



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

DALETE MOREIRA CRAVEIRO BASI

Efeito citotóxico e potencial de biomineralização de um novo ciclotrifosfato de cálcio

Araçatuba
2024

DALETE MOREIRA CRAVEIRO BASI

**Efeito citotóxico e potencial de biomineralização de um
novo ciclotrifosfato de cálcio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^a. Dra. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Prof. Dr. Caio Sampaio

Araçatuba
2024

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B311e Basi, Dalete Moreira Craveiro.
Efeito citotóxico e potencial de biomineralização de um
novo ciclotrifosfato de cálcio / Dalete Moreira Craveiro
Basi. -
Araçatuba, 2024
31 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Thayse Yumi Hosida
Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientador: Prof. Caio Sampaio

1. Fosfatos 2. Cálcio 3. Odontoblastos I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À Deus, antes de tudo, pois foi ELE quem me manteve até aqui, quem segurou minhas mãos e não me deixou desistir. Pois, tudo é por ELE, para ELE e por meio DELE, pelo dom da vida, pelas inúmeras bençãos recebidas e por ter me sustentado até aqui, pois sem ELE nada seria possível. Por sempre mostrar-me o melhor caminho e por ter colocado pessoas tão maravilhosas em minha vida. Espero cumprir sempre os seus propósitos.

Aos meus pais, Paulo e Nilda, pelo amor dedicado a mim, pelas orações, pela educação e valores cristãos que me tornaram um ser humano com dignidade e por ensinarem-me que não seria fácil e que sem persistência não chegaria a lugar algum.

Ao meu esposo Rogério, por me apoiar e incentivar quando eu precisava de uma palavra de encorajamento, por nunca medir esforços e por fazer o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço por sempre ter acreditado que este dia chegaria. A minha gratidão por todo empenho será eterna, e espero poder retribuir todos os dias.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus,

Por me amar tanto, a Ti toda honra.

Aos meus pais, Paulo e Nilda,

Carregarei sempre comigo seus exemplos e ensinamentos.

Aos meus irmãos: Jesiel, Jeseias e Damares,

Obrigada por tanto incentivo, pelas orações ao nosso Deus, por todo amor e carinho, por sempre acreditar em mim e por sempre estarem presentes quando eu precisei. Amo vocês.

À minha sobrinha Stephanny,

Por compreender-me e sempre falar palavras de incentivo, assim como aos demais sobrinhos, **Kalebe, Hadassa, Asafe, Eliabe, Felipe, Maria Eduarda, Alerrandro e Jhon Wesley**, por compreenderem a minha ausência, titia os ama muito.

Aos meus tios, Juranildo (*in memoriam*) e Elenice,

Embora passando um momento tão difícil em relação à saúde e precisarem tanto de mim naquele momento, mesmo assim davam-me o incentivo por sempre acreditarem que eu conseguiria e sempre incentivar-me a buscar o melhor para mim e a realizar meus sonhos. Vou levar os ensinamentos e exemplos de vocês por toda minha vida em meu coração.

À minha família,

Tios, tias, avós, por todo amor e apoio nessa minha jornada.

À minha orientadora,

Professora **Thayse Yumi Hosida**, por sempre se fazer presente, mesmo sendo tão difícil para ela, pois foi de forma remota e isto dificultou em muitos passos até este momento, mas sempre me incentivou e orientou a pensar no melhor a ser feito, por me apoiar e não desistir de ensinar-me a perseverar, por acreditar que eu fosse capaz,

e sempre proporcionar o necessário para que este projeto pudesse ser concluído, sem palavras.

Aos meus coorientadores,

Professor **Alberto Carlos Botazzo Delbem** e Professor **Caio Sampaio**, por me dar a oportunidade de iniciar carreira na área acadêmica. Por todo o suporte dado ao decorrer deste projeto, e disponibilidade para que ele fosse concluído.

Aos professores do departamento de Odontopediatria, Juliano Pelim Pessan, Cristiane Duque, Robson Frederico Cunha, Caio Sampaio e Thayse Yumi Hosida, por ter proporcionado o melhor aprendizado e oportunidades para que eu desempenhasse de forma proveitosa a pós-graduação.

Aos colaboradores do departamento: Marcel, Luiz e Mário,

Por zelarem pelo bom ambiente e funcionamento do laboratório, propiciando execução das atividades.

Aos meus amigos, Viviane, Matheus, Luigi, Leonardo e Jesse,

Por todo apoio e incentivo, por toda orientação e paciência. Que nossas conquistas possam ser compartilhadas e comemoradas juntos! Vocês foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

Aos meus amigos do departamento,

Agradeço por cada palavra, descontrações nos momentos de tensão, sorriso, ajuda e parceria. Serão sempre personagens especiais dessa etapa da minha vida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP,

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

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”,

Pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

À todos aqueles que,

De alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão!

Epígrafe

“A imaginação é mais importante que o conhecimento, porque o conhecimento é limitado, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

BASI, DMC. **Efeito citotóxico e potencial de biomineralização de um novo ciclotrifosfato de cálcio**. 2024. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba 2024.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar um novo ciclotrifosfato com substituição do íon sódio (Na^+) do trimetafosfato de sódio (NaTMP) por íons cálcio (Ca^{++}), e verificar seu efeito, citotóxico e potencial de biomineralização. O ciclotrifosfato contendo cálcio (CaTMP) foi sintetizado utilizando uma coluna para cromatografia e adição de solução contendo hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Em seguida, o CaTMP foi caracterizado morfológicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS). Células de linhagem MDPC-23 foram cultivadas em meio DMEM e expostas a diluições seriadas a partir da concentração 1% CaTMP e 5 % NaTMP (não diluída, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128 diluição) e determinada a citotoxicidade pelo ensaio de MTT por 24, 48 e 72h. Determinadas as concentrações com menor citotoxicidade, as MDPC-23 foram cultivadas em DMEM, durante 1 e 3 semanas e o potencial de biomineralização avaliado por coloração de vermelho de alizarina. Os resultados foram submetidos à ANOVA a dois critérios e o teste de Student Newman-Keuls para o MTT e ANOVA e o teste de Tukey para o vermelho de alizarina ($p < 0,05$). O processo de síntese por cromatografia levou à substituição total dos átomos de Na por átomos de Ca e as partículas apresentaram tamanho homogêneo. Nos tempos de 24h e 72h houve um aumento da viabilidade celular para todas as diluições do CaTMP quando comparado ao NaTMP, exceto para diluição 1/64 no tempo de 72h. Com relação ao potencial de mineralização, foi possível observar que na semana 1 (1S) que não houve diferença entre o controle e os grupos contendo NaTMP e CaTMP. Quando comparado a 1S e a 3S é possível observar um aumento dos valores na deposição de matriz mineralizada para todos os grupos, principalmente nas diluições 1/64 e 1/128 CaTMP. Conclui-se que o novo composto sintetizado, CaTMP, foi citocompatível e apresenta potencial de biomineralização.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Fosfatos, Cálcio, Odontoblasto.

BASI, DMC. **Cytotoxic effect and biomineralization potential of a new calcium cyclotriphosphate**. 2024. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba 2024.

ABSTRACT

The objective of this study was to synthesize and characterize a new cyclotriphosphate with replacement of the sodium ion (Na^+) of sodium trimetaphosphate (NaTMP) by calcium ions (Ca^{++}), and to verify its cytotoxic effect and biomineralization potential. The calcium cyclotriphosphate (CaTMP) was synthesized using a chromatography column and addition of a solution containing calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Next, CaTMP was characterized morphologically using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). MDPC-23 cell lines were cultivated in DMEM medium and exposed to serial dilutions starting from 1% CaTMP and 5% NaTMP (undiluted, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 and 1/128 dilution) and cytotoxicity was determined by the MTT assay for 24, 48 and 72h. Having determined the concentrations with the lowest cytotoxicity, MDPC-23 were cultivated in DMEM for 1 and 3 weeks and the biomineralization potential was assessed by alizarin red staining. The results were submitted to two-way ANOVA and the Student Newman-Keuls test for MTT and ANOVA and Tukey's test for alizarin red ($p < 0.05$). The chromatographic synthesis process led to the total replacement of Na atoms by Ca atoms and the particles presented a homogeneous size. At 24h and 72h there was an increase in cell viability for all dilutions of CaTMP when compared to NaTMP , except for dilution 1/64 at 72h. Regarding the mineralization potential, it was possible to observe that in week 1 (1S) there was no difference between the control and the groups containing NaTMP and CaTMP . When compared to 1S and 3S, it is possible to observe an increase in the values of mineralized matrix deposition for all groups, especially in the 1/64 and 1/128 CaTMP dilutions. It is concluded that the new synthesized compound, CaTMP , was cytocompatible and has biomineralization potential.

Keywords: Cytotoxicity, Phosphates, Calcium, Odontoblasts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A), CaTMP (C) e respectivos histogramas de EDS (B e D). NaTMP: trimetafosfato de sódio; CaTMP: ciclotrifosfato de cálcio; P: fósforo; Ca: cálcio; O: oxigênio. 16
- Figura 2** Viabilidade celular de odontoblastos (MDPC-23) determinada por um ensaio MTT nos periodos de 24, 48 e 72 horas. Letras maiúsculas: comparação entre o tempo em cada %. Letras minúsculas: comparação entre as diluições em cada tempo. 18
- Figura 3** Gráfico representativo dos valores médios do teste de vermelho de alizarina para células (MDPC-23) expostas ao NaTMP e CaTMP durante a semana 1 (1S) e semana 3 (3S). Letras maiúsculas: comparação entre o tempo em cada %. Letra minúscula: comparação entre as diluições em cada tempo. 19
- Figura 4** Painel de imagens representativas dos nódulos de mineralização referentes a semana 1. 20
- Figura 5** Painel de imagens representativas dos nódulos de mineralização referentes a semana 3. 20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS	24
8. ANEXOS	28
8.1. Anexo A	28
8.2. Anexo B	29
8.3. Anexo C	30

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das doenças bucais mais prevalentes no mundo, sendo definida como uma doença dinâmica, mediada por biofilme, modulada pela dieta, multifatorial e não transmissível, resultando em sucessivos ciclos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros dentais [Kassebaum et al., 2015; Machiulskiene et al., 2020]. Quando a desmineralização prevalece, a perda mineral leva à formação de uma lesão subsuperficial. À medida que esse processo evolui, a lesão pode progredir, comprometendo a integridade estrutural do esmalte (processo químico) até atingir a dentina. A cárie não tratada fornece uma via de entrada das bactérias para a polpa dentária, visto que os odontoblastos se apresentam justapostos em toda extensão da dentina e polpa dentária [Bleicher, 2014]. Os odontoblastos são células que surgem na fase mitótica, durante a divisão celular, são responsáveis pela estruturação das dentinas primária, secundária e terciária [Bleicher, 2013].

A prevenção e o tratamento das lesões de cárie dentária, principalmente em pacientes de alto risco, é um desafio constante na prática clínica. Nesse sentido, esforços têm sido direcionados na busca de avanços tecnológicos que promovam a remineralização das lesões cariosas, bem como prevenção da doença [Cummins, 2013]. Fortes evidências demonstram o efeito de produtos contendo F sobre o controle desta doença, em especial, os dentifrícios fluoretados, sendo este considerado como o melhor método não profissional para o controle da cárie dentária [Marinho et al., 2016; Walsh et al., 2019].

O íon flúor (F^-) tem seu efeito por meio da manutenção de sua concentração na saliva devido ao uso frequente dos dentifrícios, e pela formação de produtos da reação esmalte e dentina com o fluoreto, formando o mineral fluoreto de cálcio (CaF_2), que quando depositado no biofilme dental em lesões de cáries iniciais, é capaz de reduzir a sua progressão [Rolla, 1988]. Ainda que o fluoreto (F) proporcione uma maior mineralização da parte mais externa do substrato dentário, os produtos depositados na presença do F (fluoreto de cálcio, apatita fluoretada e fluorapatita) são altamente solúveis em pH abaixo de 4,5, limitando seu efeito contra os ácidos que promovem a desmineralização [Philip, 2019; Barbour et al., 2011]. Para superar a limitação descritas acima, ativos à base de fosfato têm sido estudados, associados ou não ao F.

Grupos aniônicos, como os fosfatos, têm a capacidade de atrair íons cálcio

e, conseqüentemente, podem atuar como agentes nucleadores de cristais de apatita [Li e Chang, 2008; Leone et al., 2008]. Particularmente, este processo pode induzir a mineralização do tecido dentinário [Gu et al., 2011; Liu et al., 2011]. Os compostos à base de fosfatos podem ser classificados como sistemas de liberação à base de cálcio e fosfato, os quais têm a função de aumentar a saturação do meio oral em relação à hidroxiapatita. Como exemplos, têm-se a nanohidroxiapatita, o fosfato tricálcico funcionalizado, o fosfato de cálcio amorfo estabilizado pelo fosfopeptídeo de caseína (CPP-ACP) e o glicerofosfato de cálcio. Entretanto, estes agentes não demonstram efeitos superiores ao F [González-Cabezas & Fernández, 2018].

Outro agente à base de fosfato são os ciclofosfatos, como o trimetafosfato de sódio (NaTMP). Este quando associado ao F, atua como uma barreira contra a difusão de ácido no substrato dentário e favorece um maior fluxo de cálcio e fosfato potencializando o processo de remineralização em profundidade no substrato dentário [Takeshita et al., 2009; Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021; Amaral et al., 2018]. Além disso, em um estudo recente foi observado que quando uma fonte de fosfato de cálcio é aplicada após o tratamento com dentifrício de NaTMP com F, o processo de remineralização foi melhorado em 50% quando comparado ao tratamento com dentifrício de 1100 ppm F [Gonçalves et al., 2021].

Embora a saliva apresente cálcio (Ca) e fósforo (P), a capacidade de promover remineralização depende da difusão desses íons para o interior do substrato dentário [Reynolds et al., 2003; Reynolds, 2008]. Diante disso, supersaturar o meio com cálcio pode reduzir a desmineralização [Lussi et al., 2011]. Assim como o NaTMP quando associado ao F apresenta a capacidade de adsorver ao esmalte, de reduzir a penetração dos ácidos e melhorar a difusão de cálcio para o interior do esmalte, funcionalizar o NaTMP com o cálcio pode ajudar a fixar este íon e aumentar sua disponibilidade na superfície dentária [Amaral et al., 2018; Nalin et al., 2021; Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021].

A substituição do sódio (Na) pelo Ca no NaTMP pode ser realizada com auxílio de uma coluna cromatográfica de troca iônica com resina catiônica, havendo a substituição total dos Na^+ por hidrogênio, seguida de uma reação de neutralização com uma solução contendo fonte de Ca, como exemplo solução de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) [Watanabe et al., 1998; Guisso et al., 2024]. Estudo recente mostrou que o ciclofosfato de cálcio (CaTMP) promove efeito protetor na erosão inicial do esmalte superiores ao grupo 1100 ppm F e NaTMP, *in vitro* [Guisso et al.,

2024]. Logo, seria importante sintetizar e caracterizar o CaTMP e avaliar o efeito citotóxico e potencial de biomineralização. A hipótese nula deste estudo foi que não há diferenças entre o NaTMP e o CaTMP em termos de sua citotoxicidade e potencial de mineralização.

2. OBJETIVO

A proposta do presente trabalho foi sintetizar e caracterizar um novo ciclofosfato com substituição do íon sódio (Na^+) do trimetafosfato de sódio (NaTMP) por íons cálcio (Ca^{++}), e verificar seu efeito, citotóxico e potencial de biomineralização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização

O ciclofosfato contendo cálcio (CaTMP) foi preparado a partir da diluição de NaTMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em água deionizada (pH 5,6). A rota de síntese para a substituição do Na^+ pelo Ca^{++} foi realizada por cromatografia seguida pela mistura de solução de TMP sem Na e solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [Watanabe et al., 1998; Griffith, 1962]. Para realizar a cromatografia, a solução foi tratada em uma coluna de vidro (2 cm $\times$ 30 cm) contendo resina de troca iônica catiônica forte na forma H^+ (PUROLITE C100H, Purolite®, Philadelphia, PA, EUA) para a substituição dos íons Na^+ pelos de íons de Ca^{++} , com fluxo de 0,5 mL/min [Watanabe et al., 1998]. Após a passagem pela coluna (pH 0,7) foi adicionado à solução tratada a solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Cód. HC09743RA, Exôdo, Sumaré, SP, Brasil) diluído em água deionizada até atingir o mesmo valor de pH da solução de NaTMP antes da troca iônica. A solução foi mantida em estufa por 48 horas a 37°C para precipitação do novo composto, seguido pela filtragem usando papel filtro quantitativo (Quanty JP42, J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e funil de Buchner conectado a um sistema de vácuo (-600 mmHg) [Griffith, 1962; Amaral et al., 2018]. O precipitado foi mantido em estufa por 24 horas a 70°C para secagem, e o pó, homogeneizados em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 8 horas [Amaral et al., 2018; Guisso, 2024].

A caracterização do CaTMP foi realizada na Faculdade de Engenharia (FEIS/Unesp). O pó sintetizado foi depositado sobre suporte recoberto com fita de carbono, submetidos a vácuo e pulverização catódica para uma fina cobertura com ouro (Quorum - Q150T E, West Sussex, UK). As morfologias das partículas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Germany) a 20 kV e aumento de 3.000 ×. A composição química das amostras foi determinada por espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS, Oxford Instruments, INCAx - act, 133 eV, England) com 20 keV, resolução espacial de × 2 µm e tempo de contagem de 150 s. Os elementos químicos analisados foram fósforo (P), oxigênio (O), sódio (Na) e cálcio (Ca) [Guisso, 2024].

3.2. Avaliação da viabilidade celular

Células odontoblástica de linhagem MDPC-23 foram cultivados sob condições de cultura de células padrão em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C, 100% de umidade e 5% CO₂. As células foram subsequentemente semeadas em placas de 96 poços (10⁵ células / poço) e incubadas por 24h. A solução inicial foi de 1% CaTMP e 5% NaTMP [Guisso, 2024]. Após várias diluições, a solução do contendo CaTMP e NaTMP foram aplicadas nas células, sendo: 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, 48 e 72 horas. Após cada período as diluições foram removidas e adicionados em cada poço 100 µL 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 [Braga et al., 2023]. A placa foi mantida em temperatura ambiente em uma câmara escura por 30 minutos em um agitador rotativo. A absorbância das placas foi avaliada a 570 nm usando um leitor Elisa (Expert 96, Asys Hitch, Ec Austria). Esses valores foram convertidos em porcentagens de viabilidade celular considerando o meio DMEM (controle, sem tratamento) como 100% de crescimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata [Caiaffa et al., 2019; Massunari et al., 2021].

3.3. *Deposição de nódulos de mineralização*

A deposição de nódulos mineralizados foi determinada pelo método de coloração vermelha de alizarina de acordo com estudos anteriores [Caiaffa et al., 2019; Massunari et al., 2021]. Resumidamente, MDPC-23 a 5×10^4 células/poço cultivadas até a confluência de 80 % em placas de cultura de 6 poços em meio de cultura DMEM. O meio foi trocado por meio mineralizante constituído por 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mmol/L de β -glicerolfosfato e 1,8 mmol/L de KH_2PO_4 em meio de cultura DMEM. As células foram cultivadas com os compostos em concentrações determinadas a partir do ensaio de MTT em meio mineralizante. Após 1 e 3 semanas o potencial de biomineralização foi avaliado [Choi et al., 2015]. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas em 10% de tampão de formalina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado lavagem adicional em água, foram incubadas em vermelho de alizarina a 2% (pH 4,2) em água durante 20 minutos à temperatura ambiente com agitação suave, seguidas de 3 lavagens com água e deixadas secar ao ar. Os nódulos mineralizados foram posteriormente quantificados através de um ensaio colorimétrico. O vermelho de alizarina foi incubado com 10% de cloreto de cetilpiridínio em 10 mmol/L de tampão de fosfato de sódio durante 30 minutos para eluir toda a coloração ligada ao cálcio para posteriormente coletar-se o sobrenadante e determinar-se os valores de densidade óptica a 560 nm. A quantificação da formação de nódulos mineralizados foi apresentada como densidade óptica por miligrama de proteína celular total, determinada pelo kit de análise de proteína de ácido micro bicinconínico (Sigma-Aldrich) [Shrestha et al., 2015].

3.4. *Análise Estatística*

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) ($p < 0,05$). Foi realizada usando ANOVA a dois critérios e o teste de Student-Newman-Keuls para o MTT e ANOVA e o teste de Tukey para o vermelho de alizarina. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. *Síntese e caracterização do ciclotrifosfato*

As imagens obtidas pelo MEV, foi possível observar granulações pequenas e regulares para os grupos de NaTMP e CaTMP (Figura 1A e 1C). Pelos espectrogramas obtidos pela técnica do EDS, foram observados picos de Na a 1,04 keV para o NaTMP, além de picos de O a 0,52 keV e P a 2,02 keV comuns para os dois compostos, houve também a presença de picos a 3,69 e 4,00 KeV característicos de Ca no grupo de CaTMP. A porcentagem (%) da massa de P nas amostras de CaTMP foi menor quando comparada ao NaTMP e a % de O foi maior para no CaTMP (Figura 1C e 1D).

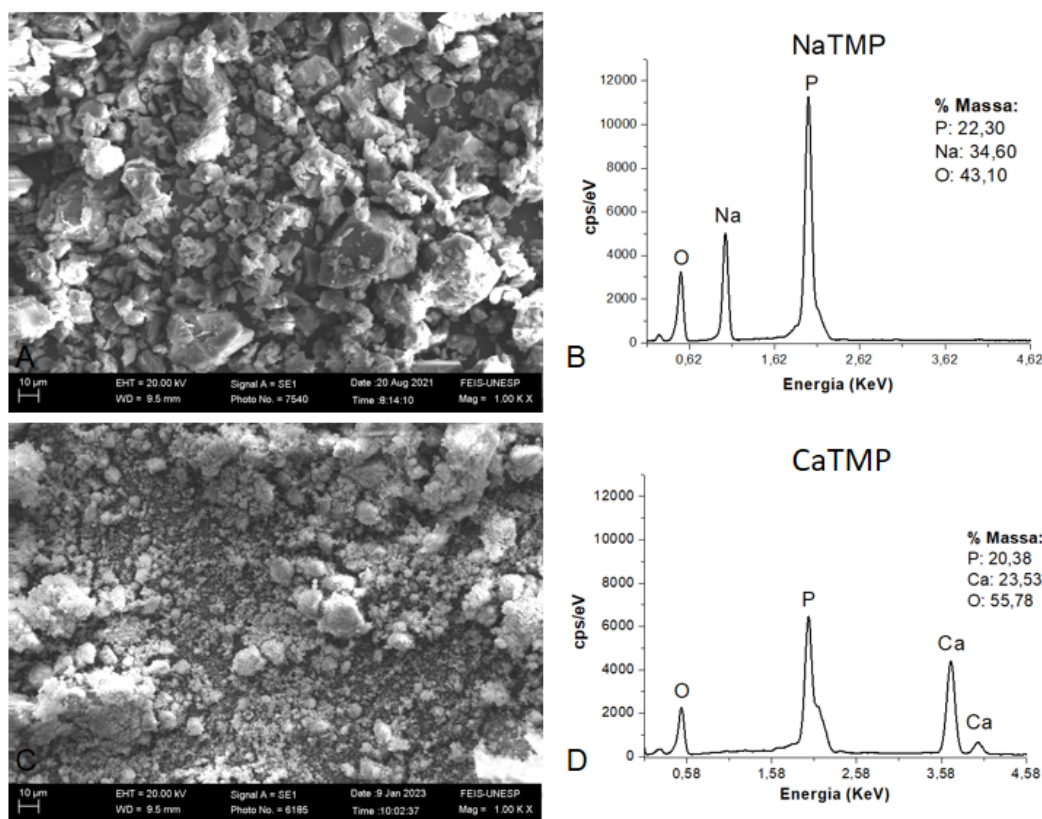


Figura 1. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A), CaTMP (C) e respectivos histogramas de EDS (B e D). NaTMP: trimetafosfato de sódio; CaTMP: Ciclotrifosfato de cálcio; P: fósforo; Ca: cálcio; O: oxigênio.

4.2. Avaliação da viabilidade celular

Nas primeiras 24 h houve um aumento da viabilidade celular para todas as diluições do CaTMP em relação as diluições do NaTMP (Figura 2). Após 48 h, houve maior viabilidade celular para os grupos de NaTMP nas diluições 1/32, 1/64 e 1/128 quando comparado as outras diluições contendo NaTMP e todas as diluições com

CaTMP (Figura 2). Entretanto, os grupos contendo CaTMP, 1, 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 apresentaram maior viabilidade celular quando comparados a mesma diluição dos grupos de NaTMP no tempo de 48 h. No período de 72 h, as diluições com CaTMP apresentaram maior viabilidade celular quando comparado aos grupos contendo NaTMP, exceto a diluição 1/64 que não apresentou diferença estatística (Figura 2).

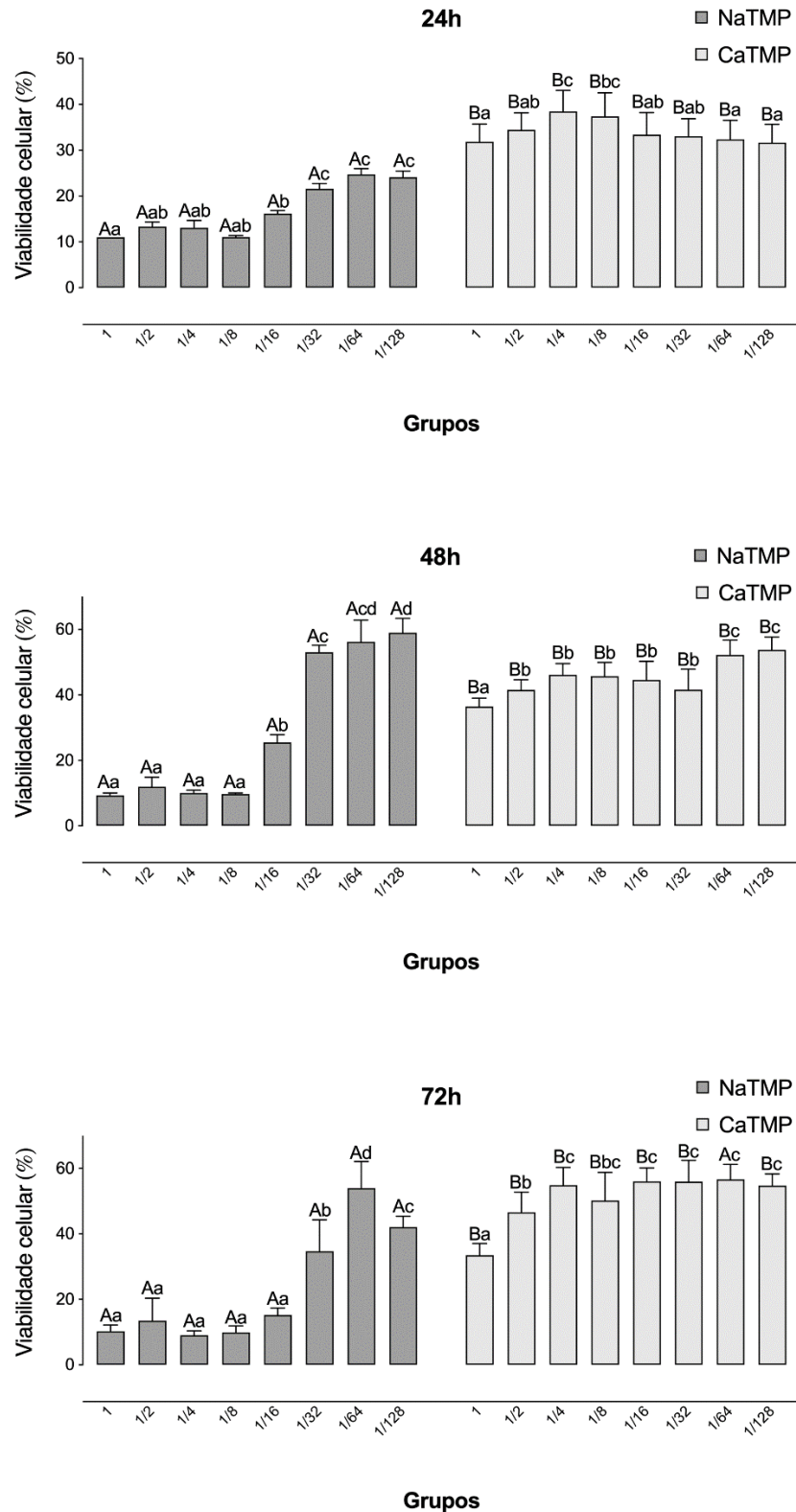


Figura 2. Viabilidade celular de odontoblastos (MDPC-23) determinada por um ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Letras maiúsculas: comparação entre os tratamentos com CaTMP e NaTMP no mesmo tempo e diluição. Letras minúsculas: comparação entre as diluições em cada tempo.

4.3. Deposição de nódulos de mineralização

As menores concentrações (diluições 1/64 e 1/128) de NaTMP e CaTMP apresentaram maior viabilidade celular nos tempos analisados quando comparado as demais diluições. Sendo assim, essas diluições foram avaliadas no teste de vermelho de alizarina. Foi possível observar que na semana 1 (1S) o controle (composto por células e meio) apresentou potencial de mineralização semelhante aos grupos contendo NaTMP e CaTMP, não havendo diferença estatística (Figura 3). A semana 3 apresenta aumento dos valores na deposição de matriz mineralizada para os grupos contendo NaTMP e CaTMP quando comparada a 1S. As imagens dos grupos de CaTMP com diluição 1/64 e 1/128 apresentaram maior formação de nódulos de mineralização (representada pelos pontos escuros na imagem) quando comparado aos grupos de mesma diluição do NaTMP, independente do tempo (Figura 4 e 5).

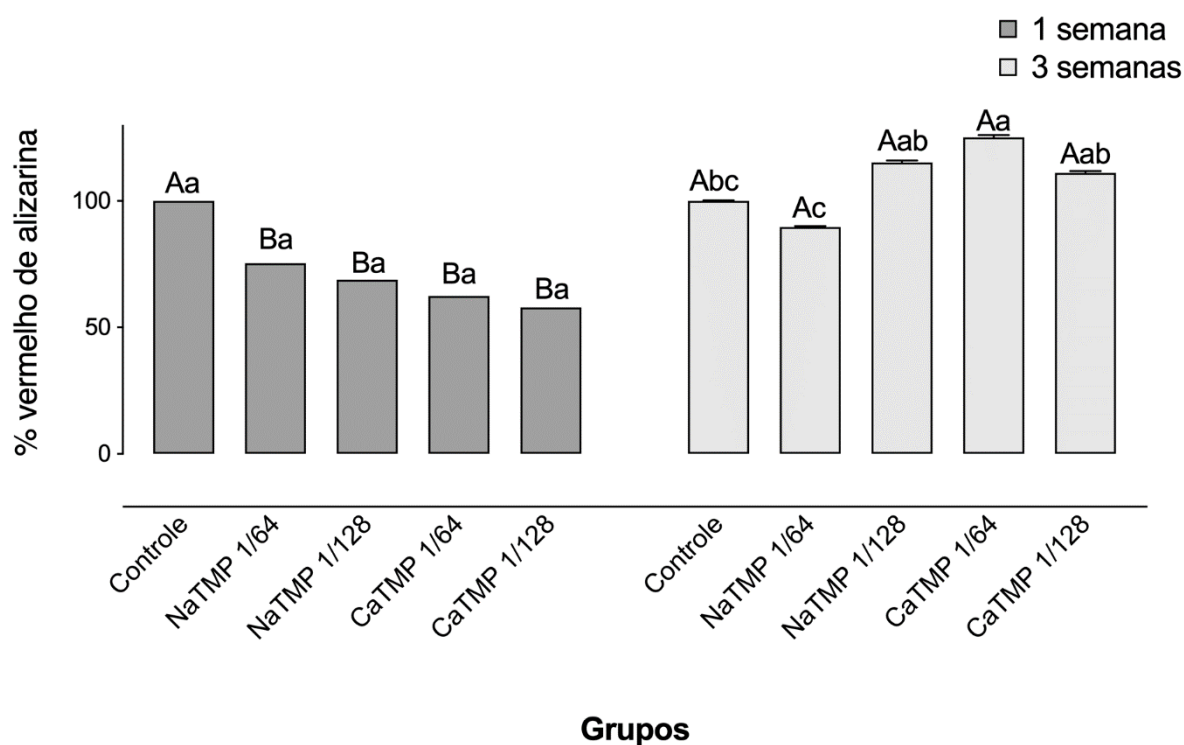


Figura 3. Gráfico representativo dos valores médios do teste de vermelho de alizarina para as células (MDPC-23) expostas ao NaTMP e CaTMP durante a semana 1 (1S) e semana 3 (3S). Letras maiúsculas: comparação entre os tempos avaliados na mesma diluição. Letra minúscula: comparação entre as diluições em cada tempo.

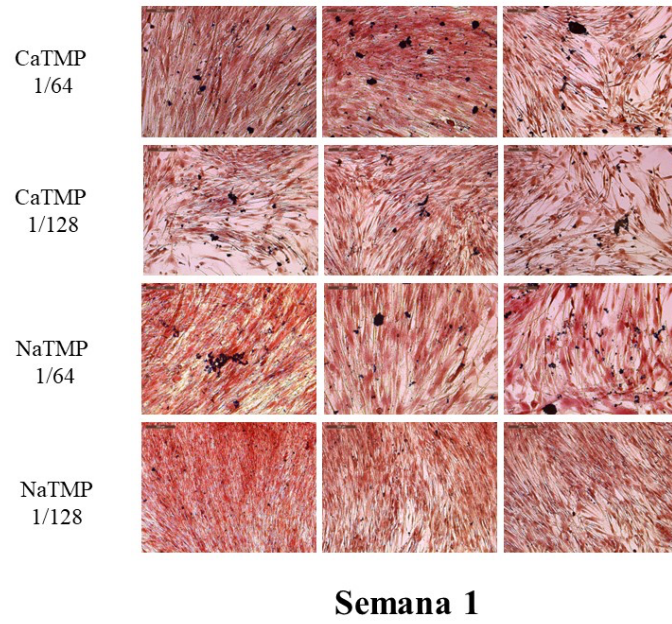


Figura 4. Paineis de imagens representativas dos nódulos de mineralização referentes a semana 1.

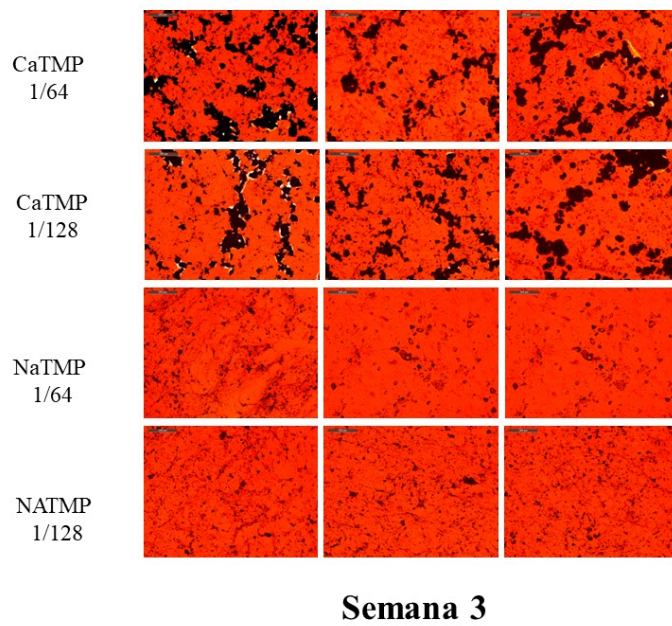


Figura 5. Paineis de imagens representativas dos nódulos de mineralização referentes a semana 3.

5. DISCUSSÃO

Considerando os resultados promissores do novo ciclotrifosfato de cálcio na erosão inicial *in vitro* e a busca por alternativas para prevenção e remineralização de lesões de cárie, este estudo sintetizou e caracterizou o ciclotrifosfato de cálcio (CaTMP) e avaliou os efeitos citotóxicos e o potencial de mineralização. O CaTMP apresentou menor toxicidade quando aplicado ao MDPC-23 nas concentrações testadas (entre as diluições de 1 a 1/128), mantendo a partir das 48 horas viabilidade celular acima de 50%. Nas imagens foi possível observar maior potencial de mineralização no grupo CaTMP independente da diluição. A hipótese nula deste estudo foi rejeitada, uma vez que os resultados obtidos pelo CaTMP foram diferentes do NaTMP.

A utilização da cromatografia por meio da resina de troca iônica mostra-se o método eficiente de síntese do CaTMP, removendo todo sódio e impurezas da solução antes da incorporação do Ca^{++} , sendo o único subproduto da síntese a água. Na análise de EDS, foi possível verificar ausência do pico do Na e presença do pico de Ca comprovando a substituição total de Na por Ca, considerando os dados de % de massa do EDS. Além disso, não houve uma alteração significativa na % de massa de P, diferente da % de Ca quando comparado a de Na após a substituição. Provavelmente, no processo de substituição do Na, cada átomo de Ca se ligue a duas moléculas do TMP formando uma estrutura reticular [Pancote et al., 2014].

Estudo recente, mostrou que esse novo composto levou ao menor amolecimento do esmalte com efeito superior ao controle positivo (1100 ppm F) e ao NaTMP, independente da sua concentração, evidenciando a eficácia da síntese [Guisso et al., 2024]. Esta substituição do Na pelo Ca na molécula de TMP, proporciona aumento na concentração de cálcio e fosfato no meio influenciando diretamente nos resultados de erosão inicial [Guisso, 2024]. A viabilidade celular dos grupos com CaTMP foram maiores que os grupos com NaTMP, principalmente em grupos com menor diluição. O cálcio é amplamente reconhecido como um fator crucial na osteoindução, pois desempenha um papel significativo em afetar o crescimento das células [Brown et al, 2001; Mentaverri 2006]. Além disso, a maior disponibilidade do cálcio, proporciona um aumento do pH deixando esse meio mais básico ou alcalino o que pode ter estimulado uma maior proliferação dessas células ao longo do tempo.

A utilização de NaTMP em superfície proporciona uma com maior quantidade de sítios doadores de elétron levando uma maior adsorção de NaTMP na superfície [Neves et al., 2018]. Diante disso, a adesão celular é influenciada pela interação eletrostática com a superfície dos biomateriais e está relacionada com o componente polar da energia livre de superfície, ou seja, quanto maior os sítios doadores de elétron, maior a adesão celular [Harnett et al., 2007]. Após 48h, o grupo com NaTMP apresentou menor citotoxicidade nas diluições 1/64 e 1/128 em relação as mesmas diluições do CaTMP. Logo, após esse período possivelmente houve uma maior difusão de cátions do NaTMP para o meio, induzindo maior adesão celular, e consequentemente um aumento da viabilidade celular no tempo de 48 horas [Delbem et al., 2012].

A deposição de nódulos mineralizados é considerada marcador útil de biomineralização em células osteoblásticas e odontoblásticas [Goldberg et al., 2011]. A indução de diferenciação celular e formação de nódulos de mineralização foi avaliado através do vermelho de alizarina. Na 1S, o controle apresentou potencial de mineralização semelhante aos NaTMP e ao CaTMP, não havendo diferença entre eles. O cálcio é um elemento essencial de transdução de sinal envolvido na regulação de diversas atividades celulares e é necessário em diferentes estágios da célula para garantir progressão e proliferação ordenadas [Resende et al., 2013]. A presença do cálcio no meio pode atuar em estágio celulares com maior tempo de cultivo, corroborando com estudo anteriores, no qual o CaTMP mostrou maior viabilidade celular das células-tronco com tempos maiores de cultivo [Toledo et al., 2023].

Algumas limitações do presente estudo podem ser apontadas, como a falta de análise microscópica para avaliar a viabilidade celular, coloração viva/morta e alguns ensaios de fluorescência de adesão e proliferação celular em vez de apenas ensaios colorimétricos. Embora a caracterização do CaTMP tenha sido determinada, a estrutura (cíclica ou linear) após a síntese, permanece desconhecida. Sendo assim, novos testes precisam ser realizados para verificar a estrutura do CaTMP e seu efeito na desmineralização e remineralização dentária.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o novo ciclotrifosfato de cálcio sintetizado foi citocompatível e

apresenta potencial de biomineralização, podendo ser um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

7. REFERÊNCIAS

1. Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Oct;106(7):2553-2564
2. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:24-32.
3. Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*. 2014 Jul 15;325(2):65-71.
4. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*. 2001 Jan;81(1):239-297.
5. Braga GPA, Caiaffa KS, Rabelo RL, Santos VRD, Souza ACA, Ribeiro LDS, Camargo ER, Prakki A, Duque C. Cytotoxicity and Biomineralization Potential of Flavonoids Incorporated into PNVCL Hydrogels. *J Funct Biomater*. 2023 Mar 2;14(3):139.
6. Caiaffa K.S., Basso F.G., Santos-Filho N.A., de Souza-Costa C.A., Sakai V.T., Cilli E.M., Duque C. Effect of analogues of cationic peptides on dentin mineralization markers in odontoblast-like cells. *Arch. Oral Biol*. 2019;103:19–25.
7. Choi H, Kim TH, Yun CY, Kim JW, Cho ES. Testicular acid phosphatase induces odontoblast differentiation and mineralization. *Cell Tissue Res*. 2016 Apr;364(1):95-103.
8. Cummins D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent*. 2013 Aug;41 Suppl 2:S1-11.
9. Delbem, ACB., Bergamaschi M., Rodrigues E., Sassaki KT., Vierira AEM., Missel EMC. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *J Appl Oral Sci*, v. 20, n. 1, p. 94-98, 2012.
10. Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Pessan JP, Romero GDA, Cannon ML, Danelon M. Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2021 Feb;122:105001.

11. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res*. 2018 Feb;29(1):55-59.
12. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3(2):711-35.
13. Griffith EJ. The structure of salt sodium calcium metaphosphate ($\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$). *InorgChem* 1962;1(4):962.
14. Gu L, Kim YK, Liu Y, Ryou H, Wimmer CE, Dai L, Arola DD, Looney SW, Pashley DH, Tay FR. Biomimetic analogs for collagen biomineralization. *J Dent Res*. 2011 Jan;90(1):82-7.
15. Guisso LP. Synthesis and characterization of a new calcium-containing cyclophosphate and its effect in dentifrices against enamel erosion in vitro. *Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Araçatuba*. 2024.
16. Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Mar 15;55(1):90-7.
17. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015 May;94(5):650-8.
18. Leone G, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R. New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol* 2008;19:824– 830.
19. Li X, Chang J. Preparation of bone-like apatite-collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *J Biomed Mater Res A*. 2008 May;85(2):293-300.
20. Liu Y, Li N, Qi Y, Niu LN, Elshafiy S, Mao J, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent Mater*. 2011 May;27(5):465-77.
21. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:2-12.
22. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, Schulte AG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B.

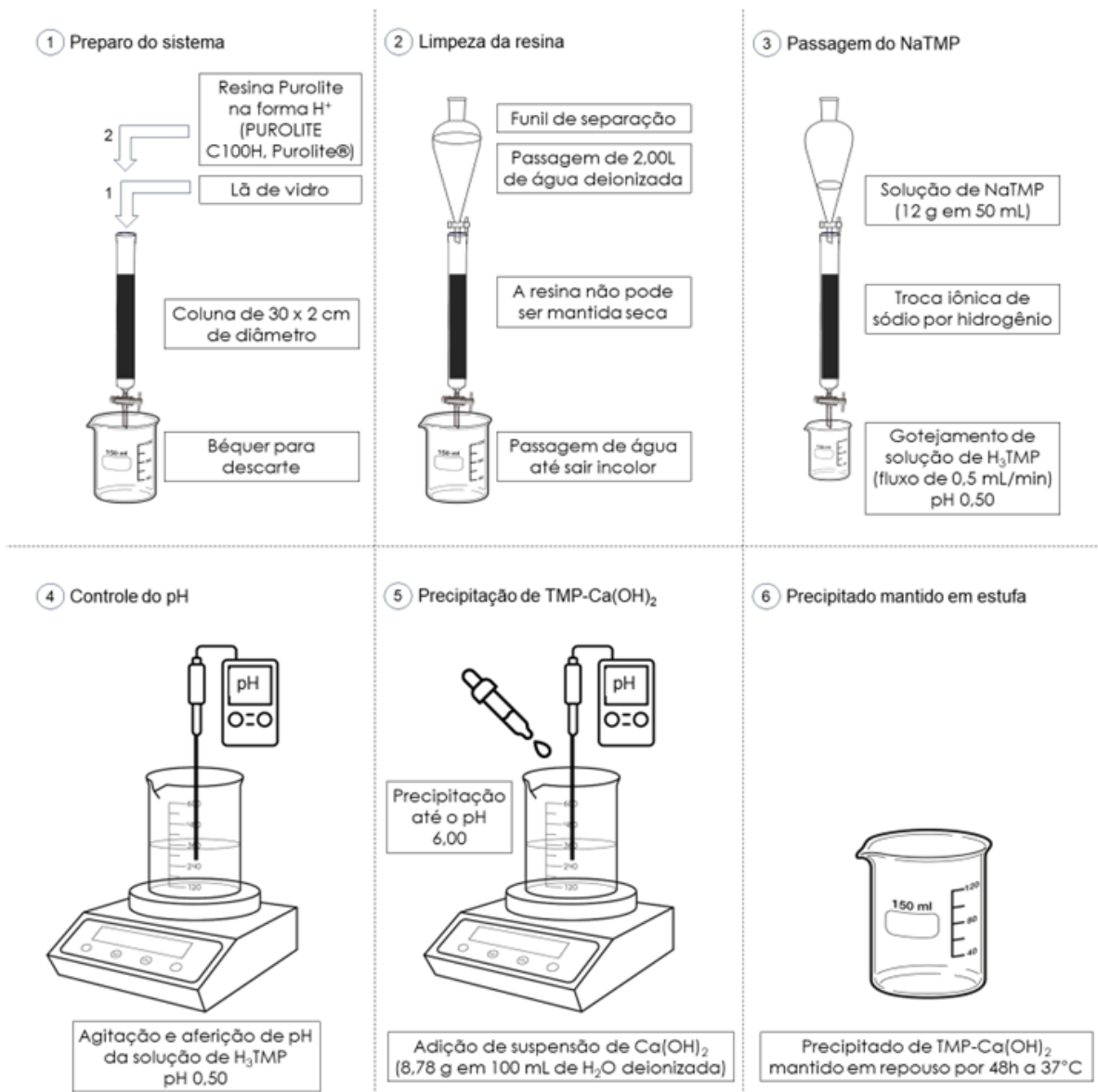
- Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14.
23. Marinho VC, Chong LY, Worthington HV, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Jul 29;7(7):CD002284.
 24. Massunari L., Rabelo R.L., Leite M.L., Soares D.G., Anovazzi G., Costa C., Duque C. Dose- and time-dependent effects of taxifolin on viability and mineralization markers of osteoblast-like cells. *Braz. Oral Res.* 2021;35:e140.
 25. Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, Kamel S, Terwilliger EF, Brazier M, Brown EM. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J.* 2006 Dec;20(14):2562-4.
 26. Nalin EKP, Danelon M, da Silva ES, Hosida TY, Pessan JP, Delbem ACB. Surface Free Energy, Interaction, and Adsorption of Calcium and Phosphate to Enamel Treated with Trimetaphosphate and Glycerophosphate. *Caries Res.* 2021;55(5):496-504.
 27. Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol.* 2018 Jun;90:108-112.
 28. Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2014 Mar;59(3):336-40.
 29. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019;53(3):284-295.
 30. Resende RR, Andrade LM, Oliveira AG, Guimarães ES, Guatimosim S, Leite MF. Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell Commun Signal.* 2013 Feb 21;11(1):14.
 31. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003 Mar;82(3):206-11.
 32. Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? *Aust Dent J.* 2008 Sep;53(3):268-73.

33. Rølla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1988 Dec;46(6):341-5.
34. Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. Temporal-controlled dexamethasone releasing chitosan nanoparticle system enhances odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla. *J Endod*, v. 41, p. 1253–8, 2015.
35. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res.* 2009;43(1):50-6.
36. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res.* 2016;50(6):571-578.
37. Toledo PTA, Anselmi C, Dal-Fabbro R, Mahmoud AH, Abel AK, Becker ML, Delbem ACB, Bottino MC. Calcium Trimetaphosphate-Loaded Electrospun Poly(Ester Urea) Nanofibers for Periodontal Tissue Engineering. *J Funct Biomater.* 2023 Jun 30;14(7):350.
38. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Marinho VC, Jeroncic A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 4;3(3):CD007868.
39. Watanabe M, Yoshida K, Sakurai M, Sato S. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *J Mater Sci* 1998;33:5601–5606.

ANEXOS

ANEXO A

Síntese de ciclotrifosfatos com substituição do sódio pelo cálcio



Preparo da coluna cromatográfica (1 e 2), da troca iônica de NaTMP (3), síntese e precipitação do CaTMP (4, 5 e 6).

ANEXO B

ENSAIO DE MTT (MDPC-23) – Análise de viabilidade celular

1. Realizou-se o plantio das células semelhantes à odontoblastos MDPC – 23 semeadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino em placas de 96 poços;
2. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas à 37°C com 5% CO₂ e 95% de umidade;
3. As células foram suplementadas com DMEM a cada 2 dias até atingir 80% de confluência – 10⁵ células / poço;
4. Em seguida, aspirou-se o meio e feita a lavagem das células 2 vezes com PBS;
5. Aplicou-se a mistura de DMEM sem SFB com as soluções dos compostos (CaTMP e NaTMP) nas células, sendo: não diluída (mistura pura), 1/2 diluição, 1/4 diluição, 1/8 diluição, 1/16 diluição, 1/32 diluição, 1/64 diluição e 1/128 diluição;
6. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48h e 72 horas, através do ensaio do MTT.;
7. Após cada período as diluições foram removidas e adicionados em cada poço 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) em DMEM sem SFB (1:10);
8. Após 4 horas foi aspirado a solução de MTT;
9. Foi acrescentado 200µl em cada poço de solução de álcool isopropílico em cada poço;
10. A placa foi mantida em temperatura ambiente em uma câmara escura por 30 minutos em um agitador rotativo.
11. Foi pipetado 100µl de cada poço em uma nova laca de 96 poços.
12. Leitura da absorbância em 570 nm em espectrofotômetro.

ANEXO C

DEPOSIÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO – VERMELHO DE ALIZARIN

1. Após realizar o plantio das células (MDPC – 23), elas foram semeadas em meio de cultura DMEM em placas de 6 poços;
2. Incubadas por 24 horas à 37°C com 5% CO₂ e 95% de umidade;
3. As células foram suplementadas com DMEM a cada 2 dias até atingir 80% de confluência – 10⁴ células / poço;
4. Em seguida, aspirou-se o meio e feita a lavagem das células 2 vezes com PBS;
5. As células foram cultivadas com os compostos nas diluições 1/64 e 1/28, determinadas a partir do ensaio de MTT em meio mineralizante;
6. As placas foram incubadas por 7 dias realizando trocas do meio a cada 24 horas por meio osteogênico (meio de diferenciação);
7. Após o período de 7 dias e 21 dias, o meio foi aspirado e lavado 2 vezes com PBS;
8. Fixadas em 10% de tampão de formalina durante 30 minutos à temperatura ambiente;
10. Lavadas uma vez com 100µl água destilada;
12. Aspirado;
13. Pipetou-se 100µl de Vermelho de Alizarin (40 mmol L⁻¹; pH 4,2; ASS 33 PM: 342,26) em cada poço;
14. Ficou em agitação por 20 minutos em shaker orbital;
15. O meio foi aspirado;
16. Lavado uma vez com 100µl água destilada;
17. Aspirou-se o meio;
18. Pipetou 200µl de Acetilpiridinium 10% em PBS 1X (Para dissolver os cristais formados pela coloração);

19. Ficou em agitação por 15 minutos em shaker orbital e em seguida foi realizado a leitura em 560 nm em espectrofotômetro.