

Priscila Toninatto Alves de Toledo

Avaliação *in vitro* da obliteração de túbulos dentinários utilizando dentifrícios contendo trimetafosfato de sódio.

Araçatuba – SP

2017

Priscila Toninatto Alves de Toledo

Avaliação *in vitro* da obliteração de túbulos dentinários utilizando dentifrícios contendo 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”.

Orientadora: Profa. Adj. Denise Pedrini Ostini

Coorientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP

2017

Dedicatória

Aos meus pais, irmão, avós, tios e amigos, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Agradecimentos

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, que, nos anos de convivência, muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, e em especial aos professores Denise Pedrini Ostini e Alberto Carlos Botazzo Delbem pela atenção e orientação durante o processo de execução do trabalho.

À Carla Oliveira Favretto, juntamente com a professora Denise Pedrini Ostini, que me orientou durante todo o trabalho com total atenção, respeito, carinho e disponibilidade.

Aos meus amigos da turma 59, e em especial à Ana Flavia Hordones, Marynara Fraga, Mariana Bis, Gabriella Costa, Rayran Orchiucci, Amaly Gonfiantini, Vinicius Fernandes, Francynne Castro, Mariana Saad e aos estagiários e pós graduandos da disciplina de Odontopediatria por todo apoio e suporte no desenvolver do projeto e principalmente na amizade criada nesse período.

À minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando em cada escolha que fiz em minha vida, me incentivando e mostrando que tudo é possível quando você faz algo com amor, carinho e dedicação.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação. Além de me desenvolver e evoluir como pessoa dentro dessa instituição.

**Happiness is only real, when shared.
Into the Wild.**

TOLEDO, P.T.A. **Avaliação *in vitro* da obliteração de túbulos dentinários utilizando dentifrícios contendo trimetafosfato de sódio.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação do trimetafosfato de sódio microparticulado (TMPm) ou nanoparticulado (TMPn) associado ao fluoreto (F) em formulações dentifrícias na obliteração dos túbulos dentinários (TD). Blocos de dentina radicular bovina (4x4x2 mm) foram planejados e os TD desobliterados com solução de ácido fosfórico a 37%. Blocos (n=20/grupo) foram submetidos à escovação mecânica (2x/dia) durante 7 dias com dentifrícios: placebo (sem F e sem TMP), 1100 ppm F (1100), 1100 ppm F associado a 3% TMPm (1100 TMPm), 1100 ppm F associado a 3% TMPn (1100 TMPn). Ao final dos tratamentos, metade dos blocos foram imersos em ácido cítrico (pH 3,2), durante 1 minuto. O número, diâmetro e área de TD desobstruídos foram quantificados utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a porcentagem (%) atômica dos elementos químicos (Ca, P, C, N e O) dos precipitados presentes nos TD foi determinada por energia dispersiva de raios-X. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (2-critérios) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Dentifrícios contendo TMPm e TMPn produziram maior obliteração dos TD ($p < 0,05$). Foi observado uma proporção de Ca/P maior nos grupos tratados com TMP, já com o desafio ácido reduziu a relação Ca/P para todos os grupos. A % atômica de C e N foi significativamente menor para os dentifrícios com TMP, aumentando essa porcentagem após o desafio ácido. Concluiu-se que a adição de TMP a dentifrícios contendo 1100 ppm F produziu uma obliteração significativamente maior dos túbulos dentinários quando comparada ao dentifrício 1100 e o tamanho das partículas de TMP (micro ou nano) não teve efeito sobre a obliteração dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: Dentina, Dentifrícios, Fosfatos, Nanopartículas.

TOLEDO, P.T.A. **Evaluation of obliteration of the dentinal tubules using toothpastes containing sodium trimetaphosphate.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

The objective of this study was to evaluate *in vitro* the effect of TMP microparticles (TMPm) or nanoparticles (TMPn) associated with fluoride (F) in toothpaste formulations on the obliteration of dentinal tubules (DT). Bovine root dentin blocks (4x4x2 mm) were ground flat and the DT were unobstructed by phosphoric acid 37%. Blocks (n=20/group) were submitted to mechanical brushing (2x/day) during 7 days with toothpastes: placebo (without F and TMP), 1100 ppm F (1100), 1100 ppm F associated with 3% TMPm (1100 TMPm), 1100 ppm F associated with 3% TMPn (1100 TMPn). After that, half of the blocks were immersed in citric acid (pH 3.2) for 1 minute. The number, diameter and area of unobstructed DT were quantified using scanning electron microscopy (SEM) and atomic percentage (%) of chemical elements (Ca, P, C, N and O) from precipitates in DT were determined by energy-dispersive X-ray. Data were submitted to 2-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Toothpastes containing TMPm and TMPn produced greater obliteration of DT ($p < 0.05$). Higher Ca/P ratios were observed in the groups treated with TMP, whereas the acid challenge reduced the Ca/P ratio for all groups. The atomic % of C and N was significantly lower for TMP toothpastes, increasing this percentage after the acid challenge. It was concluded that the addition of TMP to toothpastes containing 1100 ppm F produced significantly greater obliteration of the dentinal tubules when compared to 1100 ppm F toothpaste and the size of particles of TMP (micro or nano) had no effect on the obliteration of dentinal tubules.

Keywords: Dentin, Dentifrices, Phosphates, Nanoparticles.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1	A – Preparo dos blocos de dentina; B – Remoção da smear layer; C – Grupos experimentais; D – fase de tratamento; E – Blocos de dentina submetidos às análises; F – Blocos de dentina submetidos ao desafio ácido antes das análises; G – Blocos controle para análises; H – Análises.	15
Figura 2	Fotomicrografias da superfície de dentina dos grupos após tratamento (3.000 x de aumento). Placebo: sem ácido (A) e ácido (B). 1100: sem ácido (C) e ácido (D). 1100 TMPm: sem ácido (E) e ácido (F). 1100 TMPn: sem ácido (G) e ácido (H). Controle: (I).	18
Tabela 1	Médias (DP) da área (μm^2), diâmetro (μm) e número (mm^2) de túbulos dentinários calculados a partir das imagens da MEV de acordo com o grupo e desafio	19
Tabela 2	Valores médios (DP) de % atômica do elemento químico de acordo com o tratamento e desafio	20

Sumário

1	Introdução	10
2	Objetivo	11
3	Metodologia	11
4	Resultados	16
5	Discussão	20
6	Conclusão	22
7	Referências	22

1- Introdução

A hipersensibilidade dentinária é um problema que atinge atualmente grande parte da população. Além de causar desconforto bucal, gera uma série de inconvenientes na vida psicossocial do indivíduo, levando-o a restrições alimentares. Trata-se de uma dor aguda de curta duração quando os túbulos dentinários são expostos ao meio bucal (Liu et al., 1998; Rees et al., 2003). A prevalência de hipersensibilidade dentinária tem sido relatada em 42% da população de 18 a 35 anos de idade (West et al., 2013). Combinações de fatores de origem térmica, química ou mecânica como: tratamentos periodontais, ingestão de alimentos e bebidas ácidas, hábito agressivo de escovação dos dentes, recessão gengival, doenças sistêmicas e desordens de oclusão, podem levar ao aparecimento da hipersensibilidade dentinária (Swift Jr et al., 2001).

Atualmente, a hipersensibilidade dentinária pode ser tratada com dentifrícios, vernizes, adesivos dentários, uso de laser, restaurações, cirurgias gengivais e até tratamento endodôntico (West et al., 2015). O uso caseiro de produtos dessensibilizantes para o tratamento da hipersensibilidade está disponível no mercado. Dentre estes, os dentifrícios têm sido amplamente indicados, principalmente por serem de baixo custo e de fácil uso (Arrais et al., 2003). Estes produtos podem ser divididos em duas categorias: produtos que bloqueiam a resposta das fibras sensitivas da polpa e produtos que obliteram os túbulos dentinários abertos (Addy & West, 2013). Os dentifrícios que pertencem à categoria dos agentes com ação sobre fibras sensitivas contêm em sua composição sais de potássio (cloreto, nitrato, citrato e oxalato). A maioria dos agentes adicionados aos dentifrícios tem a função de produzir obliteração dos túbulos dentinários como o estrôncio (cloreto e acetato), fluoreto estanhoso, fosfosilicato de cálcio, derivados da caseína, copolímeros (PVM/MA - éter metílico polivinil/ácido maleico), oxalatos, fluoretos, arginina e carbonato de cálcio, hidroxiapatita e vidro bioativo (West et al., 2015; Arnold et al., 2015; Farooq et al., 2015). A obliteração dos túbulos da dentina pode ocorrer de duas maneiras: pela deposição de uma camada fina na superfície da dentina e a penetração do material obliterador no interior dos túbulos da dentina (Arnold et al., 2015). Um estudo recente *in vitro* mostrou que dentifrícios contendo acetato de estrôncio, fluoreto estanhoso, arginina e carbonato de cálcio ou hidroxiapatita produziram obliteração parcial no topo dos túbulos dentinários, porém

susceptível a dissolução ácida (Arnold et al., 2015). Entretanto, os estudos clínicos mostram um efeito baixo ou moderado dos agentes acima citados em reduzir a sensibilidade dentinária (West et al., 2015).

A maioria dos dentifrícios utilizam associações de agentes dessensibilizantes com formulações complexas (West et al., 2015), necessidade de estabilizantes e custo alto do produto. A busca por agentes que apresentem ação anticárie, que reduza a erosão dentária e promova redução da permeabilidade dentinária seria importante na manufatura de dentifrícios mais simples e de baixo custo. A adição de ciclofosfatos, como o trimetafosfato de sódio (TMP), a dentifrícios fluoretados tem mostrado reduzir a desmineralização do esmalte (Takeshita et al., 2015; Danelon et al., 2015) e a erosão dentária (Moretto et al., 2010). E a redução do tamanho da partícula de TMP mostrou aumentar a capacidade de remineralização de dentifrícios com 1100 ppm F (Danelon et al., 2015). Porém, não há estudos analisando seu efeito na dentina e obliteração dos túbulos dentinários.

Diante do exposto acima, seria interessante estudar se a adição de TMP em dentifrícios apresenta capacidade de obliteração de túbulos dentinários.

2- Objetivo

O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a ação do TMP microparticulado (TMPm) ou nanoparticulado (TMPn) associado ao fluoreto (F) em formulações de dentifrícios na obliteração de túbulos dentinários. A hipótese nula foi que os dentifrícios fluoretados contendo TMP teriam uma capacidade similar de obliteração de túbulos dentinários quando comparados ao dentifrício com 1100 ppm F, e que o tamanho das partículas não influenciaria os resultados.

3- Metodologia

3.1. Preparo do TMP nanoparticulado

A moagem do TMP microparticulado (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos. O TMP foi pesado na quantidade necessária para o estudo. Bolas de zircônia foram adicionadas ao TMP em associação com isopropanol. Os frascos foram vedados e levados ao moinho de bolas sendo submetidos à moagem por 48h. Após, o mesmo foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua

separação das bolas de zircônia. O frasco contendo o TMP foi lavado com isopropanol e o material filtrado foi vedado com papel alumínio e submetido à secagem em estufa a temperatura de 85°C para evaporação do solvente (isopropanol). Após a secagem do TMP, o mesmo foi submetido à trituração até atingir partículas com diâmetro médio de 22,7 nm. A difração de raios-X foi utilizada para a identificação da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio de TMP_m e TMP_n (Danelon et al., 2015).

3.2. Preparo e determinação de fluoreto dos dentifrícios

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. O TMP microparticulado ou nanoparticulado foi adicionado na concentração de 3% ao dentifrício contendo 1100 ppm F. O F foi acrescido às formulações na forma de NaF (Merck, Darmstadt, Germany). Foram utilizados também um dentifrício placebo (sem F e sem TMP) e um com 1100 ppm F da mesma formulação que os experimentais. Para a dosagem de F utilizou-se eletrodo específico Orion 9409 BN (Orion Research Inc., Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) acoplados ao analisador de íons Orion 720 A (Orion Research Inc., Beverly, MA, USA), previamente calibrado com cinco padrões. Foram pesados 100-110 mg de dentifrício em tubos de polipropileno aos quais foi adicionada água deionizada até o volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do F total (FT), foi pipetado 0,25 mL da suspensão em tubo de ensaio de polipropileno ao qual foi acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol/L. Esta solução permaneceu sob agitação durante 1h a 45°C, após o qual foi adicionado 0,5 mL de NaOH mol/L e 1,0 mL de TISAB II (“tampão ajustador de força iônica”, Orion Research Inc.). Para a dosagem de F iônico (FI), a suspensão de dentifrício foi submetida à centrifugação (Hanil - Combi - 514 R, Incheon, South Korea) a 1.000 g durante 20 minutos. Pipetou-se 0,25 mL do sobrenadante e acrescentou-se 0,25 mL de HCl 2 mol/L, 0,5 mL de NaOH mol/L e 1,0 mL de TISAB II (Delbem et al., 2009). As concentrações médias (DP) de FT e FI (n=3) para o dentifrício placebo foram de 12,0 ppm (0,9) e 11,0 ppm (0,7), respectivamente. Para os

dentifrícios com 1100 ppm F, os valores médios (DP) entre os grupos foram de 1135,4 ppm (52,4) e 1019,1 ppm (85,9).

3.3. Preparo dos blocos de dentina

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos. Estes foram previamente esterilizados com auxílio de um micro-ondas, a 650 w, por 3 minutos (Micro-ondas Electrolux MEV41, Curitiba, PR, Brasil) (Viana et al., 2010). Blocos de dentina (4x4x2 mm) foram obtidos das raízes na região abaixo do limite amelodentinário, na face proximal, sendo um bloco por raiz. A face proximal permite a obtenção de um bloco mais plano necessário para uma boa padronização do experimento. Para isto, foram utilizados discos diamantados (Extec XL 12205 série 15 HC, Extec Corporation, Enfield, CT, USA) montados em cortadeira elétrica (Isomet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), sob refrigeração com água deionizada. Estes blocos foram fixados em bases de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (New Wax, Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com a dentina da câmara pulpar (dentina interna) voltada para cima. A seguir, esta superfície foi planificada com auxílio da politriz BETA - grinder polisher (Buehler) e de lixa de granulação 600 (Carbimet Paper Discs, 30-5108-320, Buehler), peso de 4 lbs, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração a água para obtenção de superfícies paralelas com a dentina externa. Os blocos de dentina foram removidos, fixados com a superfície da dentina externa voltada para cima e planificados com as lixas de granulações 600 e 1200, peso de 4 lbs, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração a água. Ao final do polimento, os blocos foram submetidos ao ultrassom ((Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brasil), em água deionizada durante 20 minutos. A seguir, os blocos foram imersos em solução de ácido fosfórico a 37% (Rusin et al., 2010), por 30 segundos e lavados com água deionizada por 30 segundos, para remoção da camada de smear layer em ambos os lados do bloco. Para remoção dos demais elementos celulares ou extracelulares do interior dos túbulos, os blocos foram imersos em solução de hidróxido de sódio a 10% por 12 horas, seguido de mais 12 horas de imersão em água deionizada (Ohtani, 1987; Ushiki & Ide, 1990).

3.4. Coleta da saliva

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 20419113.0.0000.5420), foi coletada saliva humana de 6 voluntários saudáveis, 1 hora após o café da manhã, que apresentaram boa saúde bucal e não estiveram fazendo uso de qualquer medicamento (Wetton et al., 2007). A saliva foi estimulada com auxílio de parafina (Parafilm® M, Sigma-Aldrich), sendo expectorada em frascos contidos em gelo (Nekrashevych & Stösser, 2003). A saliva foi centrifugada (Hanil - Combi - 514 R, Incheon, South Korea) por 20 minutos, a 4°C, rotação de 2.000 g e a seguir filtrada. O sobrenadante foi coletado para a formação da película adquirida, sendo armazenado a -80°C (Schipper et al., 2007). Essa temperatura mantém as propriedades da saliva, podendo ser normalmente utilizada quando voltar ao estado normal, na temperatura ambiente.

3.5. Grupos experimentais

Oitenta blocos de dentina foram distribuídos em 4 grupos (n=20): grupo 1 - placebo (sem F e TMP); grupo 2 - 1100 ppm F (1100); grupo 3 - 1100 ppm F + 3% TMP microparticulado (1100 TMPm) e grupo 4 - 1100 ppm F + 3% TMP nanoparticulado (1100 TMPn). Dez blocos de dentina não sofreram qualquer tratamento e serviram como controle (Figura 1G).

3.6. Fase experimental

Previamente a cada tratamento, os blocos foram imersos em saliva humana (3 mL/bloco) durante 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, os blocos foram submetidos à escovação mecânica realizada na máquina de escovação MSet (Elquip, São Carlos, SP, Brasil), com velocidade de 150 movimentos por minuto, por 2 minutos (Wang et al., 2011), carga axial de 150 g, de maneira transversal e uniforme, a 37°C, imersos em 2 mL de suspensão do dentífrico (3 mL de água deionizada: 1 g de dentífrico). Em seguida, foram lavados suavemente com água deionizada por 10 segundos para remoção dos resíduos de dentífrico. Este tratamento foi realizado 2 vezes ao dia, às 8 horas e às 17 horas (Wang et al., 2011), permanecendo imersos em saliva humana entre esses períodos. Após o 2º tratamento, os blocos permaneceram imersos durante 1 hora em saliva humana, sendo, em seguida, armazenados em saliva artificial (1,5 mol/L

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 150 mol/L KCl, 0,9 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mol/L Tris; 37°C; 3 mL/bloco) até o próximo dia, para minimizar a proliferação bacteriana e fúngica e a necessidade de grande quantidade de saliva humana. Ao final do 7º dia, metade dos blocos de cada grupo foi armazenada e a outra metade levada ao desafio ácido, sendo imersos em ácido cítrico (pH 3,2) (Hanan & Marreiro, 2009; Barac et al., 2015) por 1 minuto, sob agitação constante. Por fim, todos os blocos foram submetidos as análises.

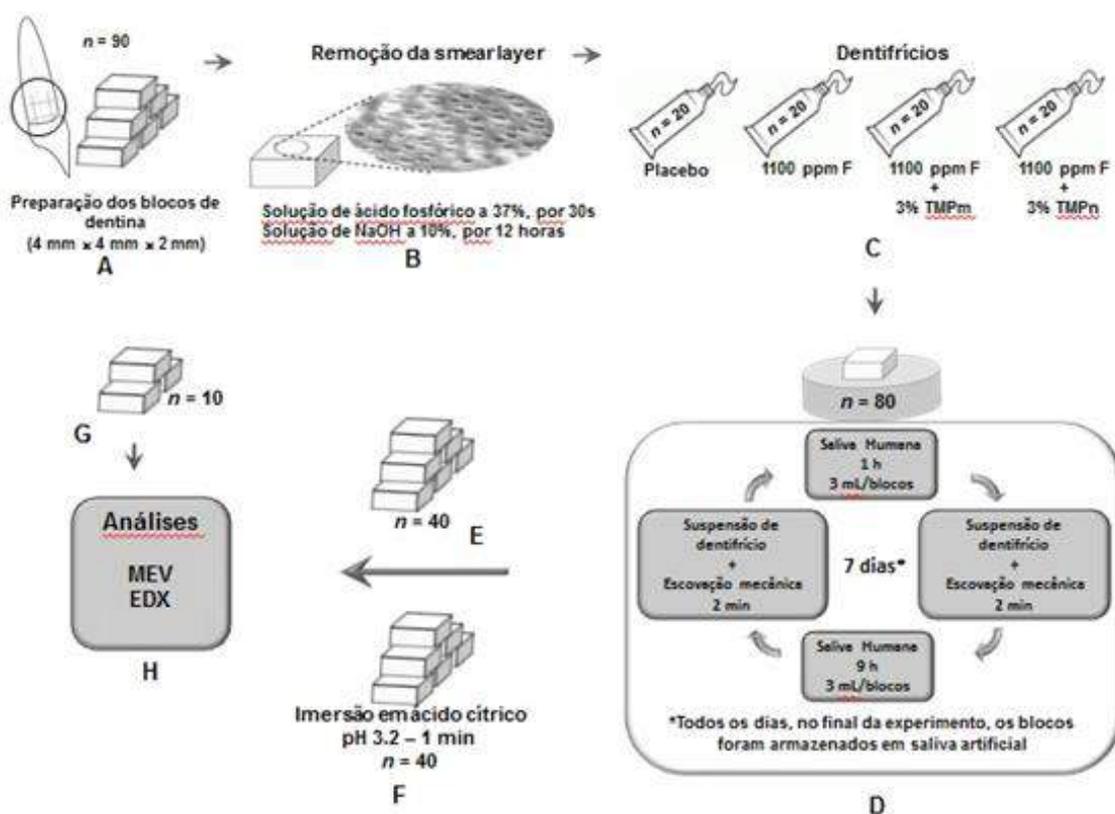


Figura 1 – A – Preparo dos blocos de dentina; B – Remoção da smear layer; C – Grupos experimentais; D – fase de tratamento; E – Blocos de dentina submetidos às análises; F – Blocos de dentina submetidos ao desafio ácido antes das análises; G – Blocos controle para análises; H – Análises.

3.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises da obliteração dos túbulos dentinários foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV). A metalização foi realizada em um aparelho Shimadzu C-50 (Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, SP,

Brasil). As imagens foram obtidas da superfície de cada bloco por meio do MEV Carl Zeiss, modelo EVO LS-15 (Carl Zeiss NTS LTD, Alemanha), no aumento de 3.000 vezes, a 20Kv, e avaliados o número de túbulos dentinários (mm^2) considerando a área total de $5.511 \mu\text{m}^2$ a partir da imagem gerada, o diâmetro dos túbulos dentinários e a área dos túbulos abertos. A análise quantitativa foi realizada com um programa de computador (ImageJ versão 1.47s, NIH, Bethesda, MD, USA). Todas as análises foram realizadas por um examinador treinado e calibrado. O coeficiente Kappa de reprodutibilidade intra e inter-examinador foi de 0,956 e 0,963, respectivamente.

3.8. Energia dispersiva de raios-X (EDX)

As amostras foram examinadas pela energia dispersiva de raios-X (Oxford Instruments, INCAx - act, 133 eV, England) a fim de determinar a presença dos elementos químicos depositados na superfície dentinária de cada bloco, os mesmos utilizados na análise por MEV. A análise quantitativa relatou a presença de carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), cálcio (Ca), titânio (Ti), potássio (K), sílica (Si) e fluoreto (F). Valores da % atômica foram considerados acima de 1% para permitir a comparação entre os grupos. Dez blocos de dentina não tratados serviram como controle para efeitos de comparação de obliteração dos túbulos e quantificação dos elementos químicos.

3.9. Análise dos resultados

Foram consideradas como variáveis: número, diâmetro e área de túbulos dentinários e % atômica dos elementos químicos. Os fatores de variação foram os dentifrícios e desafio ácido. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidas à análise de variância seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SigmaPlot versão 12.0 com limite de significância de 5%.

4- Resultados

4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV):

As imagens da MEV apresentaram túbulos dentinários abertos no grupo controle (Figura 2I), enquanto que a presença de precipitado foi observada para

os grupos tratados (Figuras 2A a 2H). O tratamento com os dentifrícios placebo e 1100 produziu uma pequena quantidade de precipitado na superfície e nos túbulos dentinários (Figuras 2A e 2C). Estes grupos apresentaram número, diâmetro e área similares de túbulos dentinários abertos ($p>0,142$). Já os grupos tratados com TMPm e TMPn (Figuras 2E e 2G), os precipitados cobriram quase que completamente a superfície dentinária, obliterando os túbulos dentinários. O número, diâmetro e área dos túbulos dentinários foram menores para os blocos tratados com dentifrícios contendo TMP ($p<0,001$) em comparação com os grupos placebo e 1100 (Tabela 1). No entanto, os resultados quantitativos foram semelhantes ($p>0,745$) entre 1100 TMPm e 1100 TMPn (Tabela 1). Após o tratamento e o desafio ácido, o padrão do precipitado foi semelhante entre os grupos não submetidos ao desafio ácido, de forma similar à observada para os dados quantitativos ($p>0,120$), exceto para o grupo TMPm, em que os túbulos dentinários tiveram número e diâmetro menores ($p=0,016$). Mesmo depois do desafio ácido uma camada de precipitados cobrindo a superfície dentinária foi visível nos grupos com TMPm e TMPn (Figuras 2F e 2H), com partículas menores principalmente no dentifrício com TMPm.

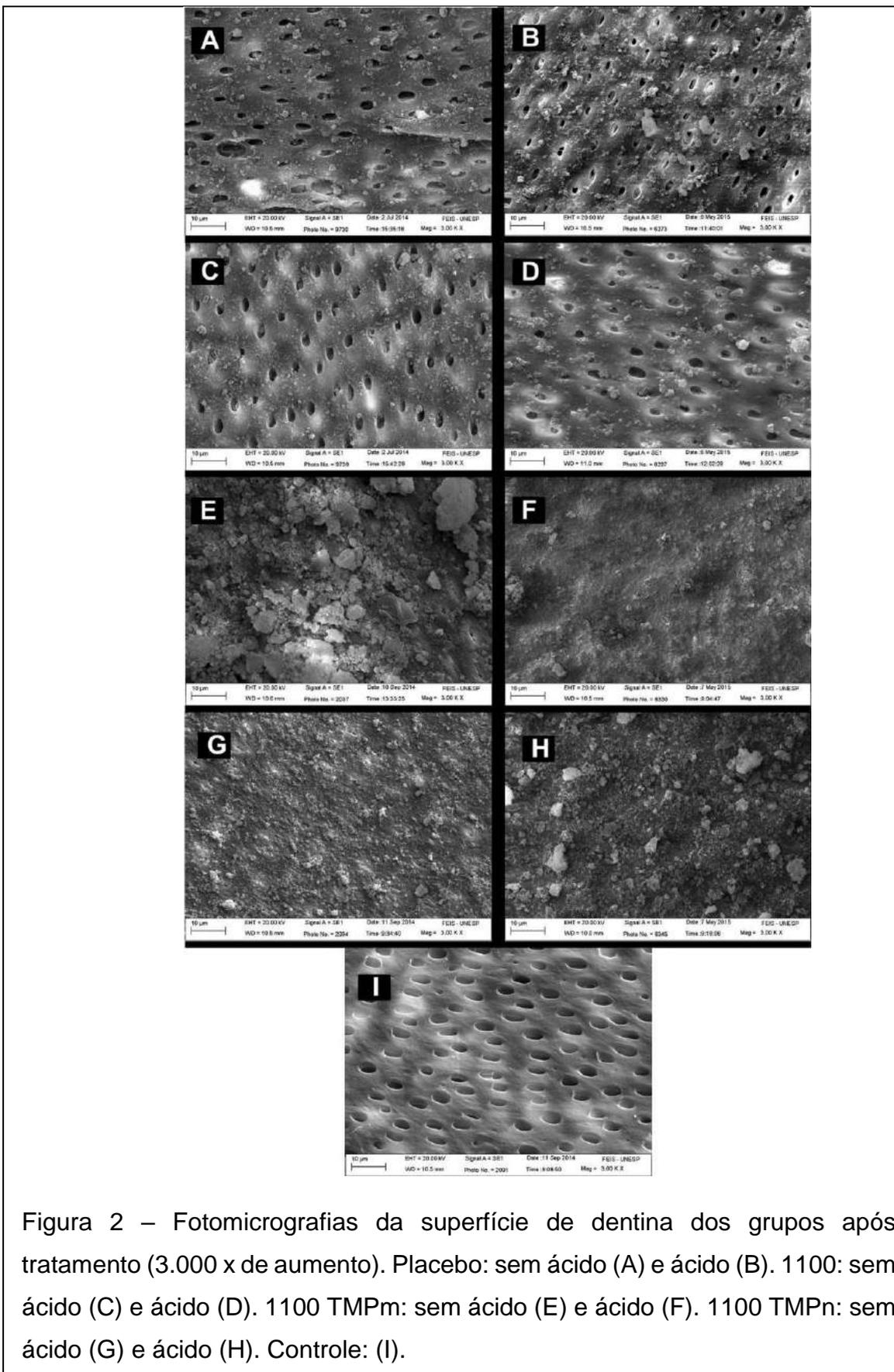


Figura 2 – Fotomicrografias da superfície de dentina dos grupos após tratamento (3.000 x de aumento). Placebo: sem ácido (A) e ácido (B). 1100: sem ácido (C) e ácido (D). 1100 TMPm: sem ácido (E) e ácido (F). 1100 TMPn: sem ácido (G) e ácido (H). Controle: (I).

Tabela 1 – Médias (DP) da área (μm^2), diâmetro (μm) e número (mm^2) de túbulos dentinários calculados a partir das imagens da MEV de acordo com o grupo e desafio

Grupos	Análises					
	Área (μm^2)		Diâmetro (μm)		n° túbulos (mm^2)	
	s/ ácido	c/ ácido	s/ ácido	c/ ácido	s/ ácido	c/ ácido
Placebo	3.221,3 ^{a,A} (897,5)	3.000,0 ^{a,A} (857,8)	2.665,0 ^{a,A} (374,9)	2.520,2 ^{a,A} (515,0)	15.004,2 ^{a,A} (2.336,1)	11.829,2 ^{a,B} (5.299,8)
1100	3.530,3 ^{a,A} (1.430,2)	3.645,4 ^{a,A} (1.631,5)	2.883,2 ^{a,A} (546,1)	2.803,1 ^{a,A} (738,4)	14.732,1 ^{a,A} (2.732,6)	14.097,1 ^{a,A} (3.680,7)
1100 TMPm	1.547,7 ^{b,A} (285,4)	916,0 ^{b,A} (790,1)	1.672,1 ^{b,A} (178,3)	987,9 ^{b,B} (859,1)	4.717,2 ^{b,A} (1.294,3)	1.796,2 ^{b,B} (2.536,3)
1100 TMPn	1.470,8 ^{b,A} (457,9)	1.202,6 ^{b,A} (1.066,2)	1.603,3 ^{b,A} (209,9)	1.164,9 ^{b,A} (1.020,9)	4.717,2 ^{b,A} (1.640,7)	2.159,0 ^{b,B} (2.722,7)
Controle	6.083,6 (2.239,0)		3.440,5 (872,5)		2.131,8 (3.760,5)	

Letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos em cada análise e desafio. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças entre desafio para cada grupo em cada análise (método de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.2. Energia dispersiva de raio X (EDX):

Os elementos químicos identificados na superfície dentinária por análise EDX em quantidades significativas foram Ca, P, C, N e O (Tabela 2). Outros, como F, Si, K, Na, Ti e Mg apareceram como vestígios ($< 1\%$) e não em todas as amostras. Após o tratamento, a quantidade de Ca, P e C foi semelhante entre os grupos ($p = 0,157$). Os grupos tratados com TMP apresentaram menores valores de N ($p < 0,005$) e maior de O ($p < 0,004$) em comparação com placebo e 1100 (Tabela 2). Após o desafio ácido, as quantidades de Ca e P foram mais baixas para todos os grupos em comparação com as que não foram submetidas ao desafio ácido ($p < 0,034$). Os valores de % atômica de Ca e N foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,078$). Além disso, valores semelhantes de N foram observados para os grupos placebo e 1100, independentemente do desafio ácido ($p < 0,293$). Os grupos tratados com dentifrícios contendo TMP apresentaram valores mais elevados de N após o desafio ácido ($p < 0,001$), enquanto maior quantidade de C foi encontrada nos blocos tratados com dentifrícios contendo TMP ($p < 0,001$) quando comparados com os grupos placebo e 1100. Todos os dentifrícios fluoretados apresentaram valores

significativamente mais elevados de C ($p < 0,011$) e valores mais baixos de O ($p < 0,042$) após o desafio ácido.

Tabela 2 – Valores médios (DP) de % atômica do elemento químico de acordo com o tratamento e desafio

Elemento	Desafio	Tratamento				Controle
		Placebo	1100	1100 TMPm	1100 TMPn	
Ca	s/ ácido	15,13 ^{a,A} (6,29)	15,88 ^{a,A} (8,61)	17,58 ^{a,A} (9,32)	19,19 ^{a,A} (6,57)	11,75 (4,40)
	c/ ácido	9,65 ^{a,B} (5,01)	12,29 ^{a,B} (2,37)	12,31 ^{a,B} (3,65)	10,46 ^{a,B} (4,06)	
P	s/ ácido	10,34 ^{a,A} (2,55)	10,72 ^{a,A} (1,82)	10,47 ^{a,A} (1,78)	11,69 ^{a,A} (2,02)	7,41 (2,36)
	c/ ácido	7,96 ^{a,B} (2,44)	8,31 ^{a,B} (1,49)	8,08 ^{a,B} (3,31)	6,65 ^{b,B} (3,16)	
C	s/ ácido	31,10 ^{a,A} (10,37)	27,18 ^{a,A} (7,64)	26,41 ^{a,A} (3,53)	26,03 ^{a,A} (1,33)	62,65 (3,15)
	c/ ácido	35,14 ^{a,A} (7,34)	34,26 ^{a,B} (7,02)	48,33 ^{b,B} (10,65)	51,37 ^{b,B} (3,16)	
N	s/ ácido	8,46 ^{a,A} (5,25)	10,87 ^{a,A} (5,70)	4,16 ^{b,A} (2,68)	3,36 ^{b,A} (2,04)	12,13 (1,59)
	c/ ácido	9,76 ^{a,A} (3,19)	10,54 ^{a,A} (2,59)	13,45 ^{a,B} (3,17)	13,15 ^{a,B} (2,46)	
O	s/ ácido	22,40 ^{a,A} (14,38)	32,67 ^{b,A} (13,38)	44,01 ^{c,A} (7,45)	44,93 ^{c,A} (6,37)	9,09 (2,62)
	c/ ácido	23,45 ^{a,A} (5,24)	25,41 ^{a,B} (6,98)	30,17 ^{a,b,B} (10,35)	33,57 ^{b,B} (6,24)	

Letras minúsculas distintas sobrescritas indicam diferença estatística entre os tratamentos em cada desafio. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças entre desafio para cada tratamento (método de Student-Newman-Keuls, $n = 10$, $p < 0,05$).

5- Discussão

Este estudo avaliou a capacidade de dentifícios fluoretados contendo TMP na obliteração de túbulos dentinários. Os resultados mostraram que a adição de TMP leva a uma maior obliteração dos túbulos dentinários quando comparada a dentifícios 1100. No entanto, o tamanho de partícula não influenciou o efeito do TMP. Embora os precipitados tenham sido observados na dentina para todos os tratamentos, os depósitos promovidos pelo TMP levaram a uma obliteração dentinária 56% superior a observada para o dentifício 1100.

Os precipitados foram formados essencialmente por fosfato de cálcio, uma vez que a maior % atômica de Ca, P e O foi observada para blocos tratados com

os dentifrícios quando comparado ao grupo controle (Tabela 2) (Li & Chang, 2008). Como os grupos aniônicos do TMP ($P-O^-$) podem se ligar aos grupos amino (NH_2) (Li & Chang, 2008; Leone et al., 2008) ou hidroxila (OH) (Souza et al., 2013; Delbem et al., 2014) da proteína presente no colágeno, a superfície dentinária torna-se mais aniônica e, portanto, mais propensa à ligação de cátions. Uma vez adsorvido à dentina, TMP funciona como um agente de nucleação para precipitações de fosfatos de cálcio (Li & Chang, 2008; Leone et al., 2008). Quando a dentina tratada com fluoreto e TMP é exposta a um meio rico em cálcio e fosfato (tal como saliva), há uma maior deposição de fosfato de cálcio (Tabela 1 e Figura 2).

Após o desafio ácido, a % atômica de C e N foi maior para os grupos tratados com dentifrícios com TMP. Assim, pode-se considerar que o colágeno permaneceu altamente mineralizado e os túbulos dentinários, obliterados, sugerindo uma maior interação entre partes minerais (fosfato de cálcio) e proteínas (colágeno) da dentina, como uma "fusão" de fosfato de cálcio/colágeno.

Estudo com modelos de cárie em esmalte mostrou que a redução do tamanho de partícula de TMP aumenta sua capacidade de promover a remineralização quando associada a dentifrícios com 1100 ppm F (Danelon et al., 2015), o que levou ao seu uso no presente estudo. No entanto, para a dentina, a redução do tamanho das partículas não implicou em uma maior obliteração dos túbulos dentinários. Dentina e esmalte são substratos diferentes, sendo a dentina mais reativa que o esmalte (Buzalaf et al., 2011). Além disso, a dentina apresenta mais locais de ligação de hidroxiapatita (OH) e colágeno (NH_2), o que proporciona mais possibilidades de adsorção de TMP. Deste modo, a quantidade de TMP adsorvida foi determinada pela maior reatividade da dentina do que pelo tamanho da partícula de TMP uma vez que as nanopartículas são mais reativas. No entanto, o TMP nanoparticulado induziu a precipitação de fosfato de cálcio com menor tamanho e homogeneidade (Figura 2G) em comparação com o TMP microparticulado. Isso pode influenciar a condutância hidráulica e deve ser testado em estudos futuros.

6- Conclusão

Com base nos resultados, concluiu-se que a adição de TMP a dentifrícios contendo 1100 ppm F produziu uma obliteração significativamente maior dos túbulos dentinários quando comparada ao dentifrício 1100. O tamanho das partículas de TMP (micro ou nano) não teve efeito sobre a obliteração dos túbulos dentinários.

7- Referências

- Addy M, West NX. 2013. The role of toothpaste in the aetiology and treatment of dentine hypersensitivity. *Monogr Oral Sci.* 23:75–87.
- Arnold WH, Prange M, Naumova EA. 2015. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *J Dent.* 43:440–449.
- Arrais CA, Micheloni CD, Giannini M, Chan DC. 2003. Occluding effect of dentifrices on dentinal tubules. *J Dent.* 31:577–584.
- Barac RJ, Gasic J, Trutic N, Sunaric S, Popovic J, Djekic P, Radenkovic G, Mitic A. 2015. Erosive effect of different soft drinks on enamel surface in vitro: application of stylus profilometry. *Med Princ Pract.* 24:451–457.
- Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. 2011. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 22:97–114.
- Danelon M, Pessan JP, Neto FN, Camargo ER, Delbem AC. 2015. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent.* 43:806–813.
- Delbem AC, Sasaki KT, Vieira AE, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, Cannon ML, Xiao X, De Carlo F, Delbem AC. 2009. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. *Caries Res.* 43:359–365.
- Delbem ACB, Souza JAS, Zaze ACSF, Takeshita EM, Sasaki KT, Moraes JCS. 2014. Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Braz Dent J* 25:479–484.
- Farooq I, Moheet IA, Alshwaimi E. 2015. In vitro dentin tubule occlusion and remineralization competence of various toothpastes. *Arch Oral Biol.* 60:1246–1253.

- Hanan SA, Marreiro RO. 2009. Evaluation of the pH of soft drinks, juices and dairy beverages produced in the city of Manaus/AM, Brazil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 9:347–353.
- Leone G, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R. 2008. New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol.* 19:824–830.
- Li X, Chang J. 2008. Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *J Biomed Mater Res A.* 85:293–300.
- Liu HC, Lan WH, Hsieh CC. 1998. Prevalence and distribution of cervical dentin hypersensitivity in a population in Taipei, Taiwan. *J Endod.* 24:45–47.
- Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem AC, Martinhon CC. 2010. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res.* 44:135–40.
- Ohtani O. 1987. Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas: a scanning electron microscopic study of NaOH treated-tissues. *Arch Histol Jap.* 50(5):557–566.
- Rees JS, Jin LJ, Lam S, Kudanowska I, Vowles R. 2003. The prevalence of dentine hypersensitivity in a hospital clinic population in Hong Kong. *J Dent.* 31:453–461.
- Rusin RP, Agee K, Suchko M, Pashley DH. 2010. Effect of a new desensitizing material on human dentin permeability. *Dent Mater.* 26:600–607.
- Schipper R, Loof A, De Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. 2007. SELDI-TOFMS of saliva: methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B.* 847:45–53.
- Souza JAS, Amaral JG, Moraes JCS, Sasaki KT, Delbem ABC. 2013. Effect of sodium trimetaphosphate on hydroxyapatite solubility: an in vitro study. *Braz Dent J.* 24:235–240.
- Swift Jr EJ, May Jr KN, Mitchell S. 2001. Clinical evaluation of Prime & Bond 2.1 for treating cervical dentine hypersensitivity. *Am J Dent.* 14:13–16.
- Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. 2015. Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 49:394–400.

- Ushiki T, Ide C. 1990. Three-dimensional organization of the collagen fibrils in the rat sciatic nerve as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 260(10):175–184.
- Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. 2010. Microwave irradiation disinfection of bovine enamel. *Caries Res.* 44:349–357.
- Wang Z, Jiang T, Sauro S, Pashley DH, Toledano M, Osorio R, Liang S, Xing W, Sa Y, Wang Y. 2011. The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: an in vitro study. *Aust Dent J.* 56:372–381.
- West NX, Lussi A, Seong J, Hellwig E. 2013. Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and a etiology of exposed cervical dentin. *Clin Oral Invest.* 17:9–19.
- West NX, Seong J, Davies M. 2015. Management of dentine hypersensitivity: efficacy of professionally and self-administered agents. *J Clin Periodontol.* 42:S256–S302.
- Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M. 2007. The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries Res.* 41:423–426.