

**ANNA JULHA SOUZA DE JESUS**

**Síntese de ciclotrifosfato de cálcio e seu efeito  
contra a erosão inicial do esmalte: estudo in vitro**

**Araçatuba – SP**

**2024**

**ANNA JULHA SOUZA DE JESUS**

**Síntese de ciclotrifosfato de cálcio e seu efeito  
contra a erosão inicial do esmalte: estudo in vitro**

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

**Araçatuba – SP**

**2024**

Dedico esse trabalho aos meus pais Juliana Sasso de Souza e Sérgio Lima de Jesus (*in memoriam*) e aos meus avós Clarice Sasso de Souza e Francisco Paulo de Souza, com meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, em especial à disciplina de Odontopediatria, que contribuiu durante 4 anos em minha jornada acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, nos processos 121704/2021-1 e 120304/2022-8.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela confiança e oportunidade em ser sua orientada em três projetos de Iniciação Científica, que agregaram de forma excepcional ao meu conhecimento.

A Dr.<sup>a</sup> Priscila Toninato Alves Toledo, pela grande atenção dispensada, pelo auxílio prestado e pela dedicação e carinho, que se tornaram essenciais para que o projeto fosse concluído com sucesso.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela excelência da qualidade técnica de cada um e seus exemplos de comprometimento com a educação, em especial ao professor Dr. Juliano Pelim Pessan, por ter aceito o convite em ser minha banca avaliadora, assim como pelos ensinamentos durante a graduação e auxílio no laboratório de odontopediatria.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho e contribuem de forma efetiva na rotina acadêmica.

À minha mãe Juliana Sasso de Souza, por todo amor, cuidado e educação que me tornaram quem eu sou hoje. Obrigada pelos incontáveis esforços feitos para que eu pudesse chegar até aqui, e pelo investimento em todos

os aspectos da minha vida e pelo apoio incondicional, fosse nos maus ou bons momentos.

À minha família, pelo carinho, atenção e apoio que me foi dado durante todo esse período, especialmente meus avós e tias maternas pelo estímulo que sempre injetaram em mim.

Agradeço ao meu namorado Kenny Kendi Hokazono, meu maior admirador, incentivador e companheiro, e que, apesar da distância, não mediu esforços para se fazer presente todos os dias durante minha graduação e em minha vida.

Aos meu melhor amigo José Roberto Vergínio de Matos, pela amizade cultivada, por ser minha dupla, dividir a rotina e todos os momentos até aqui. Você foi um presente da graduação e uma parte da minha família em Araçatuba.

A minha grande amiga Ana Paula Ribeiro Miranda, minha eterna gratidão e admiração pela pessoa que você é, agradeço por todos os momentos que estivemos juntas, estarei sempre te apoiando.

Aos meus amigos da turma 65, que estiveram ao meu lado compartilhando alegrias e tristezas e me proporcionando momentos de descontração e lazer.

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."*

Martin Luther King

## RESUMO

Jesus AJS. **Síntese de ciclotrifosfato de cálcio e seu efeito contra a erosão inicial do esmalte: estudo in vitro.** 2024. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

O objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar ciclotrifosfato (TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio, e verificar seu efeito na erosão inicial do esmalte. Microcompostos de ciclotrifosfatos com substituição total do sódio pelo cálcio (CaTMP) foram sintetizados e caracterizados morfológicamente por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX). Os blocos de esmalte (n = 98) foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a média de dureza de superfície (SH) do total de blocos e o intervalo de confiança entre 7 grupos de dentifrícios experimentais contendo 1% dos compostos: 0% de CaTMP e 100% de NaTMP (NaTMP), 20% de CaTMP e 80% de NaTMP (20% CaTMP), 50% de CaTMP e 50% de NaTMP (50% CaTMP), 80% de CaTMP e 20% de NaTMP (80% CaTMP), e 100% de CaTMP e 0% de NaTMP (CaTMP). Como Controle negativo foi utilizado um dentifrício placebo e, como controle positivo, um dentifrício de 1100 ppm F (NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Para a análise do efeito protetor, os blocos de esmalte hígidos foram imersos em saliva humana por 2 horas (sob agitação), seguido por solução de dentifrícios com saliva humana durante 2 minutos. Logo, foram feitos 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação). A percentagem de variação da dureza superficial (%SH) foi calculada após o tratamento e desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. As variáveis foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O dentifrício contendo CaTMP apresentou o maior efeito protetor em comparação aos outros grupos ( $p < 0,001$ ). O efeito protetor foi 100% CaTMP > 80% CaTMP > 50% CaTMP > 20% CaTMP > 1100 ppm F > NaTMP > Placebo ( $p < 0,001$ ). Quanto maior a porcentagem de CaTMP nas soluções, maior foi a adsorção de CaTMP. Todos os

grupos produziram precipitados com uma camada mais espessa para os grupos CaTMP. Concluiu-se que soluções de dentifrícios contendo CaTMP têm efeito protetor superior nas lesões erosivas iniciais do esmalte.

**Palavras-chave:** Esmalte dental; Fosfatos; Erosão dental.

## ABSTRACT

JESUS AJS. **Synthesis of calcium cyclotriphosphate and its effect against initial enamel erosion: in vitro study.** 2024. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

The objective of the present study was to synthesize and characterize cyclotriphosphate (TMP) with total replacement of sodium by calcium, and to verify its effect on the initial erosion of enamel. Cyclotriphosphate microcompounds with total replacement of sodium by calcium (CaTMP) were synthesized and morphologically characterized using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The enamel blocks (n = 98) were randomly distributed according to the average surface hardness (SH) of the total blocks and the confidence interval between 7 groups of experimental dentifrices containing 1% of the compounds: 0% CaTMP and 100% NaTMP (NaTMP), 20% CaTMP and 80% NaTMP (20% CaTMP), 50% CaTMP and 50% NaTMP (50 % CaTMP), 80% CaTMP and 20% NaTMP (80% CaTMP), and 100% CaTMP and 0% NaTMP (CaTMP). A placebo dentifrice was used as a negative control and a 1100 ppm F dentifrice (NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Germany) was used as a positive control. To analyze the protective effect, the sound enamel blocks were immersed in human saliva for 2 hours (enhanced), followed by a dentifrice solution with human saliva for 2 minutes. Therefore, 4 erosive challenges were performed (citric acid, 0.75%, pH 3.5, for 1 minute, under effective). The percentage of variation in surface hardness (%SH) was calculated after treatment and fatty acid challenges of 1, 2, 3 and 4 minutes. The variables were subjected to two-way repeated measures analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). Toothpaste containing Ca-TMP showed the greatest protective effect compared to other groups ( $p < 0.001$ ). The protective factor was 100% CaTMP > 80% CaTMP > 50% CaTMP > 20% CaTMP > 1100 ppm F > NaTMP > Placebo ( $p < 0.001$ ). The higher the percentage of CaTMP in the solutions, the greater the adsorption of CaTMP. All

groups produced precipitates with a thicker layer for the CaTMP groups. It is concluded that toothpaste solutions containing CaTMP have a superior effect on initial erosive lesions of the enamel.

**Keywords:** Dental enamel; Phosphates; Tooth erosion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de amostras de NaTMP (A) e CaTMP (B). (C) Espectroscopia de raios X com dispersão de energia do composto CaTMP .....	25
Figura 2 – Imagens de MEV de uma amostra representativa em diferentes grupos e respectivo espectro da análise de EDX: (A) Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 100%NaTMP/0%CaTMP, (D) 80%NaTMP/20%CaTMP, (E) 50%NaTMP/50%CaTMP (F) 80CaTMP/20%NaTMP e (G) 100CaTMP/0%NaTMP. ....	29

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Valores médios ( $\mu\text{g/g}$ ) de cálcio (Ca), fósforo (P), fluoreto (F), iônico (I) e total (T), e pH nos grupos experimentais .....	26
Tabela 2 – Valores médios (DP) da porcentagem de alteração da dureza de superfície (%SH) no esmalte de acordo com os grupos e condições experimentais (n=12) .....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca	Cálcio
CaI	Cálcio iônico
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
CaT	Cálcio total
CaTMP	Trimetafosfato de cálcio
DP	Valores médios
EDX	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
ETW	Desgaste dentário erosivo
F	Fluoreto
FI	Flúor iônico
FT	Flúor total
HCl	Ácido clorídrico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Na	Sódio
Na/CaTMP	Ciclotrifosfatos com substituição total do sódio pelo cálcio
NaTMP	Trimetafosfato de sódio
O	Oxigênio
P	Fósforo
PI	Fósforo iônico
PT	Fósforo total
SD	Média
SH	Dureza de superfície
SHC	Alteração da dureza de superfície
SHi	Dureza de superfície inicial
SHf	Dureza de superfície final
TMP	Ciclotrifosfato/Trimetafosfato

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVO .....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Síntese de ciclotrifosfatos (Trimetafosfato: TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio .....	18
3.2 Caracterização de compostos de CaTMP .....	18
3.3 Preparo dos blocos de esmalte e grupos experimentais .....	19
3.4 Formulação dos dentifrícios experimentais e determinação da concentração de F, Ca, P e pH .....	20
3.5 Coleta da saliva humana .....	22
3.6 Desafios erosivos .....	22
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	23
3.8 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS .....	25
5 DISCUSSÃO .....	31
6 CONCLUSÃO .....	34
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXOS .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é a perda química de substância mineralizada do dente causada pela exposição a ácidos não derivados de bactérias orais<sup>1</sup>, enquanto o desgaste dentário erosivo abrange a perda gradual da superfície mineralizada do dente devido a vários fatores físicos ou quimiofísicos, incluindo erosão dentária, atrito e abrasão<sup>1,2</sup>. O desgaste erosivo dos dentes é cada vez mais reconhecido como uma condição comum nas clínicas dentárias, com prevalência relatada variando entre 30 a 50% nos dentes decíduos e 20 a 45% nos dentes permanentes<sup>3</sup>, particularmente exacerbado quando associado ao refluxo gastroesofágico<sup>4</sup>. Estágios avançados de desgaste dentário erosivo podem comprometer tanto a estética quanto a função, impactando significativamente a qualidade de vida do paciente<sup>5</sup>. A erosão dentária continua a ser uma preocupação significativa, necessitando de investigação minuciosa sobre as suas causas, estratégias de prevenção eficazes e protocolos de tratamento apropriados.

Embora o Flúor (F) possa ter um efeito protetor em condições onde os fatores erosivos não são excessivos<sup>6</sup>, alguns estudos mostraram um efeito limitado de cremes dentais contendo pelo menos 1000 ppm de F em substratos dentários erodidos<sup>7,8</sup>. Neste contexto, vários protocolos de tratamento envolvendo compostos fluoretados têm sido implementados para estimular a formação de uma camada de precipitação mineral em lesões erodidas<sup>6,9</sup>. Entre as possíveis opções terapêuticas, tem sido investigada a eficácia de outros agentes remineralizantes, como os sais de fosfato, no manejo da erosão dentária<sup>10,11,12,13</sup>.

Entre os vários sais de fosfato, o trimetafosfato de sódio (NaTMP), um polifosfato cíclico, tem apresentado propriedades promissoras, incluindo forte adsorção em substratos dentários<sup>14,15</sup>, a capacidade de reduzir a difusão de  $H^+$  e aumentam a difusão de cálcio e fosfato<sup>15,16</sup> e a capacidade de ligação a grupos  $OH^-$ <sup>16,17</sup>. Além disso, estudos demonstraram que o NaTMP reduz a erosão das estruturas dentárias quando associado ao flúor (200 a 1100 ppm F)<sup>11,12,18,19</sup>.

Pesquisas indicam que grupos aniônicos de fosfatos lineares podem atrair íons de cálcio, servindo como agentes nucleantes para cristais de apatita <sup>16,17</sup>.

Entende-se que a eficácia do NaTMP depende da sua combinação com flúor<sup>12,14</sup>. Embora estudos recentes tenham explorado os efeitos remineralizantes e o potencial antierosivo do NaTMP em produtos fluoretados, nenhum analisou a substituição química de íons sódio por íons cálcio na molécula TMP (CaTMP). Tal alteração eletrostática poderia potencialmente produzir um composto que combinasse as características de ambos os íons, potencializando sua capacidade antierosiva e possibilitando seu uso sem a necessidade de coadministração com flúor. Além disso, estudar as interações e ligações químicas entre o CaTMP e a superfície do esmalte através da energia livre de superfície pode ajudar a compreender melhor os mecanismos que envolvem os efeitos do CaTMP na erosão inicial do esmalte.

Enquanto isso, o NaTMP tem sido amplamente utilizado devido à sua capacidade de aumentar a redução da solubilidade do esmalte, indicando afinidade pela superfície do esmalte e/ou hidroxiapatita<sup>20</sup>. A substituição de íons sódio por íons cálcio poderia resultar em um composto que combina as propriedades do NaTMP e do cálcio nos processos de mineralização.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo in vitro foi sintetizar ciclotrifosfatos (TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio (CaTMP) e produzir compostos com diferentes proporções (peso/peso) de CaTMP/NaTMP e avaliar seu efeito na erosão inicial do esmalte dentário. A hipótese nula do estudo foi que o dentifrício contendo CaTMP teria um efeito semelhante a um dentifrício 1100 ppm F contra a erosão inicial do esmalte dentário.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Síntese de ciclotrifosfatos (Trimetafosfato: TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio**

As sínteses dos compostos foram realizadas no Laboratório de Odontopediatria do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora (FOA-UNESP)<sup>21</sup>. Os compostos de TMP com substituição total do sódio pelo cálcio foram preparados a partir da dissolução de 30g do TMP de sódio (NaTMP) comercial ( $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ , CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em 40 mL de água deionizada. A seguir a solução foi tratada em uma coluna de troca iônica catiônica para a substituição dos íons sódio pelos de íons de cálcio<sup>22</sup>. O ajuste da composição foi obtido pelo rigoroso controle da quantidade de TMP de sódio inicial, do pH e a fração de resina de troca iônica. A precipitação e a incorporação de cálcio foram feitas com auxílio de uma solução de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , Cód. HC09743RA, Exodo, Brasil), até atingir o pH inicial da solução antes da troca iônica. As soluções foram mantidas em estufa a 37 °C por 48 horas<sup>23</sup>, a seguir filtradas, e o pó resultante, mantido na estufa a 70 °C para secagem, por 24 horas. Em seguida, o pó foi homogeneizado em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 2 horas. O composto foi denominado como TMP de cálcio: CaTMP. Compostos contendo 20%/80%, 50%/50% e 80%/20% de CaTMP/NaTMP (peso/peso) foram misturados em moinho de bolas, como descrito anteriormente.

#### **3.2 Caracterização de compostos de CaTMP**

A morfologia e a estrutura geral do pó CaTMP foram avaliadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de emissão de campo (modelo

SEM/ZEISS DSM-940A, Oberkochen, Alemanha). A amostra do pó foi montada em stubs de alumínio, revestida com uma fina camada de ouro-paládio por meio de revestimento por pulverização catódica e examinada a uma tensão de aceleração de 5 kV. Além disso, a análise de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) foi realizada em MEV para adquirir dados semiquantitativos relativos à composição química do composto.

### **3.3 Preparo dos blocos de esmalte e grupos experimentais**

Blocos de esmalte (4 × 4 × 2 mm, n=98) foram obtidos da porção mais plana da face vestibular das coroas de dentes incisivos bovinos foram imersos em solução de formaldeído a 2% em pH 7,0 por 30 dias antes de qualquer procedimento experimental<sup>11</sup>. Como os dentes bovinos foram 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), e 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 requer prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais. Os blocos tiveram sua superfície de esmalte ou dentina polida sequencialmente utilizando discos de papel de carboneto de silício refrigerado a água (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 refrigeração a água. Os blocos de esmaltes foram submetidos ao polimento final com um disco de feltro umedecido com solução aquosa diamantada (0,25 µm, Extec, Enfield, CT, USA). Os blocos foram estocados em ambiente umedecido com água deionizada a 4°C durante seu preparo. Como critério de inclusão, os blocos apresentaram uma superfície plana, sem riscos trincas ou hipoplasias.

A dureza de superfície (SH) foi determinada da seguinte maneira: uma impressão de referência foi feita a 1000 µm (Knoop, 500 g, 10 segundos, Shimadzu HMV-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) da região central do

bloco de esmalte. A uma distância de 200  $\mu\text{m}$  do vértice direito da maior impressão, foram realizadas cinco impressões (SH inicial - SHi) separadas por uma distância de 100  $\mu\text{m}$  (Knoop, 25 g, 10 segundos, Shimadzu HMV-2000)<sup>11</sup>]. Os blocos de esmalte foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a média de SH do total de blocos e o intervalo de confiança entre 5 grupos de dentifrícios contendo 1% dos compostos: 0% de CaTMP e 100% de NaTMP (NaTMP), 20% de CaTMP e 80% de NaTMP (20% CaTMP), 50% de CaTMP e 50% de NaTMP (50% CaTMP), 80% de CaTMP e 20% de NaTMP (80% CaTMP), e 100% de CaTMP e 0% de NaTMP (CaTMP). Como Controle foi utilizado placebo e, como controle positivo, um dentifrício contendo 1100 ppm F (NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). O número de blocos por grupo foi baseado em estudos prévios que analisaram dentifrícios fluoretados contendo TMP em modelo de erosão<sup>11,24</sup>, e considerando valores médios de dureza superficial (SH) e perda integrada de dureza subsuperficial ( $\Delta\text{KHN}$ ) como desfecho primário, com diferenças mínimas detectáveis entre as médias (50 e 2,000, respectivamente). Adicionalmente, foram considerados no cálculo os desvios padrão esperados (25 e 1.000, respectivamente), um erro  $\alpha$  de 5% e um erro  $\beta$  de 20%. Após tratamento e desafios erosivos, a dureza superficial foi medida e a perda percentual na dureza superficial (%SH) foi determinada. Adicionalmente, também foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e raios X de energia dispersiva (EDX). Para análise estatística, os valores de SH e energia livre superficial foram considerados como variáveis, sendo os grupos experimentais considerados como fator de variação.

### **3.4 Formulação dos dentifrícios experimentais e determinação da concentração de F, Ca, P e pH**

Os dentifrícios foram formulados utilizando os seguintes ingredientes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água

deionizada. Cada ingrediente foi cuidadosamente misturado para atingir um peso total de 100 g para cada pasta de dente. Dentifrícios contendo trimetafosfato de cálcio e trimetafosfato de sódio foram preparados nas concentrações especificadas para seus respectivos grupos. Ademais, foi formulado um creme dental contendo fluoreto de sódio (NaF, Merck, CAS 7681-49-4 e Alemanha) na concentração de 1100 ppm F. Além disso, também foi preparada uma formulação de creme dental placebo sem trimetafosfato de cálcio, trimetafosfato de sódio e flúor (F). Todas as formulações de dentifrícios foram armazenadas em temperatura ambiente e hermeticamente fechadas para manter a integridade da amostra.

Os níveis de flúor nos dentifrícios experimentais foram medidos seguindo o método descrito por Delbem *et al.*<sup>25</sup>. Inicialmente, uma amostra da suspensão foi tratada com HCl 2 mol L<sup>-1</sup> para avaliação de flúor total e posteriormente tamponada com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. Os sobrenadantes obtidos por centrifugação (906 xg; 20 min) foram utilizados para avaliação de fluoreto iônico. 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 utilizando um eletrodo íon-seletivo (Orion 9609-BN; Orion Research Inc., Beverly, EUA) conectado a um analisador de íons (Orion 720 A+; Orion Research Inc.), calibrado com padrões variando de 0,125 a 4,0 µg. F/mL.

Além disso, foram determinados os níveis de fósforo total (PT) e cálcio (CaT) nos cremes dentais<sup>25</sup>. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida pela adição de HCl 2 mol L<sup>-1</sup> a uma temperatura logo abaixo do ponto de ebulição. Após uma centrifugação de 20 minutos (906 xg) das suspensões, foram medidos o fósforo iônico e o cálcio. O cálcio iônico (CaI) e o cálcio total (CaT) foram determinados pelo método colorimétrico Arsenazo III descrito por Vogel *et al.*<sup>26</sup>, com padrões de calibração variando de 40 a 200 µg Ca/mL. O fósforo iônico (PI) e o fósforo total (PT) foram medidos usando um método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow<sup>27</sup> com um espectrofotômetro (espectrofotômetro Hitachi U-1100 UV/Vis - Hitachi High Technologies, Tóquio, Japão) em um comprimento de onda de 660nm. Os resultados foram expressos em µg/g.

O pH das soluções foi determinado em triplicata sob constante agitação utilizando eletrodo de pH (Gel-Filled Plastic pH Electrode 13-620-290, Fisher Scientific accumet® Electrodes, Ottawa, Ontario, Canada) calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

### **3.5 Coleta da saliva humana**

Previamente aos desafios erosivos, a saliva humana estimulada com parafilme foi coletada no período da manhã, 1 h após a refeição da manhã, de voluntários de ambos os gêneros (idade entre 20 e 30 anos, n=6) com boa saúde bucal e sem uso de qualquer medicação<sup>28</sup>. Para realização da coleta, o estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 52188021.2.0000.5420) para autorização. Imediatamente após a coleta, as amostras das salivas foram unificadas e centrifugadas durante 10 minutos a 4° C e 2.000 x g. Os sobrenadantes foram estocados a -72° C em frascos plásticos com 50 mL <sup>29</sup>. Esta temperatura foi mantida para preservar as propriedades da saliva humana até a sua utilização à temperatura ambiente.

### **3.6 Desafios erosivos**

Previamente aos desafios ácidos, os blocos de esmalte foram imersos individualmente em saliva humana (4 mL/bloco) durante 2 horas, para formação da película adquirida, e lavados em água deionizada por 30 segundos. A seguir, os blocos foram imersos individualmente nas soluções/ pasta de dentífrício em água deionizada (1:3 – peso:peso) correspondente a seus respectivos grupos (4ml/bloco), sob agitação (100 rpm), durante 2 minutos. Após a lavagem com água deionizada, os blocos foram imersos individualmente em 4 mL de ácido cítrico (0,75%, pH 3,5; Synth, Brasil) sob agitação (100 rpm) durante 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de lavagem com água deionizada durante 30

segundos. No total, foram realizados quatro desafios erosivos, após os tratamentos com dentifrícios. As medidas de dureza da superfície final (SHf) foram realizadas após cada desafio erosivo para calcular a porcentagem de alteração da dureza de superfície ( $\%SHC = [(SHf - SHi) / (SHi)] \times 100$ ) após 1, 2, 3 e 4 minutos do desafio<sup>11</sup>.

### **3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para avaliar a capacidade de deposição dos dentifrícios nas superfícies do esmalte, os blocos de esmalte foram preparados conforme descrito anteriormente e polidos (2 blocos/grupo). Cada bloco foi dividido em duas metades, sendo uma metade coberta com esmalte. Posteriormente, os blocos foram expostos à saliva humana por 2 horas para formar uma película adquirida. Em seguida, uma mistura de dentifrício e saliva humana foi aplicada em cada bloco por dois minutos, seguida por enxágue com água deionizada por 30 segundos. Logo, o esmalte foi cuidadosamente removido com lâmina de bisturi e acetona, e os blocos foram novamente lavados e secos com papel toalha. Os blocos de esmalte foram então fixados em stubs com fita condutora de carbono e revestidos com uma fina camada de ouro (~5 nm de espessura) por 90 segundos em um aparelho de revestimento por pulverização catódica (Quorum - Q150T E, West Sussex, Reino Unido). Imagens de cada amostra foram capturadas usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Carl Zeiss, EVO LS15, Carl Zeiss NTS LTD, Alemanha) com uma ampliação de 1000x e uma tensão de aceleração de 20 kV para avaliar a presença de depósitos nas superfícies do esmalte. Ademais, a composição desses depósitos foi analisada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) (Oxford Instruments, INCAx-act, 133 eV, Inglaterra) operando a 20 keV com resolução espacial de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  e tempo de contagem de 210 segundos<sup>11</sup>.

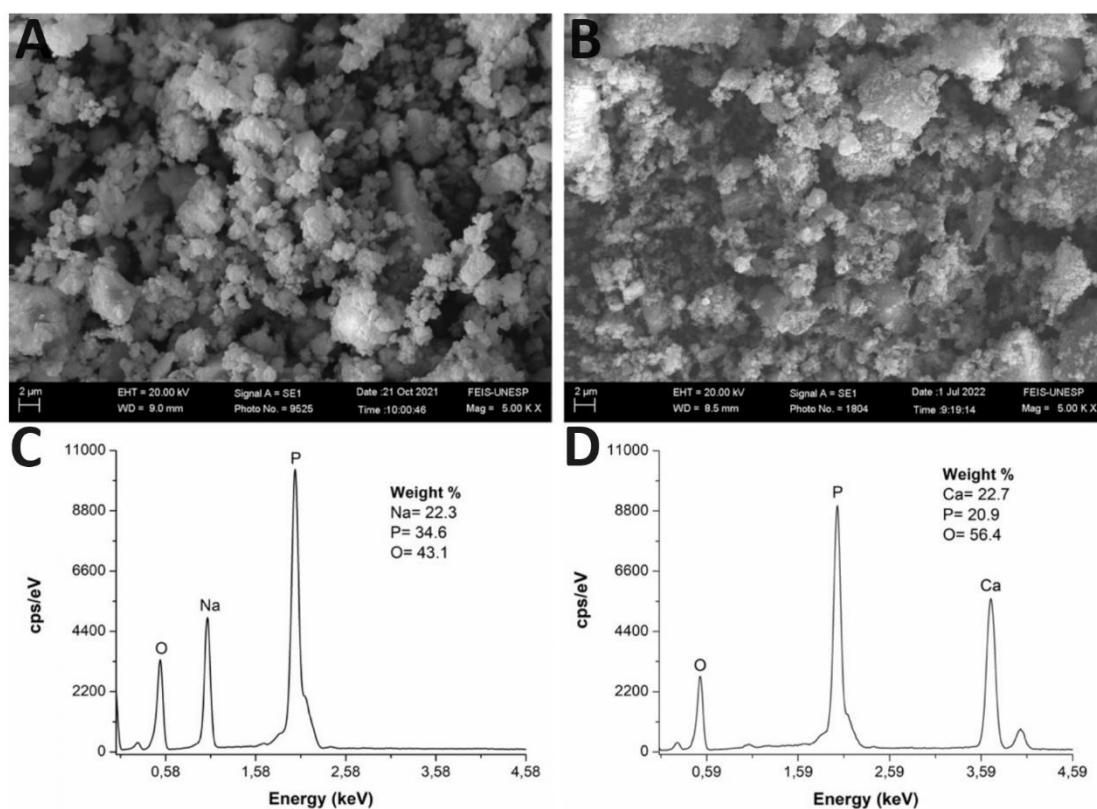
### **3.8 Análise Estatística**

Todas as variáveis apresentaram distribuições normais (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias homogêneas (teste de Cochran). Para análise estatística, foram considerados como fatores de variação o dentifrício de tratamento e o tempo de exposição ao ácido. A variável %SHC em cada tempo de desafio foi submetida à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios (ANOVA) seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot (SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, USA) para Windows versão 12.0, com significância ao nível de 5%.

## 4 RESULTADOS

As imagens de MEV mostraram cristais de granulação irregulares para NaTMP (Figura 1A) e grãos esféricos regulares para CaTMP (Figura 1B). A análise EDS identificou picos correspondentes aos elementos químicos Na a 1,04 keV, O a 0,52 keV e P a 2,02 keV, comuns às amostras NaTMP e CaTMP (Figura 1C), bem como picos característicos de 0,26 e 3,69 keV do elemento Ca no CaTMP (Figura 1D).

**Figura 1 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de amostras de NaTMP (A) e CaTMP (B). (C) Espectroscopia de raios X com dispersão de energia do composto CaTMP**



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

As concentrações médias ( $\pm$ SD) de flúor total (FT) e fluoreto iônico (FI) nos dentifrícios experimentais (Tabela 1), foram, respectivamente: 1) Placebo ( $16,5 \pm 1,6$ ) e ( $14,4 \pm 1,6$ ); 2) 1100 ppm F ( $1134,1 \pm 43,6$ ) e ( $1107 \pm 59,3$ );

3) 100%NaTMP/0%CaTMP ( $10,2 \pm 0,2$ ) e ( $11,4 \pm 0,4$ ); 4) 80%NaTMP/20%CaTMP ( $13,3 \pm 1,7$ ) e ( $12,5 \pm 0,6$ ); 5) 50%NaTMP/50%CaTMP ( $10,5 \pm 0,64$ ) e ( $12,9 \pm 0,7$ ); 6) 20%NaTMP/80%CaTMP ( $12,0 \pm 0,8$ ) e ( $11,3 \pm 0,9$ ) e 7) 100%CaTMP/0%NaTMP ( $21,6 \pm 16,6$ ) e ( $17,3 \pm 2,4$ ). A concentração de flúor ficou dentro da faixa de 10% proposta para os dentifrícios. Todos os dentifrícios experimentais apresentaram pH variando de 6,83 a 7,19 (Tabela 1). As concentrações iônicas de cálcio/fósforo (CaI e PI) foram inferiores às concentrações de cálcio/fósforo total (CaT e PT), influenciadas pela concentração de CaTMP. Quanto maior a concentração de CaTMP nos grupos, maiores as concentrações de cálcio/fósforo iônico e total (Tabela 1).

**Tabela 1 – Valores médios ( $\mu\text{g/g}$ ) de cálcio (Ca), fósforo (P), fluoreto (F), iônico (I) e total (T), e pH nos grupos experimentais**

(continua)

Grupos	Fluoreto		Cálcio		Fósforo		pH
	Iônico	Total	Iônico	Total	Iônico	Total	
<b>Placebo</b>	14.4	16.5	–	–	255.3	348.5	6.89
	(1.6)*	(2.1)			(22.2)	(27.6)	(0.06)
<b>1100 ppm F</b>	1107.3	1134.1	–	–	295.8	606.4	7.05
	(59.3)	(43.6)			(3.6)	(66.1)	(0.06)
<b>100%NaTMP/0 %CaTMP</b>	11.4	10.2	–	–	419.4	2933.5	6.83
	(0.4)	(0.2)			(2.6)	[47.9]	(0.04)
<b>80% NaTMP/ 20% CaTMP</b>	12.5	13.3	–	3419.8	588.5	5122.2	7.15
	(0.6)	(1.7)		(269.3)	(28.5)	(147.2)	(0.03)
<b>50% NaTMP/ 50% CaTMP</b>	12.9	10.5	–	2837.1	616.5	3646.0	6.90
	(0.7)	(0.64)		(255.6)	(44.3)	(60.8)	(0.04)

**Tabela 1 – Valores médios ( $\mu\text{g/g}$ ) de cálcio (Ca), fósforo (P), fluoreto (F), iônico (I) e total (T), e pH nos grupos experimentais**

(conclusão)

Grupos	Fluoreto		Cálcio		Fósforo		pH
	Iônico	Total	Iônico	Total	Iônico	Total	
<b>20% NaTMP/ 80% CaTMP</b>	11.3 (0.9)	12.0 (0.8)	–	2190.2 (16.9)	448.5 (13.6)	3551.7 (5.0)	7.05 (0.06)
<b>100%CaTMP/0 %NaTMP</b>	17.3 (2.4)	21.6 (16.6)	–	5675.2 (172.4)	769.0 (38.0)	6534.5 (33.2)	7.19 (0.05)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

(–) Não detectável. (\*) Desvio padrão da média.

Em relação ao ganho de dureza pós-tratamento, o dentifrício contendo 100%CaTMP/0%NaTMP apresentou os maiores valores, superando significativamente os dos demais grupos ( $p < 0,05$ ; Tabela 2). Além disso, este creme dental experimental também demonstrou o efeito protetor antierosivo mais eficaz no esmalte após desafios erosivos ( $p < 0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2 – Valores médios (DP) da porcentagem de alteração da dureza de superfície (%SH) no esmalte de acordo com os grupos e condições experimentais (n=12)**

(continua)

Grupos	Condição experimental				
	Após tratamento	1 <sup>st</sup> Desafio	2 <sup>nd</sup> Desafio	3 <sup>rd</sup> Desafio	4 <sup>th</sup> Desafio
<b>Placebo</b>	0.2 <sup>a,A</sup> (0.1)	–33.9 <sup>b,A</sup> (1.2)	–51.4 <sup>c,A</sup> (1.1)	–60.3 <sup>d,A</sup> (0.8)	–66.8 <sup>e,A</sup> (0.4)
<b>1100 ppm F</b>	2.2 <sup>a,B</sup> (0.3)	–17.6 <sup>b,B</sup> (0.2)	–27.4 <sup>c,B</sup> (0.7)	–52.4 <sup>d,B,E</sup> (1.8)	–58.8 <sup>e,B,E</sup> (0.3)

**Tabela 2 – Valores médios (DP) da porcentagem de alteração da dureza de superfície (%SH) no esmalte de acordo com os grupos e condições experimentais (n=12)**

(conclusão)

Grupos	Condição experimental				
	Após tratamento	1 <sup>st</sup> Desafio	2 <sup>nd</sup> Desafio	3 <sup>rd</sup> Desafio	4 <sup>th</sup> Desafio
<b>100%NaTM/ 0%CaTMP</b>	0.7 <sup>a,A</sup> (0.1)	-39.0 <sup>b,C</sup> (1.2)	-47.3 <sup>c,C</sup> (1.3)	-51.1 <sup>d,B</sup> (0.4)	-59.4 <sup>e,B</sup> (0.2)
<b>80% NaTMP/ 20% CaTMP</b>	2.5 <sup>a,B</sup> (0.3)	-35.9 <sup>b,E</sup> (1.3)	-43.8 <sup>c,E</sup> (0.8)	-57.1 <sup>d,D</sup> (1.7)	-62.0 <sup>e,D</sup> (0.9)
<b>50% NaTMP/ 50% CaTMP</b>	3.5 <sup>a,B</sup> (0.3)	-30.5 <sup>b,F</sup> (1.4)	-38.4 <sup>c,F</sup> (1.0)	-56.6 <sup>d,D</sup> (0.6)	-59.2 <sup>e,B</sup> (1.9)
<b>20% NaTMP/ 80% CaTMP</b>	5.7 <sup>a,D</sup> (0.9)	-20.8 <sup>b,G</sup> (1.3)	-27.5 <sup>c,B</sup> (0.9)	-53.0 <sup>d,E</sup> (1.8)	-57.2 <sup>e,E,F</sup> (1.2)
<b>100%CaTM/ 0%NaTMP</b>	7.4 <sup>a,C</sup> (1.3)	-7.1 <sup>b,D</sup> (0.8)	-17.1 <sup>c,D</sup> (0.6)	-43.4 <sup>d,C</sup> (0.6)	-48.1 <sup>e,C</sup> (0.8)

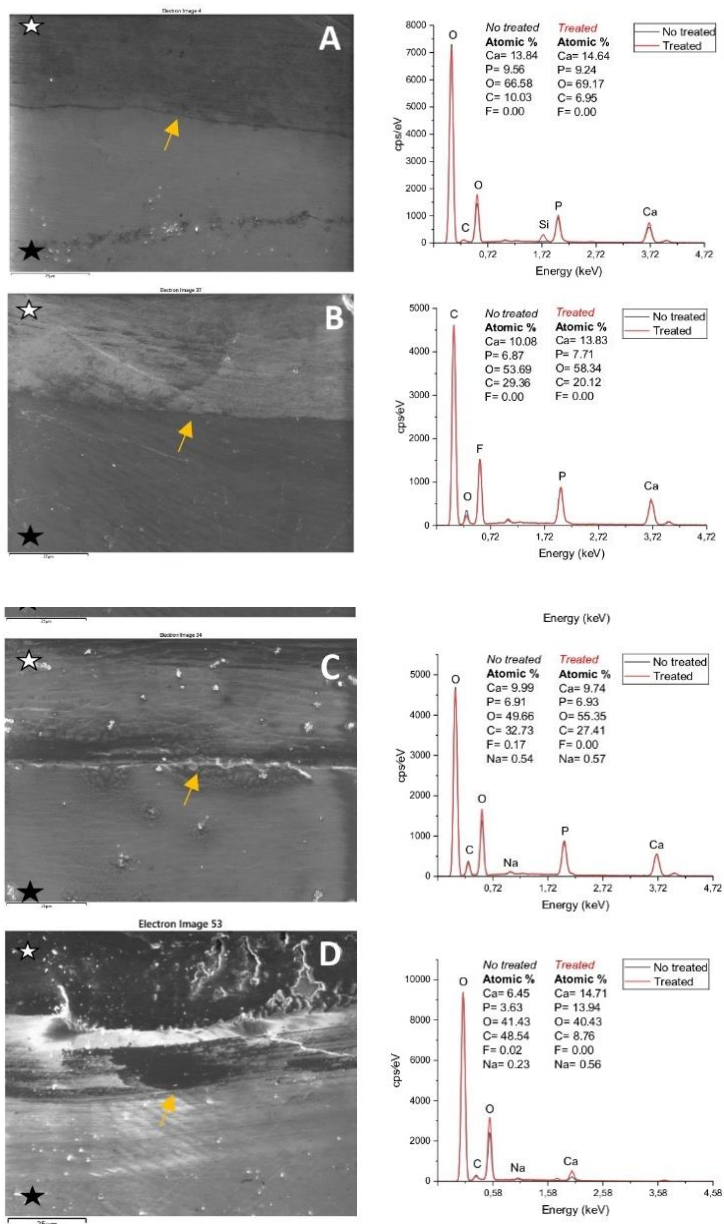
Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Letras minúsculas distintas indicam uma diferença significativa entre as condições experimentais para cada agente. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os agentes para cada condição experimental (ANOVA de medidas repetidas a dois critérios, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

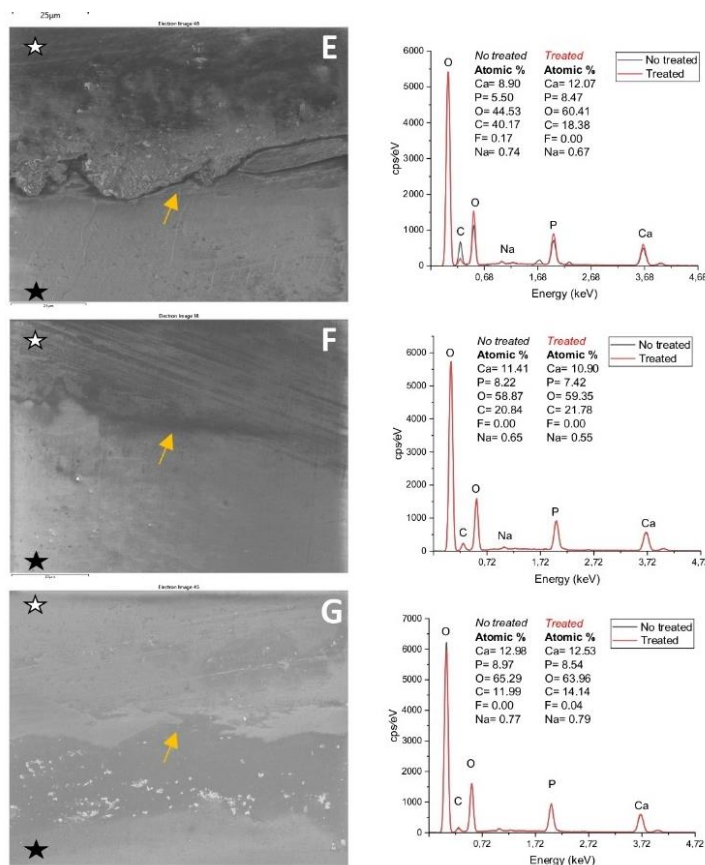
A adição de trimetafosfato de cálcio em várias concentrações ao trimetafosfato de sódio em cremes dentais resultou na formação de uma camada precipitada fina e homogênea contendo quantidades aproximadas de Ca, P e O (Fig. 2.C-G).

**Figura 2 – Imagens de MEV de uma amostra representativa em diferentes grupos e respectivo espectro da análise de EDX: (A) Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 100%NaTMP/0%CaTMP, (D) 80%NaTMP/20%CaTMP, (E) 50%NaTMP/50%CaTMP (F) 80CaTMP/20%NaTMP e (G) 100CaTMP/0%NaTMP.**

(continua)



**Figura 2 – Imagens de MEV de uma amostra representativa em diferentes grupos e respectivo espectro da análise de EDX: (A) Placebo, (B) 1100 ppm F, (C) 100%NaTMP/0%CaTMP, (D) 80%NaTMP/20%CaTMP, (E) 50%NaTMP/50%CaTMP (F) 80CaTMP/20%NaTMP e (G) 100CaTMP/0%NaTMP.**



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Asteriscos brancos indicam esmalte hígido. Asteriscos pretos indicam esmalte precipitado formado após os tratamentos. As setas indicam o limite entre o esmalte hígido e o esmalte precipitado formado após os tratamentos.

## 5 DISCUSSÃO

Em modelos de erosão in vitro que visam reduzir a perda de esmalte, a combinação de flúor e fosfatos surgiu como uma alternativa promissora<sup>11,18,30</sup>. Estudos anteriores demonstraram que a inclusão de NaTMP aumenta a eficácia antierosão de dentifrícios com flúor<sup>11,12,18</sup>, mesmo em formulações com menores concentrações de flúor (250 ppm F)<sup>11,19</sup>. O aumento da precipitação de fosfato de cálcio pode aumentar ainda mais os efeitos antierosivos do TMP. Portanto, o presente estudo in vitro avaliou dentifrícios contendo F, NaTMP e ciclotrifosfatos com substituição completa de sódio por cálcio (Na/CaTMP) em sua capacidade de inibir lesões iniciais de erosão do esmalte. Os resultados deste estudo indicaram que os cremes dentais contendo Na/CaTMP resultaram em menor amolecimento do esmalte em comparação com 1100 ppm F.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a adição de CaTMP aumentou significativamente o efeito protetor contra a erosão do esmalte. Consequentemente, a hipótese nula do estudo foi rejeitada com base nos dados obtidos. Em estudo anterior<sup>19</sup>, não foram investigadas formulações constituídas apenas por NaTMP sem suplementação de flúor. Esta decisão foi informada por evidências anteriores indicando que a eficácia do NaTMP sozinho é inferior àquela observada com cremes dentais contendo flúor. Esses achados são consistentes com os resultados, indicando que os cremes dentais contendo apenas TMP apresentam efeitos semelhantes ou diminuídos, dependendo da concentração e das condições de desafio (Tabela 2).

Sabe-se que a presença de flúor (F) em cremes dentais induz a formação de  $\text{CaF}_2$  nas superfícies erodidas do esmalte, mitigando parcialmente a erosão do esmalte após ciclos erosivos, conforme evidenciado em estudo anterior<sup>31</sup>. Esses glóbulos de  $\text{CaF}_2$  servem como barreira física, dificultando o contato do ácido com o esmalte e contribuindo para o endurecimento do esmalte<sup>31</sup>. Esta camada dissolve-se facilmente em ácido, mas atua como uma barreira física adicional, impedindo a dissolução do mineral subjacente do esmalte. Estes precipitados não só protegem diretamente a superfície subjacente do esmalte,

mas também libertam ions de flúor em resposta a desafios erosivos<sup>32</sup>. Em relação ao trimetafosfato (TMP), sua adsorção no esmalte pode impedir a difusão do ácido<sup>11,16</sup>, reduzindo assim o amolecimento do esmalte<sup>12</sup>. A substituição completa do sódio por cálcio tem mostrado resultados promissores em termos de proteção contra desafios erosivos, provavelmente atribuídos à precipitação de fosfato de cálcio, que oferece defesa durante episódios erosivos. Consequentemente, o aumento da precipitação de fosfato de cálcio resultante da substituição de sódio por cálcio obstrui a difusão ácida e minimiza o amolecimento do esmalte em todos os desafios conduzidos, mesmo na ausência de flúor.

Além disso, outros sais de fosfato também foram notados pela sua capacidade de adsorção no esmalte, incluindo cálcio ( $\text{Ca}_{2+}$ ) e fósforo ( $\text{PO}_{43-}$ )<sup>24,33</sup>. Este estudo demonstrou que o aumento da concentração de CaTMP levou a níveis mais elevados de cálcio/fósforo iônico e total, facilitando uma proteção subterrânea mais rápida e profunda. Alternativamente, os dentifrícios contendo 100%CaTMP aumentaram a eficácia da saliva, apresentando propriedades antierosivas superiores, exibiram melhoria de 28% e 18% no reparo em 2 minutos, respectivamente, e demonstraram maior resiliência contra testes erosivos subsequentes em comparação com placebo e dentifrícios com 1100 ppm de F, conforme mostrado na Tabela 2.

Dado que o esmalte é composto principalmente de cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O), a aplicação de agentes contendo fósforo e cálcio leva a alterações quantitativas mínimas. Esta observação é apoiada pelo aumento da dureza superficial (%SH) do esmalte hígido após uma única aplicação dos tratamentos, conforme detalhado na Tabela 2. Além disso, análises de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do esmalte hígido (Figura 2) revelaram disparidades qualitativas na camada superficial entre os grupos, influenciando potencialmente a dureza superficial.

É fundamental observar que a saliva humana foi utilizada neste estudo para melhor mimetizar as condições clínicas, pois foi proposto que a presença da película salivar adquirida pode mitigar a perda do esmalte. A ação diluidora,

a capacidade tampão e a supersaturação da saliva em relação ao conteúdo mineral do dente contribuem para esse efeito protetor<sup>34</sup>. Este modelo experimental de erosão precoce fornece informações valiosas sobre a ação de compostos recém-sintetizados na superfície do esmalte após exposição a desafios ácidos. A dureza superficial é adequada para analisar desafios ácidos no esmalte sem quantificar a perda de substância<sup>35</sup>, permitindo a determinação do amolecimento do esmalte e da suscetibilidade à reparação e perda de substância à medida que o processo erosivo progride. Com certeza, é importante interpretar os resultados deste estudo com cautela. Mais estudos são necessários, especialmente experimentos de longo prazo, para avaliar o produto depositado na superfície e sua contribuição para o efeito protetor contra a erosão. Além disso, é importante reconhecer possíveis limitações dos resultados, como a ausência do efeito abrasivo da escovação e o uso de esmalte bovino, sabidamente mais suscetível a ataques ácidos. Além disso, estudos in vivo ou in situ forneceria informações adicionais sobre esta questão.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados da metodologia in vitro, concluiu-se que dentifrícios contendo Na/CaTMP apresentaram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F na erosão inicial do esmalte.

## REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Jadeja, S. P., LeBlanc, A., O'Toole, S., Austin, R. S., Bartlett, D., 2023. The subsurface lesion in erosive tooth wear. *Journal of Dentistry*, 136, 104652. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104652>
3. Lussi, A., Buzalaf, M. A. R., Duangthip, D., Anttonen, V., Ganss, C., João-Souza, S. H., Baumann, T., Carvalho, T. S., 2019. The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 20, 517-527. <https://doi.org/10.1007/s40368-019-00420-0>
4. Chatzidimitriou, K., Papaioannou, W., Seremidi, K., Bougioukas, K., Haidich, A. B., 2023. Prevalence and association of gastroesophageal reflux disease and dental erosion: An overview of reviews. *Journal of Dentistry*, 133, 104520. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104520>
5. Srivastava, R., Tangade, P., Singh, V., et al., 2023. Chewing ability and the quality of life: A cross-sectional study to assess the relationship between tooth wear and oral health. *Cureus*, 15(7), e41906. <https://doi.org/10.7759/cureus.41906>
6. Né, Y. G. S., Souza-Monteiro, D., Frazão, D. R., et al., 2022. Treatment for dental erosion: A systematic review of in vitro studies. *PeerJ*, 10, e13864. <https://doi.org/10.7717/peerj.13864>
7. West, N. X., Seong, J., Hellin, N., Eynon, H., Barker, M. L., He, T., 2017. A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a sodium fluoride/triclosan dentifrice.

- International Journal of Dental Hygiene, 15(2), 113-119.  
<https://doi.org/10.1111/idh.12159>
8. Ganss, C., Lussi, A., Grunau, O., Klimek, J., Schlueter, N., 2011. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Research*, 45, 581-589.  
<https://doi.org/10.1159/000334318>
  9. West, N. X., He, T., Zou, Y., DiGennaro, J., Biesbrock, A., Davies, M., 2021. Bioavailable gluconate chelated stannous fluoride toothpaste meta-analyses: effects on dentine hypersensitivity and enamel erosion. *Journal of Dentistry*, 105, 103566. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103566>
  10. Luka, B., Duerrschnabel, A., Neumaier, S., Schlueter, N., Vach, K., 2023. Interaction between hexametaphosphate, other active ingredients of toothpastes, and erosion-abrasion in enamel in vitro. *Caries Research*, 57(3), 265-275. <https://doi.org/10.1159/000534057>
  11. de Toledo, P. T. A., Delbem, A. C. B., Cannon, M. L., Sakamoto, A. E., Pedrini, D., 2022. The effect of toothpaste with reduced concentration of fluoride-containing sodium trimetaphosphate and polyols on initial enamel erosion. *Clinical Oral Investigations*, 26, 7243-7252.  
<https://doi.org/10.1007/s00784-022-04684-7>
  12. Danelon, M., Pessan, J. P., Santos, V. R. D., Chiba, E. K., Garcia, L. S. G., de Camargo, E. R., Delbem, A. C. B., 2018. Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76, 119-124.  
<https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1388442>
  13. Carvalho, T. S., Bönecker, M., Altenburger, M. J., Buzalaf, M. A., Sampaio, F. C., Lussi, A., 2015. Fluoride varnishes containing calcium glycerophosphate: Fluoride uptake and the effect on in vitro enamel erosion. *Clinical Oral Investigations*, 19(6), 1429-1436.  
<https://doi.org/10.1007/s00784-014-1363-6>
  14. Nunes, G. P., Danelon, M., Pessan, J. P., et al., 2022. Fluoride and trimetaphosphate association as a novel approach for remineralization and


- antiproteolytic activity in dentin tissue. *Archives of Oral Biology*, 142, 105508. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105508>
15. Emerenciano, N. G., Botazzo Delbem, A. C., Pessan, J. P., et al., 2018) In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Archives of Oral Biology*, 96, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.019>
  16. Amaral J.G., Pessan J.P., Souza J.A.S., Moraes J.C.S., Delbem A.C.B., 2018. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106(7), 2553-2564. doi: 10.1002/jbm.b.34072.
  17. Nalin, E. K. P., Danelon, M., da Silva, E. S., Hosida, T. Y., Pessan, J. P., Delbem, A. C. B., 2021. Surface free energy, interaction, and adsorption of calcium and phosphate to enamel treated with trimetaphosphate and glycerophosphate. *Caries Research*, 55, 496-504. <https://doi.org/10.1159/000518943>
  18. Paiva, M. F., Delbem, A. C. B., Veri, I. V., Sampaio, C., Wiegand, A., Pessan, J. P., 2023. Fluoride varnishes supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosive wear in vitro. *Journal of Dentistry*, 138, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104726>
  19. Cruz, N. V., Pessan, J. P., Manarelli, M. M., Souza, M. D., & Delbem, A. C., 2015. In vitro effect of low-fluoride toothpastes containing sodium trimetaphosphate on enamel erosion. *Archives of Oral Biology*, 60, 1231-1236. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.010>
  20. Souza, J. A., Amaral, J. G., Moraes, J. C., Sasaki, K. T., Delbem, A. C., 2013. Effect of sodium trimetaphosphate on hydroxyapatite solubility: an in vitro study. *Brazilian Dental Journal*, 24, 235-240. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302000>
  21. Toledo, P. T. A., Anselmi, C., Dal-Fabbro, R., Mahmoud, A. H., Abel, A. K., Becker, M. L., Delbem, A. C. B., Bottino, M. C., 2023. Calcium trimetaphosphate-loaded electrospun poly(ester urea) nanofibers for

- periodontal tissue engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, 14, 350.  
<https://doi.org/10.3390/jfb14070350>
22. Watanabe, M., Yoshida, K., Sakurai, M., Sato, S., 1998. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *Journal of Materials Science*, 33, 5601–5606.  
<https://doi.org/10.1023/A:1004412131566>
23. Griffith, E. J., 1962. The structure of salt sodium calcium metaphosphate ( $\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$ ). *Inorganic Chemistry*, 1, 962.
24. Emerenciano, N. G., Delbem, A. C. B., Gonçalves, F. M. C., Quinteiro, J. P., de Camargo, E. R., Silva-Sousa, Y. T. C., Danelon, M., 2023. Effect of the association of microparticles and nano-sized  $\beta$ -calcium glycerophosphate in conventional toothpaste on enamel remineralization: In situ study. *Journal of Dentistry*, 138, 104719. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104719>
25. Delbem, A. C., Bergamaschi, M., Rodrigues, E., Sasaki, K. T., Vieira, A. E., Missel, E. M., 2009. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *Journal of Applied Oral Science*, 17(1), 94-98.  
<https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000100017>
26. Vogel, G. L., Chow, L. C., Brown, W. E., 1983. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate, and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Research*, 17, 23-31. <https://doi.org/10.1159/000260645>
27. Fiske, C. H., & Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375–400.  
<https://doi.org/10.1016/S0021-9258-18-84756-1>
28. Wetton, S., Hughes, J., Newcombe, R. G., Addy, M., 2007. The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries Research*, 41, 423–426.  
<https://doi.org/10.1159/000104802>
29. Schipper, R., Loof, A., de Groot, J., Harthoorn, L., Dransfield, E., van Heerde, W., 2007. SELDI-TOF-MS of saliva: Methodology and pre-treatment effects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 847, 45-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.005>

30. Viana, Í. E. L., Lopes, R. M., Silva, F. R. O., Lima, N. B., Aranha, A. C. C., Feitosa, S., Scaramucci, T., 2020. Novel fluoride and stannous-functionalized  $\beta$ -tricalcium phosphate nanoparticles for the management of dental erosion. *Journal of Dentistry*, 92, 103263. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103263>
31. Magalhães, A. C., Rios, D., Delbem, A. C., Buzalaf, M. A., Machado, M. A., 2007. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: An in situ/ex vivo study. *Caries Research*, 41, 77-79. <https://doi.org/10.1159/000096110>
32. Huysmans, M. C., Young, A., Ganss, C., 2014. The role of fluoride in erosion therapy. *Monographs in Oral Science*, 25, 230-243. <https://doi.org/10.1159/000360555>
33. Neves, J. G., Danelon, M., Pessan, J. P., Figueiredo, L. R., Camargo, E. R., Delbem, A. C. B., 2018. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium, and phosphate. *Archives of Oral Biology*, 90, 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.03.008>
34. Buzalaf, M. A., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 493-502. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000500001>
35. Stenhagen, K. R., Hove, L. H., Holme, B., Taxt-Lamolle, S., Tveit, A. B., 2010. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. *Caries Research*, 44, 555-561. <https://doi.org/10.1159/000321536>.

## ANEXOS

### ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de cálcio e seu efeito contra a erosão do esmalte in vitro utilizando dentífricos.

**Pesquisador:** Denise Pedrini

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 17281319.3.0000.5420

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.511.885

##### Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo in vitro será sintetizar e caracterizar ciclotrifosfato (TMP) com substituição parcial do sódio pelo cálcio, e verificar seu efeito na erosão inicial do esmalte. Microcompostos de ciclotrifosfatos com substituição parcial do sódio pelo cálcio (Ca-TMP) serão sintetizados e caracterizados morfológicamente por meio de espectroscopia de UV-Vis, difração de raios-X e de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Para determinar o efeito na erosão do esmalte, blocos de esmalte bovino sadios (n=96) e desmineralizados (n=96) serão selecionados por dureza de superfície inicial e submetidos a 8 grupos experimentais (12 blocos/grupo): placebo (sem F e Ca-TMP), 1100 ppm F, 1% Ca-TMP, 3% Ca-TMP, 9% Ca-TMP; 1100 ppm F + 1% Ca-TMP, 1100 ppm F + 3% Ca-TMP e 1100 ppm F + 9% Ca-TMP. Para a análise do efeito protetor, os blocos de esmalte sadios serão imersos em solução de dentífricos com saliva humana uma vez por 2 minutos, seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação). A percentagem de variação da dureza superficial (%SH) será calculada após os desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Para a análise do efeito reparador, os blocos de esmalte desmineralizados serão tratados e submetidos a desafios erosivos repetitivos, como descrito anteriormente. A partir de então, %SH será calculada após a desmineralização, e desafios ácidos de 1, 2, 3 e 4 minutos. As variáveis serão submetidas à análise de variância de medidas repetidas a

<b>Endereço:</b> JOSE BONIFACIO 1193	<b>CEP:</b> 16.015-050
<b>Bairro:</b> VILA MENDONCA	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> ARACATUBA
<b>Telefone:</b> (18)3636-3200	<b>Fax:</b> (18)3636-3332
	<b>E-mail:</b> andrebertoz@foa.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 3.511.885

três critérios seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Os objetivos do estudo serão sintetizar ciclotrifosfos com substituição parcial do sódio pelo cálcio, e caracterizar morfológicamente estes biomateriais por meio de espectroscopia de UV-Vis, difração de raios-X e de microscopia eletrônica de varredura e transmissão; e analisar o efeito da adição de diferentes concentrações desses ciclotrifosfos com cálcio a dentifrícios com ou sem fluoreto (1100 ppm F) contra a erosão do esmalte in vitro.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Haverá risco mínimo, pois haverá coleta de saliva que será estimulada com auxílio de parafina, sendo expectorada em frasco estéril.

Benefícios:

O benefício será entender melhor o mecanismo de ação de compostos de TMP com substituição parcial do sódio pelo cálcio no processo da erosão do esmalte.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa apresenta-se apta para aula realização.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adicionados de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

**Recomendações:**

não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado para a sua realização.

**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 01/01/2020.

**Endereço:** JOSE BONIFACIO 1193  
**Bairro:** VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050  
**UF:** SP **Município:** ARACATUBA  
**Telefone:** (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 3.511.885

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1387874.pdf	28/06/2019 11:13:20		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	28/06/2019 11:11:34	Denise Pedrini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	27/06/2019 16:39:30	Denise Pedrini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	27/06/2019 16:38:14	Denise Pedrini	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARACATUBA, 16 de Agosto de 2019

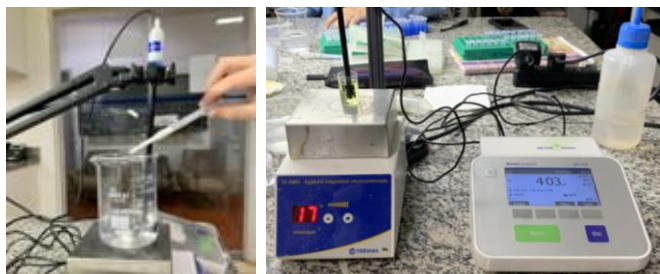
---

**Assinado por:**  
**Aldiéris Alves Pesqueira**  
**(Coordenador(a))**

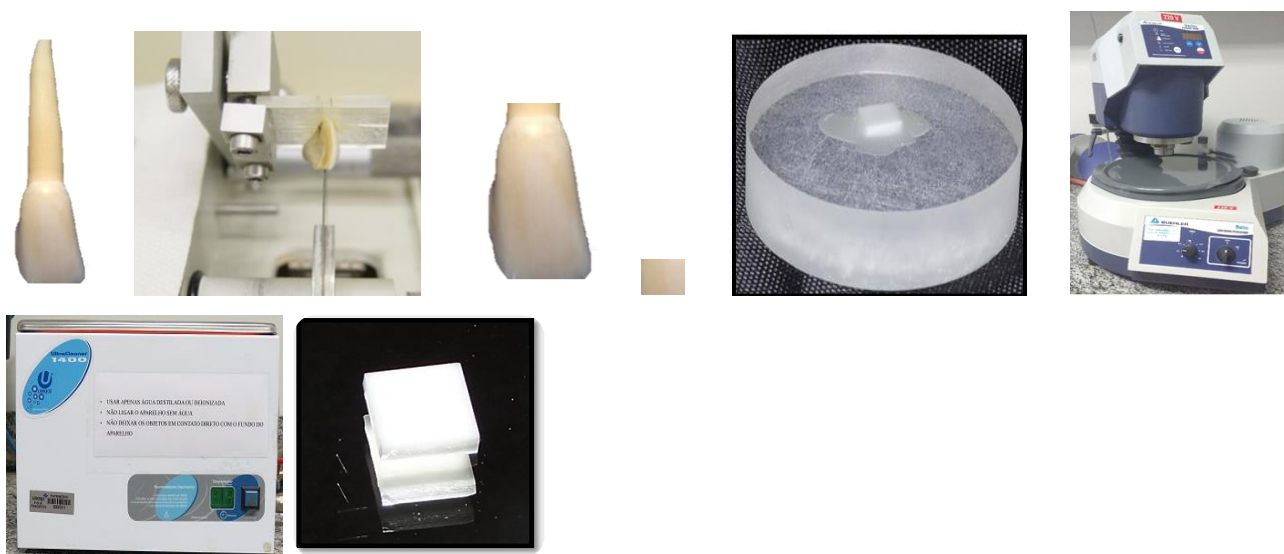
**Endereço:** JOSE BONIFACIO 1193  
**Bairro:** VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050  
**UF:** SP **Município:** ARACATUBA  
**Telefone:** (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

## ANEXO B – IMAGENS DA METODOLOGIA

Síntese de cicl trifosfatos (Trimetafosfato: TMP) com substituição total do sódio pelo cálcio



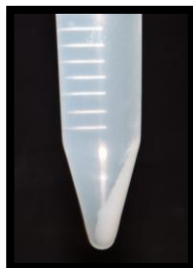
Preparo dos blocos de esmalte e grupos experimentais



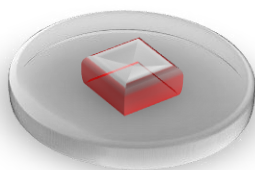
Determinação da concentração de Flúor



## Coleta da saliva humana



## Desafios erosivos



## Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

