



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**MATEUS XAVIER DE QUEIROZ**

**Liberção in vitro do fluoreto de diferentes formulações de  
dentifrícios como indicador de biodisponibilidade durante a  
escovação**

PIRACICABA

2020

**MATEUS XAVIER DE QUEIROZ**

**Liberação in vitro do fluoreto de diferentes formulações de dentifrícios como indicador de biodisponibilidade durante a escovação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Mateus Xavier de Queiroz e orientada pelo Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury.

PIRACICABA

2020

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Q32L Queiroz, Mateus Xavier de, 1994-  
Liberação in vitro do fluoreto de diferentes formulações de dentifrícios como indicador de biodisponibilidade durante a escovação / Mateus Xavier de Queiroz. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Jaime Aparecido Cury.  
Coorientador: Antônio Pedro Ricomini Filho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fluoretos. 2. Dentifrícios. 3. Biodisponibilidade. I. Cury, Jaime Aparecido, 1947-. II. Ricomini Filho, Antônio Pedro, 1983-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** In vitro fluoride release from different toothpastes formulations as indicator of bioavailability during toothbrushing

**Palavras-chave em inglês:**

Fluorides

Dentifrices

Bioavailability

**Área de concentração:** Cariologia

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Antônio Pedro Ricomini Filho [Coorientador]

Wander José da Silva

Pablo Guilherme Caldarelli

**Data de defesa:** 28-02-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8292-1230>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6612129402912160>

A comissão julgadora de trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de fevereiro de 2020, considerou o candidato MATEUS XAVIER DE QUEIROZ aprovado.

Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho

Prof. Dr. Wander José da Silva

Prof. Dr. Pablo Guilherme Caldarelli

A Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

Depressão e ansiedade são doenças presentes na vida de 322 e 264 milhões de pessoas no mundo, respectivamente.  
(World Health Organization – WHO, 2015)

Alunos de pós-graduação são 6 vezes mais propensos a terem depressão e ansiedade do que a população em geral.  
(Gastelum et al., 2018 – Nature Biotechnology)

Aos colegas **pós-graduandos** que enfrentam essa realidade todos os dias;

A palavra Substância vem do latim de Substantia, “essência, ser, material”, derivada de Substantis, participio passado de Substare, “estar presente, ficar firme, estar debaixo de”, formado por sub-, “abaixo”, mais stare, “estar de pé, ficar”.

Em bioquímica, a química da vida, estuda-se as substâncias presentes nos organismos vivos, como o material genético, DNA.

Aos meus pais, Marta e Reginaldo, pelo seu **substancioso** amor;

**eu dedico este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Marcelo Knobel**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

À **Profa. Dr. Karina Gonzales Silvério Ruiz**, coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dr. Michelle Franz Montan Braga Leite**, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, meu orientador, pelo privilégio de tê-lo como cerne da minha formação acadêmica no mestrado. Agradeço não somente por todo seu amplo conhecimento contribuindo para o meu amadurecimento como pesquisador, mas também para o meu amadurecimento pessoal e de caráter. Levá-lo-ei para minha vida como um modelo intelectual a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho**, por sua colaboração ativa e imprescindível para realização desta pesquisa. Adicionalmente, agradeço por sua contribuição na minha formação, a qual me deixa além de grandes aprendizados, estimáveis lembranças.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, pelo aprendizado e contribuições durante o mestrado. Agradeço pela sempre gentil atenção dispensada e pelas conversas que me ajudaram a aprender sobre determinação.

À **Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury** pela oportunidade de aprender e contar com suas contribuições durante todo o mestrado. Agradeço por todo o suporte nos momentos de dificuldades.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de mestrado (proc. nº 133173/2018-6) e suporte à pesquisa (proc. nº 435955/2018-7), a qual garantiu a realização deste trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio (Código de Financiamento 001) à pesquisa, o qual é de extrema importância para o avanço da ciência no Brasil, seja através deste trabalho ou de tantos outros pesquisadores brasileiros.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pela disposição em ajudar e amigável convivência.

Aos **Voluntários** desta pesquisa, por sua colaboração e comprometimento com as demandas do estudo, sem os quais a realização desse trabalho não seria possível.

Aos **Amigos**, por todo o suporte emocional que encontrei quando precisei ao longo dessa jornada.

A todos que contribuíram de alguma forma na minha formação e na realização deste trabalho, por todo aprendizado obtido e por fazerem parte desse verso da minha história.

## RESUMO

Dentifrício é utilizado como um veículo para liberar fluoreto na cavidade bucal durante a escovação dental e exerce um importante papel para o controle de cárie. No entanto, os dentes são escovados por um curto período de tempo, durante o qual a maior parte do fluoreto (F) deve ser liberada da formulação para permitir sua máxima eficácia. A liberação de fluoreto da formulação depende de seu comportamento reológico e deve ser avaliada como um pré-teste do seu potencial anticárie. Como não há um teste in vitro validado em termos de dados in vivo, desenvolveu-se um teste in vitro de liberação de fluoreto de dentifrícios e foi conduzido um estudo piloto in vivo para validá-lo como indicador da biodisponibilidade de fluoreto durante a escovação dental. Primeiro, um estudo piloto in vivo do tipo cruzado foi realizado em três fases. Em cada fase, os voluntários (n=3) escovaram seus dentes por 1 min com 0,7 g de um dos seguintes dentifrícios: SDB: Sorriso Dentes Brancos (MFP/CaCO<sub>3</sub>, 1.468,9 ppm FT e 1.324,5 ppm FST), T: Tandy (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1.164,6 ppm FT e 1.130,2 ppm FST) e CUF: Close-up Fresh Action (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1.494,1 ppm FT e 1.497,1 ppm FT). Todo o slurry dentifrício-saliva produzido durante a escovação foi coletado para determinação de fluoreto. O teste in vitro (n=6) avaliou quanto de fluoreto foi liberado quando 4 g de cada dentifrício colocado no fundo de um frasco e imerso em 12 ml de água foi mecanicamente agitado por 1 min à 200 rpm. O frasco foi invertido para coletar o que foi mecanicamente liberado na água. Fluoreto Total (FT) foi determinado nas alíquotas das amostras coletadas in vivo e in vitro, e Fluoreto Solúvel Total (FST) foi determinado no sobrenadante das amostras. Todas as amostras foram tratadas com HCl por 1 h a 45 °C, neutralizadas e tamponadas com TISAB II (contendo NaOH) para determinação de fluoreto com eletrodo íon-específico. As concentrações de FT e FST foram determinadas nos dentifrícios para calcular a porcentagem da quantidade de fluoreto liberada em relação à submetida nos testes in vitro e in vivo. Os dados foram expressos em porcentagem e analisados independentemente por Anova de um fator seguido por Teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ), e por Correlação de Pearson entre %F liberado in vivo vs. in vitro. As formulações apresentaram os seguintes valores (média  $\pm$  dp; letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes,  $p<0,05$ ): %FT liberado in vivo (n=3): SDB 80,1  $\pm$  2,4A; T 73,0  $\pm$  13,1AB; CUF 58,1  $\pm$  2,0B; e in vitro (n=6): SDB 71,8  $\pm$  2,0A; T 66,5  $\pm$  1,5B; CUF 54,7  $\pm$  3,1C; e %FST liberado in vivo

(n=3;): SDB  $86,8 \pm 2,2A$ ; T  $74,9 \pm 13,1AB$ ; CUF  $51,3 \pm 2,0B$ ; e in vitro (n=6): SDB  $74,9 \pm 2,0A$ ; T  $66,8 \pm 2,7B$ ; CUF  $57,0 \pm 8,9C$ . Correlação alta e estatisticamente significativa foi encontrada para %F liberado in vivo vs. in vitro para %FT ( $r=0,84$ ;  $p=0,0044$ ) e %FST ( $r=0,91$ ;  $p=0,0005$ ). Os dados sugerem que o modelo in vitro desenvolvido pode funcionar como um indicador da biodisponibilidade de fluoreto de dentifrícios durante a escovação.

Palavras-chave: Fluoretos. Dentifrícios. Biodisponibilidade.

## ABSTRACT

Toothpaste is used as a vehicle to release fluoride into the oral cavity during tooth brushing for caries control. However, the teeth are brushed during a short period of time during which most fluoride (F) should be released from the formulation to allow maximum efficacy. The release of fluoride from the formulation depends on its rheological behavior and should be evaluated as a pre-test of its anti-caries potential. As there is no in vitro test validated in terms of in vivo data, we developed an in vitro fluoride release test from toothpaste and conducted an in vivo study to validate it as an indicator of fluoride bioavailability during toothbrushing. First, an in vivo crossover study was carried out in three phases. In each phase, the volunteers (n = 3) brushed their teeth for 1 min with 0.7 g of one of the following toothpastes: SDB: Sorriso Dentes Brancos (MFP/CaCO<sub>3</sub>, 1,468.98 ppm TF and 1,324.53 ppm TSF) , T: Tandy (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1,164.68 ppm TF and 1,130.28 ppm TSF) and CUF: Close-up Fresh Action (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1,494.19 ppm TF and 1,497.05 ppm TSF). All toothpaste-saliva slurry produced during brushing was collected for fluoride determination. The in vitro test (n=6) evaluated how much fluoride was released when 4 g of each toothpaste placed in the bottom of a flask and immersed in 12 ml of water was mechanically stirred for 1 min at 200 rpm. The flask was inverted to collect what was mechanically released into water. Total Fluoride (TF) was determined in the aliquots of the samples collected in vivo and in vitro, and Total Soluble Fluoride (TSF) was determined in the sample supernatant. All samples were treated with HCl for 1 h at 45 °C, neutralized and buffered with TISAB II (containing NaOH) to determine fluoride with an ion-specific electrode. The concentrations of TF and TSF were determined in the toothpaste to calculate the percentage of the amount of fluoride released in relation to that submitted in the in vitro and in vivo tests. Data were expressed as percentage and analyzed independently by one-way Anova followed by Tukey's test ( $\alpha=5\%$ ), and by Pearson's correlation between %F released in vivo vs. in vitro. The formulations presented the following values (mean  $\pm$  SD; different letters represent statistically significant differences,  $p < 0.05$ ): %TF released in vivo (n=3): SDB 80.1  $\pm$  2.4A; T 73.0  $\pm$  13.1AB; CUF 58.1  $\pm$  2.0B; and in vitro (n=6): SDB 71.8  $\pm$  2.0A; T 66.5  $\pm$  1.5B; CUF 54.7  $\pm$  3.1C; and %TSF released in vivo (n=3): SDB 86.8  $\pm$  2.2A; T 74.9  $\pm$  13.1AB; CUF 51.3  $\pm$  2.0B; and in vitro (n=6): SDB 74.9  $\pm$  2.0A; T 66.8  $\pm$  2.7B; CUF 57.0  $\pm$  8.9C. High and significant correlation was found in vivo with the results in vitro for %TF ( $r=0.84$ ;

$p=0.0044$ ) and %TSF ( $r=0.91$ ;  $p=0.0005$ ). The data suggest that the in vitro model developed may work as an indicator of the bioavailability of toothpaste fluoride during brushing.

Keywords: Fluorides. Dentifrices. Bioavailability.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
3	PROPOSIÇÃO	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXOS	
	ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	46
	ANEXO 2 – RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE	47

## 1. INTRODUÇÃO

Dentifrício fluoretado é considerado o meio mais racional de uso de fluoreto porque, ao mesmo tempo em que o biofilme é desorganizado, o fluoreto é liberado na cavidade bucal para interferir no processo de desenvolvimento de lesões de cárie (Tenuta e Cury, 2013). O fluoreto tem um efeito físico-químico no processo de desenvolvimento de lesões de cárie, diminuindo a desmineralização e ativando a remineralização do mineral dental (Tenuta e Cury, 2013). Para ter esse efeito físico-químico, o fluoreto deve estar na sua forma solúvel e ser biodisponibilizado na cavidade bucal durante a escovação (Martínez-Mier et al., 2019).

A biodisponibilidade do fluoreto de dentifrício durante a escovação pode estar relacionada com o comportamento reológico que suas formulações apresentam. Reologia é o estudo de como os materiais se deformam e fluem sob forças externas (Naé, 1993; Pader, 1993). Os dentifrícios são fluidos que apresentam uma propriedade reológica chamada tixotropia, que além de terem a capacidade de fluir sob uma força, podem recuperar sua estrutura quando essa força é reduzida ou removida (Pader, 1993). Assim, as formulações de dentifrícios apropriadamente formuladas apresentem-se fluidas durante sua extrusão e escovação, assim como, estáveis sobre a escova dental (Pader, 1993; Corrêa et al., 2005). Especificamente em relação ao momento da escovação, a estrutura das formulações de dentifrícios deve ser quebrada durante a escovação para, assim, tornar-se fluida e biodisponibilizar seus agentes terapêuticos na cavidade bucal. Entretanto, a liberação dos agentes terapêuticos das formulações dos dentifrícios podem ser influenciadas pelo seu comportamento reológico quando se apresentam mais viscosas, dificultando a quebra da sua estrutura (Pader, 1983; Chorilli et al., 2007).

Especificamente em relação ao fluoreto como agente terapêutico anticárie, a sua liberação da formulação de um dentifrício deveria ser a máxima possível durante a escovação dental (Lippert, 2013; Duckworth, 2013). No entanto, os dentes são escovados por um curto período de tempo (Saxer et al., 1998; Albertsson e van Dijken, 2010; Nordström e Birkhed, 2017), o que poderia influenciar na completa homogeneização do dentifrício para que todo o flúor seja biodisponibilizado na cavidade bucal. Assim, a capacidade de liberação de fluoreto como o agente terapêutico anticárie

(Lippert, 2013) das formulações de dentifrícios deve ser avaliada como um dos pré-teste de seu potencial anticárie (Martínez-Mier et al., 2019).

A American Dental Association (ADA) sugere um teste in vitro (“teste de 1 min”) para avaliar o quanto de fluoreto um dentifrício libera em 1 minuto (ADA, 2005). Para este teste, uma quantidade de dentifrício é homogeneizada parte em vórtex e parte manualmente na proporção 1:3 em água por 1 min (ADA, 2005; Carey et al., 2013). Entretanto, este teste não foi validado em termos de correlação com dados in vivo da biodisponibilidade bucal de fluoreto durante a escovação (Tenuta e Cury, 2013). Adicionalmente, a falta de precisão sobre a força e a velocidade de agitação pode comprometer a reprodutibilidade das análises, o que faz necessário uma metodologia padronizada.

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um teste in vitro de liberação de fluoreto de dentifrícios e conduzir um estudo piloto in vivo para validá-lo como indicador da biodisponibilidade de fluoreto durante a escovação dental.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2 Mecanismo de ação do fluoreto de dentifrício no processo físico-químico de desenvolvimento de lesões da cárie

Dentifrício fluoretado é considerado o meio mais racional de fluoreto no controle de cárie (Tenuta e Cury, 2013) porque combina duas de suas principais funções: A constante desorganização do biofilme dental, o qual é fator necessário para o desenvolvimento da doença cárie e a constante disponibilização de flúor na sua forma iônica na cavidade bucal, sendo capaz de interferir nos fenômenos de des-mineralização na interface dente biofilme (Tenuta e Cury, 2013). Sobretudo, a eficácia do dentifrício fluoretado no controle de cárie é fortemente evidenciada por revisões sistemáticas na literatura (Marinho et al., 2003; dos Santos et al., 2013; Walsh et al., 2019).

Durante a escovação dental com dentifrícios fluoretados, o fluoreto se espalha na saliva, dentes, mucosa bucal e no biofilme remanescente, que não foi totalmente removido após a escovação (Tenuta e Cury, 2013). Embora o fluoreto disponibilizado durante a escovação aumente a concentração de fluoreto na saliva 100 vezes mais alto que os níveis basais, essa concentração diminui rapidamente devido ao clearance salivar (Duckworth e Morgan, 1991; Zamataro et al., 2008). No entanto, o fluoreto adsorvido na mucosa é lentamente liberado, mantendo uma concentração ligeiramente elevada de fluoreto na saliva por uma a duas horas após a escovação com dentifrício fluoretado (Zero et al., 1992). Zamataro et al. (2008) demonstraram essa cinética do fluoreto quando os dentes eram escovados com dentifrícios fluoretados seguido ou não de bochecho com água destilada, o que poderia diminuir a biodisponibilidade de fluoreto na saliva. Os autores observaram um aumento inicial da concentração de fluoreto na saliva 1 min após a escovação que, no entanto, dentro de 30 min diminuiu devido ao clearance salivar. Por outro lado, a concentração de fluoreto na saliva permaneceu mais alta que as concentrações basais 60 min após a escovação, mesmo após um bochecho com água destilada. Nesse sentido, maior tempo é necessário para que a concentração de fluoreto na saliva após a escovação retorne aos valores basais (Zamataro et al., 2008). Durante esse período, o fluoreto presente na saliva após a escovação com dentifrício fluoretado

tem a capacidade de ativar a remineralização de superfícies dentais previamente desmineralizadas e livres de biofilme (Cury e Tenuta, 2008).

O fluoreto, biodisponível na cavidade bucal durante a escovação, retido no biofilme remanescente é um sítio de ação considerado de grande importância, pois é o local onde o fluoreto pode interferir no processo de cárie. Quando o biofilme dental é exposto a carboidratos fermentáveis da dieta, as bactérias metabolizam esses carboidratos, produzindo ácidos. Os ácidos provocam uma queda de pH no biofilme dental que levará a dissolução do mineral dental. No entanto, mesmo quando um desafio cariogênico acontece horas após a escovação com dentifrício fluoretado, o fluoreto disponível no biofilme dental pode diminuir essa desmineralização (Paes Leme et al., 2007). Em acréscimo, quando o pH no biofilme dental retorna ao normal pela ação tamponante da saliva, se o fluoreto estiver presente no biofilme, ele pode ativar a remineralização dos minerais previamente perdidos (Cury et al., 2017). Nesse sentido, Paes Leme et al. (2007) avaliaram *in situ*, sob condições cariogênicas, o efeito do dentifrício fluoretado no biofilme dental formado sobre blocos de esmalte bovino. Durante o estudo, os voluntários escovaram os dentes com dentifrício fluoretado ou não, bem como os blocos dentais eram expostos a um slurry de dentifrício (1:3 p/v) 3x/dia. Após 14 dias, a concentração de fluoreto encontrada no biofilme dental, 10 h após a última escovação, para o grupo utilizando dentifrício fluoretado foi 30 vezes mais alta do que o grupo utilizando dentifrício placebo. Além disso, a perda mineral dos blocos dentais foi menor quando dentifrício fluoretado foi utilizado em comparação com o dentifrício placebo.

Por outro lado, durante a escovação, o fluoreto disponibilizado na cavidade bucal pode reagir com a superfície dental limpa e formar fluoreto fracamente ligado/"fluoreto de cálcio" ( $\text{CaF}_2$ ). Este produto de reação poderia funcionar como reservatório de fluoreto, liberando-o em um novo biofilme formado na superfície dental e, conseqüentemente, interferir no processo de cárie (Rølla et al., 1991; ten Cate, 1997; Cury e Tenuta, 2008). Assim, os reservatórios de  $\text{CaF}_2$  poderiam ser considerados um mecanismo de ação do dentifrício fluoretado. Nesse sentido, o estudo de Tenuta et al. (2009) utilizando um modelo *in situ* de curta duração, avaliou o mecanismo de ação do dentifrício fluoretado na desmineralização do esmalte. Dois experimentos foram conduzidos: Um avaliou o efeito do  $\text{CaF}_2$  pré-formado na superfície do esmalte e o

outro avaliou o efeito da escovação com dentifrício fluoretado no biofilme dental e sua associação com o “CaF<sub>2</sub>” pré-formado. Os resultados demonstraram uma pequena quantidade de “CaF<sub>2</sub>” formado no esmalte e, conseqüentemente, que uma pequena concentração do fluoreto foi liberada para o fluido do biofilme dental durante um evento cariogênico. Em contrapartida, quando dentifrícios fluoretados foram utilizados pelos voluntários, a concentração de fluoreto encontrada no fluido do biofilme foi significativamente maior. Em acréscimo, Tenuta et al. (2009) demonstraram que o efeito do “CaF<sub>2</sub>” na diminuição da desmineralização é significativamente menor em comparação ao fluoreto retido no biofilme após a escovação. Dessa forma, sugere-se que o enriquecimento do biofilme, que não foi removido durante a escovação, é o principal mecanismo do efeito anticárie do dentifrício fluoretado (Tenuta et al., 2009; Tenuta e Cury, 2013).

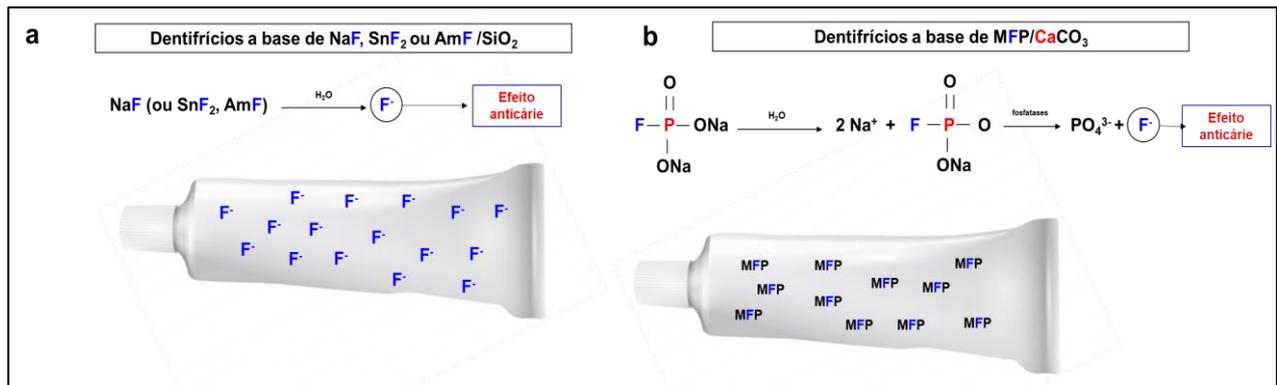
## **2.3 Formulações dos dentifrícios e sua influência na biodisponibilização de fluoreto**

### *2.3.1 Ingredientes das formulações de dentifrícios que podem influenciar na biodisponibilização de fluoreto*

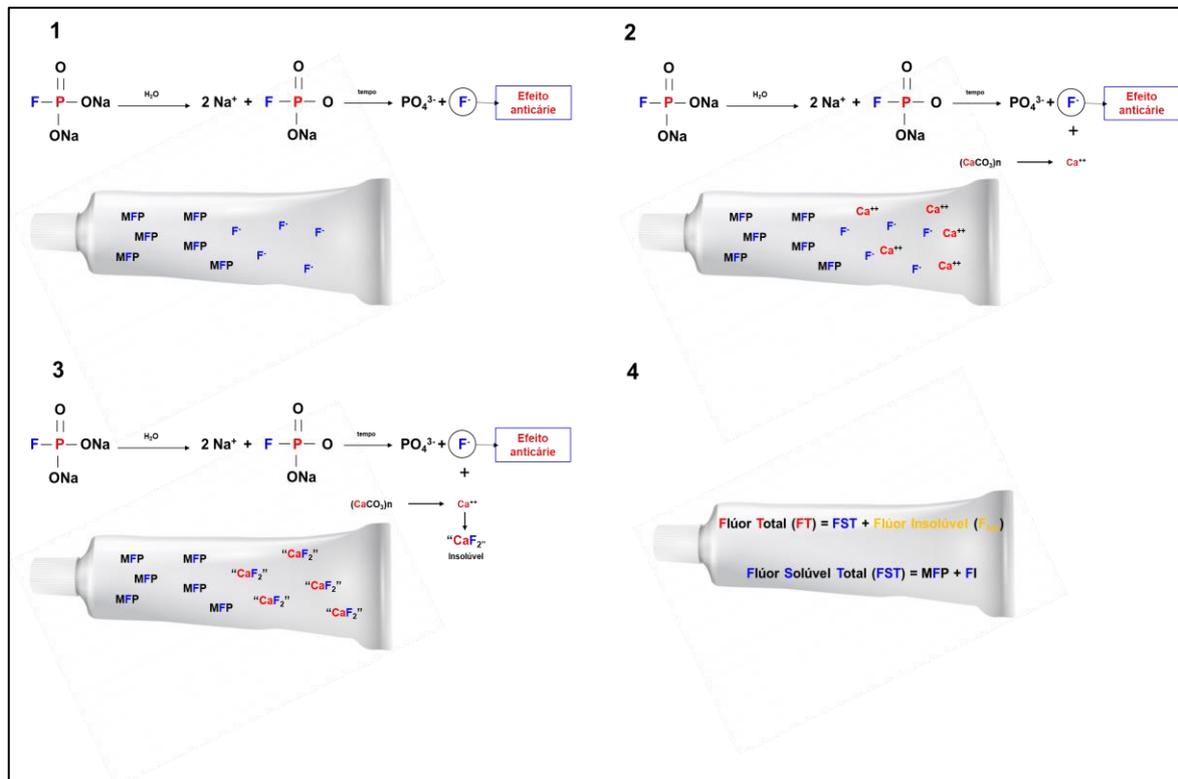
Dentifrícios apresentam uma das mais complexas formulações de produtos de cuidados da saúde (Lippert, 2013). Normalmente, diversos ingredientes são adicionados do ponto de vista farmacotécnico da formulação para garantir os aspectos físicos e de conservação (Cury, 2002). Por outro lado, as formulações de dentifrícios são essencialmente uma forma de biodisponibilizar agentes terapêuticos na cavidade bucal (Cury, 2002; Lippert, 2013). No caso do fluoreto, ele é o único agente terapêutico anticárie das formulações de dentifrícios, o qual deve estar constantemente presente na cavidade bucal na sua forma solúvel/iônica para interferir no processo de cárie, diminuindo a desmineralização e ativando a remineralização do mineral dental (Cury, 2002; Lippert, 2013; Tenuta e Cury, 2013).

Atualmente no Brasil, grande parte dos dentifrícios são formulados com monofluorfosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{FPO}_3 = \text{MFP}$ ), fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ) ou fluoreto estanhoso ( $\text{SnF}_2$ ) (Figura 1) (Tenuta e Cury, 2013; Cury et al., 2015). Enquanto, o  $\text{NaF}$  e  $\text{SnF}_2$  são sais inorgânicos solúveis em água, liberando íon flúor ( $\text{F}^-$ ) que é ativo no controle de cárie (Figura 1.a), o MFP ao ser solubilizado na água libera o íon monofluorfosfato ( $\text{FPO}_3^{-2}$ ), no qual o  $\text{F}^-$  está ligado covalentemente ao radical fosfato (Figura 1.b). Esta ligação precisa ser hidrolisada na cavidade oral por fosfatases, presentes principalmente no biofilme dental, para liberar fluoreto na sua forma iônica para interferir no processo de cárie (Figura 1.b). Todas as formas de fluoreto descritas acima são eficazes no controle de cárie, no entanto, as formulações contendo  $\text{NaF}$  ou  $\text{SnF}_2$  apresentam restrições em relação ao abrasivo (Tenuta e Cury, 2013; Cury et al., 2015). As formulações a base de abrasivos de carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio di-hidratado podem apresentar íons  $\text{Ca}^{++}$  livres, os quais reagem com o  $\text{F}^-$  formando sais insolúveis que não possuem atividade anticárie. Dessa forma, dentifrícios com  $\text{Ca}^{++}$  no abrasivo não podem ser formulados com compostos tipo  $\text{NaF}$ ,  $\text{SnF}_2$  ou  $\text{AmF}$ , assim, sais de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) são utilizados como abrasivo em combinação com sais de flúor que liberam  $\text{F}^-$ , permitindo que todo o flúor presente na formulação esteja na sua forma solúvel. Por outro lado, os dentifrícios contendo MFP podem ser formulados com qualquer agente abrasivo, uma vez que, ele não reage imediatamente com os cátions do abrasivo, como  $\text{Ca}^{++}$  (Lippert, 2013). Entretanto, em formulações a base de MFP/carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio di-hidratado, o MFP pode ser hidrolisado ainda no tubo de dentifrício em função do tempo (Figura 2.1), liberando íon flúor que interage com os íons cálcio do abrasivo (Figura 2.2) (Tenuta e Cury, 2013; Cury et al., 2015). Embora essa reação seja lenta, há uma redução gradativa da concentração de flúor solúvel (Figura 2.3), o que diminui a quantidade de fluoreto potencialmente biodisponível no dentifrício (Figura 2.4).

**Figura 1.** Dois tipos de formulações de dentifrício majoritariamente vendidas no Brasil que tem o F como monofluorofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{FPO}_3 = \text{MFP}$ ), fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ) ou fluoreto estanho ( $\text{SnF}_2$ ). **a.** Reação de solubilização do  $\text{NaF}$  ou  $\text{SnF}_2$ : todo o fluoreto da formulação está na forma de íon flúor ( $\text{F}^-$ ) no dentifrício, o qual é ativo no controle de cárie; **b.** Reação de solubilização do MFP: F permanece ligado covalentemente a molécula de MFP, sendo necessário a hidrólise dessa ligação na cavidade oral por ação de fosfatases para liberar o íon flúor.



**Figura 2.** Redução de F solúvel no tubo de dentifrício em função do tempo. **1.** Reação de hidrólise da molécula de MFP ainda no tubo de dentifrício; **2.** Íons cálcio do abrasivo  $\text{CaCO}_3$  podem interagir com os íons F liberados; **3.** Formação de sais tipo fluoreto de cálcio de baixa solubilidade; **4.** Dentifrícios a base de  $\text{MFP}/\text{CaCO}_3$  podem apresentar flúor total (flúor solúvel total (FST) + flúor insolúvel (ligado ao abrasivo) e FST (fluoreto na forma iônica ou de MFP).



Além disso, o dentifrício precisa primeiramente ser homogeneizado na cavidade bucal pelo ato da escovação para liberar o fluoreto (Lippert, 2013; Tenuta e Cury, 2013). No entanto, essa liberação pode ser modulada por alguns ingredientes do dentifrício, modificando o comportamento reológico da formulação (Pader, 1983; Pagano et al., 2019). As formulações dos dentifrícios apresentam diversos componentes (Cury, 2002) que podem influenciar no seu comportamento reológico ao modificarem sua viscosidade de forma a garantir uma boa estabilidade estrutural (Pader, 1983), eles são:

1. Agentes umectantes (glicerina, sorbitol aquoso e polietilenoglicol (PEG)), que podem adicionar viscosidade ao dentifrício sem que seu comportamento reológico seja alterado, exceto pelo PEG (Pader, 1983);
2. Agentes ligantes (carboximetilcelulose (CMC), metilcelulose, alginato, goma arábica, carragena), que podem alterar viscosidade ao formarem uma matriz polimérica, ou seja, um aglomerado de moléculas em que vários componentes da formulação podem ser atraídos e unidos (Pader, 1983).
3. Agentes abrasivos como a sílica hidratada ( $\text{SiO}_2$ ) que podem também formar matriz poliméricas ao se associar aos agentes umectantes ou ainda a outros componentes (Pader, 1983), e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que pode adicionar alguma viscosidade ao dentifrício devido a sua grande quantidade na formulação (Pader, 1983; Pader, 2000).

### *2.3.2 Influência do comportamento reológico das formulações de dentifrício na biodisponibilidade de fluoreto*

O comportamento reológico é a capacidade de fluidez e deformação de um fluido frente a uma força externa (Pader, 1983). Dentifrícios são classificados como fluidos não-newtonianos com propriedades tixotrópicas (Pader, 1983), os quais tem sua viscosidade diminuída gradualmente à medida que aumenta a tensão de cisalhamento (força externa) e um aumento da viscosidade quando essa tensão é removida (Barnes, 1997; Silva e Pereira, 2000). Dessa forma, os dentifrícios apresentam-se resistentes frente a certa quantidade de estresse aplicado até que perca sua identidade sólida e tornem-se fluidos durante sua extrusão e a escovação dental (Pader, 1983; Silva e Pereira, 2001; Ahuja e Potanin, 2018). Por outro lado, os dentifrícios também apresentam estabilidade sobre a escova dental após extrusão do tubo, para que não escorra para dentro das cerdas da escova (Pader, 1983; Silva e Pereira, 2000). Assim, a reologia de um fluido está intimamente ligada à sua viscosidade, uma vez que, ela confere resistência à fluidez (Chorilli et al., 2007).

Como discutido anteriormente, as formulações dos dentifrícios apresentam diversos ingredientes (Cury, 2002; Lippert 2013) que podem influenciar no seu comportamento reológico ao modificarem sua viscosidade (Pader, 1983). Nesse sentido, Ahuja e Potanin (2018) avaliaram as propriedades reológicas de diversas formulações de dentifrício e observaram que formulações diferindo apenas nas concentrações dos ligantes (sílica espessante, goma xantana e carboximetilcelulose) apresentaram diferentes efeitos nas propriedades reológicas avaliadas. Em acréscimo, o estudo de Corrêa et al. (2005) avaliou a influência da concentração de ligantes polímeros para acrescentar viscosidade no comportamento reológico de formulações de géis. Os géis continham 0,5 ou 1% da formulação de um dos seguintes ligantes: Carbopol 940, Carbopol Ultrez e Pemulen. Após realização dos testes de avaliação das propriedades reológicas, observou-se que o tipo de ligante, assim como sua concentração teve grande influência na propriedade tixotrópica do gel.

Embora a propriedade tixotrópica seja desejada para a estabilidade e fluidez do dentifrício, ela tem sido associada na literatura como um fator que pode influenciar controlando a liberação de agentes terapêuticos (Pader, 1983; Silva e Pereira, 2000; Bruschi et al., 2007; Chorilli et al., 2007). Ao avaliar-se a propriedade tixotrópica de um material, obtém-se a área de histerese, a qual é proporcional à liberação do princípio ativo do fluido (Silva e Pereira, 2000). Nesse sentido, Silva e Pereira (2000) ao avaliarem dois tipos de formulação de dentifrício, observaram diferentes propriedades tixotrópicas entre eles. A formulação que apresentou maior viscosidade teve uma recuperação mais rápida da sua estrutura, o que demonstra uma melhor consistência ao ser aplicado sobre a escova dental, minimizando escoamento do dentifrício pelas cerdas. Além disso, a mesma formulação também apresentou uma maior área de histerese, o que poderia evidenciar uma maior liberação dos agentes terapêuticos. Por outro lado, Chorilli et al. (2007) avaliaram *in vitro* a liberação de cafeína a partir de formulações de géis contendo o ligante carbopol a 1% ou 1,5%. Os autores concluíram que o gel contendo mais carbopol apresentou maior viscosidade e que isso influenciou em uma menor liberação de cafeína. Da mesma forma, um estudo *in vitro* (Isaac et al., 2015) avaliou o comportamento reológico de emulsões para prever a liberação do agente terapêutico ácido alpha-lipóico. Os resultados mostraram que o tempo de recuperação da estrutura da formulação B foi mais lento em comparação a formulação A. Assim, a formulação B apresentou maior área de histerese, o que repercutiu em maior liberação de ácido alpha-

lipóico do que a formulação A. Diante disso, os autores destacam que devido ao sistema mais lento de recuperação da estrutura de uma formulação, ela teria mais tempo para liberar seus agentes terapêuticos.

Assim, os componentes das formulações dos dentifrícios ao modificarem a viscosidade e, conseqüentemente, as propriedades tixotrópicas, poderiam também influenciar na liberação dos agentes terapêuticos da formulação. Nesse sentido, um estudo (Bruschi et al., 2007) avaliou o comportamento reológico de formulações contendo diferentes concentrações de carbopol como ligante e própolis como agente terapêutico para tratamento de doença periodontal. De acordo com os resultados, observou-se que conforme aumentou-se a concentração do ligante, maior foi a viscosidade da formulação. Tal mudança no comportamento reológico dificultou a liberação de própolis da formulação. Especificamente em relação a liberação de fluoreto, o único agente anticárie das formulações dos dentifrícios, Pagano et al. (2019) avaliaram o comportamento reológico e liberação de  $F^-$  in vitro de dentifrícios contendo hidrotalcites (HTlc), os quais podem funcionar como agentes ligantes. Os resultados demonstraram que a formulação de um dos dentifrícios avaliados contendo 4% de HTlc apresentou maior viscosidade que outro dentifrício contendo 3% de HTlc. Além disso, a formulação com 3% HTlc significativamente apresentou maior liberação de fluoreto do que a formulação com 4% HTlc nos dois métodos de avaliação in vitro de liberação de fluoreto.

Em suma, a eficácia de um dentifrício fluoretado pode ser comprometida devido ao comportamento reológico das formulações ao liberar menos fluoreto no caso de formulações com maior viscosidade (Pader, 1983; Pagano et al., 2019). Assim, o quanto de fluoreto um dentifrício libera durante a escovação dental deveria ser avaliado como um pré-teste do seu potencial anticárie. O próximo capítulo abordará os presentes testes de avaliação da concentração de fluoreto ativo contra cárie e sua potencial biodisponibilidade durante a escovação dental.

## **2.4 Determinação in vitro de fluoreto potencialmente biodisponível durante a escovação dental**

Em um dentifrício o fluoreto pode ser encontrado em diferentes formas: o fluoreto iônico que está todo disponível em uma solução aquosa; fluoreto ionizável, como o MFP, que libera fluoreto após ação das fosfatases; fluoreto insolúvel, o qual é resultado da interação do fluoreto iônico com o cálcio do agente abrasivo. Em acréscimo, os fluoretos iônico e ionizável podem ser classificados como Fluoreto Solúvel Total (FST) presente na formulação (Tenuta e Cury, 2013). O FST dos dentifrícios é aquele que pode interferir nos fenômenos de des e remineralização do processo de desenvolvimento de lesões de cárie. Nesse sentido, a determinação do FST dos dentifrícios deve ser avaliada quer seja em relação ao FST presente nos dentifrícios ou quer seja em relação ao FST biodisponível na cavidade bucal durante a escovação dental.

A determinação do FST pode ser realizada centrifugando a amostra para separação do FST do fluoreto insolúvel, o qual é precipitado junto com as partículas do abrasivo. Em relação ao íon MFP, ele pode ser determinado diretamente por cromatografia iônica. No entanto, ao considerar o custo benefício desse método, assim como em outros métodos de determinação de fluoreto (cromatografia gasosa, técnica de microdifusão), o protocolo padronizado para determinar todas as formas de fluoreto usando um eletrodo íon-específico parece ser a melhor opção (Tenuta e Cury, 2013). Tal método requer uma etapa de hidrólise química (adicionando 1M HCl à 45 °C por 1h) ou enzimática (por fosfatases ácidas) da molécula de MFP, liberando F para ser detectável pelo eletrodo. Da mesma forma, para a determinação do Fluoreto Total (insolúvel + solúvel), as amostras podem incluir um tratamento ácido para a dissolução do F<sup>-</sup> ligado ao abrasivo (fluoreto insolúvel) (Pearce, 1974; Cury et al., 2010).

Por outro lado, a análise para estimar o fluoreto potencialmente biodisponível durante a escovação é descrita e exigida pela American Dental Association (ADA) no “Guia para dentifrícios contendo fluoreto” (ADA, 2005). Neste teste, é verificado o quanto de fluoreto é liberado in vitro durante 1 min, o que simularia o tempo de escovação. Em acréscimo, a ADA indica que devem ser liberados pelo menos 80% de F do conteúdo total declarado pelo fabricante, contudo, não especifica que os dentifrícios devem apresentar fluoreto solúvel. Para este teste, amostras de dentifrícios são

homogeneizadas em proporção 1:3 em água ou saliva e é feita uma combinação de agitação vigorosa em vórtex e manualmente. Além da ADA, a International Organization for Standardization (ISO) também tem sugerido o mesmo “teste de 1 min” para avaliação do fluoreto potencialmente biodisponível durante a escovação dental (ISO, 2010). Ko et al. (2015) baseando-se na metodologia proposta pela ISO, determinaram a concentração de fluoreto total e fluoreto biodisponível de dentifrícios vendidos em diferentes países e com diferentes formulações. Os resultados do “teste de 1 min” demonstraram distintas liberações de fluoreto entre os 6 dentifrícios avaliados. No entanto, foram inconsistentes em relação a concentração de fluoreto total e potencialmente biodisponível, já que alguns dentifrícios apresentaram maior concentração de fluoreto biodisponível do que a de fluoreto total. Os autores concluíram que este método é inadequado para avaliar o fluoreto biodisponível durante a escovação dental, sendo necessária uma revisão para garantir a padronização da metodologia.

Visando aprimorar este teste, Carey et al. (2014) sugeriram uma modificação: após a agitação do dentifrício em água ou saliva por 1 min, submergir um papel de filtro por 15 s para coletar uma amostra do fluoreto liberado. Em seguida, o papel filtro é centrifugado em um tubo de centrifuga e o filtrado é utilizado para análise do fluoreto potencialmente biodisponível em 1 min. Os autores utilizaram essa metodologia para avaliar dentifrícios com diferentes formulações e diferentes formas de fluoreto comprados no mercado de Gaithersburg (EUA) e compararam com o flúor solúvel total (FST) determinado quimicamente. Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre a quantidade de FST presente e o fluoreto potencialmente biodisponível, indicando que o fluoreto não foi totalmente liberado durante o “teste de 1 min”. Além disso, os dentifrícios a base de MFP e NaF tiveram pelo menos 80% de fluoreto liberado durante o teste, o que foi menor para a formulação a base de SnF<sub>2</sub> com apenas 50% do fluoreto liberado.

Em acréscimo, Pagano et al. (2019) recentemente propuseram dois diferentes métodos *in vitro* para avaliar a liberação de fluoreto de dentifrícios durante a escovação dental. O primeiro método consistia na utilização de uma escova rotatória conectada a um agitador mecânico que realizava a escovação de uma prótese por 10 min à 60 rpm; o segundo método consistia na utilização de uma escova mecânica para escovação manual de uma prótese dentária fazendo 60 movimentos circulares/min. Em ambos os

métodos, a escovação era realizada com o a escova contendo 1 g de dentifrício e a prótese imersos em um béquer contendo 80 ml de um meio ( $\text{NaHCO}_3$  3,5 mM) em banho maria à 37 °C. O meio era coletado em tempos diferentes para avaliar o fluoreto liberado. Embora, entre as diferentes formulações testadas, o dentifrício fluoretado tenha apresentado maior liberação em ambos os métodos, a taxa de liberação foi diferente entre eles. Enquanto o método manual obteve uma liberação máxima de fluoreto de 92% aos 10 min, o método utilizando a escova rotatória obteve aproximadamente 80%. Além de tal diferença demonstrar limitações da metodologia na acurácia dos dados obtidos, também apresenta viés de reprodutibilidade em relação a escovação manual, a qual pode variar entre pessoas.

Da mesma forma, o “teste de 1 min” apresentado pela ADA (2005) e Carey et al. (2014) apresenta limitações em relação a técnica necessária para homogeneização do dentifrício com agitação manual, a qual pode variar em relação à força e velocidade aplicada. Além disso, a exigência da ADA para a liberação de 80% de flúor contido na formulação não é válida; como discutido anteriormente, os dentifrícios devem apresentar fluoreto solúvel (Cury et al., 2010) e apresenta uma relação dose-resposta de fluoreto no controle de cárie (Walsh et al., 2019). Sobretudo, nenhum destes testes é validado com dados in vivo de biodisponibilidade de fluoreto na cavidade bucal durante a escovação dos dentes.

Diante das limitações discutidas neste capítulo, é necessário a padronização de uma metodologia para avaliar a quantidade de fluoreto que uma formulação de dentifrício libera durante a escovação dental como um pré-teste de seu potencial anticárie.

### **3. PROPOSIÇÃO**

A quantidade de fluoreto que uma formulação de dentifrício libera durante a escovação dental deveria ser avaliada como um pré-teste de seu potencial anticárie. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver um teste in vitro de liberação de fluoreto de dentifrícios e conduzir um estudo piloto in vivo para validá-lo como um indicador da biodisponibilidade de fluoreto durante a escovação dental.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas e seleção dos voluntários**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, (CAAE: 19842819.0.0000.5418) (Anexo 1). Os voluntários foram informados sobre os objetivos e a metodologia do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Na seleção dos voluntários os critérios de inclusão foram: voluntários maiores de 18 anos; dos critérios de exclusão foram: indivíduos com alteração no fluxo salivar, uso de medicamentos que alterem o fluxo salivar, impossibilidade para comparecer nos horários previamente agendados ao laboratório de bioquímica da FOP/UNICAMP para realização dos testes. Foram selecionados 3 voluntários (2 mulheres e 1 homem) que residiam em Piracicaba, cidade com água fluoretada na concentração ótima de 0,7 mg F/L (na faixa de 0,6-0,8 mg F/L). Os voluntários apresentaram fluxo salivar não estimulado normal, com fluxo salivar médio de  $0,75 \pm 0,13$  mL/min.

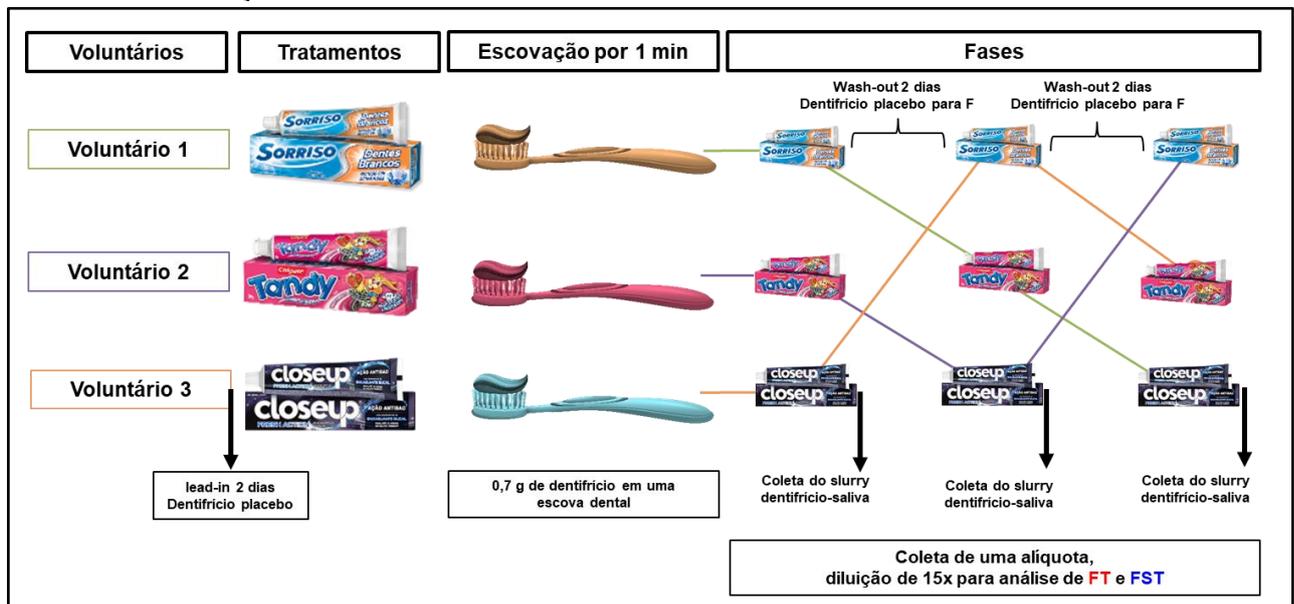
### **4.2 Delineamento experimental**

Foi conduzido um estudo piloto in vivo (n=3) do tipo cruzado e cego de 3 fases e um estudo in vitro (n=6). Em ambos estudos foram utilizados os mesmos tubos de três dentifrícios comerciais comprados em um mercado da cidade de Santa Bárbara d'Oeste-SP, sendo eles: SDB: Sorriso Dentes Brancos (MFP/CaCO<sub>3</sub>, 1.450 ppm F; Lote: 9154BR121J, Validade: junho/2021), T: Tandy (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1.100 F; Lote: 9078BR122C, Validade: março/2022) e CUF: Close-up Fresh Action (NaF/SiO<sub>2</sub>, 1.450 F; Lote: T3C10, Validade: abril/2022). Tais dentifrícios foram escolhidos por apresentarem em um estudo piloto in vitro diferentes capacidades de liberação de fluoreto (Ricomini-Filho et al., 2017). Adicionalmente, dos dentifrícios selecionados, dois apresentam em sua composição (T e CUF) NaF/SiO<sub>2</sub> e um deles (SDB) MFP/CaCO<sub>3</sub>.

## In vivo

Em cada fase, durante 3 fases, os voluntários compareceram ao Laboratório de Bioquímica Oral (FOP-UNICAMP) sem utilizar qualquer produto de higiene bucal e qualquer tipo de alimento por pelo menos 2 h antes do experimento. Adicionalmente, em um período de 2 dias, antes do início do experimento (período de lead-in) e entre as fases (período de washout), os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado (Fernández et al., 2014), assim como foram orientados a não utilizar alimentos ricos em flúoreto (por exemplo, chá de *Camellia sinensis*). No laboratório, eles escovaram seus dentes por 1 min com 0,7 g de um dos dentifrícios em estudo e todo o slurry dentifrício-saliva produzido durante a escovação foi coletado e o volume medido (Figura 3). Fluoreto total (FT) foi determinado nas alíquotas das amostras coletadas; as amostras remanescentes foram centrifugadas (16.000 g, 10 min) para a determinação de flúor solúvel total (FST) em alíquotas do sobrenadante. Todas as amostras foram tratadas com HCl 2 M por 1h a 45 °C, neutralizadas e tamponadas com TISAB II (contendo NaOH 1 M) para determinação de fluoreto com eletrodo íon-específico. A quantidade de fluoreto liberado foi calculada considerando o volume final do slurry saliva-dentifrício; baseado na quantidade de FT e FST liberado durante a escovação e na quantidade de FT e FST presente nos 0,7 g de dentifrício utilizado pelos voluntários para escovar os dentes, a porcentagem liberada foi calculada.

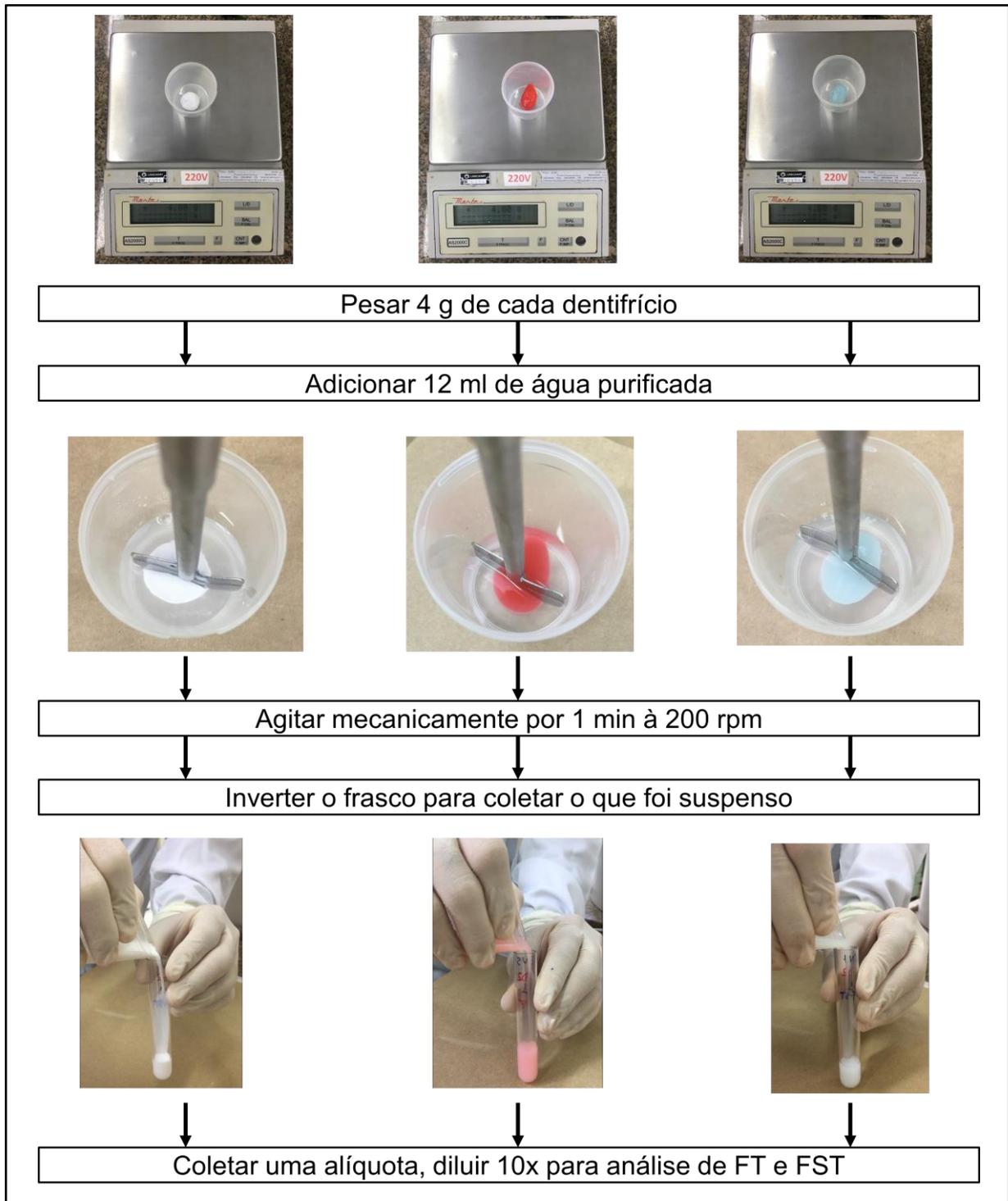
**Figura 3.** Fluxograma da análise in vivo para avaliar fluoreto biodisponível na cavidade bucal durante a escovação.



## In vitro

Foi conduzido um estudo utilizando os mesmos tubos dos três diferentes dentifrícios comerciais (n=6). Amostra de 4 g dos dentifrícios foi colocada no fundo de um frasco coletor (Diâmetro externo inferior: 45,04 mm; Diâmetro externo superior: 50,93 mm; altura: 57,13; volume: 80 ml) e uma espátula metálica para agitação do dentifrício foi posicionada no meio do dentifrício, justaposta ao fundo do frasco coletor. Em seguida, a amostra de dentifrício foi imersa em 12 ml de água e mecanicamente agitada pela espátula por 1 min à 200 rpm. O frasco foi invertido para coletar o que foi mecanicamente liberado na água (Figura 4). Após a agitação de uma amostra e antes da agitação da próxima amostra, a espátula metálica era lavada com água purificada até remoção completa dos resíduos que porventura ficaram aderidos a ela e, em seguida, secada com papel toalha. A análise in vitro dos dentifrícios foi repetida 6 vezes para cada dentifrício. Fluoreto total (FT) foi determinado nas alíquotas das amostras coletadas; as amostras remanescentes foram centrifugadas (16.000 g, 10 min) para a determinação de flúor solúvel total (FST) em alíquotas do sobrenadante. Todas as amostras foram tratadas com HCl 2 M por 1 h a 45 °C, neutralizadas e tamponadas com TISAB II (contendo NaOH 1 M) para determinação de fluoreto com eletrodo íon-específico. As concentrações de FT e FST foram determinadas nos dentifrícios para calcular a quantidade de fluoreto submetida nos testes in vitro e in vivo. Baseado na quantidade de FT e FST liberado a e na quantidade de FT e FST presente nos 4 g de dentifrício utilizados, a porcentagem liberada foi calculada.

**Figura 4.** Fluxograma do modelo in vitro para avaliar fluoreto potencialmente biodisponível na cavidade bucal durante a escovação.



### 4.3 Determinação da concentração de FT e FST no dentifrício

As concentrações de FT e FST foram determinadas nos dentifrícios para calcular a quantidade de fluoreto presente nas amostras de dentifrício utilizados nos testes *in vitro* e *in vivo*. Para os testes de FT e FST, 90-110 mg de cada dentifrício foram suspensos em 10 mL de água, homogeneizados e duplicatas de 0,25 ml foram destinadas à determinação de FT. O restante da suspensão foi centrifugado (3000 g, 10 min) e duplicatas de 0,25 ml do sobrenadante foram destinadas à análise de FST. Todas as amostras foram tratadas com 0,25 ml de HCl 2 M durante 1h a 45°C para hidrólise do MFP e dissolução do F ligado ao abrasivo. Após neutralização com 0,5 ml de NaOH 1 M e tamponamento com 1,0 ml de TISAB II, a concentração de fluoreto foi determinada utilizando eletrodo íon específico calibrado com padrões de F preparados nas mesmas condições das amostras (Cury et al., 2010).

### 4.4 Determinação da concentração FT e FST das amostras *in vivo* e *in vitro*

*In vivo*: As amostras de slurry dentifrício-saliva foram diluídas em 15 vezes em água purificada para que as concentrações de fluoreto esperadas estivessem entre os limites da curva de calibração estabelecida. Em seguida, duplicatas de 0,25 mL das amostras foram destinadas à determinação de FT. O restante foi centrifugado (16.000 g, 10 min) e duplicatas de 0,25 mL do sobrenadante foram destinadas à análise de FST.

*In vitro*: As amostras de slurry dentifrício-água purificada foram diluídas 10 vezes em água purificada. Em seguida, duplicatas de 0,25 mL das amostras foram destinadas à determinação de FT. O restante foi centrifugado (3.000 g, 10 min) e duplicatas de 0,25 mL do sobrenadante foram destinadas à análise de FST.

Todas as amostras foram tratadas com 0,25 ml de HCl 2M durante 1 h a 45 °C para hidrólise do MFP e dissolução do F ligado ao abrasivo. Após neutralização e tamponamento com 0,5 ml de TISAB II (contendo NaOH 1M), a concentração de fluoreto foi determinada utilizando eletrodo íon específico calibrado com padrões de F preparados nas mesmas condições das amostras.

#### 4.5 Análise do fluoreto dos testes in vitro e in vivo

A dosagem da concentração de fluoreto total e fluoreto solúvel total foi feita utilizando eletrodo íon específico modelo 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, EUA acoplado a um analisador de íons (Orion StarA214; Orion Research, Cambridge, MA, EUA). A calibração do aparelho foi realizada com soluções padrões de fluoreto variando de 0,0625 a 8,0 µg F/ml (preparados a partir de um padrão Orion de 100 µg F/ml) preparadas nas mesmas condições das amostras em HCl 0,25 M (utilizado para hidrólise do MFP e dissolução do F ligado ao abrasivo); TISSAB II a 50% (tampão acetato 1 M, pH 5,0, contendo NaCl 1,0 Me CDTA a 0,4%) para tamponamento, contendo NaOH 1 M para neutralização. A confiabilidade dos resultados foi confirmada pelo coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 0,999 para todas as curvas de calibração realizadas. A exatidão dos resultados foi confirmada utilizando-se soluções teste de fluoreto com concentrações conhecidas, obtendo-se uma diferença entre essas soluções teste e a concentração esperada de 2,3%. O coeficiente de variação médio de 3,3% e 0,97% entre as duplicatas das amostras in vitro e in vivo, respectivamente, demonstraram a precisão dos resultados.

#### 4.6 Cálculos da porcentagem de fluoreto liberado in vivo e in vitro

As concentrações de FT e FST foram determinadas nos dentifrícios para calcular a quantidade de fluoreto submetida nos testes in vitro e in vivo. A concentração de fluoreto nos dentifrícios é dada por µg F/g, assim, em 1 g de dentifrício pode ser encontrado “x” µg F. O estudo in vitro e in vivo utilizaram, respectivamente, 4 g e 0,7 g de dentifrício, dessa forma, o seguinte cálculo foi feito com base na concentração de fluoreto encontrada nos dentifrícios.

$$\boxed{\text{Quantidade de fluoreto na amostra de dentifrício in vivo ou in vitro (}\mu\text{g F)}} = \boxed{4 \text{ g ou } 0,7 \text{ g de dentifrício}} \times \boxed{\text{Concentração de flúor determinada nos dentifrícios (}\mu\text{g F/g)}}$$

Baseado na quantidade de FT e FST usados e a quantidade liberada, a porcentagem liberada foi calculada.

$$\boxed{\% \text{ de fluoreto liberado in vivo ou in vitro (}\mu\text{g F)}} = \boxed{\text{Quantidade de fluoreto liberado in vivo ou in vitro}} / \boxed{\text{Quantidade de fluoreto na amostra de dentifrício in vivo e in vitro (}\mu\text{g F)}} \times 100\%$$

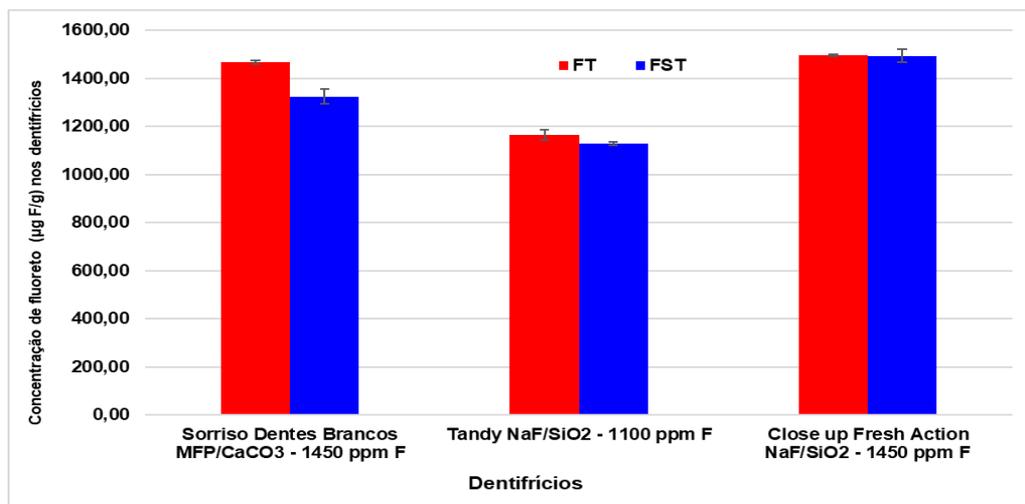
#### 4.7 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada para cada uma das variáveis respostas usando teste de Kolmogorov-Smirnov; todos os dados apresentaram distribuição normal. Os dados das %FST e %FT liberadas in vitro e in vivo foram comparadas entre os dentifrícios independentemente por ANOVA de um critério seguido por Teste de Tukey. Os dados in vitro da %FST liberado (n=6) foram organizados em ordem decrescente para cada dentifrício analisado; os dados in vitro da %FT liberado foram organizados de acordo com a sequência dos dados in vitro da %FST liberado, mantendo-se a posição dos dados de %FT referente a mesma amostra em que foi avaliado a %FST. A média aos pares dos dados in vitro da %FT e %FST liberados foi feita para obter-se um n=3 e correlacionar com os dados de %FT e %FST liberados in vivo com n=3. A relação da %F liberado in vivo vs. in vitro foram analisadas por correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram feitas utilizando o software SPSS® Statistic 21.0 (SPSS for Windows, version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. RESULTADOS

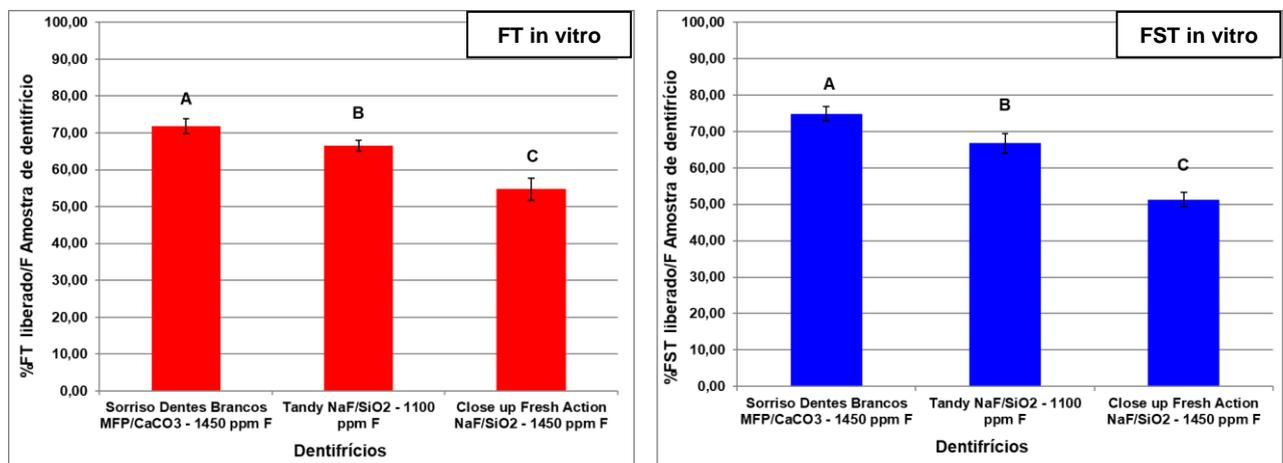
Os dentífrícios apresentaram as seguintes concentrações de FT e FST, respectivamente (média ± dp) (Figura 3): Sorriso Dentes Brancos: 1468,9 ppm FT e 1324,5 ppm FST; Tandy: 1164,6 ppm FT e 1130,2 ppm FST; e Close-up Fresh Action 1494,1 ppm FT e 1497,1 ppm FST.

**Figura 3.** Concentração ( $\mu\text{g F/g}$ ) de FT e FST (média  $\pm$  dp;  $n=2$ ) nos dentífrícios utilizados nos estudos in vivo e in vitro.



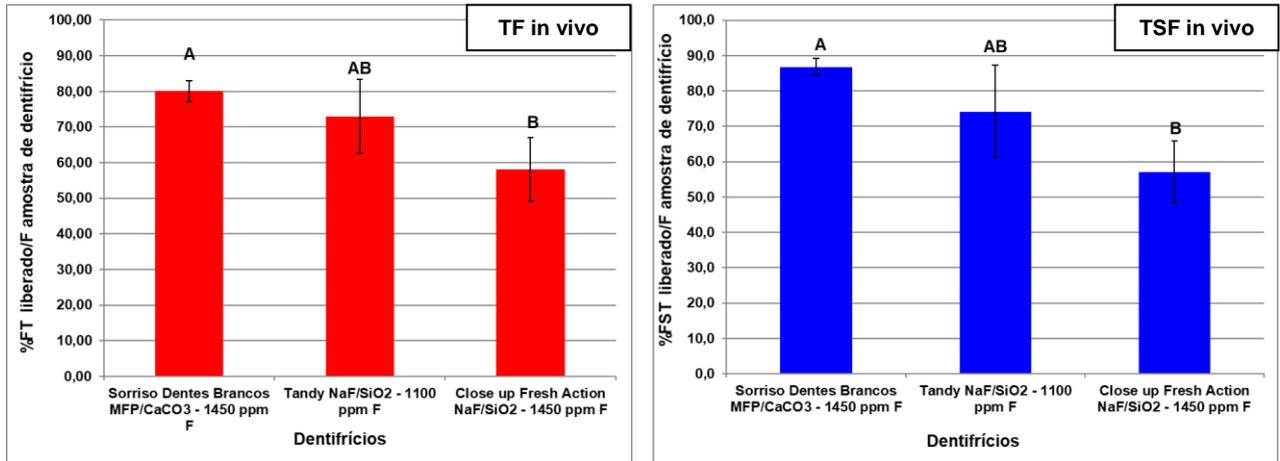
Os dentífrícios testados diferiram estatisticamente em relação à %FT e %FST liberados in vitro (Figura 4); in vivo, o grupo utilizando Sorriso Dentes Brancos diferiu estatisticamente do grupo utilizando Close Up Fresh Action, mas ambos não foram diferentes estatisticamente do grupo utilizando Tandy (Figura 5) ( $p<0,05$ ).

**Figura 4.** Porcentagem (média  $\pm$  dp;  $n=6$ ) de FT e FST liberados in vitro de acordo com os dentífrícios testados.



\*Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ).

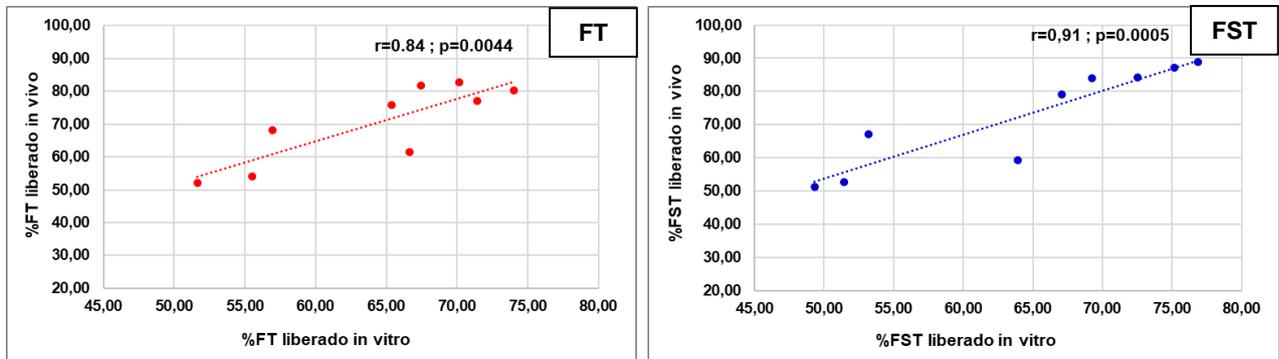
**Figura 5.** Porcentagem (média  $\pm$  dp; n=3) de FT e FST liberados in vivo de acordo com os dentifícios testados.



\*Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

Correlação alta e estatisticamente significativa foi encontrada para %F liberado in vivo vs. in vitro tanto para %FT ( $r=0,84$ ;  $p=0,0044$ ), como para %FST ( $r=0,91$ ;  $p=0,0005$ ) (Figura 6).

**Figura 6.** Correlação da porcentagem de FT e FST liberado in vivo em função da porcentagem de FT e FST, respectivamente, liberados in vitro pelos dentifícios testados (n=9).



## 6. DISCUSSÃO

O fluoreto de dentifício deve ser biodisponibilizado na cavidade bucal durante a escovação dental para ter efeito anticárie (Cury e Tenuta, 2008). A American Dental Association e ISO recomendam um “teste de 1 min” de liberação de fluoreto in vitro para avaliar a potencial biodisponibilidade de fluoreto dos dentifícios (ADA, 2005; ISO, 2010). No entanto, este teste não foi validado em termos de dados in vivo de biodisponibilidade de fluoreto na cavidade bucal quando os dentes são escovados, o que foi proposto neste trabalho.

Quando os estudos in vivo e in vitro foram correlacionados em relação a %F liberado, uma correlação alta e significativa foi encontrada para %FT ( $r=0,84$ ;  $p=0,0044$ ) e %FST ( $r=0,91$ ;  $p=0,0005$ ). Assim, os dados demonstram que o modelo in vitro proposto pode ser utilizado como indicador da potencial biodisponibilidade de fluoreto dos dentifícios testados.

Ainda que tenha sido encontrada uma correlação alta e significativa para %FT in vivo vs. in vitro, a correlação para %FST é de maior importância, uma vez que, o fluoreto deve estar na sua forma solúvel para ter efeito anticárie (Stookey, 1985; Cury e Tenuta, 2008). Nesse sentido, dentifícios a base de MFP/CaCO<sub>3</sub>, como é o caso do dentifício Sorriso Dentes Brancos testado neste estudo, podem ter uma redução gradativa da concentração de flúor solúvel devido a hidrólise do MFP ainda no tubo de dentifício em função do tempo, liberando íon flúor que interage com os íons cálcio do abrasivo (Tenuta e Cury, 2013; Cury et al., 2015). Assim, um indicador da %FT liberada durante a escovação não avaliaria o real potencial anticárie de uma formulação a base de MFP/CaCO<sub>3</sub>; neste caso, um indicador da %FST liberada durante a escovação é o adequado.

Por outro lado, um indicador da %FT liberada durante a escovação poderia funcionar para as formulações a base de NaF/SiO<sub>2</sub>, como é o caso dos dentifícios Tandy e Close-up Fresh Action testados neste estudo, pois apresentam todo o fluoreto na sua forma solúvel (Tenuta e Cury, 2013). No entanto, os agentes modificadores de reologia (ligantes) das formulações dos dentifícios ao formar uma matriz polimérica para adicionar viscosidade, poderia controlar a liberação do fluoreto de dentro dessa estrutura

(Pader, 1983; Zanetti et al., 2002). Dessa forma, ainda que o fluoreto esteja na sua forma solúvel, ele poderia ser precipitado juntamente com as partículas de dentifrício na etapa de centrifugação das amostras para análise de FST. Assim, o sobrenadante coletado para análise de FST representaria o que de fato estava biodisponível na cavidade bucal durante a escovação. De qualquer forma, o FST é o fluoreto que tem efeito anticárie (Cury e Tenuta, 2008) e enquanto não há uma maior elucidação a respeito da influência do comportamento reológico na biodisponibilização do fluoreto durante a escovação, o modelo *in vitro* desenvolvido deveria ser utilizado para indicar a %FST liberado como potencial anticárie para ambos os tipos de dentifrício, a base de MFP/CaCO<sub>3</sub> ou NaF/SiO<sub>2</sub>.

O modelo *in vitro* desenvolvido lançou alguma luz em relação a análise do fluoreto potencialmente biodisponível, mas outros dentifrícios precisam ser avaliados quanto a relação da biodisponibilidade *in vivo* vs. *in vitro*. Diante das limitações dos dentifrícios discutidas acima, um estudo avaliando *in vivo* a biodisponibilidade de diferentes formulações a base de MFP/CaCO<sub>3</sub> ou NaF/SiO<sub>2</sub> poderia ajudar a esclarecer as suas diferentes capacidades de liberação de fluoreto. Além disso, dentifrícios a base de MFP/CaCO<sub>3</sub> deveriam ser analisados em relação a diferentes prazos de validade, o que impactaria no FST presente na formulação.

Em relação aos aspectos técnicos, o modelo *in vitro* desenvolvido neste estudo foi padronizado em relação a quantidade de dentifrício, tempo e velocidade de agitação utilizados, o que torna o teste reprodutível. A reprodutibilidade do modelo *in vitro* foi confirmada pelo coeficiente de variação médio de 3,3% entre as duplicatas das amostras *in vitro*. Adicionalmente, é necessário o uso de um frasco coletor com as mesmas dimensões (Diâmetro externo inferior: 45,04 mm; Diâmetro externo superior: 50,93 mm; altura: 57,13; volume: 80 ml) do utilizado neste estudo. Da mesma forma, o posicionamento da espátula para agitar o dentifrício e a água deve ser justaposta ao frasco para permitir o contato dela com todo o dentifrício posicionado no frasco coletor. Em acréscimo, a reprodutibilidade interpessoal do estudo precisa ser avaliada.

Os dentifrícios testados foram escolhidos devido a apresentarem diferentes capacidades de liberação de fluoreto no estudo piloto de Ricomini-Filho et al. (2017). Neste estudo a %FST e %FT liberados diferiu estatisticamente entre os três dentifrícios para o estudo in vitro ( $p < 0,05$ ), observando-se a mesma tendência de liberação demonstrada no estudo Ricomini-Filho et al. (2017): Sorriso dentes Brancos > Tandy > Close Up Fresh. Tal diferença na liberação de fluoreto dos dentifrícios pode ser inversamente proporcional às suas viscosidades, as quais eram visivelmente diferentes: Close Up Fresh > Tandy > Sorriso dentes Brancos. Outros estudos in vitro observaram esse mesmo comportamento de formulações com maior viscosidade liberando uma menor quantidade de agentes terapêuticos (Silva e Pereira, 2000; Bruschi et al., 2007; Chorilli et al., 2007; Isaac et al, 2015; Pagano et al., 2019). No entanto, testes de viscosidade dos dentifrícios utilizados precisam ser realizados para verificar se há uma correlação entre a %F liberado e a viscosidade do dentifrício. Em acréscimo, a viscosidade do dentifrício pode modificar as propriedades reológicas da formulação, as quais podem estar relacionadas com a liberação dos agentes terapêuticos (Pader, 1983; Silva e Pereira, 2000; Bruschi et al., 2007; Chorilli et al., 2007). Assim, estudos investigando a relação da liberação de fluoreto de formulações diferindo apenas em suas viscosidades, poderia ajudar na elaboração de formulações mais efetivas em termos de biodisponibilidade do fluoreto.

Quanto a diferença na %FST e %FT liberados in vivo, ela foi significativa apenas entre os grupos utilizando Sorriso Dentes Brancos e Close-up Fresh, mas ambos não foram estatisticamente diferentes do grupo utilizando Tandy. A falta de poder amostral pode ter influenciado na falta de diferenciação do grupo utilizando Tandy em comparação com os outros dois dentifrícios. No entanto, nota-se a mesma tendência de liberação observada no presente estudo piloto in vitro e no de Ricomini-Filho et al. (2017). Neste caso, um dentifrício liberando menos fluoreto para estar biodisponível durante a escovação dental, reduziria seu potencial de ação anticárie (Zamataro et al. 2008). Portanto, os dentifrícios também deveriam ser analisados quanto sua potencial biodisponibilidade durante a escovação dental para proteger o público de dentifrícios com pouca ou nenhuma eficácia (Martínez-Mier et al., 2019). O presente estudo não somente demonstrou que dentifrícios podem ter diferentes liberações de fluoreto, mas também desenvolveu um modelo in vitro para indicar a quantidade de fluoreto biodisponível na cavidade bucal durante a escovação como um pré-teste do potencial

anticárie do dentífrico. No entanto, ainda é necessário esclarecer o efeito das diferentes liberações de fluoreto das formulações de dentífricos na dinâmica do processo de cárie. Estudos *in vitro* ou *in situ* (Tenuta e Cury, 2013) poderiam ajudar a elucidar essa questão ao investigar, por exemplo, a concentração de fluoreto encontrado no biofilme, assim como, a perda e ganho mineral de blocos de esmalte após exposição de diferentes dentífricos.

Em suma, este estudo piloto sugere que diferentes formulações de dentífricos podem ter distintas liberações de fluoreto durante a escovação dental. O modelo *in vitro* desenvolvido pode funcionar como um indicador do potencial anticárie em termos da quantidade de fluoreto que a formulação de um dentífrico biodisponibiliza durante a escovação.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados sugerem que o modelo in vitro desenvolvido pode funcionar como um preditor da biodisponibilidade da quantidade de fluoreto que a formulação de um dentifício libera durante a escovação.

## REFERÊNCIAS

Ahuja At & Potanin A. Rheological and sensory properties of toothpastes. *Rheologica Acta*. 2018.

Albertsson KW, van Dijken JW. Awareness of toothbrushing and dentifrice habits in regularly dental care receiving adults. *Swed Dent J*. 2010;34(2):71-8.

American Dental Association, Council on Scientific Affairs. Fluoride-containing dentifrices. Chicago, American Dental Association, 2005.

Bruschi MI, Jones DS, Panzeri H, Gremiao MP, De Freitas O, Iara EH. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *Journal Pharmaceutical Sciences*. 2007.

Carey CM, Holahan EC, Schmuck BD. Analysis of 1-Minute Potentially Available Fluoride from Dentifrice. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 2014 Dec 4;119:602-609.

Chorilli M, Zague V, Scarpa MV, Leonardi GR. Influência da viscosidade do veículo na liberação in vitro da cafeína. *Revista eletrônica de farmácia*. 2007; 4(1):52-60.

Corrêa NM, Camargo Júnior FB, Ignácio RF, Leonardi GR. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41(1):73-78.

Cury JA, Tenuta LMA, Tabchoury CPM. *Bioquímica oral*. São Paulo: Artes Médicas, 2017. (Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Básica).

Cury JA, Caldarelli PG e Tenuta LMA. Necessidade de revisão da regulamentação brasileira sobre dentifrícios fluoretados. *Revista de Saúde Pública*. 2015; 49, 74.

Cury JA, Oliveira MJ, Martins CC, Tenuta LM, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by Brazilian children. *Braz Dent J*. 2010;21(5):396-400.

Cury JA, Tenuta LMA. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. *Adv Dent Res*. 2008; 20 (1): 13-6.

Cury JA. Dentifrícios: como escolher e como indicar. In: Cardoso RJC, Gonçalves EAN. *Odontologia- odontopediatria e prevenção*. São Paulo: Artes Médicas; 2002. v. 4, p. 281-95.

dos Santos APP, Nadanovsky P, de Oliveira BH. A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41(1):1-12.

Duckworth RM, Morgan SN: Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Res* 1991; 25: 123–129.

Duckworth RM. Pharmacokinetics in the oral cavity: fluoride and other active ingredients. *Monogr Oral Sci*. 2013; 23:125-39.

Ekstrand J, Oliveby A. Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57:330-333.

Fernández CE, Cury JA, Tenuta LMA. Wash-out period for crossover design experiments using high fluoride concentration dentifrice. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2015;8(1):1-6

Isaac VL, Chiari-Andréo BG, Marto JM, Moraes JD, Leone BA, Corrêa MA, Ribeiro HM. Rheology as a Tool to Predict the Release of Alpha-Lipoic Acid from Emulsions Used for the Prevention of Skin Aging. *Biomed Res Int*. 2015;2015:818656.

ISO. ISO 11609:2010 Dentistry-Dentifrices-Requirements, test methods and marking. Geneva:ISO;2010.

Ko HY, Kang SM, Kwon HK, Kim BI. Evaluation of fluoride bioavailability in toothpastes. *J. Kor. Acad. Oral Health*. 2015; 39, 81–87.

Lippert F. An introduction to toothpaste: its purpose, history and ingredients. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:1-14.

Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev In: The Cochrane Library, Issue 1, 2003.*

Martínez-Mier EA, Tenuta LMA, Carey CM, Cury JA, van Loveren C, Ekstrand K, et al. ORCA workshop: Methodology for determination of potentially available fluoride in toothpastes. *Caries Res.* 2019;53(2):119-136.

Naé HM. *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries: Introduction to Rheology.* New York: Cosmetic Science and technology Series. 1993; 13.

Nordström A, Birkhed D. Attitudes and behavioural factors relating to toothbrushing and the use of fluoride toothpaste among caries-active Swedish adolescents - a questionnaire study. *Acta Odontol Scand.* 2017 Oct; 75(7):483-487.

Pader M. Dentifrices. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* John Wiley & Sons. 2000.

Pader M. *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries: Dentifrice Rheology.* New York: Cosmetic Science and technology Series. 1993; 13.

Paes Leme AF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Efeito da associação da aplicação de fluoreto profissional e uso de dentifício no esmalte dental. *RGO, Porto Alegre, v. 55, n.1, p. 35-40, jan./mar. 2007.*

Pagano, C., Perioli, L., Marmottini, F. et al. Dentifrice Based on Fluoride–Hydroxycalcite Compounds: Characterization and Release Capacity Evaluation by Novel In Vitro Methods. *AAPS PharmSciTech.* 2019; 20, 248.

Pearce EI: A laboratory evaluation of New Zealand fluoride toothpastes. *N Z Dent J* 1974; 70: 98–108.

Ricomini-Filho A., Leme-Junior J., Monteiro D., Tenuta L., Cury J. Fluoride Release from Toothpastes Sold in Brazil Simulating Brushing Time. *Caries Res* 2017;51:370. Abstract 176.

Rølla G, Ogaard B, Cruz Rde A. Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int Dent J*. 1991Jun;41(3):171-4.

Saxer UP, Barbakow J, Yankell SL. New studies on estimated and actual toothbrushing times and dentifrice use. *J Clin Dent*. 1998; 9(2):49-51.

Silva MVS e Pereira RG. Comportamento reológico de formulações para dentifrícios. Universidade Federal Fluminense, Departamento de Engenharia Mecânica. 2000.

Stookey GK. Are all fluoride dentifrices the same? In: Wei SHY, editor. *Clinical uses of fluorides*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1985:105-131.

ten Cate JM: Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:461–465

Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:108-24.

Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res*. 2009;43(4):278-85.

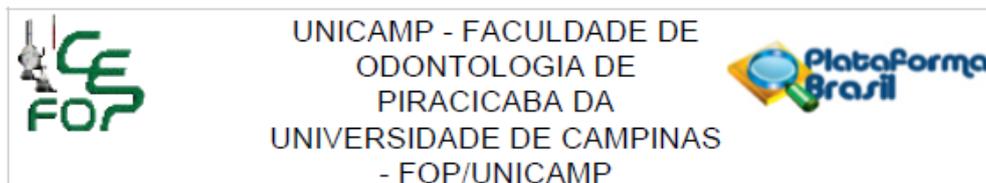
Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2019;(1):CD007868.

Zamataro CB, Tenuta LM, Cury JA. Low-fluoride dentifrice and the effect of post-brushing rinsing on fluoride availability in saliva. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2008 Jun;9(2):90-3.

Zanetti BG, Soldi V e Lemos-Senna E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. Rev. Bras. Cienc. Farm. [online]. 2002, vol.38, n.2, pp.229-236.

Zero DT, Raubertas RF, Pedersen AM, Fu J, Hayes AL, Featherstone JD: Studies of fluoride retention by oral soft tissues after the application of home-use topical fluorides. J Dent Res 1992; 71: 1546–1552.

## ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Liberação in vitro do fluoreto de formulações de dentifrícios como um preditor de biodisponibilidade durante e após a escovação dental

**Pesquisador:** Jaime Aparecido Cury

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19842819.0.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.595.034

#### Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil

**Delineamento da pesquisa:** Será conduzido um estudo "in vivo" do tipo cruzado e cego de 4 fases. Doze voluntários (número a ser definido por cálculo de amostras com base nos resultados obtidos em estudo piloto), com boa saúde bucal e fluxo salivar normal, serão submetidos aos seguintes grupos experimentais: 1 – Sorriso Dentes Brancos (MFP/CaCO<sub>3</sub>); 2 – Close Up Triple (MFP/CaCO<sub>3</sub>); 3 – Tandy (NaF/SiO<sub>2</sub>); 4 – Close Up Ação Profunda (NaF/SiO<sub>2</sub>). Em cada fase, amostras de saliva não estimulada serão coletadas antes da escovação.

**Critérios de inclusão:** voluntários deverão ser maiores de 18 anos e deverão ter boa saúde bucal.

**Critérios de exclusão:** se não apresentar fluxo salivar normal; faça uso de medicamentos que alterem o fluxo salivar; e que não puderem comparecer nos horários previamente agendados ao laboratório de bioquímica da FOP/UNICAMP.

**METODOLOGIA:** Participação 12 voluntários (número estimado de voluntários, a ser confirmado por

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903  
 UF: SP Município: PIRACICABA  
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br

## ANEXO 2 – RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

### Dissertação Mateus Xavier de Queiroz

#### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>8%</b>	<b>7%</b>	<b>2%</b>	<b>%</b>
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

#### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>3%</b>
<b>2</b>	<b>sbpqo.org.br</b> Fonte da Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>www.yumpu.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.rbpfex.com.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>repositorio.ufpa.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>"66th ORCA Congress. Cartagena, Colombia, 3-6 July, 2019", Caries Research, 2019</b> Publicação	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>Antônio Pedro Ricomini Filho, Livia Maria Andaló Tenuta, Frederico Silva de Freitas Fernandes, Ana Flávia Bissoto Calvo et al. "Fluoride concentration in the top-selling Brazilian toothpastes purchased at different</b>	<b>&lt;1%</b>