



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Araçatuba

EMANUELLE KARINE PRADO NALIN

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ENERGIA LIVRE DE SUPERFÍCIE NO
ESMALTE DENTÁRIO TRATADO COM GLICEROFOSFATO
DE CÁLCIO E TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO, EXPOSTO OU
NÃO AO CÁLCIO E FOSFATO**

Araçatuba – 2018

Emanuelle Karine Prado Nalin

EMANUELLE KARINE PRADO NALIN

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ENERGIA LIVRE DE SUPERFÍCIE NO
ESMALTE DENTÁRIO TRATADO COM GLICEROFOSFATO
DE CÁLCIO E TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO, EXPOSTO OU
NÃO AO CÁLCIO E FOSFATO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcelle Danelon

Araçatuba – 2018

Emanuelle Karine Prado Nalin

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / Unesp

N171a	Nalin, Emanuelle Karine Prado. Análise in vitro da energia livre de superfície no esmalte dentário tratado com glicerofosfato de cálcio e trimetafosfato de sódio, exposto ou não ao cálcio e fosfato / Emanuelle Karine Karine Prado Nalin. - Araçatuba, 2018 51f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem Coorientadora: Profa. Marcelle Danelon 1. Esmalte dentário 2. Fosfatos 3. Cálcio 4. Energia I. T. Black D27 CDD 617.645
-------	---

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Emanuelle Karine Prado Nalin

Nascimento	24.03.1987
Filiação	Gilda Leida Prado e Silva José Carlos da Silva
2012/2015	Curso de Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário São Lucas
2017/2018	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Agradecimentos

Emanuelle Karine Prado Nalin

Nesse momento de tanta alegria e realização, dedico essa vitória as pessoas mais importantes de minha vida.

A Deus, que me deu a vida, minha eterna gratidão. O senhor que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada, guiou meus passos e minhas decisões, me encheu de esperança e coragem permitindo assim o alcançar dessa conquista, sua presença foi acolhedora e fundamental.

A minha mãe, meu amor mais puro e sincero, Gilda Prado, exemplo de amor e generosidade, meu grande exemplo de vida e de mulher, a mais guerreira e incrivelmente especial, obrigada pela persistência, por sempre acreditar em mim, nos sabemos quão árdua foi essa batalha, esse sonho eu sei que é nosso, eu te amo e vou te honrar por toda minha vida.

A meu pai, José Carlos, meu amor e eterna saudade, mesmo não estando mais presente no mundo dos homens, foi promovido a capitão dos meus anjos da guarda, tenho certeza que o céu está em festa, sei o quanto se orgulha e me ama, essa vitória é por você.

A minha irmã, Katerine Vanessa, a dona do meu coração, da minha emoção, a mulher mais incrível que eu conheço, mas que sempre será a minha pequena. A você que sempre acreditou, se orgulhou, que vibra com as minhas conquistas, que continuamente esteve ao meu lado, muito obrigada pela sua vida, o amor que nos une é eterno, essa vitória é nossa.

A todos vocês, que são a razão da minha vida, meu amor, meu carinho e meu sincero agradecimento.

As minhas amigas, Nayara e Mayra, me emociono ao escrever essas palavras, vocês foram as responsáveis por manterem minha sanidade

mental, me deram carinho, palavras de conforto e alento nos momentos que mais precisei, representaram com maestria o papel de família, sou muito grata pela amizade de vocês, muito obrigada por fazerem parte dessa jornada ao meu lado.

Ao meu Orientador, Prof. Titular. Alberto Carlos Botazzo Delbem, gostaria de agradecer ao senhor, pela grande oportunidade de realizar esse estudo sob sua orientação. O seu brilhantismo como pesquisador, não há necessidade de pontuá-los, são tantos, que por muitas vezes me faltava coragem de me aproximar, sentia-me intimidada com tanto conhecimento sentado a minha frente, hoje me arrependo, poderia ter aprendido muito mais. Mas, nesses últimos dias de convivência, o mais importante pra mim, foi o seu olhar de pai, sobre um filho que passava por um momento de dificuldade, o senhor é de poucas palavras, mas usou de empatia, e quando eu precisei, me ofereceu conforto e a tranquilidade que eu precisava, muito obrigada por isso e por tudo.

A minha Coorientadora, Professora Doutora Marcelle Danelon, foi através dos seus ensinamentos que eu iniciei minha vida dentro desse laboratório, eu não tenho palavras de gratidão que seriam suficientes para mensurar o quanto a senhora é especial e foi fundamental nessa caminhada. No momento em que a senhora precisou se distanciar, eu pensei que eu não conseguiria, mas na verdade, estava me ensinando a caminhar sozinha, e mesmo de longe, sempre esteve ao meu lado. Pessoas assim são raras, eu lhe desejo toda felicidade e sucesso do mundo, Deus habita no seu coração, a senhora é luz no meu caminho, muito obrigada por tudo, conte comigo, sempre será uma honra poder ajudá-la. Muito obrigada!

Ao professor Robson Frederico Cunha, quanto carinho e respeito eu sinto pelo senhor, me acolheu, me deu carinho, amor e me ouviu. Sua

sensibilidade e empatia são de seres evoluídos, muito obrigada por tudo, tenho certeza que a sua missão nessa vida está sendo realizada dentro dos planos de Deus, obrigada por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos e companheiros da Pós-graduação, obrigada por me ensinarem tanto durante este período, foram muitas batalhas, mas enfim, aqui estamos, parabéns e sucesso a todos.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Adj. Robson Frederico Cunha, Prof. Ass. Dr. Juliano Pelim Pessan, Profa. Dra. Marcelle Danelon, Profa. Adj. Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar, Profa. Ass. Dra. Cristiane Duque, pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos.

A Bebê Clínica e meus pacientes, foram meus momentos de terapia ao longo desses dois anos, poder ajudar uma criança, e aprender com elas está entre as coisas mais sublimes dessa vida, obrigada do fundo do meu coração por aprender com vocês.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores: Prof. Titular Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria, obrigado a vocês que sempre nos receberam com tanto carinho, cuidado e atenção. Obrigado por se preocuparem até com um simples café, que nos faria despertar quando estávamos cansados. Que Deus os abençoe sempre!

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do Coordenador Prof. Adj. Luciano Tavares Angelo Cintra.

Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, à Valéria e Cristiane pelo profissionalismo e atenção.

Ao Frigorífico FRIBOI, Andradina/SP, pela permissão da coleta dos dentes bovinos

Epígrafe

Emanuelle Karine Prado Nalin

Assim eu vejo a vida
A vida tem duas faces:
Positiva e negativa
O passado foi duro
mas deixou o seu legado
Saber viver é a grande sabedoria
Que eu possa dignificar
Minha condição de mulher,
Aceitar suas limitações
E me fazer pedra de segurança
dos valores que vão desmoronando.
Nasci em tempos rudes
Aceitei contradições
lutas e pedras
como lições de vida
e delas me sirvo
Aprendi a viver.

Cora Coralina

“Mas, sejam fortes e não desanimem, pois o trabalho de vocês será
recompensado.”

2 Crônicas 15.7

Resumo

Emanuelle Karine Prado Nalin

Análise *in vitro* da energia livre de superfície no esmalte dentário tratado com glicerofosfato de cálcio ou trimetafosfato de sódio, exposto ou não ao cálcio e fosfato

Emanuelle Karine Prado Nalin • Marcelle Danelon • Juliano Pelim Pessan • Emanuel Soares da Silva • Alberto Carlos Botazzo Delbem•

Objetivo: Analisar *in vitro* a energia livre de superfície (γ_s) no esmalte dentário após o tratamento com diferentes concentrações de Trimetafosfato de sódio (TMP) ou Glicerofosfato de cálcio (CaGP), exposto ou não a solução contendo cálcio (Ca) e fosfato (PO_4), assim como determinar a adsorção de TMP, CaGP, Ca e PO_4 ao esmalte dentário. *Método:* Blocos de esmalte bovino (n=192; 24 blocos/grupo) planificados e polidos foram tratados (2 mL/bloco/2 minutos) com TMP (0, 1, 3 e 9%) ou CaGP (0, 0,25, 0,5 e 1%), expostos ou não a solução contendo Ca/ PO_4 . TMP, CaGP, Ca e PO_4 foram analisados nas soluções antes e após o tratamento para calcular a adsorção ao esmalte. A γ_s , os componentes apolar (γ_s^{LW}) e polar (γ_s^{AB}), e ácido/base (γ_s^+/γ_s^-) foram calculados pelo ângulo de contato de três líquidos sondas (água, diiodometano e etilenoglicol). Os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). *Resultados:* A adsorção de TMP foi dose-dependente ($p < 0,001$) e reduziu a γ_s e γ_s^{AB} , e aumentou a γ_s^- , quando comparado ao grupo sem TMP ($p < 0,001$). A solução contendo Ca/ PO_4 aumentou a γ_s ($p < 0,050$) e a γ_s^{AB} ($p < 0,001$) e reduziu a γ_s^- ($p < 0,001$). Houve correlação entre a adsorção de TMP e Ca ($r = 0,916$; $p < 0,001$) e P ($r = 0,899$; $p < 0,001$) ao esmalte. A adsorção de CaGP ao esmalte foi dose-dependente ($p < 0,001$) diminuindo a γ_s , γ_s^{LW} e γ_s^- quando comparado ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$). Quando exposto à solução de Ca/ PO_4 , houve aumento da γ_s^{LW} e γ_s^- , e diminuição da γ_s^{AB} ($p < 0,001$), sem adsorção de Ca ao esmalte. *Conclusão:* O TMP e CaGP foram adsorvidos ao esmalte reduzindo a γ_s , devido a γ_s^{AB} ou γ_s^{LW} , respectivamente. O TMP produz sítios doadores de elétrons (γ_s^-) induzindo a adsorção de Ca enquanto o CaGP libera Ca para o meio.

Palavras-Chave: Esmalte dentário, Fosfato, Cálcio, Energia

Abstract

Emanuelle Karine Prado Nalin

***In vitro* analysis of surface free energy in dental enamel treated with calcium glycerophosphate and sodium trimetaphosphate, whether exposed or not to the solution containing calcium and phosphate**

Emanuelle Karine Prado Nalin • Marcelle Danelon • Juliano Pelim Pessan • Emanuel Soares da Silva • Alberto Carlos Botazzo Delbem•

Objective: *In vitro* analysis of free surface enamel (γ_s) in dental enamel after treatment with different concentrations of sodium trimetaphosphate (TMP) or calcium glycerophosphate (CaGP), exposed or not to the solution containing calcium (Ca) and phosphate (PO_4), as well as to determine the adsorption of TMP, CaGP, Ca and PO_4 to the dental enamel. *Design:* Bovine enamel blocks ($n = 192$; 24 blocks/group) planned were treated (2 mL/block; 2 minutes) with TMP (0, 1, 3 e 9%), CaGP (0, 0.25, 0.5 e 1%) exposed or not to the solution containing CaPO_4 were analyzed in the solutions before and after the treatment will be determined for the calculation of the adsorption of these to the enamel. The γ_s and their components γ_s^{LW} Lifshitz-van der Waals surface tension component, γ_s^{AB} and Lewis acid-base interaction (γ_s^+/γ_s^-) was calculated by measuring the contact angles of three liquids probes (deionized water, diiodomethane and ethylene glycol). The data were submitted to ANOVA followed by Student-Newman Keuls test ($p < 0.05$). Results: The adsorption of TMP was dose-dependent ($p < 0.001$) reduced the γ_s and γ_s^{AB} when compared to the group without TMP ($p < 0.001$). The solution containing Ca/ PO_4 increased the γ_s , γ_s^{AB} and reduced the γ_s^- ($p < 0.001$). There was a correlation between adsorption of TMP and Ca ($r = 0.916$; $p < 0.001$) and P ($r = 0.899$; $p < 0.001$) to the enamel. The adsorption of CaGP to the enamel was dose-dependent ($p < 0.001$) reducing the γ_s , γ_s^{LW} and γ_s^- when compared to the group without CaGP ($p < 0.001$). When exposed the de Ca/ PO_4 solution there was an increase of γ_s^{LW} and γ_s^- , reduction of γ_s^{AB} ($p < 0.001$), without adsorption of calcium to the enamel. *Conclusion:* The TMP was adsorbed to the enamel reducing the γ_s due the γ_s^{LW} or γ_s^{LW} , respectively. The TMP generates electron-donor inducing adsorption of Ca while CaGP releases Ca to the medium.

Key words: Dental Enamel, Phosphate, Calcium, Energy

Sumário

Emanuelle Karine Prado Nalin

SUMÁRIO

1. RESUMO	20
2. INTRODUÇÃO	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	28
6. REFERÊNCIAS	34
7. ANEXOS	45

Artigo

De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research:

<https://www.karger.com/Journal/Guidelines/22421>

Emanuelle Karine Prado Nalin

Análise *in vitro* da energia livre de superfície no esmalte dentário tratado com glicerofosfato de cálcio ou trimetafosfato de sódio, exposto ou não ao cálcio e fosfato.

E.K.P. Nalin¹, M. Danelon¹, J.P. Pessan¹, E.S.Silva¹, A.C.B.Delbem^{1*}

¹Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Odontologia Infantil e Social, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

Título resumido: Energia de superfície do esmalte após tratamento com fosfatos.

***Autor Correspondente:**

Alberto Carlos Botazzo Delbem
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Odontologia Infantil e Social
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça
Araçatuba, SP, Zip code 16.015-050, Brasil
Tel: +55 18 3636 3314
Email: alberto.delbem@foa.unesp.br

Palavras-Chave: Esmalte dentário, Fosfato, Cálcio, Energia

Resumo

Objetivo: Analisar *in vitro* a energia livre de superfície (γ_s) no esmalte dentário após o tratamento com diferentes concentrações de Trimetafosfato de sódio (TMP) ou Glicerofosfato de cálcio (CaGP), exposto ou não a solução contendo cálcio (Ca) e fosfato (PO_4), assim como determinar a adsorção de TMP, CaGP, Ca e PO_4 ao esmalte dentário. **Método:** Blocos de esmalte bovino ($n=192$; 24 blocos/grupo) planificados e polidos foram tratados (2 mL/bloco/2 minutos) com TMP (0, 1, 3 e 9%) ou CaGP (0, 0,25, 0,5 e 1%), expostos ou não a solução contendo Ca/ PO_4 . TMP, CaGP, Ca e PO_4 foram analisados nas soluções antes e após o tratamento para calcular a adsorção ao esmalte. A γ_s , os componentes apolar (γ_s^{LW}) e polar (γ_s^{AB}), e ácido/base (γ_s^+/γ_s^-) foram calculados pelo ângulo de contato de três líquidos sondas (água, diiodometano e etilenoglicol). Os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). **Resultados:** A adsorção de TMP foi dose-dependente ($p<0,001$) e reduziu a γ_s e γ_s^{AB} , e aumentou a γ_s^- , quando comparado ao grupo sem TMP ($p<0,001$). A solução contendo Ca/ PO_4 aumentou a γ_s ($p<0,050$) e a γ_s^{AB} ($p<0,001$) e reduziu a γ_s^- ($p<0,001$). Houve correlação entre a adsorção de TMP e Ca ($r = 0,916$; $p<0,001$) e P ($r = 0,899$; $p<0,001$) ao esmalte. A adsorção de CaGP ao esmalte foi dose-dependente ($p<0,001$) diminuindo a γ_s , γ_s^{LW} e γ_s^- quando comparado ao grupo sem CaGP ($p<0,001$). Quando exposto à solução de Ca/ PO_4 , houve aumento da γ_s^{LW} e γ_s^- , e diminuição da γ_s^{AB} ($p<0,001$), sem adsorção de Ca ao esmalte. **Conclusão:** O TMP e CaGP foram adsorvidos ao esmalte reduzindo a γ_s , devido a γ_s^{AB} ou γ_s^{LW} , respectivamente. O TMP produz sítios doadores de elétrons (γ_s^-) induzindo a adsorção de Ca enquanto o CaGP libera Ca para o meio.

Introdução

O declínio da cárie dentária foi observado em muitos países desde a década de 70, sendo alvo de muitas discussões [Sheiham e James, 2015]. A adição de fluoreto (F) às águas de abastecimento público e o uso de produtos fluoretados de uso tópico contribuíram para a redução da doença. Dentre os produtos tópicos, o dentifrício fluoretado destaca-se como a forma de administração mais utilizada pela população e que contribui efetivamente para a diminuição da cárie dentária [Marinho, Higgins, Logan, e Sheiham, 2003].

Sabendo-se da existência do risco de toxicidade crônica pelo F, principalmente quando utilizado em concentração convencional por crianças de tenra idade [Walsh et al., 2010], e seu efeito limitado contra a erosão dentária [Ponduri et al., 2005; Magalhães et al., 2007], estudos têm sido conduzidos na tentativa de buscar outros agentes que potencialize o efeito do F sobre os processos de Des/Remineralização, adição de fosfatos inorgânicos e orgânicos a dentifrícios com concentração reduzida de F mostrou aumentar o efeito anticárie e anti-erosivo. Takeshita et al., 2015; Danelon et al., 2018]. Nos últimos anos, estudos demonstraram que é possível aumentar a efetividade de dentifrícios com reduzida concentração de F e convencionais sobre a desmineralização e remineralização do esmalte [Amaral et al., 2013; Moretto et al., 2010; Zaze et al., 2014a; Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Freire et al., 2016] ou com 1100 ppm F [Castro et al., 2015; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017; Danelon et al., 2018].

As hipóteses que explicam os efeitos dos fosfatos em reduzir a perda mineral do esmalte baseiam-se, principalmente, na sua capacidade em ligar-se aos grupos hidroxila da hidroxiapatita [Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018], formando uma camada que reteria cálcio (Ca), fosfato (PO_4) e F, aumentando a disponibilidade desses íons durante os processo de desmineralização e remineralização [Amaral et al., 2013; Zaze et al., 2014b; Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Castro et al., 2015; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017]. Estas hipóteses foram consideradas tanto para o trimetafosfato de sódio (TMP) quanto para o glicerofosfato de cálcio (CaGP). Como o TMP é um fosfato cíclico inorgânico e o CaGP um fosfato orgânico (fosfolipídio), a interação com a

superfície do esmalte e com o meio podem ser diferentes. Nesse sentido, torna-se fundamental avaliar o comportamento dos sais acima mencionados com a superfície do esmalte, bem como na presença de um meio rico em Ca e PO₄ (simulando o ambiente salivar) corroborando para a comprovação científica das hipóteses levantadas.

Por outro lado, sabe-se que as propriedades da superfície de um substrato e sua interação com o meio podem ser analisadas pela energia livre de superfície (γ_s). O método utiliza princípios da termodinâmica e dependendo a abordagem utilizada, é possível demonstrar quais forças reativas são determinantes (apolar e/ou polar) [Comyn, 1992; Ueta, 2016] na interação entre esmalte e fosfato [Neves et al., 2018], assim como, se o composto testado promove uma superfície mais doadora ou receptora de elétrons, o que pode alterar sua reatividade com o meio. Estudo prévio demonstrou que o tratamento com hexametáfosfato de sódio aumenta os sítios doadores de elétrons e consequentemente leva a maior adsorção de cálcio e fosfato no esmalte [Neves et al., 2018].

Diante o exposto acima, o objetivo do presente estudo analisar *in vitro* a energia livre de superfície (γ_s) no esmalte dentário após o tratamento com diferentes concentrações de Trimetafosfato de sódio (TMP) ou Glicerofosfato de cálcio (CaGP), exposto ou não a solução contendo cálcio (Ca) e fosfato (PO₄), assim como determinar a adsorção de TMP, CaGP, Ca e PO₄ ao esmalte dentário. A hipótese nula foi de que a energia livre de superfície do esmalte não se altera após tratamento com TMP ou CaGP, tratados ou não a solução contendo Ca e PO₄, e não influenciaria na adsorção destes ao esmalte.

Materiais e Métodos

Delineamento experimental

Dentes incisivos bovinos com idade entre 2 e 3 anos foram obtidos e mantidos previamente em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês. A seguir, blocos de esmalte (4 mm x 4 mm, n=192, 24 blocos/grupo) foram obtidos da região vestibulo-cervical e tiveram sua superfície dentinária planificada. Após, a superfície do esmalte foi polida sequencialmente com discos de lixa (carboneto de sílica, granulação 600, 800 e 1200, Extec,

Enfield, CT, USA), refrigeração a água, utilizando máquina de polimento (Vector-Phoenix Beta, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), por 30 s, e disco de feltro para polimento (Polishing Pads LAP MASTER FNL-A008, Mount Prospect, IL, USA) umedecido em suspensão aquosa diamantada (0,25 μm , Extec, Enfield, CT, USA), durante 1 minuto. Entre cada lixa e ao final, os blocos foram submetidos ao ultra-som (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brasil), a 40 Hz em água deionizada durante 2 minutos. Blocos de esmalte com superfícies planas e ausência de trincas e hipoplasias foram inseridos no experimento. O tratamento dos blocos de esmalte foi realizado através da imersão em soluções contendo TMP (0%, 1%, 3% e 9%) [Takeshita et al., 2009; Amaral et al., 2018] ou CaGP (0%; 0,25%; 0,5%; 1,0%) [Zaze et al., 2014]. Metade dos blocos (n=96) foi exposta às soluções contendo Ca e PO_4 , após o tratamento com TMP ou CaGP. Para análise do mecanismo da interação do TMP ou CaGP com a superfície do esmalte, foram mensuradas as medidas do ângulo de contato de três líquidos sondas na superfície do esmalte tratado, para o cálculo da γ_s e seus componentes (Figura 1).

Formulação das soluções e tratamento dos blocos de esmalte.

Foram preparadas soluções contendo TMP (Sigma-Aldrich Co., CAS 7785-84-4, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 1% (pH 6,04), 3% (pH 6,21) e 9% (pH 5,89) [Takeshita et al., 2009; Amaral et al., 2018], e sem TMP (água destilada/deionizada: 0% de TMP). As soluções contendo CaGP (β -isômero, Sigma-Aldrich Chemistry, CAS 58409-70-4, St. Louis, MO, USA) foram formuladas nas concentrações de 0,25% (pH 7,52), 0,5% (pH 7,78), 1,0% (pH 9,22) [Zaze et al., 2014a] e sem CaGP (água: 0% de CaGP). Solução contendo Ca e PO_4 (1,25 mmol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 3,5 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5,33; Sigma-Aldrich, USA) foram preparadas [ten Cate, 2012]. Os blocos (n=24/grupo) foram imersos em frascos individualmente contendo 1 mL das soluções de tratamentos (TMP ou CaGP), sob agitação constante por um período de 2 minutos (Mesa agitadora TE-420 Orbital, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). A seguir, foram suavemente lavados com água deionizada por 30 s e secos com toalha de papel. Doze blocos foram estocados em ambiente com umidade

relativa do ar a 44 ± 6 e temperatura a 23°C (Termo-Higrômetro Digital HTH-240, Hikari, São Paulo, SP, Brasil). Os demais blocos ($n=12/\text{grupo}$) foram imersos em 1 mL de solução contendo Ca e PO_4 sob agitação, durante 2 minutos, lavadas com água e secos, como descrito anteriormente (Figura 1).

Determinação de CaGP, TMP, Ca e PO_4 das soluções

O TMP e CaGP foram dosados após hidrólise em meio ácido por meio da determinação do fósforo (P). Para análise do TMP, alíquotas de 0,1 mL das amostras foram acrescidas de 100 μL de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol/L e aquecidas em banho fervente, a 100°C , por 1 hora. A seguir, sobre as alíquotas 100 μL das amostras e dos padrões (1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g P/mL}$) foram adicionados 50 μL de molibdato e 20 μL de reativo redutor. O P foi determinado através de método colorimétrico em comprimento de onda a 660 nm [Fiske & Subbarow, 1925], utilizando placas de 96 poços e espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA). Para análise do CaGP, alíquotas de 100 μL das amostras foram acrescidas de 20 μL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L e 20 μL de ácido periódico a 1%, aquecidas em banho fervente, a 100°C , por 1 hora. Após o resfriamento, foram adicionados 800 μL de água deionizada. A seguir, às alíquotas 55 μL das amostras e dos padrões (1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g P/mL}$) foram pipetadas em placas de 96 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Em seguida adicionaram-se 10 μL de sulfito de sódio a 8% e 5 μL de molibdato de sódio a 7%. Após a homogeneização dos reagentes, foram adicionados 5 μL de hidroquinona a 1%. A placa foi mantida por 30 min a 37°C . Após esse período, o volume de cada poço foi ajustado com 175 μL de água deionizada. O P foi determinado através de método colorimétrico em comprimento de onda a 640 nm usando um leitor de placas (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA). A análise do Ca foi realizada pelo método colorimétrico do Arsenazo III [Vogel et al., 1983] utilizando leitora de microplaca e comprimento de onda de 650 nm. Alíquotas de 5 μL foram coletadas das amostras e 50 μL de água deionizada e 50 μL de Arsenazo foram adicionados, como também nos padrões (40, 80, 120, 160 e 200 $\mu\text{g Ca/mL}$). O P das soluções de Ca e PO_4 foi determinado como descrito anteriormente para dosagem do TMP, porém sem a realização da

hidrólise. As dosagens foram realizadas em duplicatas e coletadas das soluções antes e após o tratamento da superfície do esmalte. A adsorção ao esmalte foi calculada pela diferença ($\Delta \mu\text{g}$) entre as concentrações de TMP, CaGP, Ca e PO_4 final e inicial nas soluções, obtendo valores negativos que indicam a diminuição nas soluções devido à adsorção ao esmalte.

Análise da Energia Livre de Superfície

A fim de avaliar o mecanismo da interação do TMP e CaGP com a superfície do esmalte, todos os blocos foram analisados quanto à energia livre de superfície (γ_s) e seus componentes apolar (γ_s^{LW} : Lifshitz van der Waals) e polar (γ_s^{AB} : ácido/base). As medidas foram realizadas com goniômetro automático (DSA100S, KRÜSS GMBH, Hamburgo, Alemanha) usando três líquidos sondas com energia de superfície conhecida: água deionizada (polar), diiodometano (apolar) e etileno glicol (polar com componentes ácido e base). Previamente as medições, os blocos permaneceram ao ar por 45 min para obter estabilidade da camada formada pelo tratamento [van der Mei et al., 2002]. Para a determinação do ângulo de contato, uma gota com volume de 0,5 μL de cada líquido foi dispensado em um quadrante diferente na superfície do esmalte utilizando uma seringa de vidro (500 μL) e agulha com calibre de 0,5 mm. Um segundo após a deposição da gota, os ângulos de contatos (direito e esquerdo) foram medidos usando uma câmera CCD para captura da imagem e o método de análise de forma Laplace-Young (Drop Shape Analysis DSA4 Software, version 2.0-01, Krüss). Cada gota teve os ângulos de contato medidos cinco vezes durante 5 s a uma temperatura de 22° C e umidade relativa do ar de 44 ± 6 (Termo-Higrômetro Digital HTH-240, Hikari, São Paulo, SP, Brasil) [Harnett et al., 2007; van der Mei et al., 2002]. Os parâmetros de γ_s^{LW} e γ_s^{AB} e ácido (γ_s^+ , componente doador) e base (γ_s^- , componente receptor) da energia livre de superfície (mN/m), foram calculados de acordo com o modelo de van Oss, Chaudhury e Good [van Oss, 1995; Chaudhury, 1996; Knorr et al., 2005; van der Mei et al., 2002; Harnett et al., 2007].

Análise Estatística

Para análise dos dados foram consideradas como fator de variação as concentrações de CaGP e TMP e à exposição ou não as soluções contendo Ca e PO₄. Como variáveis, foram considerados os valores de energia livre de superfície (mN/m) e os componentes polar e apolar, bem como os valores de adsorção de CaGP, TMP, Ca e PO₄. Após os testes de normalidade e homogeneidade, os dados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os dados de Ca do CaGP e do P da solução de Ca e PO₄ foram heterogêneos e submetidos a teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls. Teste de correlação de Pearson ou Spearman foi aplicado entre as variáveis [Dancey & Reidy, 2011]. Foi utilizado o programa estatístico SigmaPlot versão 12.0, com significância ao nível de 5%.

Resultados

O tratamento com TMP levou a menores valores de ângulo de contato para os três líquidos sondas quando comparado ao sem TMP ($p < 0,001$). As comparações entre as médias estão descritas na Tabela 1. Houve redução da γ_s para todos os grupos, após tratamento com TMP ($p < 0,001$), exceto para o grupo tratado com 1%TMP, o qual foi semelhante ao 0%TMP ($p = 0,812$). A imersão em solução de Ca e PO₄ levou a maiores valores de γ_s após tratamento com 1% e 9% de TMP em relação aos demais grupos ($p < 0,050$), sem diferença entre 0%TMP e 3%TMP ($p = 0,060$).

Os valores da γ_s^{LW} (Figura 2A) foram maiores para os tratamentos com TMP do que os grupos sem TMP ($p < 0,001$). A γ_s^{AB} tornou-se mais negativa com aumento da % do TMP ($p < 0,050$), havendo uma relação de dose-resposta. A exposição à solução contendo Ca e PO₄ levou a valores de γ_s^{AB} menos negativos ($p < 0,001$) em comparação aos grupos que não foram expostos a essa solução, sem alteração da γ_s^{LW} ($p = 0,102$). Correlação fraca e positiva foi observada entre γ_s e γ_s^{LW} (Pearson's $r = 0,312$; $p = 0,002$) e forte e positiva entre γ_s e γ_s^{AB} (Pearson's $r = 0,867$; $p < 0,001$). Houve aumento dos sítios doadores de elétrons (γ_s^-) após o tratamento com TMP quando comparado ao grupo sem TMP ($p < 0,001$) mostrando uma relação dose-resposta (Figura 2B). Os valores de γ_s^- das superfícies tratadas com TMP foram menores ($p < 0,001$), após a exposição à

solução de Ca e PO_4 , considerando a comparação entre as respectivas concentrações de TMP. Houve correlação forte e negativa entre γ_s^- e γ_s^{AB} (Pearson's $r = -0,800$; $p < 0,001$) e fraca e positiva entre γ_s^- e γ_s^{LW} (Pearson's $r = 0,186$; $p = 0,070$). A adsorção de TMP ao esmalte apresentou relação dose-resposta com o aumento da % de TMP nas soluções de tratamento (Figura 2C). Correlação forte e positiva foi observada entre adsorção de TMP e de Ca (Pearson's $r = 0,916$; $p < 0,001$) e de P (Pearson's $r = 0,899$; $p < 0,001$) no esmalte (Figura 2C e 2D). Houve correlação forte e positiva entre a γ_s^- e a adsorção de TMP (Pearson's $r = 0,946$; $p < 0,001$), de Ca (Pearson's $r = 0,861$; $p < 0,001$) e de P (Pearson's $r = 0,885$; $p < 0,001$) no esmalte.

O tratamento com CaGP levou a maiores valores de ângulo de contato para os três líquidos sondas quando comparado ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$). Os valores de γ_s do esmalte reduziram após tratamento com CaGP quando comparado ao sem CaGP ($p < 0,001$), sem diferença entre as concentrações ($p > 0,050$). Após a exposição à solução contendo Ca e PO_4 , os ângulos de contato diminuíram ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo sem CaGP (Tabela 2) e a γ_s foi maior ($p < 0,050$). As demais comparações entre as médias estão descritas na Tabela 2.

O tratamento com CaGP reduziu a energia apolar (γ_s^{LW}) quando comparado ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$), sem diferença entre as concentrações ($p = 0,783$). A energia polar (γ_s^{AB}) não apresentou diferença entre os tratamentos ($p = 0,670$). A exposição às soluções contendo Ca e PO_4 aumentou a γ_s^{LW} da superfície do esmalte tratadas com CaGP em relação ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$), sem diferença entre as concentrações ($p > 0,050$). A γ_s^{AB} apresentou valores mais negativos quando comparado ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$), sem diferença entre as % de CaGP ($p > 0,050$). Houve correlação moderada e positiva entre γ_s e γ_s^{LW} (Pearson's $r = 0,654$; $p < 0,001$) e, fraca e positiva entre γ_s e γ_s^{AB} (Pearson's $r = 0,174$; $p = 0,091$). Os valores dos sítios doadores de elétrons (γ_s^-) foram menores após o tratamento com CaGP quando comparado ao grupo sem CaGP ($p < 0,001$), não havendo diferença ($p > 0,050$) entre as concentrações (Figura 3B). A imersão na solução contendo Ca e PO_4 levou a um aumento da γ_s^- para os grupos com CaGP ($p < 0,001$) e diminuição para o grupo sem CaGP

($p < 0,001$). Os valores dos sítios receptores de elétrons (γ_s^+) foram próximos a zero sem interação entre os tratamentos ($p = 0,182$). Houve correlação moderada e negativa entre γ_s^- e γ_s^{AB} (Pearson's $r = -0,627$; $p < 0,001$) e forte e positiva entre γ_s^- e γ_s^{LW} (Pearson's $r = 0,843$; $p < 0,001$).

A adsorção de CaGP no esmalte apresentou relação dose-resposta com o aumento da concentração nas soluções de tratamento (Figura 3C). A adsorção de P foi maior para os grupos com CaGP quando comparado ao sem CaGP ($p < 0,001$), mas sem diferença entre as concentrações ($p > 0,050$). Maior quantidade de Ca foi observada nas soluções de Ca e PO_4 , após o tratamento dos blocos de esmalte com CaGP (Figura 3D). Correlação forte e positiva foi observada entre adsorção de Ca e de GP (Spearman's $r = 0,866$; $p < 0,001$) a partir do CaGP. Houve correlação moderada e positiva entre a adsorção de GP e de P (Spearman's $r = 0,680$; $p < 0,001$), e negativa com o Ca (Spearman's $r = -0,567$; $p < 0,001$) no esmalte (Figura 3C e 3D). Houve correlação moderada e positiva entre a γ_s^- e a adsorção de GP (Spearman's $r = 0,533$; $p < 0,001$), forte com o Ca (Spearman's $r = 0,755$; $p < 0,001$) e moderada com o P (Spearman's $r = -0,603$; $p < 0,001$) no esmalte.

Discussão

Como a superfície do esmalte não apresenta características que favoreçam a adsorção de fosfato de cálcio [Neves et al., 2018], este estudo avaliou o efeito do tratamento com CaGP e TMP em diferentes concentrações na energia livre de superfície e adsorção de cálcio e fosfato ao esmalte bovino. Os resultados mostraram que o tratamento com TMP favoreceu a adsorção de Ca e P reduzindo a energia livre de superfície (γ_s), havendo uma relação de dose resposta entre a % de TMP nas soluções, energia polar (γ_s^{AB} : ácido-base de Lewis) e componente ácido base (γ_s^- : doador de elétrons). Os tratamentos com as soluções de CaGP, mostraram que o CaGP foi adsorvido ao esmalte (Ca e P adsorvido) reduzindo a energia livre de superfície (γ_s) do esmalte devido aos menores valores da energia apolar (γ_s^{LW}). Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

A superfície do esmalte apresentou-se pouco hidrofóbica no presente estudo, pois os valores de energia livre de superfície foram menores do que 30

mN/m (28,1 mN/m) [van Oss, 1993; Knorr et al., 2005], com valores de γ_s^+ próximos a zero (0,3 mN/m) e de γ_s^- pouco maior que 28,5 mN/m (30,6 mN/m) [van Oss, 1995]. Além disto, as superfícies biológicas podem ser consideradas como monopolares básicas, pois os valores de γ_s^{LW} não excederam 45 mN/m e os valores de γ_s^+ foram aproximadamente zero [van Oss, 1993; van Oss, 1995; Harnett et al., 2007]. Resultados semelhantes foram observados previamente no estudo de Neves et al. [2018]. Como a abordagem teórica utilizada no presente estudo para o cálculo da γ_s foi ácido-base [van Oss, 1993; van Oss, 1995; Harnett et al., 2007], envolvendo a decomposição em γ_s^{LW} e γ_s^{AB} , estas influenciam fortemente a γ_s . Assim, os resultados podem diferir de outros estudos que utilizaram diferentes abordagens teórica para obtenção da γ_s . Em adição, serão as forças ácido(γ_s^+)/base(γ_s^-) que indicarão se uma superfície é mais hidrofóbica ou hidrofílica, pois as forças dispersivas (energia apolar) estão sempre presente [van Oss, 1995; Harnett et al., 2007].

Considerando a abordagem anterior, avaliando apenas o ângulo de contato da água, é possível afirmar que o tratamento com TMP aumenta o caráter hidrofílico da superfície do esmalte, tornando-a propensa ao molhamento, pois os ângulos de contato foram inferiores a 65° [Vogle, 1998]. Outro dado que fornece suporte para esta afirmação, são os valores de γ_s^- maiores do que 28 mN/m que indicam uma superfície hidrofílica após o tratamento com TMP [Olsson et al., 1992; van Oss, 1995]. O esmalte sem tratamento com TMP adsorveu 462% menos cálcio do que a superfície tratada com TMP (Figura 2D). Isto indica pouca ligação com os íons fosfatos na superfície do esmalte [Harding et al., 2005; Vandiver et al., 2005] já que os valores do componente polar (γ_s^{AB}) e seus parâmetros (γ_s^+ ; γ_s^-) não se alteraram. Portanto, pode-se concluir que o esmalte não favorece a adsorção de Ca e PO₄. Entretanto, no meio bucal, a adsorção através do esmalte de proteínas ricas em prolina e tirosina (película adquirida) tem a função de ligar-se ao Ca e PO₄ proveniente da saliva [Buzalaf et al., 2012]. A adsorção de Ca sem alteração na carga da superfície provavelmente ocorreu pelo deslocamento de dois H⁺ da superfície por um Ca²⁺ [Harding et al., 2005].

Os dados comprovam que o TMP é adsorvido ao esmalte mesmo ambos apresentando-se carregados negativamente, por meio da interação entre os sítios aniônicos do TMP e grupos hidroxila da hidroxiapatita [Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018]. Consequentemente, a superfície do esmalte passa a ter maior quantidade de sítios doadores de elétrons devido à adsorção de TMP (Figura 2B e 2C). Em acréscimo, estas superfícies podem ser parcialmente ou totalmente neutralizadas por Ca^{2+} ou $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ presentes nas soluções de Ca e PO_4 [Neves et al., 2018]. Maior quantidade de íons contendo Ca foi adsorvida ao esmalte do que PO_4 (Figura 2D) devido a redução dos γ_s^- e valores menos negativos para γ_s^{AB} (Figura 2A e 2B). Como a nucleação de Ca e PO_4 ocorre na camada de TMP adsorvido, há uma supersaturação desses íons próxima à superfície do esmalte. Desta forma, a precipitação não ocorre diretamente no esmalte, mantendo os poros na superfície abertos, o que facilita a difusão de íons para o interior do esmalte [Takeshita et al., 2011; Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Emerenciano et al., 2018]. Provavelmente os estudos *in situ* [Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Emerenciano et al., 2018] que mostram maior conteúdo de Ca no esmalte na presença do TMP são consequência deste mecanismo. Os resultados do presente estudo trazem novos conhecimentos que ajudam a explicar o efeito do TMP na redução da desmineralização e aumento da remineralização em profundidade no esmalte [Takeshita et al., 2011; de Castro et al., 2015; Danelon et al., 2015; Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018], comprovando assim as hipóteses dos estudos anteriores.

Diferentemente do TMP, o tratamento do esmalte com CaGP levou a uma superfície hidrofóbica, pois ocorreu uma redução na γ_s devido ad redução dos valores da γ_s^{LW} (redução de 20%) e nenhuma alteração significativa nos valores de γ_s^{AB} (Figura 1A). Os resultados da γ_s^- confirmam estes achados, pois ocorreu uma redução de 43% em seus valores ($< 28,5 \text{ mN/m}$), reforçando a superfície do esmalte como hidrofóbica [van Oss, 1993; van Oss, 1995] após o tratamento com CaGP, independente da concentração utilizada. As interações de van der Waals ocorrem entre todos os átomos e moléculas (energia apolar), assim não há substâncias com energia de superfície somente com energia polar. Porém,

existem superfícies que podem não conter nenhuma energia polar, como os hidrocarbonetos. No caso do esmalte, a maior parte da energia de superfície é advinda do seu componente apolar e menor componente polar. O CaGP é um fosfolipídio composto por glicerol, que possui grupo funcional dos álcoois, e fosfato (polar). Apesar de a parte glicerol possuir hidrocarbonetos (apolar), apresenta também oxigênio que adiciona um componente polar a molécula. Portanto, a água e moléculas polares tem maior dificuldade de se aderirem nessa superfície, o que sugere que a não alteração nos valores de energia polar após os tratamentos com CaGP e solução contendo Ca e PO_4 é advinda da própria energia de superfície do esmalte.

O arranjo estrutural do CaGP adsorvido a superfície do esmalte, considerando que a união entre o glicerol e o fosfato seja a parte estável da molécula, produz uma disposição em concha da molécula no esmalte [Inoue et al., 1992]. Assim, há a formação de uma película com esta característica que leva a menor energia apolar quando o esmalte foi tratado com as soluções contendo CaGP. Isto explica a redução da energia de superfície do esmalte já que o componente polar não sofreu alteração após os tratamentos. Apesar disso, ocorre à diminuição dos sítios doadores de elétrons (γ_s^-), componente básico da energia polar (Figura 3B). Os menores valores do componente básico da energia polar podem indicar que a disposição em concha do CaGP reage com a hidroxiapatita do esmalte de forma que a parte apolar da molécula (glicerol) fique voltada para a superfície do esmalte e a parte polar (fosfato) para fora com os átomos de Ca dispostos superficialmente na camada de CaGP adsorvida ao esmalte. Considerando estes dados, os tratamentos somente com CaGP produzem uma superfície mais hidrofóbica que não favorece a adesão celular ou de proteínas à superfície do esmalte e nem a adsorção de Ca^{2+} ou $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ (Figura 3D).

A ligação entre o cálcio e o grupo fosfato da estrutura do CaGP é considerada a parte instável da molécula [Inoue et al., 1992] o que sugere que essa instabilidade favoreça a perda de Ca para o meio (Figura 3D) deixando os grupos aniônicos de fosfato livres. Isto explica o aumento dos sítios doadores de elétrons após o tratamento com as soluções de Ca e PO_4 e o aumento do Ca na solução de Ca e PO_4 (Figura 3B e 3D). Assim, a camada de CaGP adsorvida ao esmalte funcionaria somente como fonte de cálcio favorecendo a redução da perda

mineral nos processo de cárie como observado em estudos *in vitro* [Zaze et al., 2014a] e *in situ* [Amaral et al., 2013; Zaze et al., 2014b]. Nesses estudos, o conteúdo de Ca e PO_4 no esmalte está aumentado quando as formulações dentifrícias contém CaGP [Amaral et al., 2013; Zaze et al., 2014b], bem como, a quantidade destes íons no biofilme [do Amaral et al., 2013]. Porém, após a liberação de Ca, a superfície apresenta mais sítios doadores de elétrons o que pode favorecer a nucleação de Ca e PO_4 ao esmalte, estando em um meio rico com esses íons.

O presente estudo trouxe novos entendimentos sobre o mecanismos de ação do TMP e CaGP. Apesar de ambos os fosfatos reduzirem a γ_s do esmalte, esta ocorreu por caminhos diferentes. O TMP, como é um fosfato inorgânico, deixa a γ_s^{AB} mais negativa e aumenta a γ_s^- . O CaGP, um fosfato orgânico com grupamento apolar e polar, diminui a γ_s^{LW} e os γ_s^- , porém os γ_s^- aumentam após liberação do Ca da molécula. Embora o presente estudo colabore para o entendimento do mecanismo de ação do TMP e CaGP, os resultados devem ser avaliados com cautela, visto que o modelo não previu a presença da saliva, o tratamento foi realizado uma vez e utilizando soluções aquosas, sem a complexidade das formulações testadas nos estudos prévios. Também, o esmalte bovino foi utilizado para substituir o esmalte humano, pois apresenta semelhante arquitetura ultraestrutural, composição mineral [Nogueira et al., 2014; Teruel et al., 2015] e condições de lubricidade [Reeh et al., 1995]. Em acréscimo, a associação com fluoreto e seu efeito na γ_s e na adsorção ao esmalte deve ser investigada para melhorar o entendimento do mecanismo de ação desses fosfatos.

Conclusão

Concluiu-se que o tratamento com o TMP e CaGP foram adsorvidos ao esmalte reduzindo a γ_s , devido a γ_s^{AB} ou γ_s^{LW} , respectivamente. O TMP produz sítios doadores de elétrons (γ_s^-) induzindo a adsorção de Ca enquanto o CaGP libera Ca para o meio.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia, Proc. n. 308981/2014-6) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, Proc. n. 88887.068358/2014-00) pelo suporte financeiro da pesquisa.

Declaração de Ética

Os autores declaram não possuírem conflitos éticos.

Declaração de Publicação

Os autores declaram não possuírem conflitos de divulgação.

Fontes de Financiamento

CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia, Proc. n. 308981/2014-6) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, Proc. n. 88887.068358/2014-00). As agências de fomento não tiveram nenhuma função no delineamento experimental, coleta dos dados e análises, decisão de publicação, ou na preparação do manuscrito.

Contribuição dos Autores

Ideia e delineamento do estudo: M. Danelon, J.P. Pessan, A.C.B.Delbem.

Realização do experimento: E.K.P. Nalin, M. Danelon, E.S.Silva.

Análise dos dados: M. Danelon, A.C.B.Delbem.

Preparação do manuscrito: E.K.P. Nalin, M. Danelon, J.P. Pessan, E.S.Silva, A.C.B.Delbem.

Referências Bibliográficas

1. do Amaral JG, Sasaki KT, Martinhon CC, Delbem AC: Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel desmineralization in situ. *Am J Dent* 2013;26:75-80.
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;106:2553-2564.
3. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT: Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2012;20:493-502.
4. Chaudhury MK: Interfacial interaction between low energy surfaces. *Mater Sci Engng* 1996;16:97-59.
5. Comyn J: Contact angles and adhesive bonding. *Int J Adhes Adhesives* 1992;12:145-149.
6. Dancey CP, Reidy J: *Statistics Without Maths for Psychology*. 5rd ed. Pearson:London; 2011.
7. Danelon M, Pessan JP, Neto FNS, Camargo ER, Delbem ACB: Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 2015;43:806-813.
8. Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC: Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization:An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2017;78:82-87.
9. Danelon M, Pessan JP, Santos VRD, Chiba EK, Garcia LSG, de Camargo ER, Delbem ACB: Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro. *Acta Odontol Scand* 2018;76:119-124.
10. de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C: In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 2015;19:1683-1687.
11. Delbem ACB, Souza JAS, Zaze ACSF, Takeshita EM, Sasaki KT, Moraes JCS: Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Braz Dent J* 2014;25:479-484.
12. Emerenciano NG, Delbem ACB, Pessan JP, Nunes GP, Neto FNS, Camargo ER, Danelon M: In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-

- sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol* 2018;96:223-229.
13. Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
 14. Freire IR, Pessan JP, Amaral JG, Martinhon CC, Cunha RF, Delbem AC.: Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: A randomized, controlled trial. *J Dent* 2016;50:37-42.
 15. Harding IS, Rashid N, Hing KA: Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. *Biomaterials* 2005; 26: 6818-6826
 16. Harnett EM, Alderman J, Wood T: The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Coll Surf B: Biointerfaces* 2007;55:90-97.
 17. Inoue M, In Y, Ishida T: Calcium binding to phospholipid: structural study of calcium glycerophosphate. *J Lipid Res* 1992;33:985-94.
 18. Knorr SD, Combe EC, Wolff LF, Hodges JS: The surface free energy of dental gold-based materials. *Dental Mat* 2005;21:272-277.
 19. Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA: Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2007;41:77-79.
 20. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A: Topical fluoride (tooth- pastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003;4: CD002782.
 21. Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR: Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44:135-140.
 22. Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Souza JAS, Camargo ER, Delbem ACB: Surface free energy of enamel treated with sodium hexameta-phosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol* 2018;90:108-112.
 23. Nogueira BCL, Fernandes PM, Paiva ACJ, Fagundes NCF, Teixeira FB, Lima RR: Benchmarking of the ultrastructure and physical properties of bovine, buffalo and human enamel. *Pesq Vet Bras* 2014;34:485-490.

24. Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K: Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Res* 1992;26:428-433.
25. Ponduri S, Macdonald E, Addy M: A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. *Int J Dent Hyg*. 2005;3:7-12.
26. Reeh ES, Douglas WH, Levine MJ: Lubrication of human and bovine enamel compared in an artificial mouth. *Arch Oral Biol* 1995;40:1063-1072.
27. Sheiham A, James WP: Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res* 1995;10:1341-1347.
28. 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.
29. 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;45:494-497.
30. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB: Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2015; 49:394-400.
31. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem ACB: Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res* 2016;50:571-57.
32. ten Cate JM: The role of saliva in mineral equilibria – caries, erosion and calculus formation. In: Edgar WM, Dawes C, O' Mullane DM, editors. *Saliva and oral health: an essential overview for the health professional*. Stephen Hancocks Ltd:England; 2012. Vol. 4; p. 135–150.
33. Teruel JD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO: Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol* 2015;60:768-775.
34. Ueta H, Tsujimoto A, Barkmeier WW, Oouchi H, Sai K, Takamizawa T, Latta MA, Miyazaki M: Influence of an oxygen-inhibited layer on enamel bonding of

- dental adhesive systems: surface free-energy perspectives. *Eur J Oral Sci* 2016;124:82-88.
35. Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C: Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high resolution force spectroscopy. *Biomaterials* 2005;26:271-283.
 36. van Oss CJ: Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf A Physicoch Eng Asp* 1993;78:1-49.
 37. van Oss CJ: Hydrophobicity of biosurfaces – origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1995;5:91-110.
 38. van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ: Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 2002; 110:434-438.
 39. 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.
- Vogler EA: Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces *Adv Colloid Interface Sci* 1998;74:69-117.
40. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;20: CD007868.
 41. Zaze ACSF, Dias AP, Sasaki KT, Delbem ACB: The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Inv* 2014a;18:1619-1624.
 42. Zaze AC, Dias AP, Amaral JG, Miyasaki ML, Sasaki KT, Delbem AC: In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. *J Dent* 2014b;42:1621-1625.

Legendas das Figuras

Figura 1 – Fluxograma do delineamento experimental de acordo com os tratamentos dos blocos de esmalte.

Figura 2 – (A) valores médios do componente apolar (γ_s^{LW} : Lifshitz-van der Waals) e polar (γ_s^{AB} : ácido-base de Lewis), da energia livre de superfície, e (B) do componente ácido (γ_s^+ : receptor de elétrons) e base (γ_s^- : doador de elétrons), da energia polar, de acordo com a % de TMP exposto ou não a solução com Ca e PO_4 . (C) valores médios da adsorção de TMP e (D) de Ca e PO_4 no esmalte de acordo com a % de TMP. As barras verticais indicam os desvios-padrões. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada análise (n =12; Student-Newman-Keuls; $p<0,050$).

Figura 3 – (A) valores médios do componente apolar (γ_s^{LW} : Lifshitz-van der Waals) e polar (γ_s^{AB} : ácido-base de Lewis), da energia livre de superfície, e (B) do componente ácido (γ_s^+ : receptor de elétrons) e base (γ_s^- : doador de elétrons), da energia polar, de acordo com a % de CaGP exposto ou não a solução com Ca e PO_4 . (C) valores médios da adsorção de CaGP e (D) de Ca e PO_4 no esmalte de acordo com a % de CaGP. As barras verticais indicam os desvios-padrões. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada análise (n =12; Student-Newman-Keuls; $p<0,050$).

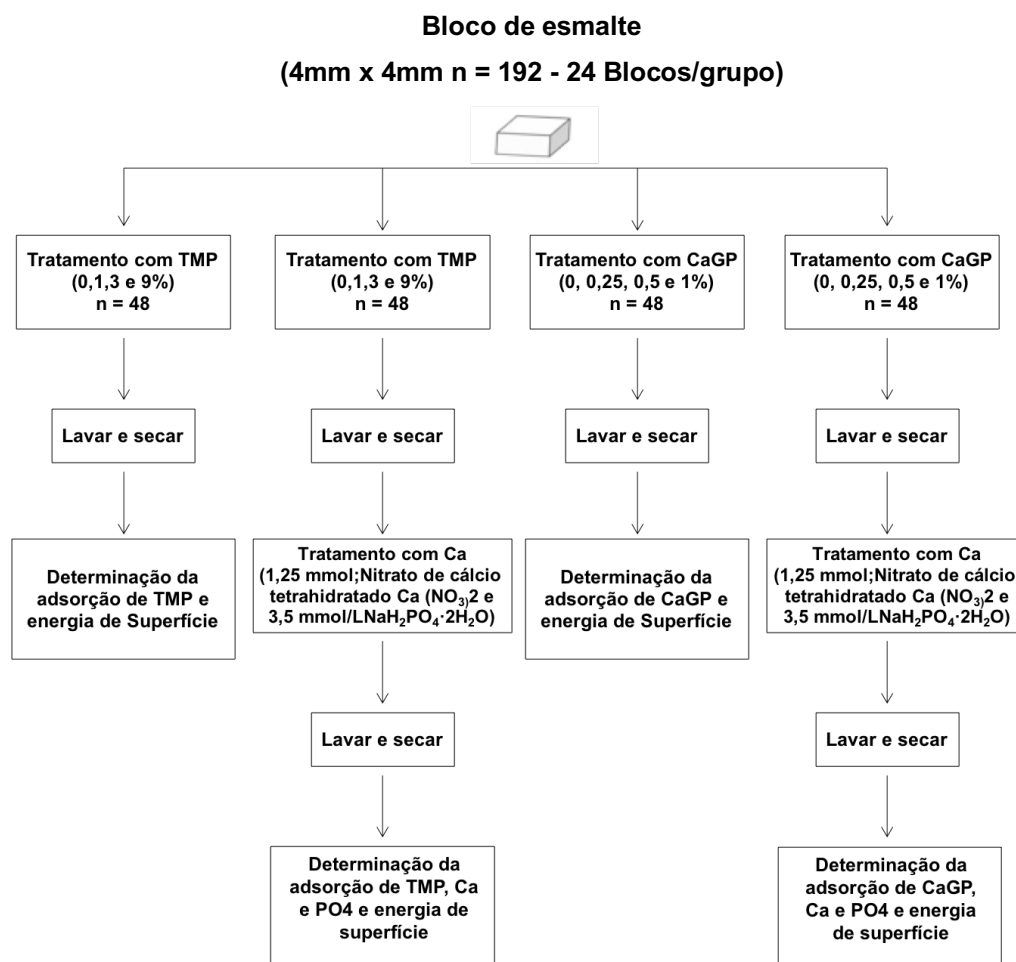


Figura 1.

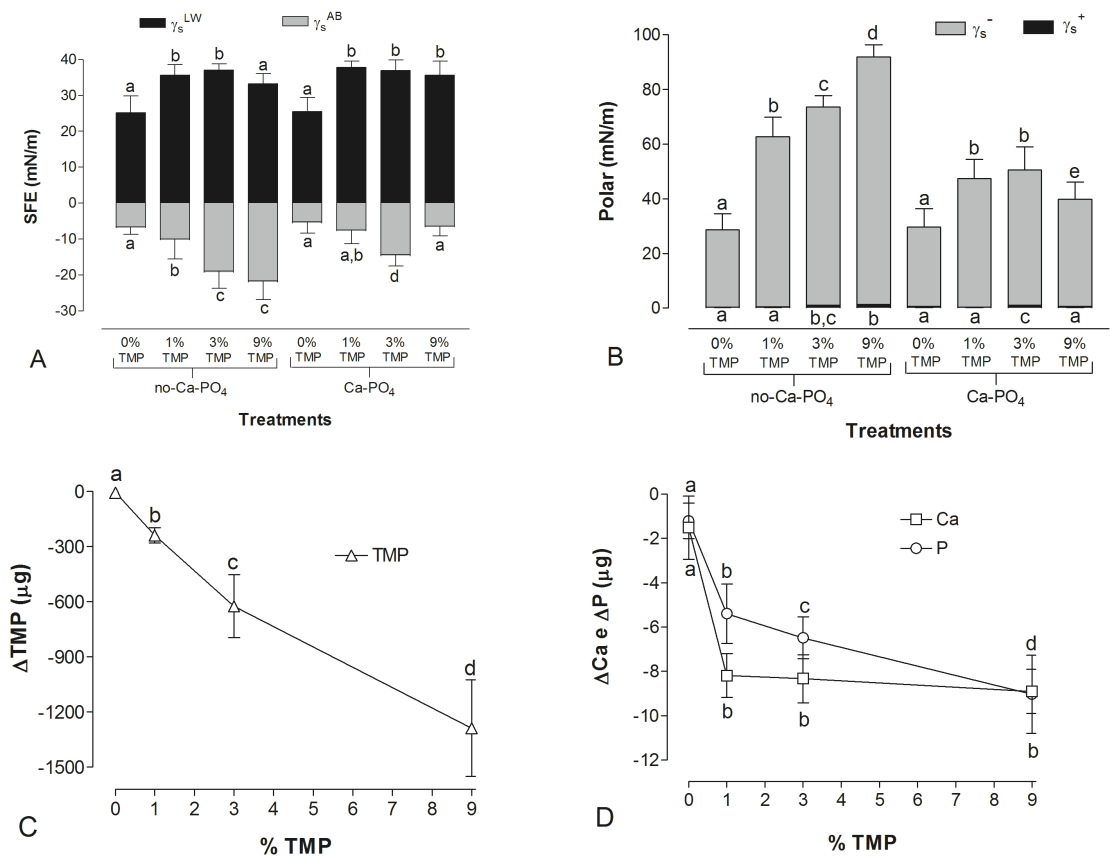


Figura 2.

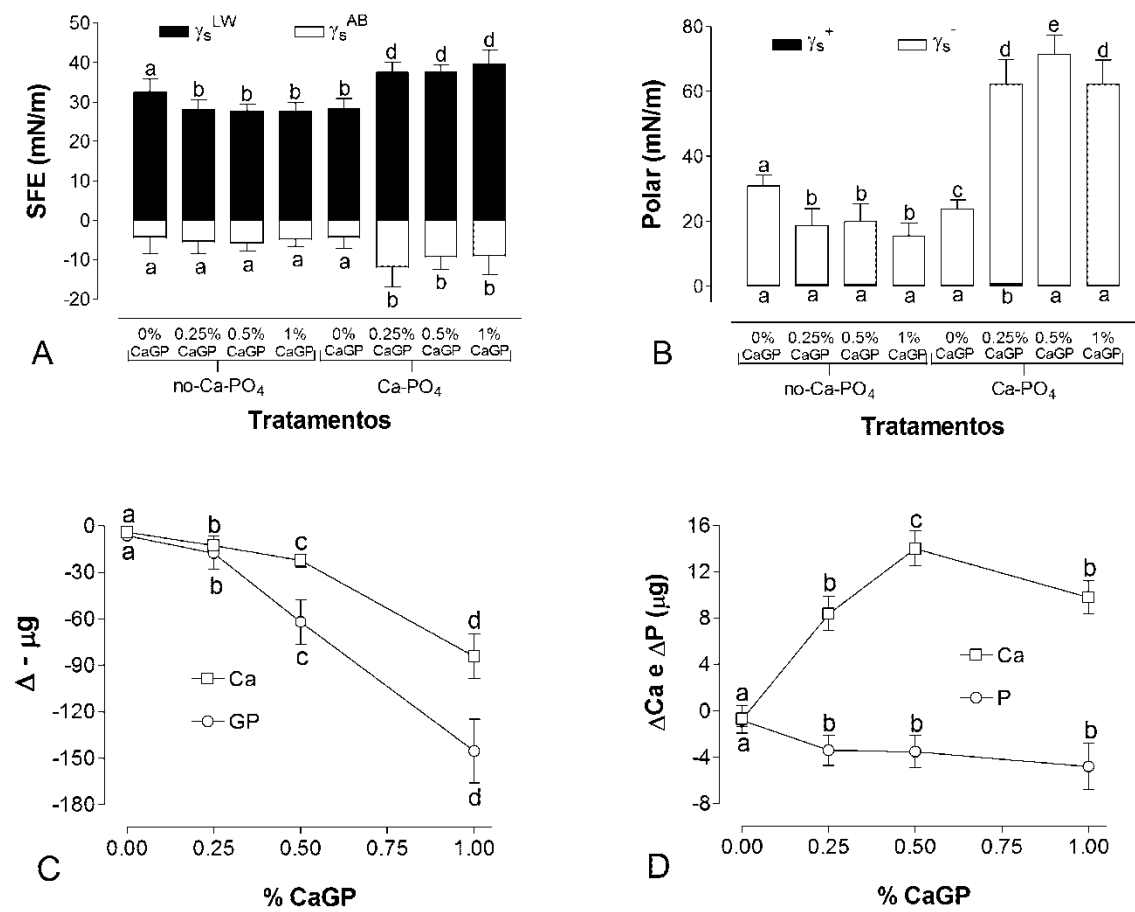


Figura 3.

Tabela 1: Valores médios (DP) dos ângulos de contato (θ) dos líquidos sondas e da energia livre de superfície (γ_s) após tratamento do esmalte com soluções contendo diferentes concentrações de TMP seguidos ou não pela exposição de Ca e PO₄ (n=12)

Tratamentos		Água $\theta(^{\circ})$	Diiodometano $\theta(^{\circ})$	Etilenoglicol $\theta(^{\circ})$	γ_s (mN/m)
Sem Ca-PO ₄	0%TMP	68,4 ^a	54,4 ^a	59,6 ^a	24,6 ^a
		(6,3)	(5,8)	(7,4)	(3,9)
	1%TMP	40,5 ^b	48,3 ^{b,c}	40,3 ^b	25,5 ^a
		(4,9)	(4,7)	(3,3)	(3,7)
	3%TMP	36,3 ^b	45,1 ^b	44,0 ^b	18,5 ^b
		(3,8)	(3,0)	(3,7)	(3,5)
	9%TMP	25,2 ^c	51,3 ^{c,a}	42,7 ^b	11,7 ^c
		(2,6)	(2,8)	(3,7)	(4,4)
	0%TMP	69,6 ^a	56,2 ^a	62,3 ^a	25,5 ^a
		(7,7)	(5,4)	(6,4)	(3,9)
	1%TMP	45,5 ^c	46,4 ^{b,c}	44,2 ^b	30,2 ^e
		(5,2)	(6,0)	(5,7)	(4,2)
Com Ca-PO ₄	3%TMP	52,7 ^d	47,1 ^{b,c}	50,9 ^c	22,3 ^a
		(7,9)	(7,4)	(7,9)	(4,7)
	9%TMP	58,8 ^e	47,6 ^c	50,2 ^c	29,0 ^e
		(5,8)	(7,4)	(7,8)	(3,5)

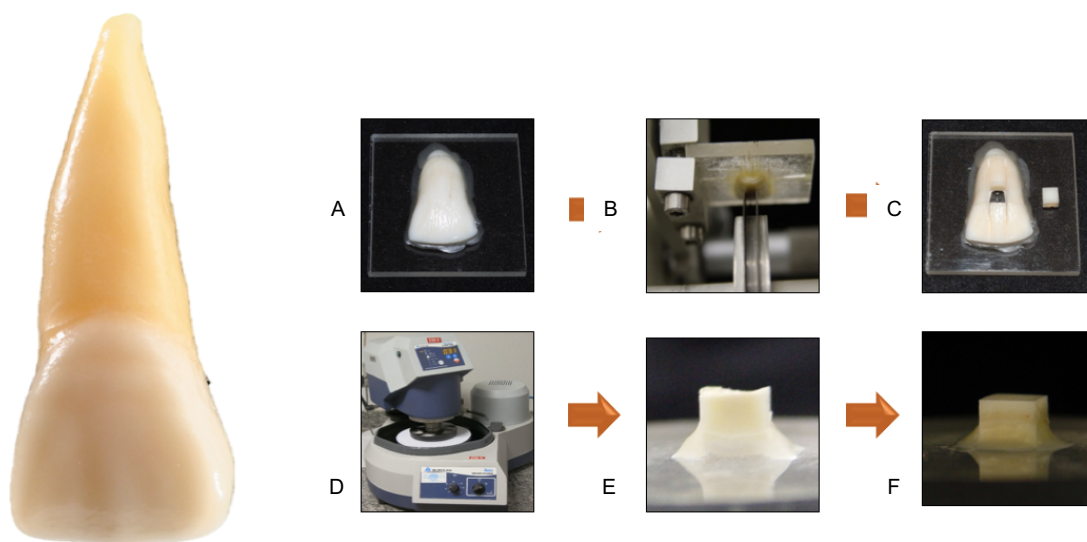
Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada análise (ANOVA a dois critérios, Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Tabela 2: Valores médios (DP) dos ângulos de contato (θ) dos líquidos sondas e da energia livre de superfície (γ_s) após tratamento do esmalte com soluções contendo diferentes concentrações de CaGP seguidos ou não da exposição com Ca e PO₄ (n=12)

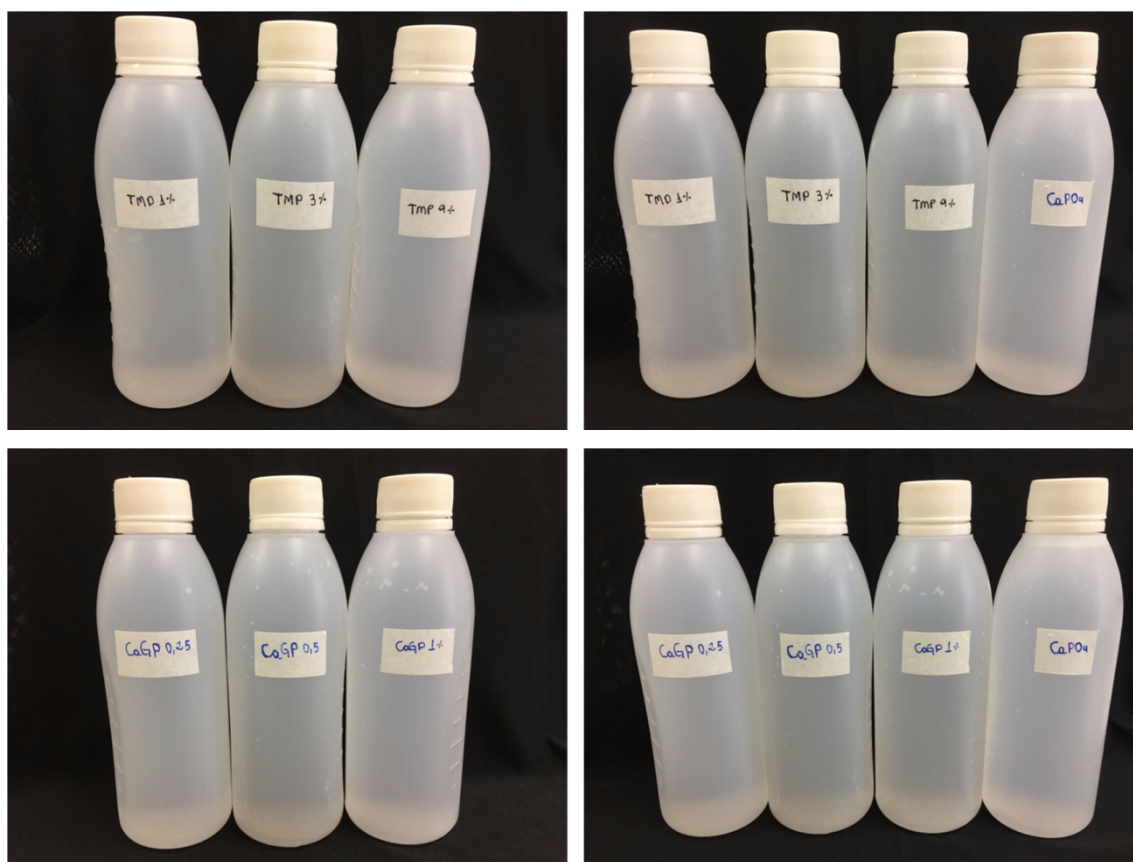
Tratamentos		Água $\theta(^{\circ})$	Diiodometano $\theta(^{\circ})$	Etilenoglicol $\theta(^{\circ})$	γ_s (mN/m)
Sem Ca PO ₄	0%CaGP	63,8 ^a	53,0 ^a	53,7 ^a	28,1 ^a
		(4,6)	(5,8)	(7,6)	(5,4)
	0,25%CaGP	79,9 ^b	61,2 ^b	69,6 ^b	22,6 ^b
		(4,0)	(4,6)	(4,4)	(3,9)
	0,5%CaGP	79,0 ^b	61,7 ^b	70,2 ^b	21,9 ^b
		(5,5)	(3,0)	(4,5)	(1,9)
	1%CaGP	80,6 ^b	62,1 ^b	70,1 ^b	22,7 ^b
		(7,1)	(3,8)	(6,8)	(2,5)
Com Ca-PO ₄	0%CaGP	73,6 ^c	60,9 ^b	64,5 ^c	23,7 ^c
		(3,9)	(4,4)	(5,3)	(3,2)
	0,25%CaGP	41,1 ^d	43,4 ^c	41,5 ^d	25,5 ^c
		(7,0)	(6,7)	(3,4)	(3,6)
	0,5%CaGP	29,2 ^e	44,6 ^c	30,8 ^e	28,3 ^d
		(5,5)	(3,5)	(4,2)	(3,1)
	1%CaGP	35,7 ^f	41,3 ^c	32,7 ^e	30,4 ^d
		(6,1)	(6,1)	(2,9)	(2,4)

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada análise (ANOVA a dois critérios, Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Anexos

Anexo A - Preparo dos blocos de esmalte.

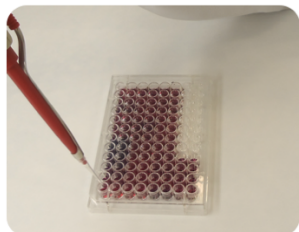
- A – Incisivos centrais bovinos;
B – Cortadeira elétrica sob refrigeração;
C – Obtenção dos blocos 4/4mm;
D – Polimento dos blocos de esmalte com politriz;
E – Planificação da dentina;
F – Polimento do esmalte.

Anexo B - Soluções experimentais.

Anexo C - Dosagem TMP (P) nas Soluções.

Anexo D - Dosagem CaGP (P) nas soluções.

Anexo E - Dosagem Cálcio nas Soluções.

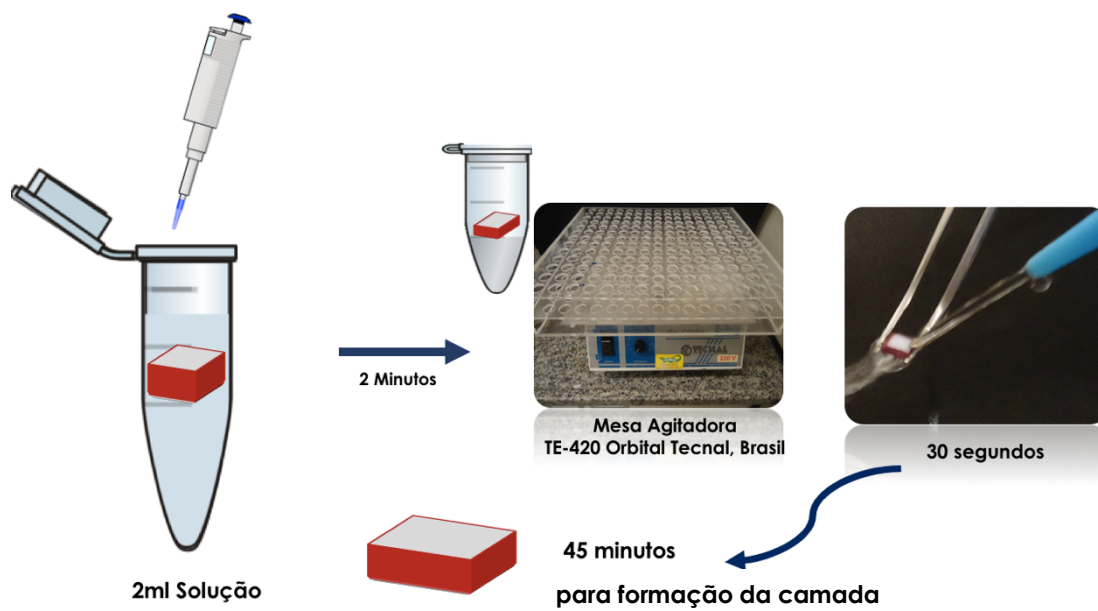


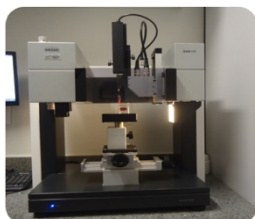
5 μ L da amostra,
50 μ L de Água deionizada,
50 μ L de Arsenazo III.



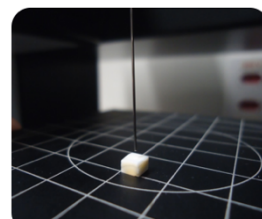
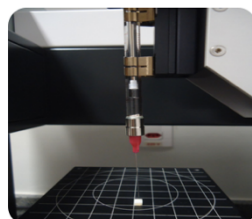
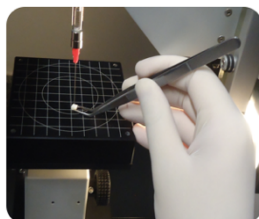
Espectrofotômetro de
microplaca EON, Biotek, USA



Anexo F - Tratamento dos Blocos de Esmalte.

Anexo G - Análise da Energia Livre de Superfície.

Goniômetro Automático
DAS110S, Kruse, Germany



Três líquidos foram contidos no interior das seringas de vidro: água, diiodo-
metano e etilenoglicol, para determinação do ângulo de contato, um volume
de 0,5 μL de cada líquido foi dispensado sobre a amostra.