

LUIGI PEDRINI GUISSO

**Síntese e caracterização de um novo ciclofosfato contendo cálcio e seu efeito
em dentifrícios contra a erosão do esmalte *in vitro***

ARAÇATUBA
2024

LUIGI PEDRINI GUISSO

Síntese e caracterização de um novo ciclotrifosfato contendo cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Biomateriais

Orientadora: Prof.^a Associada Thayse Yumi Hosida
Coorientadores: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem
Prof. Titular João Carlos Silos de Moraes

ARAÇATUBA
2024

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G967s Guisso, Luigi Pedrini.
Síntese e caracterização de um novo ciclofosfato contendo cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte *in vitro* / Luigi Pedrini Guisso. - Araçatuba, 2024
44 f. : il. ; tab.

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

1. Esmalte dentário 2. Fosfatos 3. Cálcio 4. Fluoretos
5. Erosão dentária 6. Dentifrícios I. T.

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Maria Lucia Pedrini Guisso** e **Maurício Guisso** pelo amor, educação e valores, que me formaram como ser humano.

À minha tia **Denise Pedrini Ostini** por todo apoio moral e acadêmico quando mais precisei e por todos incentivos e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

Pela minha vida, minha inteligência e por me mostrar os caminhos que levam à Verdade e o Bem.

À toda a minha família,

Por terem me apoiado de todas as maneiras, acreditando em mim e por me acompanharem em todos desafios.

À minha orientadora,

Professora Thayse Yumi Hosida,

Por sempre estar presente, ter me ensinado e orientado de maneira atenciosa e paciente, ter me instruído em todas necessidades e ser um exemplo de professora. Serei eternamente grato.

Aos meus coorientadores,

Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem e Professor João Carlos Silos de Moraes

Pelo auxílio nas diretrizes do projeto, a atenção aos detalhes, instruções nas análises e suas interpretações.

Aos docentes,

Ao **Professor Juliano Pelim Pessan**, à **Professora Cristiane Duque** e ao **Professor Robson Frederico Cunha**, pelos ensinamentos transmitidos, essenciais a minha formação acadêmica e profissional.

À Priscila, Caio e Liliana,

Pela amizade, paciência e por terem ensinado técnicas e minuciosidades que necessitei durante a execução do projeto

A todos os amigos da Pós-Graduação,

Pelo companheirismo, bons momentos no laboratório que tornaram o trabalho mais agradável e por sempre terem me ajudado quando precisei.

Aos funcionários do departamento,

Marcel, Mário e Luizinho

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

Ao Técnicos de laboratório Elton José Souza da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira

Pela dedicação na leitura das amostras e utilização do aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectrômetro de Difração de Raios-X.

À seção de Pós-Graduação,

Cristiane, Elis e Lucas muito obrigado por toda atenção e paciência.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Nas pessoas dos professores: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem, digníssimo Diretor e Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Vice-Diretor.

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

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

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

Pelo fornecimento da bolsa de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

EPÍGRAFE

“Reverencie os deuses e ajude os homens. A vida é curta.”

Marco Aurélio

GUISSO, L. P. **Síntese e caracterização de um novo ciclofosfato contendo cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte *in vitro***. 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

O objetivo do estudo foi determinar a melhor rota de síntese e caracterizar um novo ciclofosfato de cálcio e verificar seu efeito quando administrado em dentifrícios, sobre lesões iniciais de erosão no esmalte *in vitro*. Os ciclofosfatos contendo cálcio foram sintetizados por mistura de soluções de NaTMP com soluções de fontes de Ca^{+2} (nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ou cloreto de cálcio (CaCl_2), ou utilizando cromatografia e adição de suspensão de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Os ciclofosfatos foram caracterizados por MEV e EDX. Para determinar o efeito sobre lesões erosivas, blocos de esmalte bovino sadios ($n=120$) foram selecionados por dureza de superfície inicial e divididos em 10 grupos experimentais (12 blocos/grupo) dos dentifrícios: [1] placebo (controle negativo); [2] 1100 ppm F (controle positivo); [3] 0,5% NaTMP; [4] 1% NaTMP; [5] 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e [6] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; [7] 0,5% TMP- CaCl_2 e [8] 1% TMP- CaCl_2 ; [9] 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e [10] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Os blocos foram imersos em suspensão de dentifrícios experimentais durante 2 minutos, seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto cada, sob agitação). Foi calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) a cada desafio ácido. As variáveis foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios e teste de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). O processo de síntese por cromatografia levou à substituição total dos átomos de sódio por átomos de cálcio, enquanto as sínteses por mistura ainda apresentaram sódio. Após o primeiro e segundo desafios ácidos, tratamentos com dentifrícios 1100 ppm F, 1% TMP- CaCl_2 , 0,5 e 1% NaTMP, 0,5% e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levaram a menor %PDS em comparação aos outros grupos, sem diferença estatística entre si. No terceiro e quarto desafios ácidos, os dentifrícios 0,5 e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levaram menor %PDS quando comparados aos outros grupos ($p<0,001$). Concluiu-se que a síntese por cromatografia possibilita a substituição total do sódio pelo cálcio e os dentifrícios de TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F e aos grupos contendo NaTMP na erosão inicial do esmalte *in vitro*.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fosfatos, Cálcio, Fluoretos, Erosão dentária, Dentifrícios.

GUISSO, L. P. **Synthesis and characterization of a new calcium cyclophosphate and its effect in toothpastes against enamel erosion *in vitro***. 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the best synthesis route and characterize a new calcium cyclophosphate and verify its effect when administered in toothpastes, on initial enamel erosion lesions *in vitro*. Calcium-containing cyclophosphates were synthesized by mixing NaTMP solutions with solutions of Ca^{+2} sources (calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) or calcium chloride (CaCl_2), or using chromatography and addition of calcium hydroxide suspension ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Cyclophosphates were characterized by SEM and XRD. To determine the effect on erosive lesions, blocks of healthy bovine enamel ($n=120$) were selected by initial surface hardness and divided into 10 experimental groups (12 blocks/group) of toothpastes: [1] placebo (negative control); [2] 1100 ppm F (positive control); [3] 0.5% NaTMP; [4] 1% NaTMP; [5] 0.5% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and [6] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; [7] 0.5% TMP- CaCl_2 and [8] 1% TMP- CaCl_2 ; [9] 0.5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and [10] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$. The blocks were immersed in experimental dentifrice suspension for 2 minutes, followed by 4 erosive challenges (citric acid, 0.75%, pH 3.5, for 1 minute each, under agitation). The percentage of loss of surface hardness (%PDS) was calculated for each acid challenge. The variables were subjected to two-criteria repeated measures analysis of variance and the Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$). The chromatographic synthesis process led to the total replacement of sodium atoms by calcium atoms, while mixture syntheses still presented sodium. After the first and second acid challenges, treatments with 1100 ppm F, 1% TMP- CaCl_2 , 0.5 and 1% NaTMP, 0.5% and 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dentifrices led to lower %PDS in comparison to the other groups, with no statistical difference between them. In the third and fourth acid challenges, the 0.5 and 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ toothpastes led to lower %PDS when compared to the other groups ($p<0.001$). It was concluded that synthesis by chromatography allows the total replacement of sodium by calcium and the TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ toothpastes promoted superior protective effects compared to the 1100 ppm F group and the groups containing NaTMP in the initial erosion of enamel *in vitro*.

Key-words: Dental enamel, Phosphates, Calcium, Fluorides, Tooth erosion, Toothpaste

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Fluxograma do preparo da coluna cromatográfica (1 e 2), da troca iônica de NaTMP (3), síntese e precipitação do TMP-Ca(OH)₂ (4, 5 e 6). 19
- FIGURA 2** Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A), TMP-Ca(OH)₂ (C), TMP-CaCl₂ (E) e TMP-Ca(NO₃)₂ (G) e respectivos histogramas de EDS (B, D, F, H). 24
- FIGURA 3** Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos. Barras denotam desvios padrões das médias (ANOVA, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$, $n=12$). * indica diferença significativa entre diferentes tempos dentro de cada grupo experimental. Placebo (controle negativo); 1100 ppm F (controle positivo); 0,5% NaTMP; 1% NaTMP; 0,5% TMP-Ca(NO₃)₂ e 1% TMP-Ca(NO₃)₂ (fonte de Ca⁺² proveniente de Ca(NO₃)₂); 0,5% TMP-CaCl₂ e 1% TMP-CaCl₂ (fonte de Ca⁺² proveniente de CaCl₂); 0,5% TMP-Ca(OH)₂ e 1% TMP-Ca(OH)₂ (fonte de Ca⁺² proveniente de Ca(OH)₂). 26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores médios (DP) de fósforo (P) iônico e total, cálcio (Ca) iônico e total, fluoreto (F ⁻) iônico e total e pH dos dentifrícios.	25
-----------------	---	----

SUMÁRIO

RESUMO	15
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	29
ANEXO	34

Síntese e caracterização de um novo ciclofosfato contendo cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte *in vitro*.

RESUMO

O objetivo do estudo foi determinar a melhor rota de síntese e caracterizar um novo ciclofosfato de cálcio e verificar seu efeito quando administrado em dentifrícios, sobre lesões iniciais de erosão no esmalte *in vitro*. Os ciclofosfatos contendo cálcio foram sintetizados por mistura de soluções de NaTMP com soluções de fontes de Ca^{+2} (nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ou cloreto de cálcio (CaCl_2), ou utilizando cromatografia e adição de suspensão de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Os ciclofosfatos foram caracterizados por MEV e EDX. Para determinar o efeito sobre lesões erosivas, blocos de esmalte bovino sadios ($n=120$) foram selecionados por dureza de superfície inicial e divididos em 10 grupos experimentais (12 blocos/grupo) dos dentifrícios: [1] placebo (controle negativo); [2] 1100 ppm F (controle positivo); [3] 0,5% NaTMP; [4] 1% NaTMP; [5] 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e [6] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; [7] 0,5% TMP- CaCl_2 e [8] 1% TMP- CaCl_2 ; [9] 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e [10] 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Os blocos foram imersos em suspensão de dentifrícios experimentais durante 2 minutos, seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto cada, sob agitação). Foi calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) a cada desafio ácido. As variáveis foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios e teste de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). O processo de síntese por cromatografia levou à substituição total dos átomos de sódio por átomos de cálcio, enquanto as sínteses por mistura ainda apresentaram sódio. Após o primeiro e segundo desafios ácidos, tratamentos com dentifrícios 1100 ppm F, 1% TMP- CaCl_2 , 0,5 e 1% NaTMP, 0,5% e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levaram a menor %PDS em comparação aos outros grupos, sem diferença estatística entre si. No terceiro e quarto desafios ácidos, os dentifrícios 0,5 e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levaram menor %PDS quando comparados aos outros grupos ($p<0,001$). Concluiu-se que a síntese por cromatografia possibilita a substituição total do sódio pelo cálcio e os dentifrícios de TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F e aos grupos contendo NaTMP na erosão inicial do esmalte *in vitro*.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fosfatos, Cálcio, Fluoretos, Erosão dentária, Dentifrícios.

1. INTRODUÇÃO

A erosão dentária é definida como a dissolução química dos tecidos duros dentários por ácidos de origem intrínseca ou extrínseca, sem envolvimento bacteriano [Wiegand & Attin, 2003; Schlueter et al., 2020]. Uma revisão estimou a prevalência global de erosão dentária variando de 30 a 50% e 20-45%, respectivamente para dentes decíduos e permanentes, com números tão altos quanto 100% reportados em alguns estudos [Schlueter & Luka, 2018]. As medidas usadas para prevenir ou minimizar os efeitos da erosão dentária incluem a aplicação de fluoretos tópicos [Magalhães et al., 2012], especialmente em altas concentrações, visto que fornece minerais adicionais às superfícies do esmalte, o que reduz sua taxa de dissolução em desafios ácidos [Lagerweij & ten Cate, 2006]. Apesar do fluoreto (F^-) levar à hipermineralização da parte mais externa do substrato dentário, os produtos depositados na presença do fluoreto (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 erosão dentária [Philip, 2019; Barbour et al., 2011]. Para superar a limitação descritas acima, ativos à base de fosfato têm sido estudados, associados ou não ao flúor (F).

Os agentes à base de fosfatos podem ser classificados como sistemas de liberação à base de cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}), os quais têm a função de aumentar a saturação do meio oral com estes íons 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 fluoreto [González-Cabezas & Fernández, 2018; Delbem & Pessan, 2019]. Outro agente à base de fosfato são os ciclofosfatos, como o trimetafosfato de sódio (NaTMP). Este diferentemente dos agentes anteriores, não serve com fonte de fosfatos, porém quando associado ao fluoreto, 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., 2011; 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 dentifrícios de NaTMP com flúor, o processo de remineralização foi melhorado em 50% quando comparado ao tratamento com 1100

ppm F [Gonçalves et al., 2021].

Embora a saliva apresente cálcio e fosfato, a capacidade de promover remineralização depende da difusão desses íons para o interior do substrato dentário [Reynolds et al., 2003; Reynolds, 2008]. Prévios estudos têm mostrado que supersaturar o meio com cálcio pode reduzir o efeito erosivos dos ácidos [Lussi et al., 2011]. Assim, como o NaTMP 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 poderia, teoricamente, favorecer a retenção deste íon e aumentar sua disponibilidade na superfície dentária [Amaral et al., 2016; Amaral et al., 2018; Nalin et al., 2021; Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021].

Diante do exposto, seria interessante substituir o íon sódio (Na^+) do NaTMP por íons Ca^{+2} , verificar se tal substituição produziria um composto com maior atividade no processo de erosão. Considerando as propriedades do TMP (e.g., redução da difusão de ácidos, adsorção às estruturas mineralizadas e nucleação de cálcio e fosfato) e os efeitos do Ca sobre processos de des-/re-mineralização e precipitação mineral, é possível que a substituição de íons Na^+ por íons Ca^{+2} gere um composto que reúna propriedades de ambos, TMP e cálcio, sobre processos de erosão quando incorporado a dentifrícios [Dalpasquale et al., 2017; Souza et al., 2017].

A substituição do sódio pelo cálcio no NaTMP pode ser realizada com auxílio de uma coluna cromatográfica de troca iônica com resina [Watanabe et al., 1998], havendo a substituição dos íons Na^+ por hidrogênio, seguida de uma reação de neutralização com uma fonte de cálcio. Outro método reportado na literatura para essa substituição seria a mistura de soluções de fosfato (i.e., NaTMP) e uma solução de cálcio (nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), cloreto de cálcio (CaCl_2) ou hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)) [Griffith, 1962]. Logo, seria importante verificar qual a melhor forma de sintetizar um novo ciclofosfato com substituição do Na^+ pelo Ca^{+2} no NaTMP e avaliar o efeito destas sínteses em dentifrícios utilizando modelo *in vitro*, na prevenção da erosão inicial do esmalte.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a melhor rota de síntese e caracterizar um novo ciclofosfato com substituição do íon sódio (Na^+) do

trimetafosfato de sódio (NaTMP) por íons cálcio (Ca^{+2}), e verificar seu efeito, quando administrado em dentifrícios, sobre lesões iniciais de erosão no esmalte *in vitro*. A hipótese nula do estudo foi que não é possível sintetizar um novo ciclofosfato a base de cálcio (Ca) que apresente efeito preventivo em lesões erosivas iniciais do esmalte quando comparado ao 1100 ppm F.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese e caracterização de ciclofosfatos contendo cálcio

Os ciclofosfatos contendo cálcio foram preparados 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), e diluição de diferentes fontes de Ca (hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ou nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ou cloreto de cálcio (CaCl_2)). A rota de síntese para a substituição do sódio pelo cálcio foi realizada apenas pela mistura de solução ou cromatografia seguida pela mistura de solução [Watanabe et al., 1998; Griffith, 1962]. Para realizar a cromatografia, a solução foi tratada em uma coluna de vidro (2 cm × 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^{+2} , com fluxo de 0,5 mL/min [Watanabe et al., 1998]. Após a passagem pela coluna (pH 0,7) foi adicionado à solução tratada o sobrenadante 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. Concomitantemente foram preparadas solução de NaTMP e soluções de diferentes fontes de Ca: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou CaCl_2 . Em seguida, foi adicionado separadamente as soluções de diferentes fontes de cálcio na solução de NaTMP para substituição do sódio pelo cálcio por meio de mistura de duas soluções. Todas as soluções foram mantidas 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]. Os precipitados foram mantidos em estufa por 24 horas a 70°C para secagem, e os pós, homogeneizados em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 5 minutos [Amaral et al., 2018].

A seguir, os pós sintetizados foram depositados sobre suportes recoberto

com fita de carbono, submetidos a vácuo e pulverização catódica para uma fina cobertura com ouro (Quorum - Q150T E, West Sussex, UK). A morfologia 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 $3.000\times$. 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 $\times 2\text{ }\mu\text{m}$ e tempo de contagem de 150 s. Os elementos químicos analisados foram fósforo (P), oxigênio (O), sódio (Na), cloro (Cl) e cálcio (Ca).

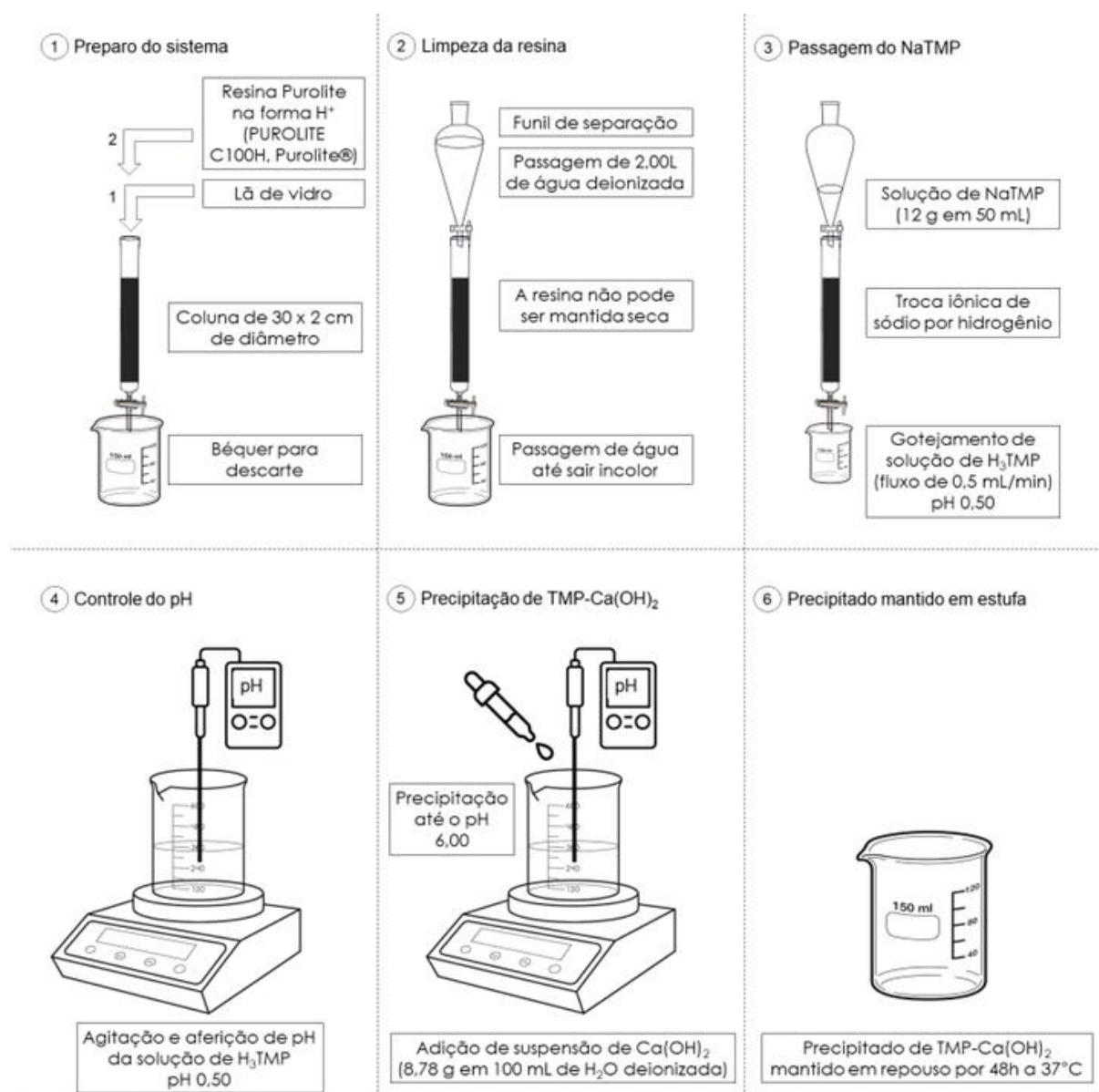


Figura 1. Fluxograma do preparo da coluna cromatográfica (1 e 2), da troca iônica de NaTMP (3), síntese e precipitação do TMP-Ca(OH)₂ (4, 5 e 6).

3.2. Análise do efeito da adição de diferentes concentrações de TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, TMP- CaCl_2 e TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a dentifrícios contra a erosão inicial do esmalte

3.2.1. Preparo e seleção dos blocos de esmalte

Blocos de esmalte ($4 \times 4 \times 2$ mm) foram obtidos da porção mais plana da superfície vestibular das coroas de dentes incisivos bovinos, obtidos dos descartes *post mortem* de animais criados para o abate comercial (artigo 1º, parágrafo 3º, Lei nº 11.794/08, de 8 de outubro de 2008). Como a experimentação animal é definida como procedimentos conduzidos em animais vivos (artigo 3º, Lei nº 11.794/08, de 8 de outubro de 2008), o estudo não requereu prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais. Os dentes foram previamente esterilizados com auxílio de um forno de micro-ondas, a 650 W, por 3 minutos (Micro-ondas Electrolux MEV41, Curitiba, PR, Brasil) [Viana et al., 2010; Favretto et al., 2018]. Os blocos tiveram sua superfície de dentina planificada e a superfície de esmalte foi polida sequencialmente utilizando discos de papel de carboneto de silício (granulação 600, 800 e 1200, Extec, Enfield, CT, USA) e máquina de polimento automática (Vector-Phoenix Beta, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), operada com 4 lbs, 200 rpm e água. Os blocos de esmalte foram submetidos a polimento final com disco de feltro umedecido com solução aquosa diamantada ($0,25 \mu\text{m}$, Extec, Enfield, CT, USA). Ao final do uso de cada lixa, os blocos foram limpos em água deionizada utilizando ultrassom (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brazil), operado a 40 Hz e 135 W durante 20 minutos a temperatura ambiente [Favretto et al., 2018; Neves et al., 2018]. Os blocos foram estocados em ambiente umedecido com água deionizada a 4°C durante o preparo dos blocos.

Foram selecionados blocos com superfície plana, sem riscos, trincas ou hipoplasias, e com dureza de superfície inicial (SHi) entre 351,0 e 368,0 KHN. A dureza de superfície (SH) foi determinada a uma distância de $200 \mu\text{m}$ do vértice direito de uma impressão de referência feita a $1000 \mu\text{m}$ (Knoop, 500 g, 10 segundos, Shimadzu HMV-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) na região central do bloco de esmalte. Foram realizadas cinco impressões separadas por uma distância de $100 \mu\text{m}$ utilizando uma ponta Knoop, com carga de 25 g e tempo de 10 s [Toledo P.T.A, 2022]. Os blocos de esmalte foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a média de SH do total de blocos e o intervalo de confiança entre 10 grupos experimentais: placebo (controle negativo); 1100 ppm F (controle positivo); 0,5%

NaTMP; 1% NaTMP; 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (fonte de Ca^{+2} proveniente de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$); 0,5% TMP- CaCl_2 e 1% TMP- CaCl_2 (fonte de Ca^{+2} proveniente de CaCl_2); 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (fonte de Ca^{+2} proveniente de $\text{Ca}(\text{OH})_2$).

3.2.2. Formulação, determinação do pH e concentração de F, P e Ca nos dentifrícios experimentais

Os dentifrícios foram manipulados em laboratório com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foram preparados dentifrícios contendo TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, TMP- CaCl_2 , TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaTMP nas concentrações de 0,5 e 1%. Um dentifrício placebo (sem F e sem PO_4^{3-}) e um dentifrício contendo 1100 ppm F (NaF , Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha) foram preparados utilizando a mesma formulação base que os demais.

Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 (peso:peso) e foi realizada a leitura através do eletrodo de pH (2A09E, Analyser, São Paulo, Brazil), calibrado com padrão de pH 4 e 7, sob agitação constante [Moretto et al., 2010]. Para determinação do F, foi pesado ~100 mg de cada dentifrício, em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais foram acrescentadas água deionizada até volume final de 10 mL. Após dispersão em água, uma amostra da suspensão foi tratada com HCl 2 mol L^{-1} para avaliação de fluoreto total e tamponada com NaOH 1 mol L^{-1} . Para avaliação do fluoreto iônico, os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação (906 xg; 20 min). O mesmo volume de TISAB II ("tampão de ajuste de força iônica total", Orion, Thermo Scientific Inc., Beverly, MA, EUA) foi adicionado às soluções. As medições de flúor foram realizadas com um eletrodo íon seletivo para fluoreto (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A), calibrados com padrões contendo entre 0,125 e 4,0 $\mu\text{g F/mL}$. foi usado.

Para medições de fósforo total e cálcio em dentifrícios, a amostra foi submetida à hidrólise ácida prévia com adição de HCl 1 mol L^{-1} em temperatura logo abaixo do ponto de ebulição. O fósforo total foi determinado utilizando método colorimétrico do molibdato com comprimento de onda de 660 nm [Fiske & Subbarow, 1925]. Também foi determinado o P iônico (no sobrenadante – PI) utilizando 100 μL das amostras. Tanto as amostras quanto os padrões de P (1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g P/mL}$)

foram acrescidos com 50 µL de molibdato e 20 µL de reativo redutor em placas de 96 poços [Delbem et al., 2012; Amaral et al., 2018].

O cálcio (Ca) foi determinado (µg Ca/g) em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA), com comprimento de onda de 650 nm de acordo com o método colorimétrico do Arsenazo III [Vogel et al., 1983]. Alíquotas de 5 µL foram coletadas das amostras (suspensão e sobrenadante) e 50 µL de água deionizada e 50 µL de Arsenazo foram adicionados em microplacas de 96 poços (“Fundo chato”, Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) [Delbem et al., 2012; Amaral et al., 2018]. Foram utilizados padrões contendo 20 a 200 µg Ca/mL para construção da curva de calibração.

3.2.3. Coleta da saliva humana

Previamente aos desafios erosivos, a saliva humana estimulada com parafilme (Parafilm® M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi coletada no período da manhã, 1 h após a refeição da manhã, de voluntários de ambos os gêneros (idade entre 20- 30 anos, $n=6$). Para realização da coleta, o estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa para prévia autorização (CAEE:69125123.5.0000.5420). Imediatamente após a coleta, as amostras das salivas foram combinadas e centrifugadas durante 10 minutos, a 4°C e $2.000 \times g$. Os sobrenadantes foram estocados a -72° C em frascos plásticos com 50 mL [Schipper et al., 2007].

3.2.4. Desafios erosivos

Blocos hígidos foram imersos (4 mL/bloco) em saliva humana apenas uma vez durante 1 hora sob agitação (100 rpm), sendo posteriormente lavados em água deionizada por 30 s [Buzalaf et al., 2012]. Imediatamente após, os blocos foram imersos individualmente em 4 mL de suspensão de dentifrícios (1:3 peso:peso), durante 2 minutos sob agitação (100 rpm) e lavados em água deionizada por 30 s. O desafio erosivo foi realizado imergindo individualmente cada bloco de esmalte em 4 mL de ácido cítrico (0,75%, pH 3,5, Synth, Diadema, SP, Brasil) sob agitação (100 rpm) durante 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de lavagem com água deionizada durante 30 s. No total, foram realizados quatro desafios erosivos individuais, após os tratamentos com as suspensões de dentifrícios. As medidas de

dureza da superfície final (SHf) foram realizadas após os tratamentos (T0) e após o 1º, 2º, 3º e 4º desafio erosivo (T1, T2, T3, T4) para calcular a porcentagem de perda da dureza de superfície ($\%PDS = [(SH_{T,d} - SH_i) / (SH_i)] \times 100$) [Toledo P.T.A, 2022].

3.3. Análise estatística

Os grupos experimentais e as condições do esmalte (pós-tratamento, 1º, 2º, 3º e 4º desafios erosivos) foram considerados como fatores de variação. A %PDS foi usada como variável. As variáveis %PDS em cada tempo foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios seguidas pelo teste Student-Newman-Keuls. Foi utilizado do programa estatístico SigmaPlot (SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, USA) para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Síntese e caracterização dos ciclotrifosfatos a base de cálcio

Através das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível observar granulações pequenas e regulares para todos os grupos analisados (NaTMP, TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$, TMP- CaCl_2 e TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) (Figura 1). Pelos espectrogramas obtidos pela técnica de espectroscopia EDS, foram observados picos de sódio (Na) a 1,04 keV para o NaTMP, TMP- CaCl_2 e TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, além de picos de oxigênio (O) a 0,52 keV e fósforo (P) a 2,02 keV comuns a todos outros compostos, houve também a presença de picos a 3,69 e 4,00 KeV característicos de cálcio (Ca) nos compostos que apresentaram este elemento e um pico a 2,60 keV característico do cloro (Cl) para o composto de TMP- CaCl_2 (Figura 1).

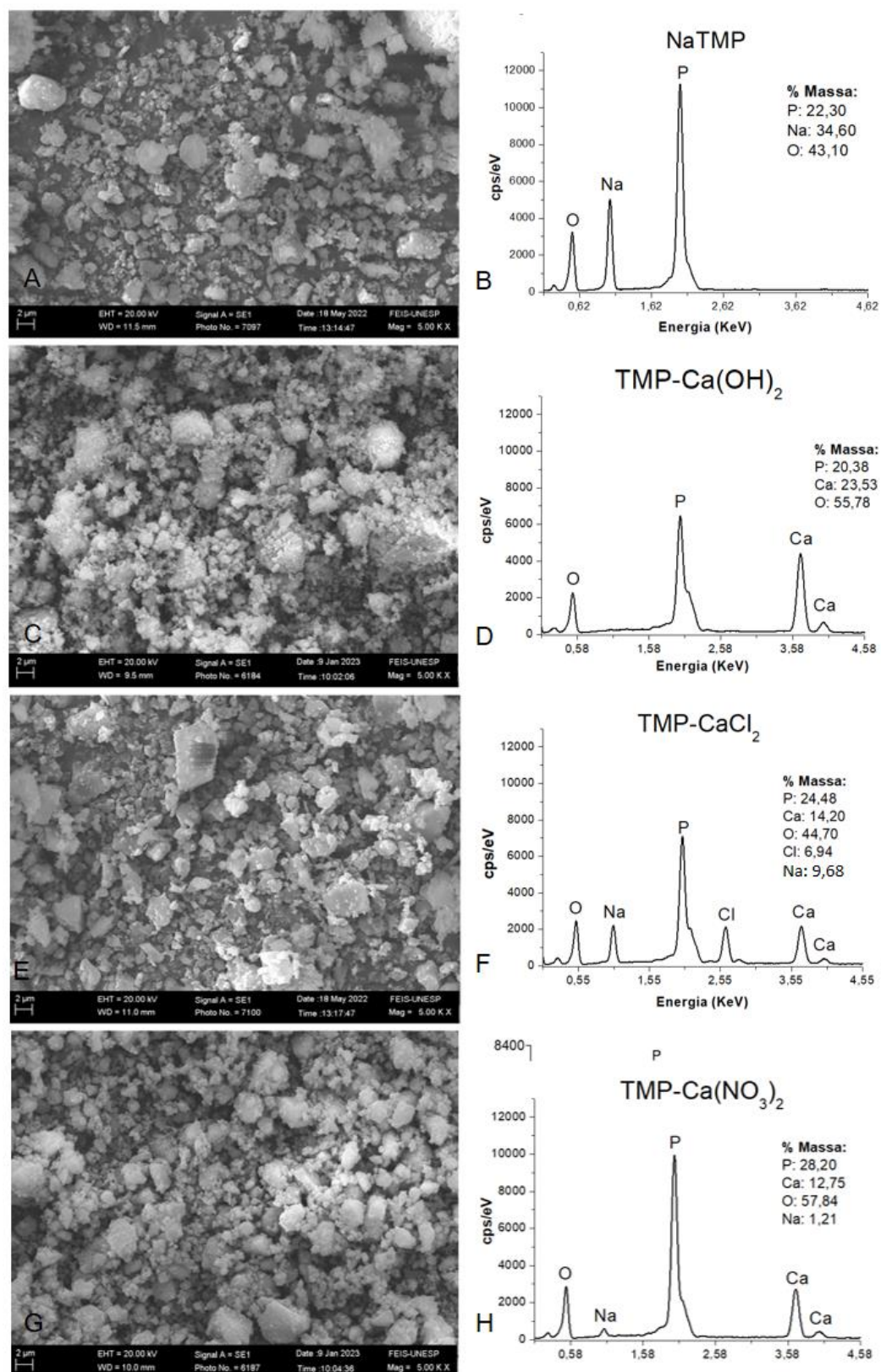


Figura 2. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A), TMP-Ca(OH)₂ (C), TMP-CaCl₂ (E) e TMP-Ca(NO₃)₂ (G) e respectivos histogramas de EDS (B, D, F, H).

4.3. Formulação, Determinação de pH e concentração de F e P nos dentifrícios experimentais.

O grupo placebo, 1100 ppm F e TMP-Ca(OH)₂ apresentaram valores de pH próximo ao neutro, enquanto as demais soluções de dentifrício apresentaram pH fracamente ácido (Tabela 1). A concentração de fluoreto do grupo 1100 ppm F e dos demais foram condizentes com a manipulação do dentifrício, assim como a concentração do cálcio (Ca), fósforo (P) e fluoreto (F⁻) nos demais grupos. As concentrações de cálcio e fósforo foram maiores após a hidrólise das suspensões de dentifrício (P total e Ca iônico).

Tabela 1 – Valores médios (DP) de fósforo (P) iônico e total, cálcio (Ca) iônico e total, fluoreto (F⁻) iônico e total e pH dos dentifrícios

Concentração	Grupos	P Iônico (µg/mL)	P Total (µg/mL)	Ca Iônico (µg/mL)	Ca Total (µg/mL)	F Iônico (µg/mL)	F Total (µg/mL)	pH
Controles	Placebo	-	-	-	-	11,7 (0,99)	12,4 (1,04)	6,6 (0,05)
	1100 ppm F	-	-	-	-	1141 (21,39)	1175 (22,39)	6,9 (0,10)
0,5%	NaTMP	11,1 (1,71)	43,9 (8,99)	-	-	5,1 (0,13)	5,9 (0,20)	6,2 (0,04)
	TMP-Ca(NO ₃) ₂	15,3 (3,79)	25,3 (3,48)	1,1 (0,07)	60,3 (1,40)	9,1 (0,11)	8,9 (0,28)	6,1 (0,1)
	TMP-CaCl ₂	17,0 (1,12)	34,7 (7,79)	0,9 (0,03)	52,9 (1,10)	6,5 (3,37)	9,1 (0,45)	6,5 (0,03)
	TMP-Ca(OH) ₂	12,8 (0,03)	40,2 (1,34)	1,4 (0,04)	43,0 (0,61)	8,0 (0,29)	8,8 (0,26)	7,0 (0,03)
1%	NaTMP	14,6 (2,20)	92,9 (8,82)	-	-	5,6 (0,77)	4,0 (0,80)	5,9 (0,01)
	TMP-Ca(NO ₃) ₂	12,0 (0,89)	40,1 (0,05)	1,1 (0,03)	77,6 (9,17)	8,3 (2,10)	9,1 (0,11)	5,3 (0,40)
	TMP-CaCl ₂	36,1 (2,99)	55,9 (1,05)	0,9 (0,05)	81,9 (6,73)	6,9 (0,10)	10,8 (0,75)	6,3 (0,02)
	TMP-Ca(OH) ₂	23,2 (1,96)	82,2 (3,70)	1,5 (0,10)	44,3 (1,71)	6,2 (0,70)	9,7 (0,69)	7,1 (0,16)

(-): Valor não detectável pela técnica.

4.2. Perda de dureza de superfície

Foi possível observar perda significativa na dureza de acordo com os tempos/desafios, dentro de cada grupo experimental (Figura 2). Os valores de dureza superficial (%PDS) não diferiram entre si após o tratamento com os dentifrícios (T0) (Figura 2). Os tratamentos com dentifrícios 1100 ppm F, 1% TMP- CaCl_2 , 1% e 0,5% NaTMP, 1% e 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresentaram menores perdas em comparação aos outros grupos avaliados, sem diferença estatística entre si para o T1 e T2. Os grupos 0,5 e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ obtiveram %PDS iguais ao grupo placebo nos primeiros dois desafios (T1 e T2) e nos dois desafios seguintes (T4 e T5) apresentaram %PDS iguais ao grupo 1100ppm F. A %PDS não diferiu entre os tratamentos contendo 0,5 e 1% de TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após o tratamento (T0) e durante os desafios (T1, T2, T3, T4). Após os dois último desafios ácidos (T3 e T4) estes grupos promoveram as menores %PDS quando comparados aos demais grupos ($p < 0,001$).

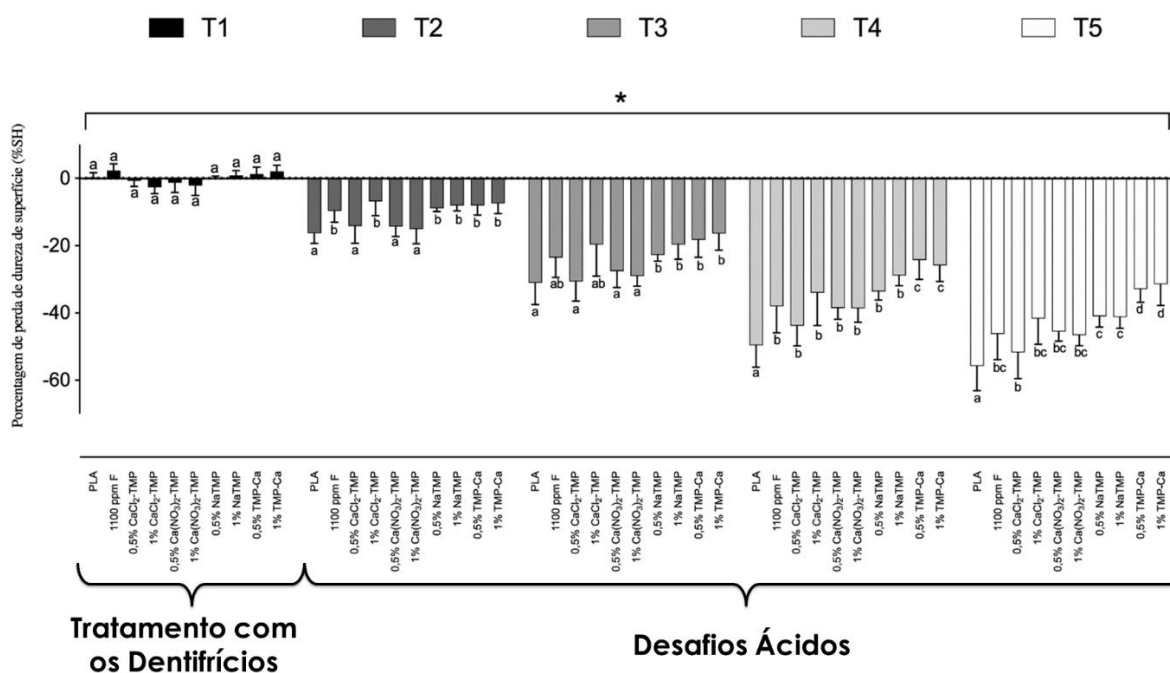


Figura 3. Valores médios de porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) de cada grupo após o tratamento (T0) e após os desafios ácidos (T1, T2, T3, T4). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos. Barras denotam desvios padrões das médias (ANOVA, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$, $n = 12$). * indica diferença significativa entre diferentes tempos dentro de cada grupo experimental. Placebo (controle negativo); 1100 ppm F (controle positivo); 0,5% NaTMP; 1% NaTMP; 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (fonte de Ca^{+2} proveniente de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$); 0,5% TMP- CaCl_2 e 1% TMP- CaCl_2 (fonte de Ca^{+2} proveniente de CaCl_2); 0,5% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 1% TMP- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (fonte de Ca^{+2} proveniente de $\text{Ca}(\text{OH})_2$).

5. DISCUSSÃO

A associação do trimetafosfato de sódio (NaTMP) a produtos fluoretados tem mostrado reduzir o processo de desmineralização e o desgaste erosivo do esmalte dentário [Moretto et al., 2010; Manarelli et al., 2013; Manarelli et al., 2014]. Há evidências de que os agentes a base de fosfato de cálcio fornecem altas concentrações de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} que ajudam a prevenir lesões erosivas, quando aplicado antes do desafio ácido, reduzindo a porcentagem de perda de microdureza superficial do esmalte humano [Yu et al., 2018 ; Bejoy et al., 2020]. Porém, até então não foi avaliado o efeito de um ciclofosfato com cálcio em sua composição na dissolução do esmalte. Os resultados deste estudo mostraram que o ciclofosfato a base de cálcio apresentou efeito preventivo em lesões erosivas iniciais do esmalte quando comparado ao 1100 ppm F; assim a hipótese nula foi rejeitada.

A influência do flúor na erosão dentária depende de muitos fatores, como maior concentração, frequência de aplicação e veículo [Schlueter et al., 2020]. A presença de fluoreto na superfície do esmalte leva à formação de uma camada protetora de fluoreto de cálcio (CaF_2) que bloqueia a ação dos ácidos e promove o endurecimento dessa superfície, entretanto o CaF_2 é dissolvido facilmente em pHs < 4,00, o que limita sua eficácia nestas condições, sendo gradualmente perdido ao longo dos desafios ácidos [Buzalaf et al., 2012, Magalhães et al., 2011]. No presente estudo, o NaTMP apresentou perdas de dureza de superfície semelhantes ao grupo 1100 ppm F após dois primeiros desafios ácidos (T1 e T2). Esse resultado difere de estudos anteriores, pois o NaTMP apresenta resultados significativos na desmineralização do esmalte apenas quando associado ao F [Amaral et al., 2016; Danelon et al., 2014; Takeshita et al., 2009]. É importante ressaltar que nenhum estudo investigou o efeito antierosivo de dentifrícios com NaTMP sem associar ao F. Diante dos resultados, o NaTMP possivelmente foi incorporados a película salivar ou a superfície do esmalte promovendo uma proteção nos primeiros desafios ácidos, isso ocorre porque os grupos fosfatos podem se ligar a locais livres de cálcio na superfície do esmalte [Busscher et al., 2002].

Os dentifrícios com os compostos TMP-CaCl_2 e $\text{TMP-Ca(NO}_3)_2$ apresentaram maior perda de dureza superficial (%PDS) quando comparado ao TMP-Ca(OH)_2 . Apesar da síntese por meio da mistura de soluções seja o método mais prático e acessível, subprodutos podem ser formados, diminuindo a ação e concentração do

ciclotrifosfato de cálcio. As reações dos grupos contendo TMP-CaCl₂ e TMP-Ca(NO₃)₂, além de possivelmente produzirem um ciclotrifosfato contendo cálcio, produzem, respectivamente, os subprodutos NaCl e NaNO₃, cuja presença em dentifrícios não causa efeitos adversos à saúde bucal. Soluções salinas (NaCl) em concentrações maiores são utilizadas como enxaguante bucal, reduzindo a contagem de colônias de *S. mutans* pela ação da osmose [Duane et al, 2023].

A utilização da cromatografia por meio da resina de troca iônica mostra-se o método mais eficiente de síntese do ciclotrifosfato a base de cálcio, removendo todo Na e impurezas da solução antes da incorporação do íon Ca⁺², sendo o único subproduto da síntese a água. Na análise de EDS, foi possível verificar ausência do pico de sódio e presença do pico de cálcio comprovando a substituição total de sódio por cálcio, considerando os dados de % de massa do EDS. Esse novo composto levou ao menor amolecimento do esmalte com efeito superior aos demais grupos avaliados, independente da sua concentração, evidenciando a eficácia da síntese. Provavelmente, no processo de substituição do sódio, um átomo de cálcio é ligado a duas moléculas do NaTMP formando uma estrutura reticular [Pancote et al., 2014], o cálcio ligado somente pôde ser quantificado por meio de hidrólise, denotando uma forte interação entre cálcio e TMP, na qual possivelmente mantém a forma cíclica e não linear, corroborando com os resultados promissores obtidos após os desafios ácidos. Esta alteração nas ligações entre as moléculas aumentou a capacidade do TMP-Ca(OH)₂ em reduzir a penetração dos ácidos para o interior do esmalte e a perda mineral. Além disso, ao utilizar o TMP-Ca(OH)₂, possivelmente ocorre um aumento do Ca⁺² e PO₄⁻³ no meio, que são importantes para a estrutura mineral dos dentes [Danelon et al., 2014; Nalin et al., 2021]. Isso permite que o TMP-Ca(OH)₂ tenha um efeito direto no esmalte e diminua a solubilidade ácida da hidroxiapatita [Danelon et al., 2014].

O modelo experimental de erosão inicial fornece informações relevantes sobre a ação dos novos compostos sintetizados na superfície do esmalte após os desafios ácidos. A diminuição constante da microdureza superficial em todos os grupos mostra que os tratamentos realizados não previnem completamente o desgaste erosivo, mas a progressão da erosão foi significativamente prejudicada pelo TMP-Ca(OH)₂. Os ensaios de dureza de superfície foram adequados para analisar o amolecimento do esmalte sem perda quantitativa de substância, permitindo dessa forma determinar o quanto o esmalte está amolecido e o quanto é suscetível de reparo

e perda após os desafios ácidos [Stenhagen et al., 2010]. A saliva humana utilizada no presente estudo reproduz a película adquirida, na qual não permite o contato direto com o ácido e o esmalte reduzindo a dissolução do esmalte, simulando uma condição clínica [Magalhães et al., 2009; Buzalaf et al., 2012]. A presença da película adquirida não interfere no efeito dos fosfatos e melhora sua capacidade em reduzir a dissolução da hidroxiapatita.

O estudo apresenta algumas limitações intrínsecas ao modelo *in vitro*, como os desafios ácidos realizados logo após o tratamento e a lavagem do esmalte logo após o desafio ácido. Em condições clínicas, o paciente pode demorar horas de um procedimento a outro, mantendo o ácido por mais tempo em contato com o esmalte, o que aumentaria a perda de dureza. Além disso, deve-se observar possíveis limitações dos resultados, como a ausência do efeito abrasivo da escovação e o uso de esmalte bovino mais suscetível a ataques de ácidos. Estudos futuros são necessários para corroborar e consolidar os resultados obtidos neste estudo, bem como aprofundar o conhecimento sobre o impacto do ciclofosfato a base de cálcio.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados da metodologia *in vitro*, concluiu-se que síntese por cromatografia possibilita a substituição total do elemento sódio pelo elemento cálcio e os dentifrícios contendo TMP-Ca(OH)_2 promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F e aos grupos contendo NaTMP na erosão inicial do esmalte *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS

1. Amaral JG, Delbem ACB, Pessan JP, Manarelli MM, Barbour ME. Effects of polyphosphates and fluoride on hydroxyapatite dissolution: A pH-stat investigation. Arch Oral Biol 2016;63:40–46.
2. 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;106(7):2553-2564.
3. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. Caries Res 2011;45:24–32.

4. Bejoy BM, Sruthi MS, George L, Mathew J, Vineet RP, Joy A. Comparative Evaluation of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate-Fluoride Paste and Sodium Fluoride Mouthwash in the Prevention of Dental Erosion: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract*. 2020 Mar 1;21(3):267-270. PMID: 32434972.
5. Busscher H, White D, van der Mei H, Baig A, Kozak K. Hexametaphosphate effects on tooth surface conditioning film chemistry--in vitro and in vivo studies. *J Clin Dent*. 2002;13(1):38-43. PMID: 11507931.
6. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J. Appl. Oral Sci*. 2012;20:493–502.
7. Cury JA, Oliveira MJL, Tenuta LMA, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by brazilian children. *Braz Dent J* 2010;21(5):396–400.
8. Dalpasquale G, Delbem ACB, Pessan JP, Nunes GP, Gorup LF, Neto FNS, de Camargo ER, Danelon M. Effect of the addition of nano-sized sodium hexametaphosphate to fluoride toothpastes on tooth demineralization: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2017 Jun;21(5):1821-1827. doi: 10.1007/s00784-017-2093-3. Epub 2017 Feb 28. Erratum in: *Clin Oral Investig* 2017 Jun;21(5):1829.
9. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig*. 2014 May;18(4):1119-1127. doi: 10.1007/s00784-013-1102-4. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24061604.
10. Delbem ACB, Bergamaschi M, Rodrigues E, Sassaki KT, Vieira AEM, Missel EMC. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *J Appl Oral Sci* 2012;20(1):94–98.
11. Delbem ACB, Pessan JP. Alternatives to enhance the anticaries effects of fluoride. In: Coelho Leal S, Takeshita E. (eds) *Pediatric restorative dentistry*. Springer, Cham. 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93426-6_6.
12. Duane B, Yap T, Neelakantan P, Anthonappa R, Bescos R, McGrath C, McCullough M, Brookes Z. Mouthwashes: Alternatives and Future Directions. *International Dental Journal* 2023;73; 89-97.
13. Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS Camargo ER, de Toledo PTA, Pedrini D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2018;22(9):3021-3029.
14. Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375–400.

15. 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;122:105001.
16. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent advances in remineralization therapies for caries lesions. *Adv Dent Res* 2018;29(1):55–59.
17. Griffith EJ. The structure of salt sodium calcium metaphosphate ($\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$). *Inorg Chem* 1962;1(4):962.
18. Lagerweij MD, ten Cate JM. Acid susceptibility at various depths of pH-cycled enamel and dentine specimens. *Caries Res* 2006;40(1):33-7. doi: 10.1159/000088903.
19. 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. doi: 10.1159/000325915.
20. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. In Buzalaf MA (ed): *Fluoride in the oral cavity*. Monogr Oral Sci Basel, Karger, 2011.
21. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2009 Mar-Apr;17(2):75-86. doi: 10.1590/s1678-77572009000200002. PMID: 19274390; PMCID: PMC4327581.
22. Magalhães AC, Wiegand A, Young A, Schlueter N. Dental erosion. *Int J Dent*. 2012;2012:356021. doi: 10.1155/2012/356021. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23304144; PMCID: PMC3529484.
23. Moretto MJ, Magalhães AC, Sassaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44(2):135–140.
24. Manarelli MM, Delbem AC, Lima TM, Castilho FC, Pessan JP. In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Caries Res*. 2014;48(4):299-305. doi: 10.1159/000356308. PMID: 24526110.
25. Manarelli MM, Moretto MJ, Sassaki KT, Martinhon CC, Pessan JP, Delbem AC. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion. *Am J Dent*. 2013 Dec;26(6):307-12. PMID: 24640433.

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; doi:10.1159/000518943.
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;90:108–112.
28. Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: In vitro study. *Arch Oral Biol* 2014;59:336–340.
29. Philip N. State of the art enamel remineralization systems: The next frontier in caries management. *Caries Res* 2019;53(3):284–295.
30. Rajeshkumar S. Synthesis of silver nanoparticles using fresh bark of *Pongamia pinnata* and characterization of its antibacterial activity against gram positive and gram negative pathogens. *Resour Effici Technol* 2016;2:30–35.
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;82:206–211.
32. Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? *Aust Dent J* 2008;53:268–273.
33. Schipper R, Loof A, De Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. SELDI-TOFMS of saliva: methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B* 2007;847:45–53.
34. Schlueter N, Luka B. Erosive tooth wear - a review on global prevalence and on its prevalence in risk groups. *Br Dent J* 2018;224(5):364-370. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.167. Epub 2018 Mar 2.
35. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, Hara AT, Huysmans MDNJM, Lussi A, Moazzez R, Vieira AR, West NX, Wiegand A, Young A, Lippert F. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):2-6. doi: 10.1159/000503308. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31610535.

36. Souza MDB, Pessan JP, Lodi CS, Souza JAS, Camargo ER, Souza Neto FN, Delbem ACB. Toothpaste with nanosized trimetaphosphate reduces enamel demineralization. *JDR Clin Trans Res* 2017;2(3):233–240.
37. Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. *Caries Res* 2010;44(6):555–561.
38. Takeshita EM, Exterkate RA, Delbem AC, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. *Caries Res.* 2011;45(5):494-7. doi: 10.1159/000331209. Epub 2011 Sep 24. PMID: 21952397
39. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem, ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;43:50–56.
40. 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.
41. Takeshita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res* 2011;45(5):494–497.
42. Toledo, P.T.A., Delbem, A.C.B., Cannon, M.L., Sakamoto A.E, Pedrini D. The effect of toothpaste with reduced concentration of fluoride-containing sodium trimetaphosphate and polyols on initial enamel erosion. *Clin Oral Invest* 26, 7243–7252 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04684-7>;
43. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: Effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization. *Caries Res* 2010;44:349–357.
44. Vogel GL, Chow LC, Brow WL. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23–31.
45. Watanabe M, Yoshida K, Sakurai M, Sato S. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *J Mater Sci* 1998;33:5601–5606.
46. Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions--a review. *Oral Health Prev Dent* 2003;1(4):245-53.

47. Yu H, Jiang NW, Ye XY, Zheng HY, Attin T, Cheng H. In situ effect of Tooth Mousse containing CPP-ACP on human enamel subjected to in vivo acid attacks. J Dent. 2018 Sep;76:40-45. doi: 10.1016/j.jdent.2018.05.021. Epub 2018 May 30. PMID: 29857075.

ANEXOS

ANEXO A – Síntese de ciclofosfatos com substituição do sódio pelo cálcio e confecção dos dentifrícios



Diluição de 15 g de NaTMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em 50 mL de água deionizada (pH 5,6).



Tratamento da solução em uma coluna de vidro (2 cm × 30 cm) contendo resina de troca iônica catiônica forte na forma H^+ (PUROLITE C100H, Purolite®, Philadelphia, PA, EUA) para a substituição dos íons sódio [Watanabe et al., 1998], com fluxo de 0,5 mL/min.



Adição de suspensão de 8,78 g de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, Cód. HC09743RA, Exôdo, Sumaré, SP, Brasil) ao filtrado para formação do ciclofosfato de cálcio.



Aparência dos precipitados de TMP-CaCl_2 e $\text{TMP-Ca(NO}_3)_2$ respectivamente logo após a mistura de soluções.



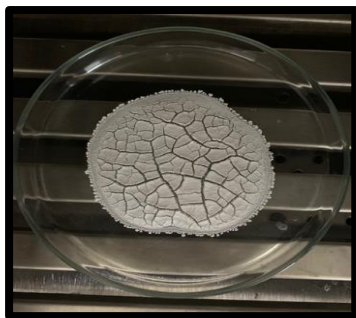
Soluções e precipitados de ciclotrifosfatos de cálcio mantidos em estufa por 24 horas a 37°C .



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).



Precipitado mantido em estufa por 24 horas a 70°C para secagem.



Aparência do precipitado após filtrado e seco em estufa a 70°C



Moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) para a homogeneização do pó por 8 horas.

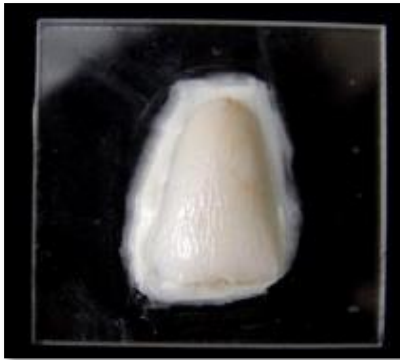


Pós moídos e caracterizados prontos para serem adicionados aos dentifrícios experimentais.

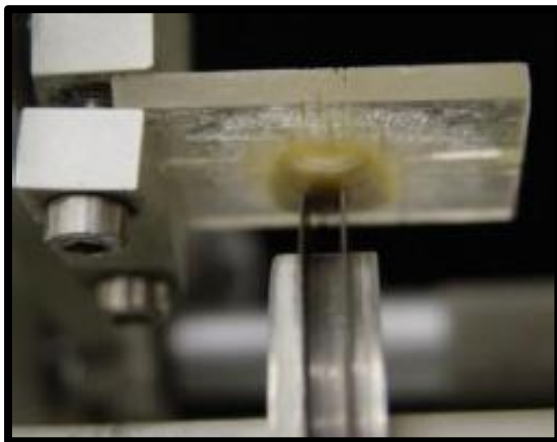


Dentifrícios experimentais confeccionados em laboratório utilizados no tratamento.

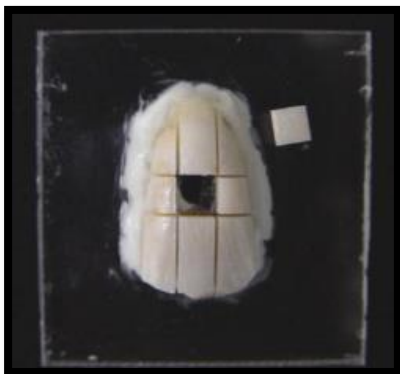
ANEXO B – Obtenção e preparo dos blocos de esmalte



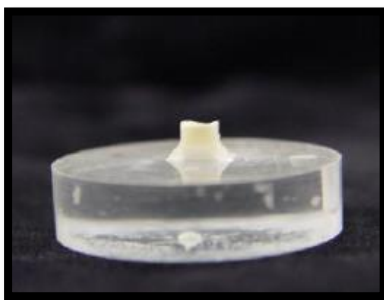
Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água deionizada) com face vestibular fixada em placa de acrílico com cera pegajosa.



Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond – n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Foi realizado também corte no sentido transversal.



Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário utilizado como espécime.

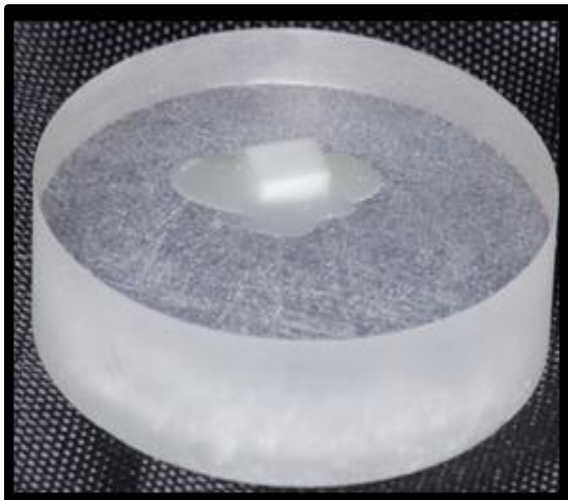


Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (3 cm de diâmetro por 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.



Polimento de dentina, utilizando politriz Beta Grinder-Polisher (Buehler) com lixa de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, Buehler), durante 20 segundos, sob baixa rotação e refrigeração.

Polimento de esmalte com lixas 600, 800, 1200 e feltro com solução diamantada sob baixa rotação e refrigeração.



Bloco fixado em base acrílica com sua superfície de esmalte voltada para cima, polida para análise de dureza, tratamento e desafios ácidos.

ANEXO C – Comitê de ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Sínteses e caracterização de um novo ciclofosfato de cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte in vitro

Pesquisador: THAYSE YUMI HOSIDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69125123.5.0000.5420

Instituição Proponente: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.029.408

Apresentação do Projeto:

Trata-se de apresentação de Projeto de Pesquisa: Sínteses e caracterização de um novo ciclofosfato de cálcio e seu efeito em dentifrícios contra a erosão do esmalte in vitro.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente trabalho será sintetizar e caracterizar um ciclofosfato com substituição parcial (CaNaTMP) ou total (CaTMP) do sódio pelo cálcio, e verificar seu efeito utilizando modelo de lesões iniciais de erosão do esmalte.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCO MÍNIMO.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

NÃO HÁ PENDÊNCIAS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adicionados de acordo com a resolução 466 de dezembro de 2012.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3234

Fax: (18)3636-3203

E-mail: cep.foa@unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"**



Continuação do Parecer: 6.029.408

Recomendações:

NÃO HÁ.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto apresentado sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Salientamos que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 01/10/2023.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2124664.pdf	18/04/2023 22:53:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	18/04/2023 22:40:44	THAYSE YUMI HOSIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	18/04/2023 22:40:22	THAYSE YUMI HOSIDA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	18/04/2023 22:39:58	THAYSE YUMI HOSIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3234

Fax: (18)3636-3203

E-mail: cep.foa@unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 6.029.408

ARACATUBA, 28 de Abril de 2023

Assinado por:
André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3234

Fax: (18)3636-3203

E-mail: cep.foa@unesp.br

ANEXO D – Coleta de saliva humana

Frente a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CAEE:17281319.3.0000.5420), foi coletada saliva humana de 6 voluntários saudáveis no período da manhã, pelo menos 1 hora após a ingestão do café da manhã. Cada voluntário recebia um pedaço de Parafilm para ajudar na produção da saliva e um recipiente plástico onde depositavam por 20 minutos toda saliva produzida. Ao final, toda saliva coletada foi homogeneizada em um becker e vertida em vários falcons de 15 mL. Em seguida, esses falcons eram levados a uma centrífuga, por 10 minutos, a 4°C, força de 2.000 $\times g$. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em frascos de 50 mL a -72°C.



Transferência da saliva doada para tubos do tipo Falcon



Centrifugação da saliva em 2.000 $\times g$ por 10 minutos a -4°C

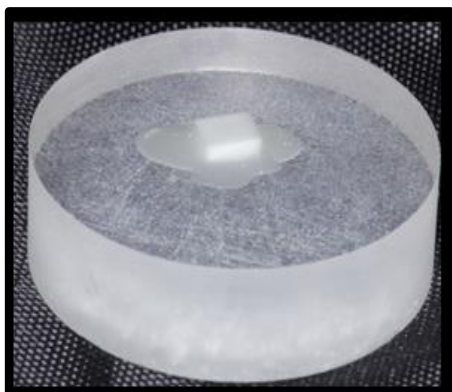


Separação do sobrenadante e pellet



Sobrenadante líquido armazenado em frascos de 50 mL e mantido em freezer a -72°C

ANEXO E – Tratamento com as soluções e análise do efeito protetor em lesões erosivas iniciais



Blocos fixados em base acrílica



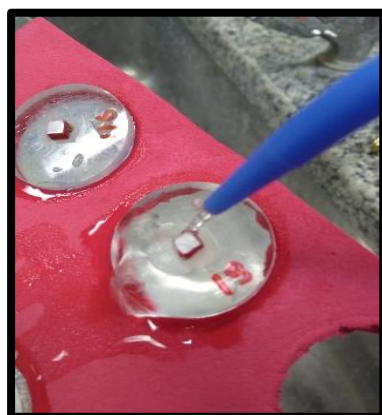
Bases acopladas em dispositivo para realização dos tratamentos e desafios ácidos



Saliva humana descongelada em banho maria a 37°C



Imersão dos blocos de esmalte (4 mL/bloco) em saliva humana durante 1 hora sob agitação



Lavagem com água deionizada por 30 s



Tratamento dos blocos de esmalte em soluções experimentais por 2 min



Lavagem com água
deionizada por 30 s



4 Desafios erosivos realizados com duração
de 1 min cada