



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

Campus de Araçatuba

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Francyenne Maira Castro Gonçalves

**Efeito da adição de hexametáfosfato de sódio
em um gel com reduzida concentração de
fluoreto na remineralização do esmalte
dentário: estudo *in vitro***

Araçatuba-SP

2017

Francyenne Maira Castro Gonçalves

**Efeito da adição de hexametáfosfato de sódio
em um gel com reduzida concentração de
fluoreto na remineralização do esmalte
dentário: estudo *in vitro***

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

Orientador: Prof. Titular. Alberto
Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba-SP

2017

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Regivânia Castro Gonçalves e Anderson Gambassi

Gonçalves, que não mediram esforços para que eu pudesse realizar o meu sonho, que se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e ter uma boa formação profissional. Devo tudo a vocês, se cheguei até aqui foi porque vocês vieram segurando a minha mão, me doando amor e confiança na certeza de que todos os esforços valeriam a pena no final. Minha eterna gratidão e todo o meu amor as duas pessoas mais importantes da minha vida, palavras são poucas para expressar a gratidão que eu tenho por vocês.

Agradecimentos Especiais

À Deus,

Que iluminou meu caminho e minha vida nesta jornada, que me deu saúde e força para superar as dificuldades, sem ele nada seria possível.

Às minhas irmãs Chayenne, Lohayne, Rayenne,

A vocês eu agradeço por sempre serem meu apoio e fortaleza, obrigada pelo companheirismo, as alegrias, as puxadas de orelha e a irmandade, se cheguei até aqui é porque sempre tive em

vocês o apoio para continuar e acreditar, e com a certeza de que essa vitória não é só minha e sim nossa, pois sem vocês nada disso faria sentido algum. Em especial a você Chay, que além de uma irmã maravilhosa, é com certeza aquela melhor amiga que sempre estava ali pronta para me ajudar, aconselhar, socorrer e apoiar, essa vitória é nossa. Eu amo vocês.

Ao meu namorado Gustavo,

Ninguém se faz sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. E você me proporcionou tudo isso. Obrigada por compartilhar todos esses anos comigo, por estar ao meu lado em todos os momentos, por fazer do meu sonho, nosso sonho. Essa conquista também é sua, que não poupou esforços para que o sorriso que hoje tenho no rosto fosse possível, que nos dias de fracasso secou minhas lágrimas e me incentivou a continuar. Obrigada por ser minha fortaleza e pelo amor dedicado a mim.

A minha amiga e professora Marcelle Danelon,

Ao celebrar o final desta longa caminhada, quero prestar minha homenagem a você, que além de orientadora se tornou uma grande amiga. Que brilhantemente compartilhou sua experiência e seu saber. Que se dedicou a transmitir-me uma das maiores virtudes que se pode ter: o conhecimento. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos colaboraram para que eu fosse além dos meus medos e limites. A você mestre, que me ensinou a aprender, a refletir, a pesquisar, a decidir e

interrogar...mostrou-me um caminho que não tem fim, meu muito obrigada.

A banca examinadora,

Agradeço a vocês por se disporem a estar presente neste dia que conclui uma grande jornada. A vocês meu muito obrigada pelas dicas, correções, indicações e considerações que guiaram a confecção final deste trabalho. Foi uma honra e um prazer imenso dividir essa caminhada com vocês.

Aos meus amigos,

Gabriel

Um grande amigo que quero levar para sempre, meu parceiro de materiais, minha dupla desde o começo, a gente se entende, se ajuda e principalmente sempre torcemos para que o melhor sempre aconteça com o outro. Eu te desejo todo o sucesso que esse mundo possa te oferecer. Obrigada pela amizade sincera Gabis, conte sempre comigo.

Malena

Falar da nossa amizade chega a ser difícil pra mim, pois desde o começo você foi aquela melhor amiga, sempre disposta a me ouvir, ajudar, cooperar, sempre do meu lado em todos esses quase 5 anos de faculdade e como a sua amizade foi importante para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Te agradeço amiga por todo o companheirismo que temos, quero que saiba

que eu torço muito por você e pelo seu sucesso, vou sempre estar aqui para o que precisar. Amo você.

Sara

O seu esforço e dedicação para realizar o que ama fizeram com que eu te admirasse muito, e a minha admiração só aumentou depois que eu vi a pessoa especial, amiga e parceira que é, obrigada Sarinha pela amizade, pelas noites de estudo, pelas "jantinhas" em sua casa e por todas as vezes em que me ajudou e pode ter certeza que não foram poucas. O seu sucesso já é certo, pois você merece muito. Amo você.

Mariana Martins

A amizade que surgiu de uma carona e com o tempo se tornou tão importante quanto todas as outras, você é aquele tipo de pessoa que sempre estava ali para o que eu precisasse, com você as risadas e brincadeiras eram sempre certas, obrigada por ser sincera, por ouvir, aconselhar e ajudar. Eu sempre vou ficar torcendo para que seus sonhos e desejos se realizem e que você continue sendo essa menina feliz, que espalha sorrisos por onde passa. Amo você.

Anna Clara, Aniele, Beatriz, Pedro, Sandy, Tairine, Tamires, Thais

Nossos caminhos se cruzaram diante de um ideal em comum e aqui estamos. Lutamos e vencemos, dividimos medos, incertezas e inseguranças. Somamos entusiasmo, forças e alegrias. Nos tornamos uma família. Agradeço pelo companheirismo nesses 5

anos e por terem sido tantas vezes meu apoio e o incentivo a continuar. Ficam o amor e a saudade.

A todos os meus familiares e amigos,

Que sempre pude contar nesses 5 anos, sendo também grandes responsáveis por tornar este meu sonho realidade. Amo vocês.

A turma 59 de Odontologia,

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

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

Aos Pacientes,

Diante da minha inexperiência, vocês se mostraram pacientes e compreensivos. A vocês que me aceitaram sem terem me escolhido, que assistiram com tanta paciência os meus primeiros passos e que com um singelo sorriso demonstraram tamanha satisfação perante meu trabalho, fazendo me sentir vitoriosa e orgulhosa por ter aprendido a lição. Obrigada a vocês, meus pacientes, graças a todos deixo de ser acadêmica e passo a ser uma profissional da odontologia!

Ao Frigorífico Friboi,

Que permitiu a coleta dos dentes bovinos.

A todos os professores,

Pelos ensinamentos que foram ministrados e pela dedicação,
contribuindo para minha formação profissional.

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

Minha eterna gratidão.

Epígrafe

“Se fracassar, ao menos que fracasse ousando grandes feitos, de modo que a sua postura não seja nunca a dessas almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota.”

Theodore Roosevelt.

Gonçalves, F.M.C. Efeito da adição de hexametáfosfato de sódio em um gel com reduzida concentração de fluoreto na remineralização do esmalte dentário: estudo *in vitro*. 2017. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Proposição: Avaliar *in vitro* a capacidade de um gel tópico de pH neutro com reduzida concentração de fluoreto e suplementado ou não com hexametáfosfato de sódio (HMP) na remineralização do esmalte dental, usando um modelo de ciclagem de pH. Materiais e Métodos: Blocos de esmalte bovino (n = 120) foram selecionados através da dureza da superfície (SH) e submetidos a desmineralização durante 16 horas. A seguir, SH pós-desmineralização (SH₁) foi determinada e dividido em cinco grupos de tratamento (n = 24): 1) Gel sem F/HMP (Placebo); 2) Gel 4,500 µg F/g (4500), 3) Gel 4,500 µg F/g associado a 9% HMP (4500 9%HMP); 4) Gel 9,000 µg F/g (9000) e 5) Gel 12,300 µg F/g (Gel ácido). Os blocos foram submetidos a seis ciclagens de pH (soluções de desmineralização/remineralização) a 37 °C. Posteriormente, foi avaliada a SH pós-remineralização (SH₂), porcentagem de recuperação de SH (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN), e as concentrações de fluoreto de cálcio (CaF₂) e fluoreto (FA) formado e retido no esmalte foram determinadas. Os resultados foram submetidos a ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls (p < 0,001). Resultados: O grupo 4500 9%HMP apresentou os maiores valores de SH₂ e %SH_R quando

comparado aos demais grupos ($p < 0,001$). Os grupos 4500 9%HMP e Gel ácido apresentaram resultados similares e a menor perda mineral (ΔKHN) ($p > 0,001$). O grupo Gel ácido apresentou alta concentração de CaF_2 e FA formado e retido no esmalte ($p < 0,001$). Conclusão: A adição de 9%HMP a um gel de baixa concentração de fluoreto foi capaz de promover a remineralização de lesões artificiais de cárie neste estudo *in vitro*.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoreto, Fosfato, Remineralização, Gel.

Abstract

Gonçalves, F.M.C. Effect of addition of sodium hexametaphosphate on a gel with reduced fluoride concentration in the remineralization of dental enamel: *in vitro* study. 2017. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Proposition: To evaluate *in vitro*, the ability of a neutral pH topical gel with reduced fluoride concentration and supplemented or not with sodium hexametaphosphate (HMP) on the remineralization of dental enamel, using a pH-cycling model. Materials and methods: Bovine enamel blocks (n = 120) were selected through surface hardness (SH) and subjected to demineralization for 16 hours. Thus, SH after demineralization (SH₁) was determined, and divided into five treatment groups (n = 24): 1) Gel without F/HMP (Placebo); 2) Gel 4.500 µg F/g (4500), 3) Gel 4.500 µg F/g associated 9% HMP (4500, 9%HMP); 4) Gel 9.000 µg F/g (9000); and 5) Gel 12.300 µg F/g (Acid gel). The blocks were subjected to six pH cycles (demineralizing/remineralizing solutions) at 37°C. Subsequently, after remineralization SH (SH₂), percentage of SH recovery (%SH_R), and integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN) were assessed, and the concentrations of calcium fluoride (CaF₂) and fluoride (FA) formed and retained were determined. The results were subjected to ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (p < 0.001). Results: The 4500 9%HMP group showed higher SH₂ and %SH_R values when compared to the other groups (p < 0.001). The 4500 9%HMP and Acid gel groups showed similar results and the lowest mineral loss (ΔKHN) (p > 0.001). The Acid gel group presented the highest CaF₂ and FA formed and retained concentration in enamel (p <

0.001). Conclusion: The 9% HMP addition to a low-fluoride gel concentration was able to promote the remineralization of artificial caries lesions in this *in vitro* study.

Keywords: Dental enamel; Fluoride; Phosphates; Remineralization; Gel.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 1. Valores de fluoreto iônico (FI) e pH (média ± dp, n= 2) de acordo com os grupos de tratamentos	29
Tabela 2	Valores de dureza de superfície pós-remineralização (SH₂), porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R) e perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) (média ± dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos	30
Tabela 3	Valores de fluoreto de cálcio (CaF₂) formado e retido no esmalte (média ± dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos	31
Tabela 4	Valores de fluoreto (FA) formado e retido no esmalte (média ± dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos	32

Lista de abreviaturas

°C Graus Celsius

Ca Cálcio

Ca⁺⁺ Íon cálcio

CaF⁺ Íon Fluoreto de cálcio

CaHPO₄⁰ Fosfato hidrogenado de cálcio neutro

CaF₂ Fluoreto de Cálcio

dp Desvio padrão

F Fluoreto

FA Fluoreto no esmalte

FI Fluoreto iônico

FT Fluoreto total

g Grama

h Hora

HA Hidroxiapatita

HCl Ácido clorídrico

HF⁰ Fluoreto de hidrogênio neutro

HMP Hexametafosfato de sódio

KCl Cloreto de potássio

KHN Unidade de dureza Knoop

KOH Hidróxido de Potássio

L Litro

M Molar

mg Miligrama

mL Mililitro

mL/mm² Mililitro por milímetro ao quadrado

mm Milímetro

mm² Milímetro quadrado

mol/L Mol por litro

mmol/L Milimol por litro

mV Milivolts

n Número de amostra

Na⁺ Íon sódio

NaF Fluoreto de sódio

NaOH Hidróxido de Sódio

P Fósforo

Pi Fósforo inorgânico

pH Potencial de Hidrogênio

PO⁴⁻ Íon fosfato

s Segundo

SH Dureza de superfície

SH₁ Dureza de superfície pós-desmineralização

SH₂ Dureza de superfície pós-remineralização

%SH_R Porcentagem de recuperação de dureza de superfície

TISAB Tampão ajustador de força iônica total

µg Micrograma

µg/mm³ Micrograma por milímetro cúbico

µg F/mL Micrograma de fluoreto por mililitro

µm Micrômetro

Sumário

1. Introdução	17
2. Proposição.....	21
3. Metodologia	21
3.1 Delineamentos Experimental.....	21
3.2 Preparação dos Blocos de Esmalte	22
3.3 Formulação, Dosagem de F e pH nos Géis Experimentais	23
3.4 Indução das lesões de cárie artificial nos blocos de esmalte	24
3.5 Ciclagem de pH (RE>DES).....	25
3.6 Determinação da dureza do esmalte.....	25
3.7 Análise da concentração de fluoreto de cálcio (CaF₂) no esmalte	26
3.8 Análise da concentração de fluoreto (FA) no esmalte	27
3.9 Análise estatística	28
4. Resultados.....	28
5. Discussão	33
6. Conclusão	37
7. Agradecimentos	37
8. Referências Bibliográficas.....	39
9. Anexos	44

1. Introdução

Ao longo do século XX, o fluoreto (F) foi o principal agente utilizado na prevenção da cárie dentária em todo o mundo, sendo oferecido à população de maneiras diversas, como na água de abastecimento público, prescrição de suplementos, aplicação tópica de géis, soluções, vernizes e dentifrícios fluoretados [van Rijkom et al., 1998; Marinho et al., 2003a; Marinho et al., 2003b; Marinho et al., 2004]. Devido à introdução no mercado de vários métodos alternativos, o F alcançou comunidades onde não havia água de abastecimento fluoretada, o que é conhecido como “efeito halo” [Lima e Cury, 2001].

Vários produtos fluoretados que visam à prevenção da cárie dentária e a sua remineralização têm sido utilizados com o intuito de manter o F tópico na cavidade bucal, colaborando para uma maior formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) [Moreno, 1993; Hicks et al., 2004] favorecendo a manutenção de F constante no meio bucal. Quando o produto com alta concentração de F e, por exemplo, baixo pH é colocado em contato com a superfície dental, ocorre a dissolução das camadas mais superficiais do esmalte, e o cálcio dissolvido é precipitado sobre o dente na forma de CaF_2 , que é recoberto por cálcio, fosfato e proteínas salivares, formando uma espécie de capa protetora que retarda a solubilidade do composto, fazendo com que o mesmo opere como um agente de liberação de F [Moreno, 1993]. Consequentemente acaba intervindo na dinâmica do processo des-remineralização, e desta forma interferindo com a progressão da lesão de cárie [Ten Cate, 1990; Cury, 2001].

Entretanto os produtos fluoretados de utilização profissional, por exemplo, apresentam alta concentração de F, o que leva a uma preocupação quanto ao risco de intoxicação aguda em virtude da elevada concentração de F na cavidade bucal após a sua utilização e possibilidade de ingestão durante a aplicação pela criança. Por esta razão houve uma preocupação na busca de meios mais seguros na utilização do F, principalmente em crianças. Um dos produtos utilizados para minimizar a ingestão de F são as espumas que possuem a mesma concentração de F e o modo de aplicação dos géis. O risco de ingestão das espumas é menor devido à sua consistência e a menor quantidade necessária para a aplicação do produto. Entretanto tem como desvantagem o alto custo quando comparados aos géis.

Algumas alterações nos procedimentos da técnica da ATF também podem minimizar o risco de ingestão reduzindo o tempo de aplicação. Delbem e Cury [2002] demonstraram em um trabalho *in vitro* que não houve diferença na aplicação do gel no tempo de 1 ou 4 minutos. A indicação de “não bochechar, beber ou comer por 30 minutos após ATF” é uma recomendação que também poderia ser modificada sem alterar os benefícios promovidos pela técnica empregada. Delbem et al. [2010] mostraram que o enxágue bucal após a ATF não interferiu na ação anticárie (remineralização *in situ* de lesões artificiais de cárie) de géis e espumas fluoretadas.

Nos últimos anos os produtos que apresentam maior alteração em sua composição para o aumento da sua efetividade são os dentifrícios fluoretados. A adição de F ao dentifrício teve início na década de 60 e, embora seu amplo uso, tenha sido responsável pelo declínio na prevalência da cárie [Stookey et al., 2004], foi acompanhado por um aumento da incidência de fluorose dentária.

O aumento da eficácia do dentifrício pode ser obtido pela redução de seu pH e conseqüente aumento na formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) [Negri e Cury, 2002; Brighenti et al., 2006]. Ainda, alguns estudos demonstraram a ação anticárie dos sais de fosfato [Harris et al., 1967; Gonzalez et al., 1973; Städtler et al., 1996], sendo sua efetividade inicialmente estudada adicionando-o a alimentos. Estes fosfatos apresentam afinidade pelo esmalte reduzindo a perda mineral [Takeshita et al., 2009; Moretto et al., 2010; do Amaral et al., 2013; Zaze et al., 2013; da Camara et al., 2014]. Destes, o trimetafosfato de sódio (TMP) tem sido testado em diferentes concentrações de F e produtos mostrando reduzir a perda mineral e aumentar o processo de remineralização, pois apresentam capacidade de modificar a superfície da hidroxiapatita, através de sua adsorção [Manarelli et al., 2011; Danelon et al., 2013; Danelon et al., 2014; Favretto et al., 2013; Moretto et al., 2013]. Em estudos *in vitro* e *in situ*, Danelon et al. [2013; 2014], demonstraram que a suplementação de um gel com 4500 μg F/g à 5%TMP, promoveu semelhante efeito em reduzir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte quando comparado ao gel com 12.300 μg F/g, Gel ácido.

Um fosfato inorgânico com propriedades similares ao trimetafosfato de sódio, o hexametafosfato de sódio (HMP), é utilizado extensivamente na indústria de cerâmica como defloculante por apresentar capacidade de formar complexos com cátions e se ligar a compostos químicos com sítios catiônicos [Andreola et al., 2004; Castellini et al., 2005]. O nome "Hexametafosfato de sódio" é aplicado normalmente para polifosfatos comerciais e comumente utilizado na literatura [White et al., 2000; Wefel et al., 2002]. O HMP que se discute na presente

proposta (o fosfato cíclico) é também utilizado na indústria alimentícia como agente antimicrobiano devido sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana externa bacteriana [Vaara, 1992].

Devido ao HMP apresentar habilidade em reduzir a solubilidade do esmalte [van Dijk et al., 1980] e a associação TMP/F mostrar um grande potencial como tratamento anticárie, estudos *in vitro* e *in situ* avaliaram se haveria um sinergismo entre HMP/F em formulações dentifrícias com baixa (250 µg F/g) e concentração convencional (1100 µg F/g) de F [da Camara et al., 2014; 2015; 2016], mostrando resultados superiores em reduzir a desmineralização, bem como biofilme, quando comparados ao dentifrício de 1100 µg F/g. Os estudos mais recentes mostraram que uma proporção fosfato/fluoreto adequada deve ser objetivada para obter um maior efeito anticárie [Takeshita et al., 2009; Moretto et al., 2010; do Amaral et al., 2013; Zaze et al., 2013; Danelon et al., 2013; Favretto et al., 2013; Moretto et al., 2013; Danelon et al., 2014]. Danelon et al. [2012] em um estudo *in vitro* comprovaram que a suplementação de um gel com 4500 µg F/g à 9% HMP promoveu semelhante efeito em inibir a desmineralização do esmalte quando comparado com os géis de 9000 µg F/g de 12300 µg F/g (Gel ácido). Até o momento, nenhum estudo avaliou a eficácia do HMP cíclico a géis de baixa concentração de F sobre remineralização de lesões em esmalte. Estudos de novos géis com estas características seriam importantes para avaliar a eficácia em remineralizar lesões de cárie pré-existentes bem como reduzir o risco de intoxicação.

2. Proposição

Avaliar *in vitro* a capacidade de um gel de pH neutro com reduzida concentração de fluoreto e suplementado ou não com hexametáfosfato de sódio (HMP) sobre a remineralização do esmalte dentário, usando um modelo de ciclagem de pH.

A hipótese nula foi a de que o gel com baixa concentração de F associado ao HMP apresentaria a mesma capacidade em promover a remineralização do esmalte, quando comparado ao gel de baixa concentração de F sem HMP.

3. Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

Para a realização do estudo, blocos de esmalte (4 mm × 4 mm, n = 120) foram obtidos de dentes incisivos bovinos mantidos em solução de formol 2% pH 7,0 durante 30 dias previamente a qualquer procedimento experimental [Delbem e Cury, 2002]. Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida sequencialmente, o que permitiu a seleção por meio da determinação da dureza de superfície (SH) (baseline entre 320-380 KHN). Em seguida, os blocos foram submetidos à indução de lesões de cárie artificial por 16 horas e a seguir realizou-se a análise de dureza pós-desmineralização (SH₁). O delineamento experimental foi casualizado e os blocos foram

submetidos a 5 diferentes tratamentos com os seguintes géis, por 1 minuto (n=24): 1) Gel sem F/HMP (Placebo); 2) Gel 4,500 µg F/g (4500), 3) Gel 4,500 µg F/g associado a 9% HMP (4500 9%HMP); 4) Gel 9,000 µg F/g (9000) e 5) Gel 12,300 µg F/g (Gel ácido). Os géis foram aplicados uma única vez, por um período de 1 minuto. A seguir foram removidos com água deionizada, e metade dos blocos (n=60) foi destinada para a determinação de fluoreto de cálcio (CaF₂) e fluoreto (FA) formado no esmalte. A outra metade dos blocos (n=60) foi submetida à 6 ciclagens de pH, à temperatura de 37°C, por 6 dias [Vieira et al., 2005]. Em seguida, determinou-se a dureza de superfície pós-remineralização (SH₂), porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN), concentração CaF₂ e FA retido no esmalte. Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de SH₂, %SH_R, ΔKHN, CaF₂, FA formado e retido no esmalte e como fator de variação o tipo de gel.

3.2 Preparação dos Blocos de Esmalte (ANEXO B)

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=120) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Cera Bastão Kerr ou Cera em Bastões Horus), com a superfície dentinária voltada para cima,

sendo este conjunto levado à politriz BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). Para o desgaste foram utilizadas lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), peso de 2 lbs, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima sendo polidos de acordo com a seguinte sequência: lixa de granulação 600, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 4 lbs, 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), em água deionizada durante 2 minutos. Na sequência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER 40-7618) e suspensão de diamante (METADI Diamond Suspension 1 micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 4 lbs, 1 minuto. A seguir, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada durante 30 segundos e submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), durante 2 minutos, imersos em solução de limpeza (ULTRAMET Sonic Cleaning Solution, BUEHLER) diluída na proporção 20:1 em água destilada. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com formol 2% pH 7,0 [Vieira et al., 2005].

3.3 *Formulação, Dosagem de F e pH nos Géis Experimentais (ANEXO C)*

Os géis experimentais foram manipulados no laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP com os seguintes componentes: carboximetilcelulose, sacarina, glicerina, óleo de menta, água deionizada. As concentrações de F foram de 4,500 µg F/g e 9,000 µg F/g (na forma

de NaF, Merck, Darmstadt, Germany) [Danelon et al., 2012; Danelon et al., 2013; Danelon et al., 2014]. Foi adicionado ao gel de 4,500 µg F/g um sal de fosfato (Hexametáfosfato de sódio – HMP, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) na concentração de 9% [Danelon et al., 2012]. Foi preparado também um gel sem F e HMP (Placebo) e utilizado um gel de pH ácido contendo 12,300 µg F/g na forma de NaF (DFL Indústria e Comércio S.A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a dosagem de F nos géis utilizou-se um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN - Orion) e analisador de íons (720A – Orion Research, USA), previamente calibrado com cinco padrões: 2, 4, 8, 16 e 32 µg F/mL. Os dados obtidos em mV foram convertidos em µg F/mL.

Em um recipiente plástico foi colocado 100-110 mg dos produtos e após dissolução em água deionizada, o conteúdo dos recipientes foi transferido para balões volumétricos completando-se o volume para 100 mL. Foram realizadas triplicatas de cada produto. Posteriormente, amostras de 1 mL em duplicata foram retiradas de cada amostra e tamponadas com TISAB II (Tampão ajustador de força iônica total) [Delbem et al., 2010]. O pH dos géis [Moretto et al., 2010] foi verificado previamente ao início do experimento.

3.4 Indução das lesões de cárie artificial nos blocos de esmalte (ANEXO D)

Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha com exceção da superfície externa de esmalte, para a indução das lesões de cárie artificial [Queiroz et al., 2008] e colocados individualmente em solução desmineralizadora (1,3 mmol/L Ca, 0,78 mmol/L P em tampão acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03 ppm F; 32 mL/bloco)

por um período de 16 h, a 37 °C. Após, determinou-se a dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁).

3.5 Ciclagem de pH (RE>DES) (Anexo E)

Os blocos foram submetidos em frascos individuais, a 6 ciclagens de pH, à temperatura de 37°C, durante 6 dias [Vieira et al., 2005]. Inicialmente os blocos foram imersos em 3 g do respectivo gel por 1 minuto [Danelon et al., 2012; Danelon et al., 2014] e a seguir lavados com água deionizada. Imediatamente, os blocos (n=60) foram imersos na solução remineralizadora (RE – Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L, em tampão cacodilato 0,02 mol/L, 0,05 µg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²) a qual foi trocada 2 vezes ao dia (8 e 16 h). Os desafios cariogênicos foram realizados com a solução DES (Ca e P 2,0 mmol/L em tampão acetato 0,075 mol/L, 0,04 µg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm²) durante 2 horas (das 12 às 14 h). Os blocos foram lavados com jatos de água deionizada por 30 segundos, após serem removidos das soluções DES-RE, sendo secos em seguida com papel absorvente [Vieira et al., 2005]. Após 6 dias de ciclagem de pH, foi determinada a dureza de superfície pós-remineralização (SH₂) para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R) de acordo com a seguinte fórmula: [%SH_R = ((SH₂ - SH₁)/(SH - SH₁)) x 100].

3.6 Determinação da dureza do esmalte (ANEXO F)

A dureza de superfície (SH) foi determinada utilizando-se o microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff,

USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 segundos. Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 μm , foram realizadas na região central de cada bloco, para a análise da dureza de superfície (SH). Após a indução de lesão de cárie outras cinco impressões foram realizadas (SH₁). Após as ciclagens de pH foram realizadas outras cinco impressões para a análise da dureza pós-remineralização (SH₂) distantes a 100 μm das impressões de SH₁ e cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R). Para a análise da dureza em secção transversal, foi realizada uma secção no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Foi utilizado microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 14 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos [Spiguel et al., 2009]. A área integrada da dureza (KHN x μm) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (Graph Pad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN).

3.7 Análise da concentração de fluoreto de cálcio (CaF₂) no esmalte (ANEXO G)

O CaF₂ foi mensurado imediatamente após a aplicação tópica dos géis experimentais (CaF₂ formado, n=60) e após a ciclagem de pH (CaF₂ retido, n=60). Os blocos foram medidos com paquímetro digital Mitutoyo CD – 15B (Mitutoyo Corp., Japão), obtendo-se a

área superficial do esmalte. A concentração CaF_2 foi mensurada seguindo a metodologia proposta por Caslavská et al. [1975]: todas as faces dos blocos foram isoladas com cera rosa, exceto a superfície de esmalte. Em seguida, eles foram imersos em 0,5 mL de solução KOH 0,5 M por 24 h, com agitação constante. Após, a solução foi neutralizada e tamponada com 0,5 mL de TISAB II pH 5,0 acrescido de HCl. A leitura das dosagens foi realizada utilizando o analisador de íons (720A – Orion Research, USA) e o eletrodo combinado íon-seletivo (9609 BN – Orion Research, USA), previamente calibrados com 05 padrões: 4; 8; 16; 32 e 64 $\mu\text{g F/mL}$. Os dados obtidos em mV foram convertidos em $\mu\text{g F/cm}^2$.

3.8 Análise da concentração de fluoreto (FA) no esmalte (ANEXO H)

Blocos (2 mm x 2 mm) foram obtidos a partir de uma das metades dos blocos (4 mm x 4 mm) seccionados no sentido longitudinal e fixados com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte de aproximadamente 50 μm foi removida [Weatherell et al., 1985; Takeshita et al., 2009]. Foi utilizado um micrômetro eletrônico digital com saída (Starrett, São Paulo – SP) acoplado a uma base de microscópio. O desgaste foi realizado com um disco de lixa autoadesiva (13 mm de diâmetro) de carbureto de sílica de granulação 400 (Buelher), fixado em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Os frascos, após a adição de 0,5 mL de HCl 1,0 mol/L⁻¹, foram mantidos sob agitação constante durante 1 h [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. Para análise de FA formado (imediatamente após a aplicação tópica dos géis experimentais) e FA retido (após a ciclagem de pH) no esmalte foi utilizado eletrodo específico 9409BN (ThermoScientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a

um analisador de íons (Orion 720A+, ThermoScientific, Beverly, MA, EUA). Os eletrodos foram previamente calibrados com padrões contendo 0,125 a 2,00 $\mu\text{g F/mL}$, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas com alíquotas de 0,3 mL da solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II modificado com NaOH. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mm}^3$.

3.9 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%. Os valores da SH_2 , $\%\text{SH}_R$, ΔKHN , CaF_2 e FA formado e retido no esmalte mostraram distribuição normal (Shapiro-Wilk test) e homogênea (Cochran test). Os dados de SH_2 , $\%\text{SH}_R$ e ΔKHN foram submetidos a Anova-1 critério, já os dados de CaF_2 e FA formado e retido no esmalte foram submetidos a Anova-2 critérios (transformação logarítmica) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, para fins comparativos.

4. Resultados

A tabela 1 mostra as concentrações de FI e pH (média (dp) $\mu\text{g/g}$; $n = 2$) de acordo com os grupos de tratamentos: Placebo: 23,7 [4,1]; 4500: 4519,2 [41,0]; 4500 9%HMP: 4514,6 [22,7]; 9000: 9487,5 [18,2] e Gel ácido: 12889,0 [15,4]. As concentrações de FI apresentaram-se dentro da faixa de variação de 10% do valor aceitável. A média de pH dos géis foi de 6,01 [0,3], variando 6,0-6,7. Para o Gel ácido a média de pH foi de 4,7 (0,3).

Tabela 1. Valores de fluoreto iônico (FI) e pH (média \pm dp, n= 2) de acordo com os grupos de tratamentos

Grupos	FI ($\mu\text{g/g}$)	pH
Placebo	23,7 (4,1)	6,7 (0,1)
4500	4519,2 (41,0)	6,4 (0,1)
4500 9%HMP	4514,6 (22,7)	6,0 (0,2)
9000	9487,5 (18,2)	6,5 (0,1)
Gel ácido	12889,0 (15,4)	4,7 (0,3)

A Tabela 2 correlaciona os valores dureza de superfície pós-remineralização (SH_2), porcentagem de recuperação de dureza de superfície ($\%\text{SH}_R$) e perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) de acordo com grupos de tratamentos. O grupo 4500 9%HMP apresentou a maior dureza final (SH_2) sendo superior em aproximadamente 32%, 10% e 12% em relação aos grupos 4500, 9000 e Gel ácido respectivamente ($p < 0,001$). Já os grupos 9000 e Gel ácido não diferiram entre si ($p = 0,976$), apresentando menor SH_2 em relação ao grupo 4500 9%HMP, mas superior ao 4500 ($p < 0,001$) (Tabela 2). A $\%\text{SH}_R$ para o grupo 4500 9%HMP foi superior em aproximadamente 18% e 22% quando comparado aos grupos 9000

e Gel ácido. Valores similares de %SH_R foram observados para os grupos 9000 e Gel ácido ($p = 0,966$), sendo superiores aos grupos Placebo e 4500 ($p < 0,001$). Os resultados de Δ KHN mostram redução da lesão em aproximadamente 21% e 45%, para os grupos 4500 e 4500 9%HMP em relação ao grupo Placebo ($p < 0,001$) e 16% quando comparado 4500 9%HMP com 9000 ($p < 0,001$). Os grupos 4500 9%HMP e Gel ácido apresentaram a maior e similar concentração mineral no corpo da lesão ($p = 0,739$).

Tabela 2: Valores de dureza de superfície pós-remineralização (SH₂), porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN) (média \pm dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos

Grupos	SH ₂ (KHN)	%SH _R (KHN)	Δ KHN (KHNx μ m)
Placebo	122,4 (3,2) ^a	18,5 (2,3) ^a	8305,0 (902,5) ^a
4500	142,2 (2,2) ^b	26,8 (3,1) ^b	6559,2 (466,8) ^b
4500 9%HMP	188,1 (1,2) ^c	41,0 (1,8) ^c	4578,3 (354,2) ^c
9000	170,7 (2,3) ^d	34,7 (3,2) ^d	5487,3 (354,2) ^d
Gel ácido	168,4 (1,1) ^d	33,4 (3,7) ^d	4684,3 (686,1) ^c

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

A tabela 3 correlaciona os valores de fluoreto de cálcio (CaF₂) formado e retido no esmalte de acordo com os grupos de

tratamentos. O grupo Gel ácido apresentou as maiores concentrações de CaF_2 formado em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), sendo aproximadamente 7 vezes superior em relação ao 9000. Para os demais grupos a concentração de CaF_2 formado foi $9000 > 4500 > 4500 \text{ 9\%HMP} > \text{Placebo}$ ($p < 0,001$). Após a ciclagem de pH, a concentração de CaF_2 retido foi menor do que o CaF_2 formado para todos os grupos ($p < 0,001$). O Gel ácido apresentou valores mais elevados de CaF_2 retido, sendo 2 e 3 vezes superior em relação ao 9000 e 4500 9%HMP ($p < 0,001$). Já os grupos 4500 e 4500 9%HMP apresentaram valores similares ($p = 0,298$).

Tabela 3: Valores de fluoreto de cálcio (CaF_2) formado e retido no esmalte (média \pm dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos

Grupos	CaF_2 Formado ($\mu\text{g F/cm}^2$)	CaF_2 Retido ($\mu\text{g F/cm}^2$)
Placebo	0,6 (0,2) ^{a,A}	0,5 (0,1) ^{a,B}
4500	19,0 (2,2) ^{b,A}	0,7 (0,2) ^{b,B}
4500 9%HMP	13,5 (2,5) ^{c,A}	0,7 (0,3) ^{b,B}
9000	24,0 (2,4) ^{d,A}	1,2 (0,4) ^{c,B}
Gel ácido	173,2 (9,5) ^{e,A}	2,1 (0,5) ^{d,B}

Letras distintas sobrescritas minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamentos em cada coluna. Letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre o CaF_2 formado e CaF_2 retido (Anova-2 critérios, Student-Newman-Keuls test, $p < 0,001$).

A tabela 4 correlaciona os valores de fluoreto (FA) formado e retido no esmalte de acordo com os grupos de tratamentos. O

grupo Gel ácido apresentou as maiores concentrações de FA formado em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), que foi de aproximadamente 1,3 e 2 vezes superior em relação ao 9000 e 4500 9%HMP ($p < 0,001$). Os grupos 4500 e 4500 9%HMP foram semelhantes entre si ($p = 0,684$). Após as ciclagens de pH, o Gel ácido apresentou os maiores valores de FA retido, sendo superior a 2,4 e 4,8 vezes em relação aos grupos 9000 e 4500 9%HMP ($p < 0,001$). Valores similares de FA retido foram observados para os grupos 4500 e 9000 ($p = 0,489$). Apenas para o grupo Placebo as concentrações de FA formado e retido foram similares ($p = 0,180$).

Tabela 4: Valores de fluoreto (FA) formado e retido no esmalte (média \pm dp, n=12) de acordo com os grupos de tratamentos

Grupos	FA Formado ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	FA Retido ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
Placebo	0,3 (0,1) ^{a,A}	0,3 (0,1) ^{a,A}
4500	0,5 (0,3) ^{b,A}	1,1 (0,3) ^{b,B}
4500 9%HMP	0,4 (0,1) ^{b,A}	0,5 (0,1) ^{c,B}
9000	0,6 (0,2) ^{c,A}	1,0 (0,6) ^{b,B}
Gel ácido	0,8 (0,3) ^{d,A}	2,4 (0,9) ^{d,B}

Letras distintas sobrescritas minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamentos em cada coluna. Letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre o FA formado e FA retido (Anova-2 critérios, Student-Newman-Keuls test, $p < 0,001$).

5. Discussão

A aplicação dos produtos fluoretados de alta concentração é recomendada à pacientes que possuem alto risco de desenvolvimento de cárie dentária. O uso desses produtos em crianças onde o complexo de expectoração, ainda não se encontra completamente desenvolvido, deve ser cuidadosamente monitorado, devido ao risco de intoxicação aguda [Ripa, 1990; Fomon et al., 2000]. Dessa forma, é importante que estudos laboratoriais sob condições controladas e padronizadas sejam realizados para avaliar o potencial anticariogênico de novas formulações de géis antes da realização um estudo *in situ* ou clínico. Os resultados deste estudo indicam que o HMP associado ao F aumentou significativamente a remineralização de lesões artificiais de cárie, assim a hipótese nula é rejeitada.

A adição de qualquer composto à um produto fluoretado não deve interferir na biodisponibilidade do F. Ainda, verificar a relação dose-resposta é um passo importante na avaliação da eficácia de qualquer suplemento adicionado ao gel, como também validar o protocolo experimental utilizado. Os resultados obtidos para os grupos Placebo, 4500, 9000 e Gel ácido mostram uma relação dose-resposta semelhante aos estudos de Danelon et al. [2012], validando o modelo de ciclagem de pH (Tabela 1 e 2).

A escolha da concentração de 9% de HMP foi baseada no estudo de Danelon et al. [2012], onde comprovaram em estudo *in vitro* que a suplementação de um gel com 4500 µg F/g à 9% HMP promoveu semelhante efeito em inibir a desmineralização do esmalte quando comparado aos géis de 9000 µg F/g de 12300 µg F/g, Gel ácido. No presente estudo, a análise da dureza pós-

remineralização (SH_2) e porcentagem de recuperação de dureza de superfície ($\%SH_R$) foi superior para o grupo 4500 9%HMP em relação aos géis padrões (9000 e Gel ácido). O HMP pode alterar a permeabilidade seletiva do esmalte interferindo em dois processos que determinam a progressão da cárie: difusão longitudinal através dos poros do esmalte devido à sua influência na seletividade iônica e de alguma forma, na dissolução dos cristais de apatita. Após sua ligação ao esmalte ocorre a formação de uma camada de fosfatos condensados alterando a permeabilidade seletiva do esmalte [van Dijk et al., 1980], e nesse caso um aumento na seletividade a cátions, favorecendo o processo de remineralização dessas lesões de subsuperfície. Ainda, na análise da perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN), os géis 4500 9%HMP e Gel ácido apresentaram-se semelhantes entre si ($p=0,729$). O efeito mais pronunciado do 4500 9%HMP em ΔKHN sugere que sob condições clínicas, uma lesão de subsuperfície levaria mais tempo para se desenvolver quando comparada a um gel convencional (9000). Isto é extremamente desejável em uma perspectiva clínica, considerando que uma cavidade poderia demorar mais tempo para ocorrer, ou até mesmo, não ocorrer quando se usa a formulação testada no presente estudo. Os bons resultados, também estão de acordo com os achados de Danelon et al. [2012], demonstrando que o gel suplementado com HMP apresenta melhores resultados em relação aos géis convencionais.

Por outro lado, o efeito anticárie dos produtos tópicos de alta concentração de F está relacionado à deposição de CaF_2 ao esmalte [Moreno, 1993; Hicks et al., 2004] que é concentração e pH dependente [Moreno, 1993]. A concentração do CaF_2 mensurada logo após a aplicação dos géis (CaF_2 formado) aumenta com a

concentração de F presente no gel, sendo o maior valor observado no grupo Gel ácido (Tabela 3), seguido pelo grupo 9000. O pH ácido também pode ter contribuído para a maior formação de CaF_2 no grupo Gel ácido (Tabela 3). O efeito de remineralização do Gel ácido (Tabela 2) foi relacionado com a alta deposição do CaF_2 (Tabela 3), cerca de 86% maior em relação ao grupo 9000. Embora o grupo 4500 9%HMP tenha apresentado a menor concentração de CaF_2 e FA formado (quando comparado aos géis fluoretados convencionais), ele resultou numa maior SH_2 e % SH_R , bem como menor lesão de subsuperfície (ΔKHN) quando comparado ao grupo 9000, mostrando que esse efeito se deva a algum processo que não está associado a deposição de CaF_2 , ou FA, uma vez que esses valores foram menores em relação ao Gel ácido e 9000, o que possivelmente leva-se a acreditar que o HMP colabore com a formação de uma camada protetora de fosfatos condensados sobre a superfície do esmalte, o que está de acordo com os achados de da Camara et al. [2014, 2015 e 2016]. Um semelhante estudo realizado por Danelon et al. [2013, 2014], avaliaram a ação de um fosfato cíclico com propriedades similares ao HMP, denominado de trimetafosfato de sódio (TMP) sobre a desmineralização e remineralização de lesões no esmalte, confirmando os achados de nosso estudo, mostrando que a associação do fosfato ao F em adequada produz um efeito significativo na redução da desmineralização do esmalte e remineralização e de lesões iniciais de cárie.

Ainda os resultados obtidos em nosso estudo podem ser explicados pelas particularidades do sal estudado. O HMP cíclico não pode ser considerado como uma fonte de fosfato que reage espontaneamente com o esmalte dentário, uma vez que não é um

composto hidrolisável [Choi et al., 1993; Castellini et al., 2005]. Esta forma de fosfato cíclico forma fortes complexos com íons metálicos [Andreola et al., 2004; Cochrane et al., 2008] no ambiente oral, que adsorve-se à superfície do esmalte e retém os íons carregados CaF^+ e Ca^{2+} através da substituição de Na^+ na estrutura cíclica, levando a uma formação [van Wazer et al., 1950] reticular através da ligação de Ca^{2+} a uma ou mais moléculas de HMP. Essa retenção torna-se ainda maior, quando o fosfato se encontra em uma proporção molar adequada em relação ao F (F/HMP), aumentando assim o efeito na remineralização, pois ambos irão agir de forma sinérgica.

Embora esta hipótese não possa ser comprovada com base no protocolo de estudo utilizado, o efeito acima mencionado pode estar relacionado com o aumento na formação de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0) durante os ciclos de desmineralização e remineralização, os quais apresentam um coeficiente maior de difusão para o esmalte em comparação com espécies carregadas [Cochrane et al., 2008]. Esses achados também foram encontrados no estudo de da Camara et al. [2015], os quais observaram em um estudo *in situ* com alto desafio cariogênico que a associação de 1% HMP à um dentifrício convencional (1100 μg F/g), levou a um aumento das espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0) no biofilme, produzindo um efeito superior em reduzir a desmineralização do esmalte quando comparado ao dentifrício convencional. É também possível que HMP retenha H^+ em sua estrutura com maior eficácia, o que também reduz a difusão de ácido no esmalte, aumentando a remineralização das lesões de cárie. Segundo van Dijk et al. [1980], os compostos que alteram a permeabilidade seletiva do esmalte podem interferir em dois processos que determinam a progressão da cárie: na difusão longitudinal através dos poros do esmalte devido à

sua influência na seletividade iônica e de alguma forma, na dissolução dos cristais de apatita.

Embora saiba-se que os modelos de ciclagem de pH são adequados para a avaliação do impacto de novos ingredientes ativos em produtos fluoretados, bem como sua associação com outros tratamentos anticárie, os protocolos *in vitro* apresentam limitações, pois não abordam o impacto da saliva/biofilme sobre a interação do HMP com o esmalte, não reproduzindo assim as condições intra-orais. Assim os resultados devem ser avaliados com cautela, preconizando modelos de estudo *in situ* de cárie e estudos clínicos para elucidar seu efeito no processo de remineralização de lesões de cárie.

6. Conclusão

Diante resultados obtidos, conclui-se que a adição de 9% HMP a um gel de baixa concentração de fluoreto foi capaz de promover a remineralização de lesões artificiais de cárie neste estudo *in vitro*.

7. Agradecimentos

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2014/20455-5)** pela concessão de recursos para a realização deste trabalho.

8. Referências Bibliográficas

1. Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
2. Andreola F, Castellini E, Manfredini T, Romagnoli M. The role of sodium hexametaphosphate in the dissolution process of kaolinite and kaolin. *J Eur Ceramic Soc* 2004;24:2113-2124.
3. Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 2006;40:239-244.
4. Caslavská V, Moreno EC, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 1975;20:333-339.
5. Castellini E, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L. Thermodynamic aspects of the adsorption of hexametaphosphate on kaolinite. *J Coll Int Sci* 2005;292:322-329.
6. Choi IK, Wen WW, Smith RW. Technical note the effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. *Miner Eng* 1993; 6:1191-1197.
7. Cochrane HJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008;42:88-97.
8. Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri, LN et al. *Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades*. São Paulo: Santos, 739p.31-68, 2001.
9. 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;42:256-262.

10. 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;43:1249-54.
11. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clin Oral Investig*. 2016 Jan 13.
12. Danelon M, Camara DM, Miyasaki ML, Scarpa JB, Delbem ACB, Sasaki KT. Effect of fluoride gels supplemented with hexametaphosphate in inhibiting demineralization. *J Dent Res* 2012;91:162761.
13. Danelon, M, Takeshita, EM, Sasaki, KT, Delbem, ACB. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent* 2013;26: 15-20.
14. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig* 2014;18:1119-1127.
15. Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* 2002;15:169-172.
16. Delbem ACB, Danelon M, Sasaki KT, Vieira AEM, Takeshita EM, Brighenti FL, Rodrigues E. Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: an in situ study. *Arch Oral Biol* 2010;55:913-918.
17. do Amaral JG, Sasaki KT, Martinhon CCR, Delbem ACB. Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization in situ. *Am J Dent* 2013;26:75-80.

18. Favretto CO, Danelon M, Castilho FCN, Vieira AEM, Delbem ACB. In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization. *Caries Res* 2013;47:532-538.
19. Fomon SJ, Ekstrand J, Ziegler EE. Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: trends in fluoride intake with special attention to infants. *J Public Health Dent* 2000;60:131-139.
20. Gonzalez M, Jeansonne BG, Feagin FF. Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. *J Dent Res* 1973;52:261-266.
21. Harris RS, Niizel AE, Walsh BN: The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 1967;46:290-294.
22. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization nad remineralization (part 3). *J Clin Pediatr Dent* 2004;28:203-214.
23. Lima YB, Cury JA. Fluoride intake by children from water and dentifrice. *Rev Saúde Pública* 2001;35:576-81.
24. Manarelli MM, Vieira AEM, Matheus AA, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. *Caries Res* 2011;45:506-509.
25. Marinho VCC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. *J Dent Educ* 2003a;67:448-458.
26. Marinho VCC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2003b;4,CD002782.
27. Marinho VCC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1, CD002781.

28. Moreno EC. Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. *Int Dent J* 1993;43:71-80.
29. 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.
30. Moretto MJ, Delbem ACB, Manarelli MM, Pessan JP, Martinhon CCR. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: An in situ/ex vivo study. *J Dent* 2013;41:1302-1306.
31. Negri HM, Cury JA. Dose-response effect of a dentifrice formulation with low fluoride concentration - an in vitro study. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16:361-365.
32. Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J* 2008;19:21-27.
33. Ripa LW. An evaluation of the use of professional (operator applied) topical fluorides. *J Dent Res* 1990;69:786-796.
34. Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res* 2009;43:302-307.
35. Städtler P. et al. The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res* 1996;30:418-422.
36. Stookey GK, Mau MS, Isaacs RL, Gonzalez-Gierbolini C, Bartizek RD, Biesbrock AR. The relative anticaries effectiveness of three fluoride-containing dentifrices in Puerto Rico. *Caries Res* 2004;38:542-550.
37. 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.
38. Ten Cate, JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de-and remineralization. *JDent Res* 1990;69:614-619.

39. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 1992;56:395-411.
40. 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.
41. van Rijkom HM, Truin GJ, van't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. *Caries Res* 1998;32:83-92.
42. van Wazer JR, Campanella DA. Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions. *Journal of the American Chemical Society* 1950;72:655-63.
43. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520.
44. Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki, H. Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
45. Wefel JS, Stanford CM, Ament DK, Hogan MM, Harless JD, Pfarrer AM, Ramsey LL, Leusch MS, Biesbrock AR. In situ evaluation of sodium hexametaphosphate-containing dentifrices. *Caries Res* 2002;36:122-128.
46. White DJ, Gerlach RW. Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical basis, mechanism, and clinical response. *J Contemp Dent Pract* 2000;15:1-19.
47. Zaze ACSF, Dias AP, Sasaki KT, Delbem ACB. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Inv* 2013;18:1619-1624.

9. Anexos

ANEXO A

SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Caries Research

Caries Research

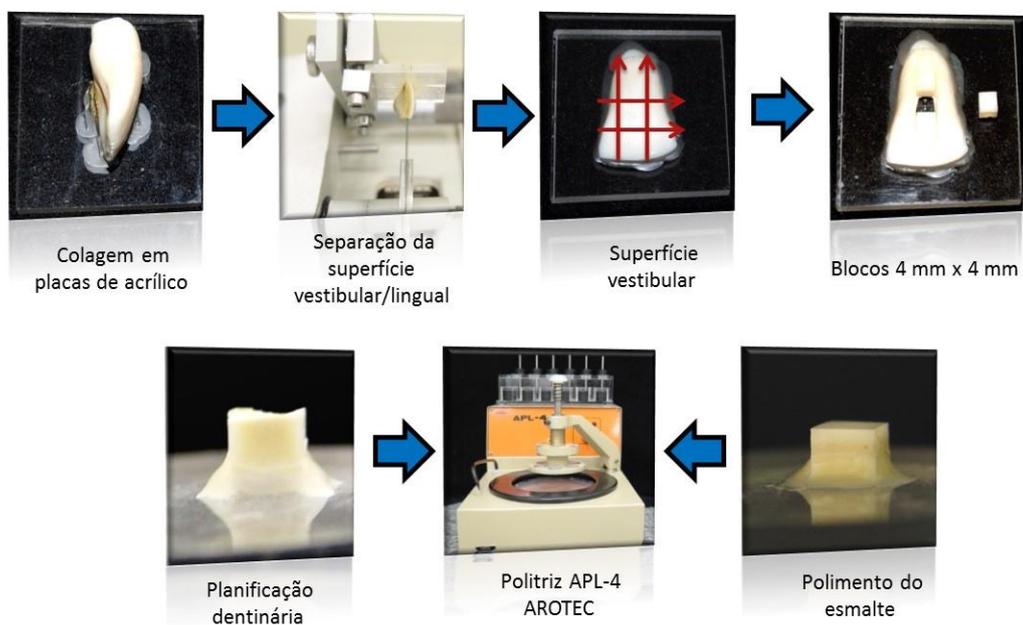
**Effect of sodium hexametaphosphate addition in fluoride gel
on tooth remineralization: An *in vitro* study**

Journal:	Caries Research
Manuscript ID	Draft
mstype:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Goncalves, Francienne Maira; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Delbem, Alberto; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Pessan, Juliano; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Nunes, Gabriel; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Garcia, Luhana; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Quintero, Liliana; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Neves, José; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health Danelon, Marcelle; Aracatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Pediatric Dentistry and Public Health
Keyword:	Remineralization, Dental enamel, Phosphates, Gel

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO B

PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

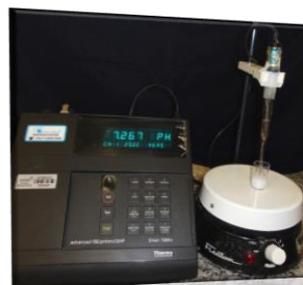


ANEXO C

DOSAGEM DE F NOS GÉIS E DETERMINAÇÃO DO pH



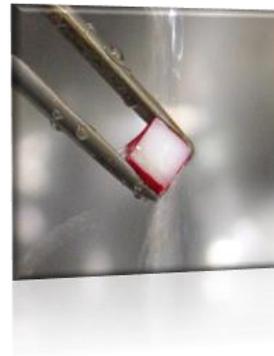
- ❖ Eletrodo específico para F; Orion 9409-BN
- ❖ Microeletrodo de referência
- ❖ Analisador de íons



- ❖ Eletrodo específico para pH
- ❖ Analisador de íons

ANEXO D**INDUÇÃO DAS LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAL**

Solução para indução de cárie artificial por 16 horas



ANEXO E

CICLAGEM DE pH (RE>DES)

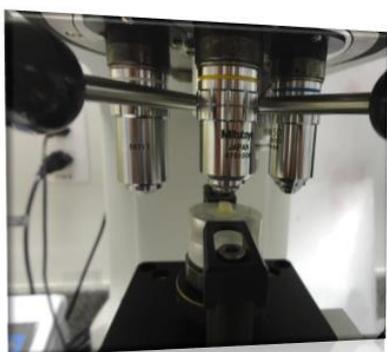


N = 60

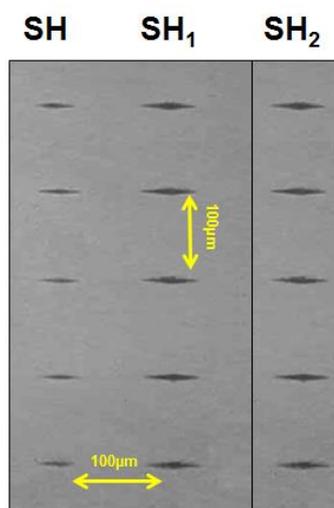


ANEXO F

DETERMINAÇÃO DA DUREZA DO ESMALTE



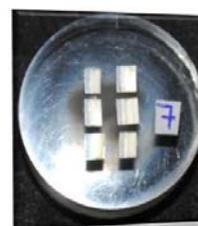
Microdurômetro Buehler
Carga 25 gramas, Tempo 10 segundos



Secção dos blocos de
esmalte no sentido
longitudinal



Embutimento dos blocos
de esmalte com resina
acrílica



Aspecto final dos blocos
de esmalte



Microdurômetro Buehler
Carga 5g; Tempo 10 segundos



Análise da Lesão em Profundidade

ANEXO G

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CaF_2 FORMADO E RETIDO NO ESMALTE

❖ Agitadora TECNAL-TE - 420



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

ANEXO H

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE F FORMADO E RETIDO NO ESMALTE



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



Desgaste 50 µm Lixa 400 (CARBIMET – BUEHLER)



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

Agitação por 1 hora

0,3 mL da amostra + 0,3 mL de Tisab II
Modificado com NaOH