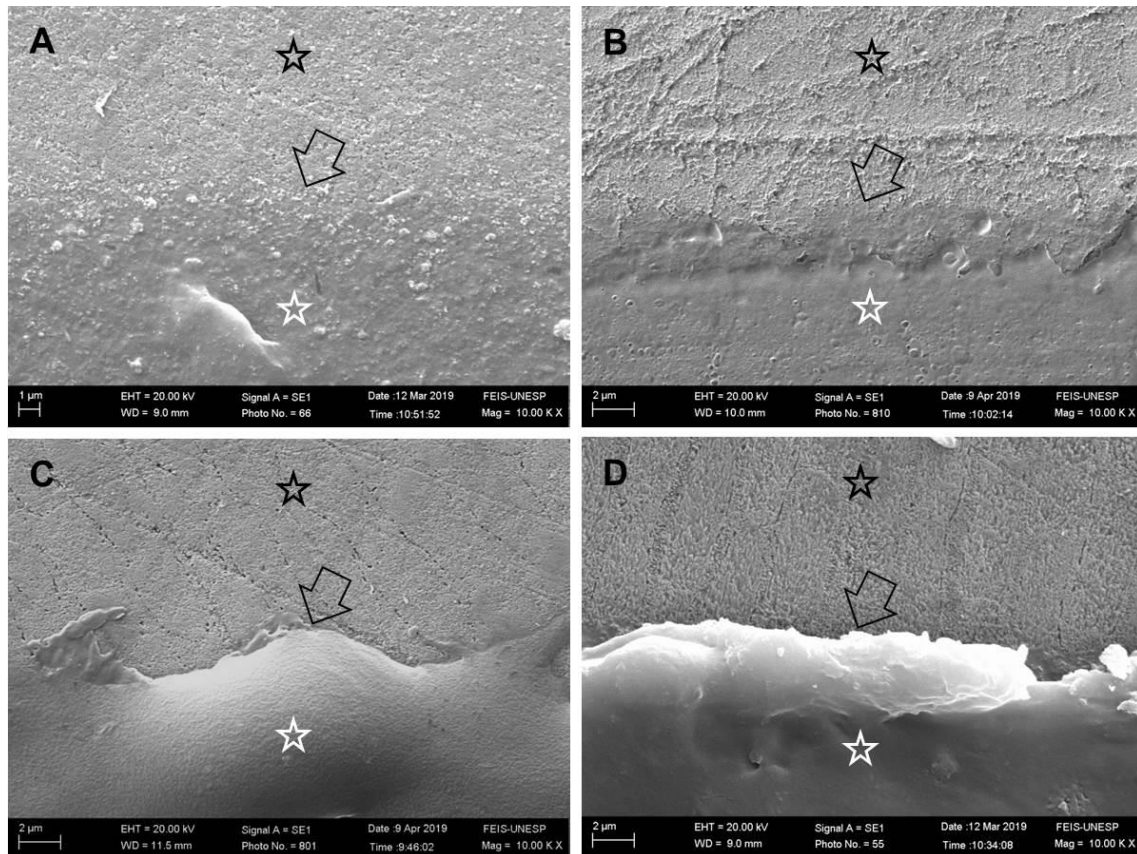


Figure 2 – SEM images of a representative specimen in different groups: (A) Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 1% HMP and (D) 1100 ppm F + 1% HMP. Black asterisk indicates eroded enamel. White asterisk indicates precipitated formed after the treatments. Arrow indicates the limit between eroded enamel and precipitated formed after treatments.

4. Discussion

The results showed that the addition of 1% HMP to 1100 ppm F toothpaste presented the lowest softening of enamel and the highest ability to repair the erosion lesion in the enamel compared to F toothpaste without HMP. Moreover, F/HMP toothpaste did present superior results over subsequences acid challenges in previously demineralized enamel. Thus, the null hypothesis was rejected. Furthermore, toothpastes containing HMP produced great quantities of precipitated on enamel demineralized surface.

Even if prior had studies showed a restricted or none effect of F toothpaste (>1000 ppm F) against enamel wear [9-11,29,30], in an initial erosive process that exhibit an enamel softened without loss of structure, the 1100 ppm F demonstrated a significant higher protective effect compared with Placebo. As known the effect of F toothpaste is due the precipitation of calcium fluoride (CaF₂-like) on enamel [9,31]. Furthermore, higher deposition of CaF₂ occurs on demineralized enamel due the great availability of calcium and phosphate and area of reactivity [32-34]. This corroborates the mineral gain 15 times higher in the demineralized enamel than in the sound enamel when treated with a toothpaste containing 1100 ppm F (post-treatment value from Table 2 over post-treatment value from Table 1). Moreover, those deposits did show the greater resistance to erosive challenge than sound enamel. Comparably, the precipitates induced by 1% HMP toothpastes that led to superior mineral gain than F toothpaste on enamel demineralized also were more durable over time.

In addition to producing initial erosion repair greater than 1100 ppm F toothpaste, 1% HMP group performed better on subsequent acid challenges. HMP has ability to adsorb on enamel creating a protective layer that hinders acid diffusion into the enamel [18,19]. HMP-layer presents larger quantities of electron-donor sites that enhance the adsorption of ionic species as Ca²⁺, H₂PO₄⁻ and CaH₂PO₄⁺ on enamel [14]. To confirm this ability, the additional experiment showed a massive deposition of that calcium phosphate layer on demineralized enamel for the HMP toothpastes (Figure 1C and 1D). Based on this, HMP demonstrated significant capacity to induce enamel remineralization in depth in the enamel [35]. However, it had not yet been shown how the product of the repair would withstand subsequent erosive challenge. Besides

leading to a higher hardness, the product consisting primarily of calcium phosphate by HMP was more resistant to erosive challenge (sound or demineralized enamel) than the fluoride-based product induced by the fluoridated toothpaste. Unlike calcium phosphate deposits formed in Placebo (Figure 1A), the presence of HMP leaves this layer less susceptible to acids. Previous study has shown that the treatment of hydroxyapatite with HMP or 1100 ppm F associated with HMP reduces its dissolution by forming a barrier that limits acid diffusion [21]. In this case, HMP-Ca-PO₄ layer minimize the exposition to acid on enamel surface by retains in its structure H⁺ [17,18], leading to a slower dissolution of the sound enamel.

Contrary to previously stated in studies utilizing caries models [17,18], and based on the data discussed above, the results of the present study demonstrated that the F/HMP association has an additive effect on the erosive process. Although studies have shown that cyclic phosphates compete with the adsorption of fluoride on enamel [19,36], the presence of F would induces an increase in HMP adsorption in healthy enamel and, consequently, a greater amount of calcium phosphate nucleating sites (unpublished data). Probably, the structural arrangement of the HMP layer formed in the presence of fluoride is different from HMP alone. The studies have hypothesized that a HMP-Ca-F layer would be formed [17,18]. This layer enhance the diffusion and deposition of calcium phosphate rich in F into the enamel (Figure 1D) that would explain the ability 2-fold higher of F/HMP association (Table 2) to repair the initial erosive lesion than 1100 ppm F toothpaste (Figure 1B). Furthermore, the inhibitory effect persisted during repeated acid challenges as observed in previous study utilizing hydroxyapatite [21].

Clinically the use of this toothpaste would have a major impact on initial erosive lesions or immediately upon ingestion of acidic beverages during meals. However, the present *in vitro* model does not fully reproduce acid challenges occurring *in vivo*, as the abrasive effect during the teeth brushing. Thus, would be interesting verify if HMP-Ca-F layer is present and protect the enamel and dentin against erosion when the toothpaste is applied through brushing.

5. Conclusion

It was concluded that 1100 ppm F toothpaste containing 1% HMP had a superior effect when compared to toothpaste with 1100 ppm F to inhibit the initial erosion on sound enamel, repair the eroded enamel and to resist to the repeated erosive challenges.

6. References

1. Taji S, Seow WK. A literature review of dental erosion in children. *Australian Dent J* 2010; 55:358–367.
2. Kreulen CM, Van't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NH, Bartlett DW. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Res* 2010; 44(2):151–159.
3. Papagianni CE, van der Meulen MJ, Naeije M, Lobbezoo F. Oral health-related quality of life in patients with tooth wear. *J Oral Rehabil* 2013; 40:185-190.
4. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2009; 17:75-86.
5. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2012; 20:493-502.
6. Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res* 2002; 36:75-80.
7. Lussi A, Jaeggi T. Dental erosion in children. *Monogr Oral Sci* 2006; 20:140-151.
8. Ponduri S, Macdonald E, Addy M. A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. *Int J Dent Hyg* 2005; 3:7-12.
9. Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2007; 41:77-79.
10. Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res* 2011; 45:581-589.
11. Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010; 44:135-140.
12. Danelon M, Pessan JP, Santos VRD, Chiba EK, Garcia LSG, de Camargo ER, Delbem ACB. Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro. *Acta Odontol Scand* 2018; 76:119-124.
13. van Dijk JW, Borggreven JM, Driessens FC. The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1980; 25:591-595.

14. Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol* 2018; 90:108-112.
15. Li X, Chang J. Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85:293-300.
16. Leone G, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R. New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol* 2008; 19:824-830.
17. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent*. 2014; 42(3):256-62.
18. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent* 2015; 43:1249-1254.
19. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clin Oral Investig* 2016; doi 10.1007/s00784-015-1707-x.
20. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res* 2011; 45:24-32.
21. Amaral JG, Delbem ACB, Pessan JP, Manarelli MM, Barbour ME. Effects of polyphosphates and fluoride on hydroxyapatite dissolution: A pH-stat investigation. *Arch Oral Biol* 2016; 63:40-46.
22. Manarelli MM, Moretto MJ, Sasaki KT, Martinhon CC, Pessan JP, Delbem AC. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion. *Am J Dent* 2013; 26:307-312.
23. Argenta RM, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:241–6.
24. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009; 43: 50-56.
25. Delbem AC, Sasaki KT, Vieira AE, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, Cannon ML, Xiao X, De Carlo F, Delbem AC. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. *Caries Res* 2009; 43:359-65.

26. Schipper R, Loof A, De Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. SELDI-TOFMS of saliva: methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B* 2007; 847:45-53.
27. Baumann T, Kozik J, Lussi A, Carvalho TS. Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Sci Rep* 2016; 6:34760.
28. Baumann T, Bereiter R, Lussi A, Carvalho TS. The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Sci Rep* 2017; 7:12999.
29. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA, Buzalaf MA Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz Oral Res* 2008; 22:132-138.
30. Cruz NV, Pessan JP, Manarelli MM, Souza MD, Delbem AC. In vitro effect of low-fluoride toothpastes containing sodium trimetaphosphate on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2015; 60:1231-1236.
31. Danelon M, Takeshita EM, Sasaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent* 2013; 26:15-20.
32. Ögaard B, Rölla G, Helgeland K. Alkali soluble and alkali insoluble fluoride retention in demineralized enamel in vivo. *Scand J Dent Res* 1983; 91:200-204.
33. Ögaard B, Rölla G, Helgeland K. Fluoride retention in sound and demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat). *Scand J Dent Res* 1984; 92:190-197.
34. Arends J, Reintsema H, Dijkman TG. 'Calcium fluoride-like' material formed in partially demineralized human enamel in vivo owing to the action of fluoridated toothpastes. *Acta Odontol Scand* 1988; 46:347-353.
35. Gonçalves FMC, Delbem ACB, Pessan JP, GP de Nunes, Emerenciano NG, Garcia LSG, Báez Quintero LC, Neves JG, Danelon M. Remineralizing effect of a fluoridated gel containing sodium hexametaphosphate: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2018; 90:40-44.
36. Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018; 106:2553-2564.

ANEXOS

ANEXO A

OBTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

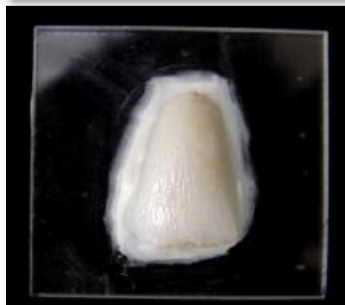
Confecção dos blocos de esmalte bovino



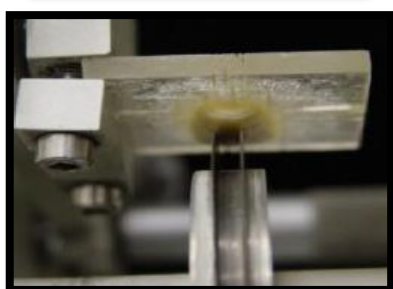
Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



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



Face vestibular fixada na placa de acrílico.

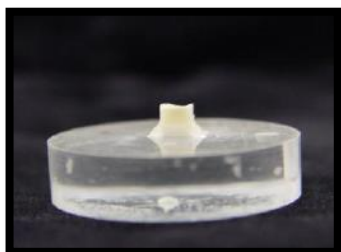


Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond – n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida,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



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

PLANIFICAÇÃO DA DENTINA E POLIMENTO DO ESMALTE



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



Polimento de dentina, utilizando Politriz Grinder-Polisher Buehler com lixa de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.

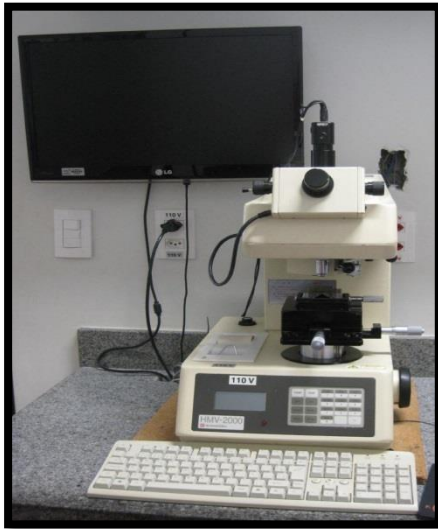


Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual foi polida para análise de dureza.

SEQÜÊNCIA DO POLIMENTO DE ESMALTE

- A.** Limpeza da superfície de esmalte com pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
- B.** Na Politriz Grinder – Polisher Buehler - lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos) refrigeração à água, e para finalizar acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler).
- C.** Limpeza em lavadora ultrassônica (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) em água destilada/deionizada (20 minutos);

ANEXO B DUREZA DE SUPERFÍCIE INICIAL



Microdurômetro SHIMADZU



Base acrílica com bloco de dente
bovino pós dureza inicial
n=48
n=12/grupo

ANEXO C GRUPOS EXPERIMENTAIS



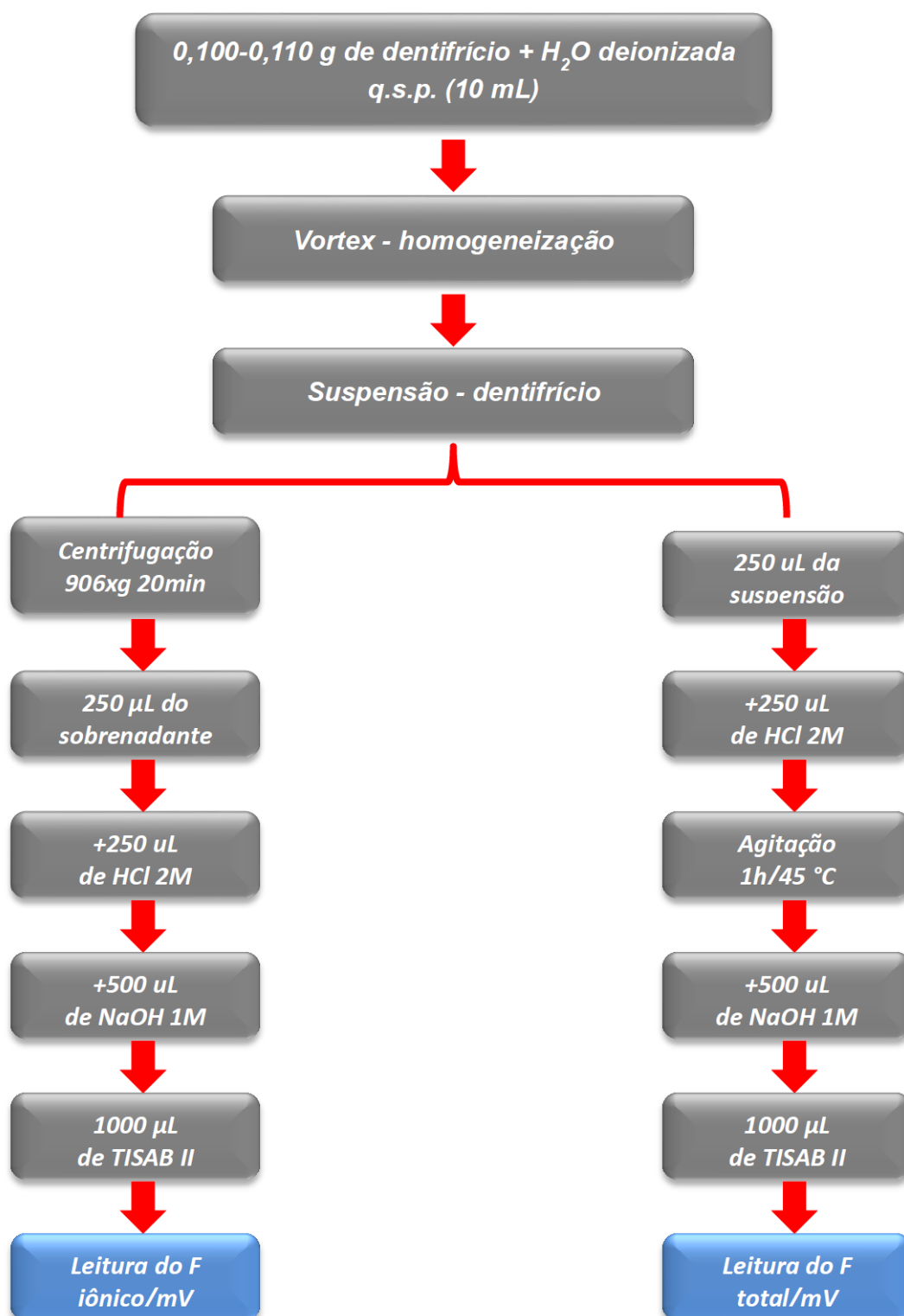
Composição dos dentifrícios dos grupos experimentais

Ingredientes*	Dentifrícios (g/100g)			
	Placebo	1% HMP	1100 ppm F	1100 ppm F + 1% HMP
Água deionizada	59,12	58,12	58,88	57,88
Glicerina	26,6	26,6	26,6	26,6
Fluoreto de sódio**	-	-	0,24	0,24
Hexametáfosfato de sódio	-	1,0	-	1,0
Metil-p-Hidroxibenzoato de sódio	0,08	0,08	0,08	0,08
Sacarina sódica	0,1	0,1	0,1	0,1
Carboximetilcelulose	1,4	1,4	1,4	1,4
Sílica abrasiva (Tixosil 73)	10,0	10,0	10,0	10,0
Dioxido de titânio	0,5	0,5	0,5	0,5
Lauril sulfato de sódio	1,7	1,7	1,7	1,7
Flavorizante (óleo de menta)	0,5	0,5	0,5	0,5

*(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). **(Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil).

Obs: Os dentifrícios foram manipulados no laboratório de Odontopediatria - UNESP/FOA.

ANEXO D ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DOSAGEM DO F NOS DENTIFRÍCIOS



ANEXO E COMITÊ DE ÉTICA

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de dentifrícios fluoretados contendo hexametáfosfato de sódio na erosão do esmalte.

Pesquisador: Denise Pedrini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03226118.6.0000.5420

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.064.283

Apresentação do Projeto:

Para este estudo in vitro, blocos de esmalte bovino serão selecionados pela dureza de superfície inicial (SHi) e divididos em 4 grupos (n=12/grupo):

placebo (sem F e sem HMP), 1100 ppm F (1100), 1100 ppm F associado a 1% HMP (1100HMP) e 1% HMP (HMP). Para a análise do efeito protetor

em lesões erosivas iniciais (n=48), os dentifrícios serão aplicados uma vez nos blocos e a seguir serão realizados 4 desafios erosivos (ácido cítrico,

0,75%, pH = 3,5, 1 minuto, sob agitação). Dureza de superfície final (SHf) será realizada após cada desafio, para calcular a porcentagem de

alteração da dureza de superfície (%SHC). Para a análise do efeito reparador em lesões erosivas iniciais (n=48), após os blocos serem imersos em

ácido cítrico, será determinada a dureza de superfície do esmalte erodido (SHE). A seguir, os blocos serão tratados com os dentifrícios e

determinada novamente a dureza para o cálculo da porcentagem de reparação do esmalte erodido (%SHR). Serão realizados 4 desafios erosivos

com ácido cítrico e SHf após cada desafio. Os dentifrícios e o tempo de exposição ao ácido serão considerados os fatores de variação e, como

variáveis, as %SHC e %SHR em cada tempo. Os dados serão submetidos à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios seguidas pelo

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.064.283

teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar in vitro o efeito do dentífrico fluoretado contendo hexametáfosfato de sódio na erosão inicial do esmalte.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Haverá risco mínimo, pois haverá coleta de saliva que será estimulada com auxílio de parafina, sendo expectorada em frasco estéril.

Benefícios:

O benefício será entender melhor o mecanismo de ação da associação fluoreto/hexametáfosfato de sódio no processo da erosão do esmalte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto científico dentro das normas da CONEP.

A metodologia proposta é capaz de atender os objetivos do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências, recomenda-se a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/06/2019. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.064.283

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1233171.pdf	21/11/2018 17:07:21		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	21/11/2018 17:05:50	Denise Pedrini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo.pdf	21/11/2018 16:13:46	Denise Pedrini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	21/11/2018 11:49:59	Denise Pedrini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

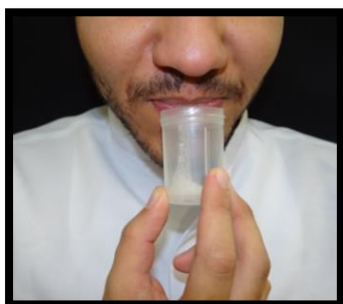
ARACATUBA, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador(a))

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

ANEXO F COLETA SALIVA HUMANA

Frente a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa humana, a coleta da saliva humana foi feita em vários dias, no período da manhã, pelo menos uma hora após a ingestão do café da manhã. Cada voluntário recebia um pedaço de parafilme para ajudar na produção da saliva e um recipiente plástico onde depositavam por 20 minutos toda saliva produzida. Ao final, toda saliva coletada foi homogeneizada num becker e vertidas em vários falcons de 15 mL. Em seguida, os falcons eram levados a um centrifuga, por 10 min, a 2000 rpm. O sobrenadante foi congelado a -72°C .



Voluntário doando saliva



Preparo da saliva em tubos



Centrifugação da saliva em 2000 rpm por 10 min.



Separação do líquido sobrenadante e pellet



Tubo Falcon com armazenamento do sobrenadante

Mantidos em freezer -72°C



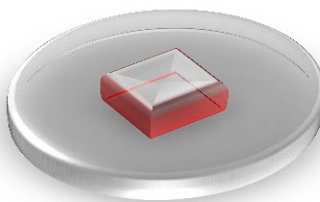
ANEXO G

ESQUEMA DE CICLAGEM DE EFEITO PROTETOR

Bloco de dente bovino com proteção com esmalte cosmético



Fixação do bloco de esmalte na base acrílica



Bases fixadas em dispositivos para realização do tratamento



Diluição do dentífrico em saliva humana (1:3)

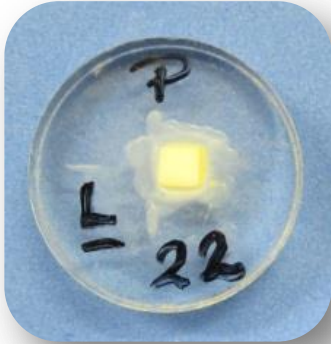


Dispositivo com bases acrílicas coladas com blocos de dentes bovinos sendo imersas em solução 2 mL na suspensão, por 2 minutos



Agitadora com dispositivo em 100 rpm, em temperatura ambiente de 25°C

ANEXO H CICLOS DE EROSÃO DE EFEITO PROTETOR



Blocos de dente
bovino colado em
base
n=48



Adição do ácido cítrico
(4 mL) 0,75%; pH 3,5



Agitação dos blocos por
100 rpm, 1 min
Temp. ambiente 25°C

**Repetir o ciclo
por 4 vezes**



Microdurômetro
Carga 25 g
Tempo 10 s

Lavado por 30s
em água
deionizada

ANEXO I CICLOS DE EROÇÃO DE EFEITO REPARADOR



Imagem da dureza inicial
n=48



Ácido cítrico (4 mL)
0,75%; pH 3,5



Agitação em 100 rpm,
por 1 min
Temp. ambiente 25°C



Imagem da dureza inicial (SHi)
e Pós erosão (SHDemin)



Carga 25 g
Tempo 10 s

Lavado por 30 s
com água
deionizada



Solução de saliva humana
+ dentifrício (1:3)



Imersão dos blocos em
2 mL na solução e agitação
por 2 min.

Dureza pós tratamento com
dentifrício e realizou 4
desafios ácidos.
Dureza final após cada ciclo.

ANEXO J MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA



Metalização da amostra
com ouro



Microscópio Eletrônico de
Varredura – MEV (Carl
Zeiss, EVO ILS15)