

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/04/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora
Programa de Pós-graduação em Ciências



DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Síntese de trimetafosfato de cálcio e seu efeito contra a erosão inicial, energia livre da superfície do esmalte e desenvolvimento de nova membrana para engenharia de tecidos periodontais: estudo *in vitro*

Aluna: Priscila Toninatto Alves de Toledo
Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientadora: Prof. Dra. Thayse Yumi Hosida

**Araçatuba – SP
2024**

Priscila Toninatto Alves de Toledo

**SÍNTESE DE TRIMETAFOSFATO DE CÁLCIO E SEU EFEITO
CONTRA A EROSÃO INICIAL, ENERGIA LIVRE DA SUPERFÍCIE DO
ESMALTE E DESENVOLVIMENTO DE NOVA MEMBRANA PARA
ENGENHARIA DE TECIDOS PERIODONTAIS: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para a defesa de tese para obtenção do título de Doutor em Ciência, área de concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientadora: Prof. Dra. Thayse Yumi Hosida

Araçatuba - SP
2024

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T649s Toledo, Priscila Toninatto Alves de.
Síntese de trimetafosfato de cálcio e seu efeito contra a erosão inicial, energia livre da superfície do esmalte e desenvolvimento de nova membrana para engenharia de tecidos periodontais: estudo in vitro / Priscila Toninatto Alves de Toledo. - Araçatuba, 2024
136 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientador: Prof. Thayse Yumi Hosida

1. Esmalte dentário 2. Fosfatos 3. Desmineralização
4. Dentifrícios 5. Engenharia tecidual 6. Nanofibras I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Priscila Toninatto Alves de Toledo

Nascimento

30. 11. 1993 – Palmeira D'Oeste – SP

Filiação

Luiz Carlos Alves de Toledo

Marilza Aparecida Toninatto de Toledo

2013/2017

Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba

2018/2020

Desenvolvimento de Projeto de Mestrado, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2020/2024

Desenvolvimento de Projeto de Doutorado, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2022/2023

Desenvolvimento de Projeto pelo CAPES PrInt como Doutorado Sanduíche, com auxílio 88887.685444/2022-00 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, na Universidade de Michigan, Ann Arbor, USA, sob supervisão do professor Marco Cícero Bottino.

Associações

CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Comissão Examinadora

DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem – Orientador, Professor Titular do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP.

Prof. Dra. Cristiane Duque - Professora Associada do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP.

Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan - Professor Associado do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP.

Prof. Dra. Eliandra de Sousa Trichês - Professora Associada do Departamento de Ciência e Tecnologia – DCT da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dra. Mayra Frasson Paiva – Mestre e Doutora pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/FOA

SUPLENTES

Prof. Dra. Aimée Maria Guiotti – Professor Assistente Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP.

Prof. Dr. José Antônio Santos Souza – Professor na UNIBRASIL “Centro Universitário Autônomo do Brasil” – Fernandópolis/SP

Prof. Dra. Tamires Pereira Dutra – Pós-Doutoranda no Departamento de Periodontia e Medicina Oral na University of Michigan, Ann Arbor, MI

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Marilza** e **Luiz Carlos**, ao meu irmão **Guilherme**, a minha **vó Maria** e aos meus tios (**Osmair**, **Osvaldir**, **Marilde**, **Elaine** e **Isabel Cristina**) e primos (**Estela**, **Eitor**, **Eduardo**, **João Vitor** e **Gabriel**).

Obrigado pelo apoio, carinho, amor e dedicação para concretização do meu sonho. Dedico este trabalho principalmente para minha mãe, que me deixou fisicamente cedo, porém em pensamento, está comigo todos os dias. Vivo e luto por vocês e para vocês.

Amo vocês incondicionalmente.

Agradecimentos Especiais

A Deus e Nossa Senhora Aparecida,

Por serem meus guias, meus alicerces, por me concederem saúde e sabedoria para seguir em frente, protegendo meu caminho e abençoando minhas conquistas.

Ao meu irmão Guilherme,

Por ser meu companheiro em toda minha jornada até aqui, andando de mãos dadas sendo um só. Amo você!

A minha vó Maria,

Obrigada pelas orações e apoio. A senhora é minha segunda mãe e é o meu exemplo de garra e superação. Nunca esquecerei tudo o que a senhora fez por mim. Eu te amo eternamente.

A toda família,

Obrigada pela força, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Vocês são tudo para mim, obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Agradeço por todo apoio e suporte desde minha iniciação científica. Agradeço pelas oportunidades que o senhor me proporcionou profissionalmente e por todo conhecimento que adquiri. Sempre serei eternamente grata.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria,

Ao Professor Robson Frederico Cunha, pela oportunidade de estagiar na Bebê-Clínica, obrigada por transmitir toda sua experiência e conhecimento, ao Professor Juliano Pelim Pessan e professora Thayse Yumi Hosida por todo conhecimento compartilhado. Professora Cristiane Duque por ser um exemplo a ser seguido como pesquisadora. Sempre serei eternamente grata e uma admiradora do seu trabalho.

Aos meus amigos de pós graduação (Heitor, Renan, Igor, Francienne, Tamires, Leticia, Georgia, Mayra, Nayara, Marcelle, Gabriel, Ana Paula),

Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pela amizade que construímos, pelo conhecimento que me passaram. Levarei a amizade de vocês para sempre.

Ao Prof. Dr. Marco C. Bottino,

Sou grata pelo conhecimento que adquiri na Universidade de Michigan e em seu laboratório. No laboratório, conheci pessoas incríveis, aprendi mais do que imaginava e obtive novas oportunidades pelas quais serei eternamente grata.

Aos meus amigos de Ann Arbor,

Agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Levarei para sempre em meu coração Tamires, Marlon, Leticia, Renan, Jinping, Abdel, Yvonne, Juliana, Kj, Gabby, Caio, Tobias, João, Morgana, Joyce, Eliandra, Alexandre e Niki. A única certeza que tenho é que logo estaremos juntos, seja agora, amanhã ou daqui a 10 anos. Vocês foram muito especiais em minha vida.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Infantil e Social,

Luizinho, Mário e Marcel, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A seção de Pós-Graduação,

Cristiane, Lucas, Lilian e Valéria, muito obrigada por toda atenção e paciência.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Na pessoa dos professores: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo
Delbem Diretor e Prof. Titular Luciano Cintra, digníssimo Vice-Diretor.

**Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba-UNESP,**

Na pessoa do Coordenador Prof. Ass. Juliano Pelim Pessan.

Ao Frigorífico FRIBOI,

Pela permissão da coleta dos dentes bovinos.

**A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e
pelo programa CAPES-PrInt.**

Pela concessão de recursos a mim e a aluna de Iniciação
Científica Anna Julha de Souza Jesus.

Epígrafe

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

- *Marie Curie*

TOLEDO P.T.A. Síntese de trimetafosfato de cálcio e seu efeito contra a erosão inicial, energia livre da superfície do esmalte e desenvolvimento de nova membrana para engenharia de tecidos periodontais: estudo *in vitro*. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

Resumo Geral

O trabalho de tese foi dividido em 2 capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo sintetizar ciclotrifosfato (TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio (Ca^{2+}), avaliar *in vitro* a energia livre de superfície (γ_s) e o efeito na inibição da lesão erosiva inicial do esmalte. O segundo capítulo visou criar e avaliar nanofibras biodegradáveis à base de polímeros, contendo distintas concentrações de trimetafosfato de cálcio (CaTMP) para engenharia de tecidos periodontais. No primeiro capítulo, ciclotrifosfatos com substituição total do sódio pelo cálcio foram sintetizados e este biomaterial foi caracterizado morfológicamente por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Avaliou-se a energia livre de superfície através de um goniômetro utilizando três líquidos sonda: água deionizada, diiodometano e etilenoglicol. Blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm) foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a média de dureza de superfície (SH) do total de blocos e o intervalo de confiança entre 7 grupos de dentifrícios experimentais contendo 1% dos compostos: 100%NaTMP/0%CaTMP (NaTMP); 80%NaTMP/20%CaTMP (20CaTMP); 50%NaTMP/50%CaTMP (50CaTMP); 20%NaTMP/80%CaTMP (80CaTMP); 100%CaTMP/0%NaTMP (CaTMP). Como controle negativo, foi utilizado um dentifrício placebo e, como controle positivo, um dentifrício com 1100 ppm de F (NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Para análise do efeito protetor, os blocos de esmalte hígidos foram imersos em solução de dentifrícios com saliva humana por 2 horas (sob agitação), seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação). A porcentagem de variação da dureza superficial (%SH) foi calculada após o tratamento e os desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Além disso, os precipitados foram analisados por MEV. As variáveis foram submetidas à análise de variância de

medidas repetidas a dois critérios, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). No segundo capítulo, soluções de poli(éster ureia) (PEU) (5% p/v) contendo Ca-TMP (15%, 30%, 45% p/p) foram eletrofiadas em estruturas fibrosas. As fibras foram avaliadas por MEV, EDS, análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e ensaios mecânicos. A taxa de degradação, a taxa de inchaço e a liberação de cálcio também foram avaliadas. A interação célula/CaTMP e célula/scaffold foi avaliada usando células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) para viabilidade celular, adesão e atividade de fosfatase alcalina (ALP). Análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc ($\alpha = 0,05$) foram utilizados. Assim, o primeiro capítulo concluiu que o dentifrício contendo CaTMP apresentou o maior efeito protetor em comparação aos outros grupos ($p < 0,001$). O efeito protetor foi $100\% \text{CaTMP}/0\% \text{NaTMP} > 20\% \text{NaTMP}/80\% \text{CaTMP} > 50\% \text{NaTMP}/50\% \text{CaTMP} > 80\% \text{NaTMP}/20\% \text{CaTMP} > 1100 \text{ ppm F} > 100\% \text{NaTMP}/0\% \text{CaTMP} > \text{placebo}$ ($p < 0,05$). Todos os grupos formaram precipitados com camadas mais espessas ao utilizar qualquer concentração de CaTMP. Quanto maior a percentagem de CaTMP nos grupos, maior foi a adsorção de CaTMP e mais sítios doadores de elétrons na superfície do esmalte foram alcançados. No segundo capítulo, as membranas baseadas em PEU e PEU/CaTMP apresentaram diâmetros de fibra de 469 nm e 414–672 nm, respectivamente. A caracterização química atestou a incorporação de CaTMP nas fibras. A adição de CaTMP resultou em maior estabilidade de degradação e menor variação dimensional do que as fibras de PEU puras; no entanto, foram observadas características mecânicas semelhantes. O cálcio mínimo foi liberado após 21 dias de incubação em solução enriquecida com lipase. Os extratos de CaTMP aumentaram a viabilidade celular e a atividade de ALP, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os grupos de suporte. No geral, concluiu-se que os dentifrícios contendo CaTMP têm um efeito protetor superior na redução das lesões erosivas iniciais do esmalte e que o CaTMP foi efetivamente incorporado nas fibras de PEU, melhorando a estabilidade da membrana sem comprometer as propriedades morfológicas e sem promover função celular significativa.

Palavras-chaves: Esmalte dentário, Fosfatos, Desmineralização, Dentifrícios, Engenharia Tecidual, Nanofibras.

TOLEDO P.T.A. Synthesis of calcium trimetaphosphate and its effect against initial erosion, enamel surface free energy, and development of a new membrane for periodontal tissue engineering: an *in vitro* study. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

General Abstract

The thesis work was divided into 2 chapters. The first chapter aimed to synthesize cyclotriphosphate (TMP) with complete substitution of sodium by calcium (Ca^{2+}), to evaluate *in vitro* the surface free energy (γ_s) and the effect on inhibiting the initial erosive lesion of the enamel. The second chapter aimed to create and evaluate biodegradable nanofibers based on polymers containing different concentrations of calcium trimetaphosphate (CaTMP) for periodontal tissue engineering. In the first chapter, cyclotriphosphates with total substitution of sodium by calcium were synthesized, and this biomaterial was morphologically characterized by dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and scanning electron microscopy (SEM). The surface free energy was evaluated using a goniometer with three probe liquids: deionized water, diiodomethane, and ethylene glycol. Bovine enamel blocks (4 x 4 mm) were randomly distributed according to the average surface hardness (SH) of all blocks and the confidence interval among 7 experimental toothpaste groups containing 1% of the compounds: 100%NaTMP/0%CaTMP (NaTMP); 80%NaTMP/20%CaTMP (20CaTMP); 50%NaTMP/50%CaTMP (50CaTMP); 20%NaTMP/80%CaTMP (80CaTMP); 100%CaTMP/0%NaTMP (CaTMP). As a negative control, a placebo toothpaste was used, and as a positive control, a toothpaste with 1100 ppm F (NaF , Merck, CAS 7681-49-4, Germany) was used. For the analysis of the protective effect, the sound enamel blocks were immersed in a solution of toothpastes with human saliva once for 2 hours (under agitation), followed by 4 erosive challenges (citric acid, 0.75%, pH 3.5, for 1 minute, under agitation). The percentage of surface hardness variation (%SH) was calculated after the treatment and the acid challenges of 1, 2, 3, and 4 minutes. Additionally, the precipitates were analyzed by SEM. The variables were subjected to two-way repeated measures analysis of variance, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). In the second chapter, solutions of poly(ester

urea) (PEU) (5% w/v) containing Ca-TMP (15%, 30%, 45% w/w) were electrospun into fibrous structures. The fibers were evaluated by SEM, EDS, thermogravimetric analysis (TGA), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and mechanical tests. The degradation rate, swelling rate, and calcium release were also evaluated. The cell/CaTMP and cell/scaffold interaction were assessed using human exfoliated deciduous teeth stem cells (SHEDs) for cell viability, adhesion, and alkaline phosphatase activity (ALP). Analysis of variance (ANOVA) and post-hoc tests ($\alpha = 0.05$) were used. Thus, the first chapter concluded that the toothpaste containing CaTMP showed the highest protective effect compared to the other groups ($p < 0.001$). The protective effect was ranked as follows: 100%CaTMP/0%NaTMP > 20%NaTMP/80%CaTMP > 50%NaTMP/50%CaTMP > 80%NaTMP/20%CaTMP > 1100 ppm F > 100%NaTMP/0%CaTMP > placebo ($p < 0.05$). All groups formed precipitates with thicker layers when using any concentration of CaTMP. The higher the percentage of CaTMP in the groups, the greater the adsorption of CaTMP and more electron donor sites on the enamel surface were achieved. In the second chapter, the membranes based on PEU and PEU/CaTMP presented fiber diameters of 469 nm and 414–672 nm, respectively. Chemical characterization confirmed the incorporation of CaTMP into the fibers. The addition of CaTMP resulted in greater degradation stability and less dimensional variation than pure PEU fibers; however, similar mechanical properties were observed. Minimal calcium was released after 21 days of incubation in a lipase-enriched solution. The CaTMP extracts increased cell viability and ALP activity, although no significant differences were found between the support groups. Overall, it was concluded that toothpastes containing CaTMP have a superior protective effect in reducing initial erosive enamel lesions and that CaTMP was effectively incorporated into PEU fibers, improving the stability of the membrane without compromising morphological properties and without promoting significant cellular function.

Keywords: Tooth enamel, Phosphates, Demineralization, Dentifrices, Tissue Engineering, Nanofibers.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Table 1. Mean values (SD) of calcium (Ca), phosphorus (P), fluoride (F), and pH in the experimental groups.

Table 2. Mean values (SD) of the percentage of change in surface hardness (%SH) in enamel according to the groups and experimental conditions (n=12).

Table 3. Means of the surface (γ_s) and interaction (ΔG_{iwi}) free energy after treatment of enamel surface (n = 12).

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figure 1. (A) Enamel Block Preparation (B) Acquired pellicle formation (C) Treatment (D) Analysis of the percentage of surface hardness after erosion challenges (E) Analysis of the F, Ca and P Concentration Present in Toothpastes (F) SEM and EDS after treatment on enamel surface (G) Surface free energy analysis.

Figure 2. Scanning Electron Microscopy images of NaTMP (A) and CaTMP (B) samples. (C) Energy-dispersive X-ray spectroscopy of CaTMP Compound.

Figure 3. SEM images of a representative specimen in different groups and respective spectrum from EDX analysis: (A) Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 100%NaTMP /0%CaTMP, (D) 80%NaTMP/20%CaTMP, (E) 50%NaTMP/50%CaTMP (F) 80CaTMP/20%NaTMP and (G) 100CaTMP/0%NaTMP. White asterisks indicate sound enamel. Black asterisks indicate precipitated enamel formed after the treatments. Arrows indicate the limit between sound enamel and precipitated enamel formed after treatments.

Figure 4. (A) Surface free-energies and their components (γ_s^{LW} : Lifshitz-van der Waals surface tension component; γ_s^{AB} : Lewis acid-base interaction) with different enamel-surface treatments. (B) Influence of the treatments on the component polar of surface free energy on enamel surface: Lewis-acid (γ_s^+) and Lewis-base (γ_s^-). Values denote mean and standard deviation (n = 12). (C) The mean values of the apolar (ΔG_{iwi}^{LW}) and polar (ΔG_{iwi}^{AB}) components of the interaction free energy. Distinct letters show significant differences among the groups (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$). Asterisk means there is no significant difference between groups.

CAPÍTULO 2

Figure 1. Initial screening for Ca-TMP (10, 25, 50, 100, 150, and 200 μM) in contact with SHEDs. (A) Percentage of cell viability (AlamarBlue®) normalized by the negative control (NC) within each time point. Welch's ANOVA/Games–Howell; $\alpha = 5\%$. (B) Alkaline phosphatase (ALP) activity of SHEDs cells after 14 days. Data presented as mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA/Tukey; $\alpha = 5\%$. (C) Representative fluorescence images of SHEDs cells at days 1 and 3 stained by F-actin (ActinRed™ 555).

Figure 2. Evaluation of chemical–morphological membranes. (A–D) Scanning electron microscope (SEM) images, energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS—5000 $\times$ magnification), and histogram of fiber diameter of PEU (control), 5% PEU + 15% Ca-TMP, 5% PEU + 30% Ca-TMP, and 5% PEU + 45% Ca-TMP, respectively. (E) Fiber diameter, (F) scaffold porosity, and (G) swelling ratio evaluations (mean $\pm$ SD, $p < 0.05$).

Figure 3. Evaluation of chemical–morphological membranes. (A) Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra, (B) X-ray diffraction (XRD), (C) thermogravimetric analysis (TGA) of electrospun fibers, and (D) contact angle data presented as mean $\pm$ SD, and (E) images formed between water and the PEU- or PEU/Ca-TMP-based membranes containing different concentrations.

Figure 4. Mechanical characterization of membranes. Elongation at break (%), tensile strength (MPa), Young's modulus (MPa), yield stress (MPa), and yield strain (%) graphs of dry and wet PEU fibers loaded with Ca-TMP. Data presented as (mean $\pm$ SD). Two-way ANOVA/Tukey; $\alpha = 5\%$. Significant interaction between variables for yield stress (MPa) and yield strain (%), p -value = 0.0037 and 0.0004, respectively.

Figure 5. Membrane degradation and total calcium release quantification. (A) Degradation of electrospun membranes conditioned in PBS and lipase-enriched solutions over 91 days. Note the greater dimensional stability of the membranes even after 3 months of incubation. (B) Calcium ion release profile from the electrospun fibers immersed in a lipase-enriched solution derived over 21 days. Note the minimal calcium released from the fiber after 3 weeks of incubation. Data presented as (mean $\pm$ SD).

Figure 6. SHEDs cells and Ca-TMP electrospun membranes interaction. (A) Percentage of cell viability (AlamarBlue®) normalized by the PEU without Ca-TMP at day 1 value. Data presented as mean $\pm$ SD, $p < 0.05$. (B) Alkaline phosphatase (ALP) activity of SHEDs cells after 7 and 14 days. Repeated measures ANOVA/Sidak post-hoc; $\alpha = 5\%$. (C) Representative fluorescence images of SHED cells spread over the membranes at 1, 3, and 7 days stained by F-actin (ActinGreen™ 488).

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	20
-----------------------	----

CAPÍTULO 1

ABSTRACT.	25
INTRODUCTION.....	26
MATERIALS AND METHODS.....	27
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	40
CONCLUSION.....	43
REFERENCES.....	44

CAPÍTULO 2

ABSTRACT.....	50
INTRODUCTION.....	51
MATERIALS AND METHODS.....	52
RESULTS.....	59
DISCUSSION.....	69
CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	74
ANEXOS.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

A erosão dentária é caracterizada pela perda química da substância mineral do dente, causada pela exposição a ácidos não derivados de bactérias orais. O desgaste dentário erosivo, por sua vez, abrange a perda gradual da superfície mineralizada do dente devido a vários fatores físicos ou quimiofísicos, incluindo erosão dentária, atrito e abrasão (Jadeja et al., 2023; Schlueter et al., 2020). O desgaste erosivo dos dentes é cada vez mais reconhecido como uma condição comum na clínica dentária, com prevalência relatada variando entre 30 a 50% nos dentes decíduos e 20 a 45% nos dentes permanentes (Lussi et al., 2019). Portanto, é necessário estabelecer abordagens preventivas e terapêuticas efetivas, focadas na etiopatogenicidade da lesão. As medidas preventivas devem começar precocemente e envolver medidas causais, como orientações dietéticas, para reduzir a frequência e a severidade dos desafios erosivos (Magalhães et al., 2009; Buzalaf et al., 2012).

Estudos recentes mostraram que o trimetafosfato de sódio (NaTMP) reduz a erosão das estruturas dentárias quando associado ao fluoreto (200 a 1100 ppm F) (de Toledo PTA et al., 2022; Cruz et al., 2015; Danelon et al., 2018). A literatura indica que grupos aniônicos, a partir de fosfatos lineares, têm a capacidade de atrair íons cálcio, atuando como agentes nucleadores de cristais de apatita (Li e Chang, 2008; Leone et al., 2008). 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. Esses fosfatos são nomeados de acordo com a quantidade de fósforos, como por exemplo, tripolifosfatos e tetrapolifosfatos, embora o mono- e difosfatos ainda sejam chamados de ortofosfato e pirofosfato, respectivamente. Os ciclofosfatos (chamados de metafosfatos) têm a composição representada pela fórmula $(MPO_3)_n$ (Greenfield & Clift, 1975; Kulaev et al., 2005). Até recentemente, apenas o ciclotrifosfato (trimetafosfato de sódio – TMP) e o ciclohexafosfato (hexametafosfato de sódio - HMP) foram empregados em processos de mineralização (Schröder & Müller, 1999; Kulaev et al., 2005).

A adição de fosfato cíclico a produtos fluoretados, como o NaTMP, demonstra que é possível aumentar o potencial anti-erosivo (de Toledo PTA et al., 2022; Danelon et al., 2018), pois o NaTMP atuaria bloqueando a difusão de ácido, reduzindo assim o amolecimento do esmalte em profundidade (Danelon et al., 2018). Entretanto, nenhum estudo analisou se a substituição do sódio pelo cálcio na molécula do TMP

resultaria em um composto com maior atividade contra a erosão dentária e uma maior energia livre de superfície, sem a necessidade de associação com fluoreto. Além disso, o TMP é um fosfato inorgânico cíclico e está presente nos fosfolipídios, o que pode resultar em interações diferenciadas com a superfície do esmalte. Considerando que o NaTMP e o CaTMP podem apresentar diferentes interações com a superfície do esmalte, é essencial avaliar suas interações em um ambiente rico em Ca^{2+} e PO_4^{3-} (simulando o ambiente salivar) para corroborar as evidências científicas que sustentam as hipóteses levantadas. Ademais, sabe-se que as propriedades superficiais de um substrato e sua interação com o meio podem ser analisadas utilizando a energia livre de superfície (γ_s) (Neves et al., 2018).

Ao contrário dos produtos exclusivamente fluoretados, que apresentam um efeito restrito à superfície, os ciclofosfatos também reduzem a perda mineral no interior do esmalte (Takeshita et al., 2011). A ação do TMP na proteção da hidroxiapatita (HA) ainda não está completamente compreendida, mas os resultados sugerem que o mecanismo está relacionado à adsorção do TMP na superfície do esmalte (Gonzalez et al., 1973; van Dijk et al., 1980), o que resulta em uma redução da troca iônica entre o esmalte e o meio bucal. O TMP se liga aos sítios de grupos hidroxila da HA (Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018), diminuindo a perda de cálcio e promovendo a cristalinidade da HA. A adsorção de TMP é influenciada pela presença de fluoreto, já que o aumento de sua concentração no meio reduz a adsorção do TMP na HA, sugerindo uma competição entre o fluoreto e o TMP pelo mesmo sítio de ligação na HA (Amaral et al., 2018). Portanto, a proporção molar TMP:F é crucial tanto na perda mineral do esmalte (Takeshita et al., 2009; Takeshita et al., 2011; Manarelli et al., 2011; Favretto et al., 2013; Souza et al., 2013; Amaral et al., 2018), quanto na formação de fluoreto de cálcio no esmalte. Esse efeito é importante para o controle do processo de cárie dentária, pois a ação anticárie dos produtos fluoretados está associada à deposição de fluoreto de cálcio no esmalte e sua dissolução durante os desafios cariogênicos (Magalhães et al., 2009; Delbem et al., 2010). A associação TMP/F aumenta a deposição de fluoreto fracamente ligado (fluoreto de cálcio) à HA e diminui o fluoreto fortemente ligado à HA (Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018).

De acordo com um estudo recente, o trimetafosfato de sódio (NaTMP) bloqueia a difusão de ácido, reduzindo o amolecimento do esmalte em profundidade (Danelon et al., 2018). Paralelamente, o NaTMP tem sido amplamente utilizado por sua

capacidade de melhorar as propriedades biológicas e mecânicas dos polímeros e pelos efeitos positivos do cálcio na mineralização óssea (Joglekar et al., 2020). A substituição dos íons sódio por íons cálcio poderia gerar um composto que combine as propriedades benéficas de ambos, TMP e cálcio, nos processos de mineralização. O NaTMP atua como um reticulador eficaz e não apresenta toxicidade em nenhuma concentração testada (Chaouat et al., 2008), além de potencializar locais de nucleação para a precipitação de apatita com fosfato de cálcio (Favretto et al., 2018), resultando em uma superfície mais aniônica (Oliveira et al., 2022; Nalin et al., 2021). Considerando a capacidade do NaTMP de melhorar as propriedades biológicas e mecânicas dos polímeros e os efeitos do cálcio na mineralização óssea, a substituição dos íons sódio por íons cálcio poderia criar um composto inovador para os processos de mineralização. Portanto, seria relevante sintetizar o trimetafosfato de cálcio para avaliar o impacto desta substituição no NaTMP em relação à erosão inicial do esmalte, à energia livre de superfície e nas estruturas nanofibras de PEU, permitindo investigar as propriedades mecânicas e biológicas dessas estruturas para a engenharia de tecidos periodontais.

Os resultados dos dois subprojetos estão apresentados na forma de dois capítulos:

Capítulo 1. Protective Potential of Calcium Cyclotriphosphate-Based Toothpaste Against Dental Enamel Erosion and Its Impact on Surface Free Energy. Artigo sendo preparado para publicação no periódico Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.

Capítulo 2. Calcium Trimetaphosphate-Loaded Electrospun Poly(Ester Urea) Nanofibers for Periodontal Tissue Engineering. Artigo publicado na revista Journal Functional Biomaterials. 2023 Jun 30;14(7):350. doi: 10.3390/jfb14070350.