



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

VITÓRIA BITTENCOURT DE AGUIAR

**Avaliação da citotoxicidade de soluções contendo
ciclofosfatos**

Araçatuba-SP

2024

VITÓRIA BITTENCOURT DE AGUIAR

**Avaliação da citotoxicidade de soluções contendo
ciclofosfatos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessan

Araçatuba-SP

2024

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, meu irmão, meus avós, tias e tios e primos, com muito amor e gratidão por toda ajuda e apoio que tiveram comigo durante esse processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho na graduação, me manter firme durante o processo e me guiar para cada caminho que escolhi;

Aos meus pais Silvia e Riberto por serem meus alicerces, fonte de amor e incentivo, que me deram a oportunidade de viver tudo isso nesses 6 anos, estiveram sempre ao meu lado e que não mediram esforços para eu conseguir concluir a graduação; Ao meu irmão Alex que também nunca negou apoio e ajuda quando precisei e sempre foi referência de amor e carinho. Estaremos juntos sempre!

Destaco ainda, gratidão aos meus tios e tias Fatima, José Carlos, Silvania e Luis, minhas primas Bruna e Gabriela e meus avós Antônia, José, Maria e Odair por todo amor e cuidado que tem por mim, eles que nunca negaram apoio e ajuda durante esses anos, para que eu conseguisse viver bem fora de casa e conseguisse me formar sabendo que fariam qualquer coisa que fosse possível por mim;

Um agradecimento também a todos meus amigos de Neves Paulista e Araçatuba, em especial: Gabi, que dividiu a casa comigo durante 4 anos, dividiu também experiências, conversas, risadas, companheirismo, foi além da amizade, foi uma família construída. À Isabela e Tielly que também me acompanharam de perto nessa jornada, com muitos momentos felizes, de ajuda, conversas e estiveram presentes sempre que precisei. Elas que tornaram essa jornada mais leve, estiveram comigo em todos os momentos, compartilharam experiências e conseguimos passar por tudo juntas;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra;

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Por fim, agradeço à todos os meus professores por toda experiência e conhecimento que foi me dado, em especial, minha orientadora Prof. Thayse Yumi Hosida pela oportunidade de conhecer e trabalhar na área da pesquisa, por toda a orientação que foi me dada e pela inspiração como profissional que me proporciona na odontopediatria; Ao Prof. Marcos Rogério Mendonça que é exemplo de profissional, uma pessoa ímpar, que inspira a todos com sua didática e simpatia e

me fez ter uma enorme admiração pela ortodontia; Ao Doutorando Leonardo Antônio de Moraes que não mediu esforços para me ajudar e esteve presente em muitos momentos dessa jornada, obrigada por toda paciência e carinho!

RESUMO

AGUIAR, V. B. **Avaliação da citotoxicidade de soluções contendo ciclofosfatos.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

A perda de tecido causado pela cárie dentária ou por traumas incentivam pesquisas na área da engenharia tecidual, com biomateriais, na intenção de regenerar a estrutura e reestabelecer forma e função. Esse estudo avaliou a viabilidade celular de soluções de trimetafosfato de sódio (TMP), hexametafosfato de sódio (HMP) e glicerofosfato de cálcio (CaGP). Fibroblastos (NIH/3T3) foram cultivados em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, 100% de umidade e 5% CO₂. As células foram subsequentemente semeadas em placas de 96 poços (10⁴ células/poço) e incubadas por 24 h. Após, diferentes diluições das soluções de TMP, HMP e CaGP (10%) foram aplicadas nas células, sendo estas: não diluída, 1/2 diluição, 1/4 diluição, 1/8 diluição, 1/16 diluição, 1/32 diluição, 1/64 diluição e 1/128 diluição. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), após 24 e 48 horas. Os resultados foram submetidos à ANOVA a dois critérios, seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A diluição 1/64 e 1/128 de HMP apresentou maior viabilidade celular quando comparado às demais diluições ($p < 0,05$), independentemente do período avaliado. Diferente do HMP, o TMP mostrou maior viabilidade celular a partir da diluição 1/8 independentemente do período avaliado ($p < 0,05$). Com relação ao CaGP houve um aumento da viabilidade celular a partir da diluição 1/8 no período de 24 horas ($p < 0,05$). Conclui-se que o TMP e o CaGP apresentam menor citotoxicidade em maiores diluições, podendo ser um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

Palavras-chave: fosfatos; fibroblastos; células.

ABSTRACT

AGUIAR, V. B. **Evaluation of the cytotoxicity of solutions containing cyclophosphates**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Tissue loss caused by dental caries or trauma encourages research in tissue engineering with biomaterials, with the intention of regenerating structure and reestablishing form and function. This study evaluated the cell viability of sodium trimetaphosphate (TMP), sodium hexametaphosphate (HMP) and calcium glycerophosphate (CaGP) solutions. Fibroblasts (NIH/3T3) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C, 100% humidity and 5% CO₂. Cells were subsequently seeded into 96- well plates (10⁴ cells/well) and incubated for 24 h. Afterwards, different dilutions of TMP, HMP and CaGP solutions (10%) were applied to the cells, these being: undiluted, 1/2 dilution, 1/4 dilution, 1/8 dilution, 1/16 dilution, 1/32 dilution, 1/64 dilution and 1/128 dilution. Cell viability was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24 and 48 hours. The results were submitted to two-way ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). All assays were performed in triplicate. The 1/64 and 1/128 dilutions of HMP showed higher cell viability when compared to the other dilutions ($p < 0.05$), regardless of the period evaluated. Unlike HMP, TMP showed greater cell viability from the 1/8 dilution, regardless of the period evaluated ($p < 0.05$). Regarding CaGP, there was an increase in cell viability from the 1/8 dilution in the 24-hour period ($p < 0.05$). It is concluded that TMP and CaGP have lower cytotoxicity at higher dilutions and may be an interesting compound for the development of new biomaterials.

Keywords: phosphates; fibroblasts; cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT no período de 24 horas	16
Figura 2 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT no período de 48 horas	17

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
Ca	Cálcio
CaGP	Glicerofosfato de cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de cultura celular Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
F	Flúor
F/mL	Flúor por mililitro
F/TMP	Flúor e Trimetafosfato de sódio
FBS	Soro fetal bovino
g	gramas
HMP	Hexametafosfato de sódio
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
nm	Nanômetro
P	Fósforo
Ppm	Partes por milhão
TMP	Trimetafosfato de sódio
uL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	13
3 MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 Preparação das soluções	14
3.2 Avaliação da viabilidade celular	14
3.3 Análise estatística	14
4 RESULTADOS	16
4.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio MTT	16
5 DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pode-se observar um declínio na prevalência de cárie dentária no mundo todo, sendo a utilização de veículos fluoretados uma das principais justificativas para este padrão (Frencken *et al.*, 2017). Fortes evidências demonstram o efeito de produtos contendo F sobre o controle desta doença (Marinho *et al.* 2015, 2016; Walsh *et al.*, 2019), em especial, dos dentifrícios fluoretados, sendo este considerado como o melhor método não profissional para o seu controle, visto que associa a remoção ou desorganização periódica do biofilme dental com as propriedades cariostáticas do F (Pessan *et al.*, 2006; Tenuta *et al.*, 2009). Neste sentido, medidas que visem a aumentar os reservatórios iônicos intrabuciais devem estar fundamentadas em estudos que avaliam a capacidade destes íons em permanecer por um longo período de tempo no biofilme dental. Dentre as estratégias disponíveis, a suplementação de veículos fluoretados com sais de fosfato tem sido uma possibilidade para se aumentar a efetividade do F, uma vez que estes parecem agir como uma barreira parcial aos ácidos bacterianos devido a sua afinidade com a superfície do esmalte (Camara *et al.*, 2014).

Os fosfatos são geralmente classificados como ciclofosfatos, polifosfatos ou fosfatos inorgânicos ramificados. Os polifosfatos têm a fórmula geral $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ com os íons fósforo dispostos em cadeias lineares. Estes fosfatos são nomeados segundo a quantidade de fósforos, como por exemplo, tripolifosfatos, tetrapolifosfatos, etc, embora o mono- e di- fosfatos ainda seja chamado de ortofosfato e pirofosfato, respectivamente. Os ciclofosfatos (chamados de metafosfatos) tem a composição representada pela fórmula $(MPO_3)_n$ (Greenfield; Clift, 1975; Kulaev; Vagabov; Kulakovskaya, 2005). Até a pouco, apenas o ciclotrifosfato (trimetafosfato de sódio – TMP) e o ciclohexafosfato (hexametafosfato de sódio - HMP) foram empregados em processos de mineralização (Schröder; Müller, 1999, Kulaev; Vagabov; Kulakovskaya, 2005).

O trimetafosfato (TMP) é o ciclofosfato mais estudado para aplicações odontológicas (Manna *et al.*, 2014) devido a sua ação anticárie (Gonzalez, 1971; Danelon *et al.*, 2013) por intermédio da adsorção do ciclofosfato na superfície do esmalte dentário (Manarelli *et al.*, 2014), o qual facilita a difusão de cátions para o esmalte dentário (Delbem *et al.*, 2012). Recente estudo mostrou que o tratamento da

dentina com TMP leva a precipitação de apatita na superfície e interior dos túbulos dentinários aumentando o conteúdo mineral da dentina (Favretto *et al.*, 2018). A utilização de fosfatos deixa a superfície do substrato com maior quantidade de sítios doadores de elétrons propiciando uma maior adsorção de fosfato de cálcio na superfície (Neves *et al.*, 2018). A adesão celular também é influenciada pela interação eletrostática com a superfície dos biomateriais e está relacionada com os componentes polar da energia livre de superfície já que maiores valores de sítios doadores de elétrons leva a maior adesão celular (Harnett; Alderman; Wood, 2007).

Também há relatos de estudos *in vitro* que mostraram que dentifrícios com concentração reduzida de F suplementados com hexametáfosfato de sódio (HMP) apresentaram efeito semelhante ao de um dentifrício convencional (1100 ppm F) sobre a desmineralização do esmalte (Camara *et al.*, 2014). Os efeitos da associação do HMP e F dependem da proporção molar entre estes compostos (Camara *et al.*, 2015, 2016), de forma que a concentração ideal de HMP a ser utilizada é de 1% em formulações de dentifrício contendo 1100 ppm F (Camara *et al.*, 2015, 2016). Quanto aos efeitos sobre o biofilme dental, demonstrou-se que a associação de 1% de HMP a 1100 ppm de F promoveu a menor retenção de Ca e maior retenção de F quando comparado ao grupo controle (1100 ppm F), enquanto os valores para P foram semelhantes entre os tratamentos. Em acréscimo, esta associação promoveu uma redução significativa na concentração de polissacarídeos extracelulares comparado ao controle negativo (placebo), porém não diferenciou estatisticamente do grupo tratado com 1100 ppm F (Camara *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* e *in situ* demonstraram ainda, que dentifrícios com concentração reduzida de F suplementados com glicerofosfato de cálcio (CaGP) apresentam efeito semelhante à de um dentifrício convencional (1.100 ppm F) sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dental (Amaral *et al.*, 2013; Zaze *et al.*, 2014a, 2014b). Tais achados foram confirmados em um estudo clínico randomizado controlado, no qual a progressão de cárie em dentes decíduos foi semelhante em crianças que utilizaram um dentifrício contendo 500 ppm F e CaGP em comparação a crianças utilizando uma formulação convencional contendo 1100 ppm F (Freire *et al.*, 2016). Em relação aos efeitos do CaGP sobre o biofilme dental, estudo *in situ* observou que este fosfato orgânico com 500 ppm F não aumenta a concentração de Ca no fluído do biofilme (Nagata *et al.*, 2017) e outro observou que

não houve diferença entre a composição inorgânica da placa que recebeu CaGP-F e 1100 ppm F (Amaral *et al.*, 2013). Em uma revisão de literatura sobre os efeitos anti-cárie deste polifosfato concluiu que a elevação dos níveis de Ca na placa é a explicação mais provável para o potencial anti-cárie do CaGP (Lynch, 2004).

Diante do exposto, os fosfatos supracitados mostram potencializar o efeito anticárie do fluoreto presente em produtos odontológicos comumente utilizados. Apesar do estudo *in vivo* mostrar que a concentração de 10% de TMP e HMP apresentam toxicidade crônica (Lanigan, 2001) e as concentrações utilizadas nos estudos seja menor de 10%, é de extrema importância avaliar a citotoxicidade de soluções a partir destes fosfatos, visto que não há estudos na literatura que avalia a citotoxicidade dos mesmos sendo que, quando incorporados nos produtos fluoretados, esses materiais apresentam íntimo contato com os tecidos da cavidade bucal.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi analisar viabilidade celular de fibroblastos após exposição de soluções contendo trimetafosfato de sódio (TMP), hexametafosfato de sódio (HMP) e glicerofosfato de cálcio (CaGP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das soluções

As soluções experimentais à base de hexametáfosfato de sódio (HMP), trimetáfosfato de sódio (TMP) e glicerofosfato de cálcio (CaGP) foram produzidas pela mistura do pó desses materiais com meio de cultura DMEM, ambos pesados e preparados na proporção de 1:10 pó para água.

3.2 Avaliação da viabilidade celular

As células de fibroblastos da linhagem NIH/3T3 foram cultivados sob condições de cultura de células padrão em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina, a 37 °C, 100% de umidade, 95% de ar e 5% CO₂. As células foram subsequentemente semeadas em placas de 96 poços (10⁴ células / poço) e incubadas por 24 h em condições de cultura de células padrão para permitir que as células aderissem antes de adicionar as soluções. Após, várias diluições das soluções de TMP, HMP e CaGP (10%) foram aplicadas nas células, sendo: não diluída, ½ diluição, ¼ diluição, 1/8 diluição, 1/16 diluição, 1/32 diluição, 1/64 diluição e 1/128 diluição. A viabilidade celular será avaliada pelo ensaio do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT), após 24, 48 horas. Após esses tempos, foram retirados o meio de cultura e as diluições das soluções de cada poço e adicionados em cada poço 100µL de solução de MTT (0,5 mg / mL) em DMEM sem SFB (1:10). A solução de MTT foi removida após 4 horas de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 µL de álcool isopropílico. A placa foi deixada em temperatura ambiente, em uma câmara escura por 30 minutos sob um agitador rotativo. A absorvância das placas foi avaliada a 570 nm usando um leitor Elisa (Expert 96, Asys Hitch, Ec Austria).

3.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) (p<0,05). O experimento foi realizado em triplicata,

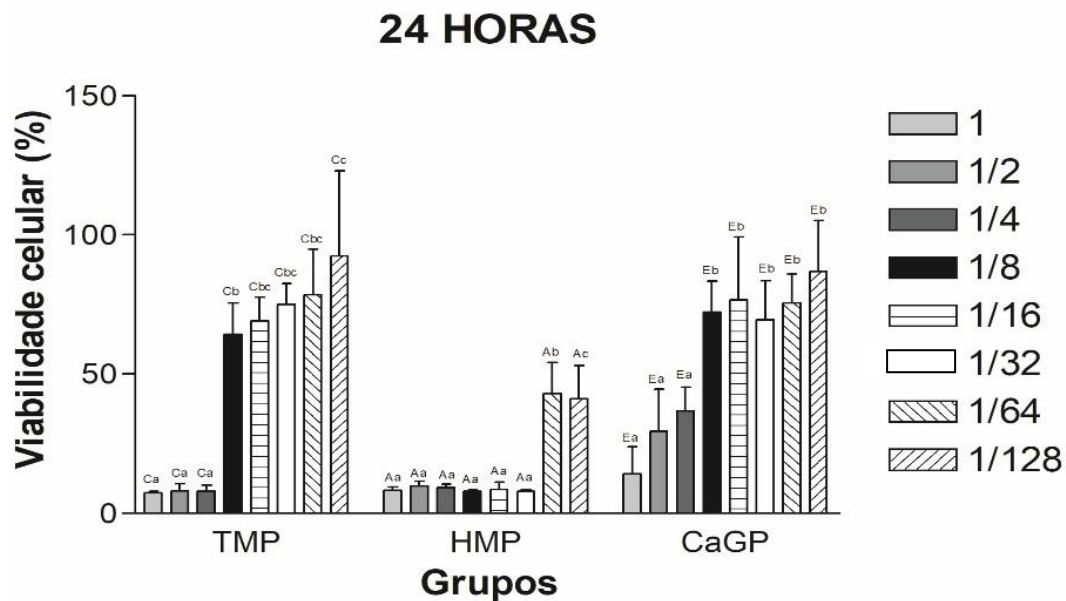
em três momentos diferentes. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro - Wilk, seguido por ANOVA bidirecional a dois critérios, seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls (Software SigmaPlot 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). A análise foi realizada com um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio MTT

A diluição 1/64 e 1/128 de TMP apresentou maior viabilidade celular quando comparado às demais diluições ($p < 0,05$), independentemente do período avaliado. Diferente do HMP, o TMP mostrou maior viabilidade celular a partir da diluição 1/8 independentemente do período avaliado ($p < 0,05$). Com relação ao CaGP houve um aumento da viabilidade celular a partir da diluição 1/8 no período de 24 horas ($p < 0,05$).

Figura 1 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT no período de 24 horas

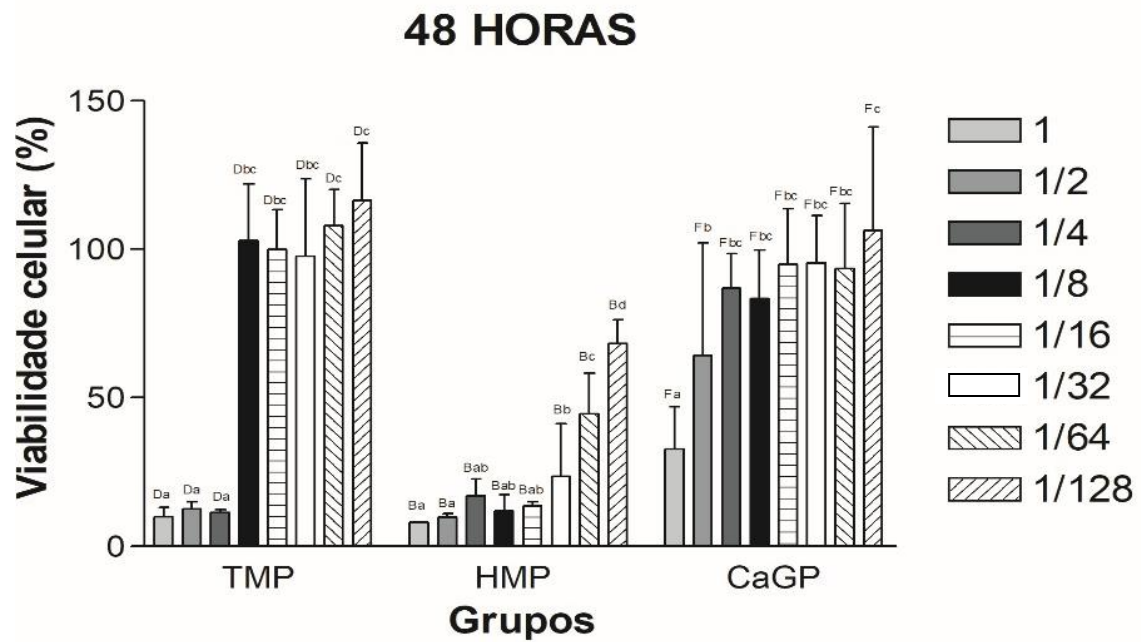


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Letra maiúscula: comparação entre os materiais e tempo em cada %.

Letra minúscula: comparação entre as porcentagens em cada tempo e material

Figura 2 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT no período de 48 horas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Letra maiúscula: comparação entre os materiais e tempo em cada %.

Letra minúscula: comparação entre as porcentagens em cada tempo e material.

5 DISCUSSÃO

O avanço tecnológico tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novos biomateriais para o tratamento e recuperações de lesões ocasionadas por traumas e doenças degenerativas (O'Brien, 2011; Haggerty; Oudega, 2013; Zadpoor, 2013). No campo da odontologia, o foco tem sido o combate à doença cárie (Gu *et al.*, 2010) uma doença relacionada à desmineralização da estrutura dura do dente (esmalte e dentina). Os ciclofosfatos possuem a capacidade de modificar a superfície da hidroxiapatita, através de sua adsorção, podendo desta forma, reduzir a dissolução do esmalte dentário. O presente estudo avaliou a citotoxicidade de três ciclofosfatos (HMP, TMP e CaGP) mostrando que o TMP e o CaGP apresentaram menor citotoxicidade em maiores diluições, podendo ser um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

Houve uma redução para todos os fosfatos nas primeiras diluições independente do tempo. O TMP se mostrou menos citotóxico principalmente na diluição de 1/28, sendo maior no tempo de 48 horas. O HMP foi o fosfato que se mostrou com maior citotoxicidade em relação aos outros fosfatos, independente do tempo. O CaGP foi composto que se mostrou menos citotóxico, principalmente no tempo de 48 horas. Como se trata de soluções, as primeiras diluições são as mais concentradas e neste estudo foi possível observar uma precipitação dos fosfatos nas primeiras diluições. Isso pode ter ocasionado morte celular devido a presença do precipitado no meio ou mesmo pela alta concentração dos fosfatos.

Favretto *et al.* (2018) mostrou que o tratamento da dentina com TMP leva a precipitação de apatita na superfície e interior dos túbulos dentinários aumentando o conteúdo mineral da dentina. A utilização de fosfatos deixa a superfície do substrato com maior quantidade de sítios doadores de elétrons propiciando uma maior adsorção de fosfato de cálcio na superfície (Neves *et al.*, 2018). A adesão celular também é influenciada pela interação eletrostática com a superfície dos biomateriais e está relacionada com os componentes polar da energia livre de superfície já que maiores valores de sítios doadores de elétrons leva a maior adesão celular (Harnett; Alderman; Wood, 2007). Dentre os fosfatos o TMP foi o que se mostrou menos citotóxico em relação aos outros ciclofosfatos e esse resultado se deve justamente

pelo seu efeito anti-cárie que facilita a difusão de cátions (Delbem *et al.*, 2012) para o meio induzindo adesão celular.

O HMP apresenta grande afinidade por íons metálicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Al^+ , Fe^{3+}), formando complexos iônicos (Changgen; Yongxin 1983; Choi; Wen; Smith, 1993; Kura; Ohashi; Kura, 1984). Esta propriedade permite que este fosfato se ligue ao Ca^{2+} e Mg^{2+} da parede celular dos microrganismos, aumentando assim a permeabilidade das células, o que está relacionado à atividade antimicrobiana do HMP. A capacidade do HMP de formar complexos com cátions, como Ca^{2+} , pode ter alterado o pH do meio influenciando a atividade metabólica e a viabilidade das células.

Em uma revisão de literatura sobre os efeitos anti-cárie do CaGP, concluiu que a elevação dos níveis de Ca na placa é a explicação mais provável para o potencial anti-cárie do CaGP (Lynch, 2004), ou seja, o CaGP, devido a sua atividade anti-cárie, ele consegue aumentar os níveis de cálcio no meio. Essa maior quantidade disponível de cálcio, tende a ter um aumento do pH deixando esse meio mais básico ou alcalino o que pode ter estimulado uma maior proliferação dessas células de acordo com o tempo.

Apesar dos resultados citotóxicos serem promissores mais estudos ainda se fazem necessários para melhor avaliar a ação remineralizadora e citotóxica desses compostos como a utilização de testes mais precisos e amplos avaliando melhor o composto HMP e também outros componentes.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o TMP e o CaGP apresenta menor citotoxicidade em maiores diluições, podendo ser um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. G. *et al.* Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization in situ. **Am. J. Dent.**, v. 26, n. 2, p. 75-80, 2013.
- CAMARA, D. M. *et al.* Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. **J. Dent.**, v. 42, n. 3, p. 256-262, 2014.
- CAMARA, D. M. *et al.* Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. **Clin. Oral Invest.**, v. 20, n. 8, p. 1981-1985, 2016.
- CAMARA, D. M. *et al.* Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. **J. Dent.**, v. 43, n. 10, p. 1249-1254, 2015.
- CHANGGEN, L.; YONGXIN, L. Selective flotation of scheelite from calcium minerals with sodium oleate as a collector and phosphates as modifiers. II. The mechanism of the interaction between phosphate modifiers and minerals. **Int. J. Miner. Process**, v. 10, p. 219–235, 1983.
- CHOI, I. K.; WEN, W. W.; SMITH, R. W. The effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. **Miner. Eng.**, v. 6, p. 1191–1197, 1993.
- DANELON, M. *et al.* In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. **Am. J. Dent.**, v.26, n. 1, p. 15-20, 2013.
- DELBEM, A. C. B. *et al.* Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 20, n. 1, p. 94-98, 2012.
- FAVRETTO, C. O. *et al.* Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. **Clin. Oral Invest.**, v. 22, n. 9, p. 3021-3029, 2018.
- FREIRE, I. R. *et al.* Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: a randomized, controlled trial. **J. Dent.**, v. 50, p. 37-42, 2016.
- FRENCKEN, J. E. *et al.* Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 44, p. 94–105, 2017.

GONZALEZ, M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. **J. Dent. Res.**, v. 50, n. 5, p. 1056-1064, 1971.

GREENFIELD, S.; CLIFT, M. General properties of the condensed phosphates. *In*: BELCHER, R.; FREISER, H. (Ed.). **Analytical chemistry of the condensed phosphates**. San Diego: Elsevier, 1975. p. 1-36.

GU, L. S. *et al.* A chemical phosphorylation-inspired design for type I collagen biomimetic remineralization. **Dent. Mater.**, v. 26, p. 1077-1089, 2010.

HAGGERTY, A. E.; OUDEGA, M. Biomaterials for spinal cord repair, **Neurosci. Bull.**, v. 29, p. 445-59, 2013.

HARNETT, E. M.; ALDERMAN, J.; WOOD, T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 55, n. 1, p. 90-97, 2007.

KULAEV, I.; VAGABOV, V.; KULAKOVSKAYA, T. **The biochemistry of inorganic polyphosphates**. 2. ed. Newark: John Wiley & Sons, 2005.

KURA, G.; OHASHI, S.; KURA, S. Complex formation of cyclic phosphate anions with bivalent cations. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v. 36, p. 1605–1609, 1974.

LANIGAN, R. S. Final report on the safety assessment of sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, and sodium hexametaphosphate. **Int. J. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 75-89, 2001.

LYNCH, R. M. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. **Int. Dent. J.**, v. 54, p. 310-314, 2004.

MANARELLI, M. M. *et al.* In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. **Caries Res.**, v. 48, n. 4, p. 299-305, 2014.

MANNA, C. M. *et al.* Facile synthesis of mononuclear early transition-metal complexes of κ^3 cyclo-tetrametaphosphate ($[P_4O_{12}]^{4-}$) and cyclo-trimetaphosphate ($[P_3O_9]^{3-}$). **Dalton Trans.**, v. 43, n. 4, p. 1509-1518, 2014.

MARINHO, V. C. *et al.* Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, 2015.

MARINHO, V. C. *et al.* Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 7. N. 7, p. CD002284, 2016.

NAGATA, M. E. *et al.* Fluoride and calcium concentrations in the biofilm fluid after use of fluoridated dentifrices supplemented with polyphosphate salts. **Clin. Oral Investig.**, v. 21, n. 3, p. 831-837, 2017.

NEVES, J. G. *et al.* Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. **Arch. Oral Biol.**, v. 90, p. 108-112, 2018.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering. **Mater. Today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

PESSAN, J. P. *et al.* Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. **Eur. J. Oral Sci**, v. 114, n. 6, p. 489-493, 2006.

SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E.G. **Inorganic polyphosphates**: biochemistry, biology, biotechnology. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.

TENUTA, L. M. A. *et al.* Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 43, n. 4, p. 278-285, 2009.

WALSH, T. *et al.* Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 3, n. 3, p. CD007868, 2019.

ZADPOOR, A. A. The evolution of biomaterials research. **Mater.s Today**, v. 16, p. 408-409, 2013.

ZAZE, A. C. *et al.* In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. **J. Dent.**, v. 42, n. 12, p. 1621-1625, 2014a.

ZAZE, A. C. *et al.* The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. **Clin. Oral Investig.**, v. 18, n. 6, p. 1619-1624, 2014b.