

MARCELA MACEDO NUNES

**Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de sódio contendo cálcio e seu
efeito na prevenção da erosão do esmalte *in vitro***

ARAÇATUBA
2021

MARCELA MACEDO NUNES

Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de sódio contendo cálcio e seu efeito na prevenção da erosão do esmalte *in vitro*

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

Orientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientadora: Prof.^a Associada Denise Pedrini

ARAÇATUBA
2021

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N972s Nunes, Marcela Macedo.
Síntese e caracterização do ciclotrifosfato de sódio
contendo cálcio e seu efeito na prevenção da erosão do
esmalte in vitro / Marcela Macedo Nunes. - Araçatuba, 2021
39 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientadora: Profa. Denise Pedrini

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

Black D27
CDD 617.645

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Marcelo Almeida Nunes** e **Maria Tereza Coelho Macedo Nunes**, que sem o amor, dedicação e incentivo esse sonho não seria possível. Obrigada por todo o esforço investido na minha educação, poder contar com o apoio de vocês é uma das melhores coisas da vida, obrigada!

Á minha tia e madrinha **Viviane Coelho Macedo**, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida, sendo meu exemplo e inspiração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

Por sempre me mostrar o caminho certo, com saúde e força para concluir mais este desafio.

À toda a minha família,

Agradeço a compreensão com a minha ausência durante todo esse tempo. Obrigada pelo profundo apoio e amor de vocês.

À minha irmã,

Daniela Macedo Nunes,

Por sempre me apoiar e incentivar, obrigada pela companhia, mesmo estando longe, pelos conselhos e pelos momentos juntas.

Ao meu orientador,

Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Obrigada por todo tempo dedicado à elaboração deste projeto, por todos os ensinamentos, pela paciência de me atender sempre que eu o procurei, pelo suporte, pelas suas correções e incentivos. Apesar de todos os desafios, foi graças a sua inteligência e dedicação que este trabalho pôde ser concluído.

À minha coorientadora,

Professora Denise Pedrini,

Obrigada por ter me acompanhado durante todo esse caminho. Agradeço por cada minuto da sua atenção e dedicação. O seu apoio, carinho e orientação fizeram toda a diferença, obrigada por tudo professora.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria,

Ao **Professor Robson Frederico Cunha**, a **Professora Cristiane Duque** e ao **Professor Juliano Pelim Pessan**, obrigada por todo o conhecimento transmitido, pelo carinho e atenção que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional.

À Thayse e Priscila,

Obrigada por toda a ajuda, paciência e dedicação, vocês foram peças fundamentais no desenvolvimento deste projeto. Poder contar com o apoio e o conhecimento de vocês foi essencial. Obrigada.

A todos os amigos da Pós-Graduação,

Quero agradecer por toda a ajuda e amizade durante esses anos, obrigada por me acolherem com tanto carinho.

Aos funcionários do departamento de Odontopediatria,

Luizinho, Mário e Ricardo,

Muito obrigada por todo o auxílio, cuidado e paciência.

Ao Prof. Dr. João Carlos Silos Moraes e ao Técnico de laboratório Elton José Souza da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira,

Obrigada pelo tempo dedicado à leitura das amostras, pelos ensinamentos e pela a utilização do aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À seção de Pós-Graduação,

Cristiane e Camila, muito obrigada por toda atenção e paciência.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

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

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

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

Ao Frigorífico FRIBOI,

Pela permissão da coleta dos dentes bovinos.

EPÍGRAFE

“Quando você elimina o impossível, o que restar, não importa o quão improvável,
deve ser a verdade.”

Arthur Conan Doyle

NUNES, M.M. **Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de sódio contendo cálcio e seu efeito na prevenção da erosão do esmalte *in vitro***. 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar ciclotrifosfato de sódio (NaTMP) contendo cálcio, e verificar seu efeito utilizando modelo de lesões iniciais de erosão do esmalte. Os ciclotrifosfatos contendo cálcio (CaNaTMP) foram sintetizados utilizando coluna para cromatografia e adição de sobrenadante de solução contendo hidróxido de cálcio e analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia. Para determinar o efeito sobre lesões erosivas iniciais, blocos de esmalte bovino sadios (n=96) foram selecionados por dureza de superfície inicial e divididos em 8 grupos experimentais (12 blocos/grupo): controle (água deionizada), 0,24% NaF (1100 ppm F), 0,25%, 0,5% e 1% de NaTMP e CaNaTMP nas mesmas concentrações. Os blocos de esmalte foram imersos em 4 mL das soluções experimentais durante 2 minutos, seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação). A porcentagem de perda da dureza de superfície (%SH) foi calculada após cada desafio ácido. Os dados foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O processo de síntese levou a substituição de átomos de Na por átomos de Ca e as partículas apresentaram tamanhos homogêneos. As soluções contendo 0,25%, 0,5% e 1% CaNaTMP apresentaram menor %SH quando comparadas as suas contrapartes sem cálcio ($p < 0,001$), após os quatro desafios erosivos. Quando comparado a solução contendo 1100 ppm F, as soluções 0,5% e 1% CaNaTMP promoveram redução na perda de dureza ($p < 0,001$). Concluiu-se que soluções contendo CaNaTMP promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F sobre lesões iniciais do esmalte.

Palavras-chave: Esmalte Dentário, Fosfatos, Cálcio, Fluoretos, Erosão Dentária, Dentifrícios.

NUNES, M.M. **Synthesis and characterization of calcium-containing sodium cyclotriphosphate and its effect on preventing enamel erosion *in vitro***. 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The objective of the present study was to synthesize and characterize sodium cyclotriphosphate (NaTMP) containing calcium and verify its effect using an initial enamel erosion model. Cyclotriphosphate containing calcium (CaNaTMP) was synthesized using column chromatography, and addition of a solution with calcium hydroxide supernatant and analyzed by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. To determine the effect on enamel initial erosion, sound bovine enamel blocks (n=96) were selected by initial surface hardness and divided into 8 experimental groups (12 blocks/group): control (deionized water), 0.24% NaF (1100 ppm F), 0.25%, 0.5% and 1% NaTMP and CaNaTMP at the same concentrations. The enamel blocks were immersed in 4 mL of the experimental solutions for 2 minutes followed by 4 erosive challenges (citric acid, 0.75%, pH 3.5, for 1 minute, under stirring). The percentage of surface hardness variation (%SH) was calculated after each acid challenge. Data were subjected to two-way repeated measures analysis of variance, followed by Tukey's test ($p < 0.05$). The synthesis process led to the replacement atoms of Na by atoms of Ca with particles having, homogeneous sizes. The solutions containing 0.25%, 0.5% and 1% CaNaTMP promoted lower %SH when compared to their counterparts without calcium ($p < 0.001$), after the four erosive challenges. When compared to the solution containing 1100 ppm F, the 0.5% and 1% CaNaTMP solutions were superior in reducing hardness loss ($p < 0.001$). It was concluded that solutions containing CaNaTMP led to superior protective effects compared to the 1100 ppm F group on initial enamel erosion.

Keywords: Dental Enamel, Phosphates, Calcium, Fluorides, Dental Erosion, Dentifrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da análise da dureza de superfície após a preparação dos blocos de esmalte (SHi), pós-tratamento (SHt), e após o 1º, 2º, 3º e 4º desafio erosivo (SHd).	16
Figura 2	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A) e CaNaTMP (B), e respectivos histogramas de EDS (C e D).	19
Figura 3	Valores médios (DP) da porcentagem de alteração da dureza de superfície no esmalte de acordo com os grupos e condições experimentais. Letras minúsculas distintas indicam uma diferença significativa entre os tratamentos e as condições experimentais (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=12$).	21
Figura 4	Fotomicrografias representativas obtidas pela microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte após os desafios erosivos (Aumento de 5000×). As setas pretas indicam esmalte interprismáticos. Setas abertas indicam os prismas de esmalte. Setas brancas indicam material amorfo depositado na superfície do esmalte.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios (DP) de trimetafosfato (TMP), cálcio (Ca), fluoreto (F), e pH nos grupos experimentais.	20
-----------------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	29

Síntese e caracterização de ciclotrifosfato de sódio contendo cálcio e seu efeito na prevenção da erosão do esmalte *in vitro*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar ciclotrifosfato de sódio (NaTMP) contendo cálcio, e verificar seu efeito utilizando modelo de lesões iniciais de erosão do esmalte. Os ciclotrifosfatos contendo cálcio (CaNaTMP) foram sintetizados utilizando coluna para cromatografia e adição de sobrenadante de solução contendo hidróxido de cálcio e analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia. Para determinar o efeito sobre lesões erosivas iniciais, blocos de esmalte bovino sadios (n=96) foram selecionados por dureza de superfície inicial e divididos em 8 grupos experimentais (12 blocos/grupo): controle (água deionizada), 0,24% NaF (1100 ppm F), 0,25%, 0,5% e 1% de NaTMP e CaNaTMP nas mesmas concentrações. Os blocos de esmalte bovino foram imersos em 4 mL das soluções experimentais durante 2 minutos, seguidos por 4 desafios erosivos (ácido cítrico, 0,75%, pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação). A porcentagem de perda da dureza de superfície (%SH) foi calculada após cada desafio ácido. Os dados foram submetidos a análise de variância de medidas repetidas a dois critérios, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O processo de síntese levou a substituição de átomos de Na por átomos de Ca e as partículas apresentaram tamanhos homogêneos. As soluções contendo 0,25%, 0,5% e 1% CaNaTMP apresentaram menor %SH quando comparadas as suas contrapartes sem cálcio ($p < 0,001$), após os quatro desafios erosivos. Quando comparado a solução contendo 1100 ppm F, as soluções 0,5% e 1% CaNaTMP promoveram redução na perda de dureza ($p < 0,001$). Concluiu-se que soluções contendo CaNaTMP promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F sobre lesões iniciais do esmalte.

Palavras-chave: Esmalte Dentário, Fosfatos, Cálcio, Fluoretos, Erosão Dentária, Dentifrícios.

Introdução

O fluoreto (F) é o principal agente de escolha para reduzir a desmineralização e favorecer a remineralização dos tecidos duros dentários. Entretanto, o F leva a hipermineralização da parte mais externa do substrato dentário, o que limita a difusão dos íons para o seu interior e o processo de remineralização [Philip, 2019]. Além disso, os produtos depositados na presença do F (fluoreto de cálcio, apatita fluoretada e fluorapatita) são altamente solúveis em pH abaixo de 4,0, limitando seu efeito contra os ácidos que promovem a erosão dentária [Barbour et al., 2011]. Para superar as limitações descritas acima, ativos a base de fosfato têm sido estudados, associados ou não ao F.

Os agentes a base de fosfatos podem ser classificados como sistemas de liberação à base de cálcio e fosfato, os quais têm a função de aumentar a saturação do meio oral em relação à hidroxiapatita. Como exemplos, têm-se a nanohidroxiapatita, o fosfato tricálcico funcionalizado, o fosfato de cálcio amorfo estabilizado pelo fosfopeptídeo de caseína (CPP-ACP) e o glicerofosfato de cálcio. Entretanto, estes agentes não demonstram efeitos superiores ao F [González-Cabezas & Fernández, 2018; Delbem & Pessan, 2019]. Outros agentes à base de fosfato são os ciclofosfatos, como o trimetafosfato de sódio (NaTMP), os quais não são usados como fonte de cálcio ou fosfato. O NaTMP, quando associado ao F, atua como uma barreira contra a difusão de ácido no substrato dentário [Takeshita et al., 2011; Amaral et al., 2018; Danelon et al., 2018] e favorece um maior fluxo de cálcio e fosfato potencializando o processo de remineralização em profundidade no substrato dentário [Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021]. Quando uma fonte de fosfato de cálcio (CPP-ACP) é aplicada após o tratamento com NaTMP, o processo de remineralização foi melhorado em 50% quando comparado ao tratamento com 1100 ppm F [Gonçalves et al., 2021].

Embora a saliva esteja supersaturada em relação ao Ca e P [Reynolds et al., 2003], a capacidade de promover remineralização depende da difusão desses íons para o interior do substrato dentário [Reynolds, 2008]. Prévios estudos têm mostrado que supersaturar o meio com cálcio pode reduzir o efeito erosivos dos ácidos [Lussi et al., 2011]. Assim, como o NaTMP apresenta a capacidade de adsorver ao esmalte [Amaral et al., 2016; Amaral et al., 2018; Nalin et al., 2021], de reduzir a penetração dos ácidos e melhorar a difusão de cálcio para o interior do esmalte [Takeshita et al.,

2016; Gonçalves et al., 2021], funcionalizar o NaTMP com o cálcio pode ajudar a fixar este íon e aumentar sua disponibilidade na superfície dentária.

Com base no exposto, o objetivo do estudo foi sintetizar TMP contendo cálcio (CaNaTMP) e caracterizar morfológicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia; e analisar o efeito de diferentes concentrações de CaNaTMP (0,25%, 0,5% e 1%) utilizando modelo *in vitro* na prevenção da erosão inicial do esmalte. A hipótese nula do estudo foi que não é possível sintetizar o CaNaTMP que apresente efeito preventivo em lesões erosivas iniciais do esmalte quando comparado ao NaTMP e 1100 ppm F.

Material e Métodos

Síntese e caracterização de ciclotrifosfatos contendo cálcio

Os compostos de TMP com substituição parcial do sódio pelo cálcio (CaNaTMP) foram preparados a partir da diluição de 30 g de NaTMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em 200 mL de água deionizada (pH 5,6). A seguir a solução foi tratada em uma coluna de vidro (2 cm × 30 cm) contendo resina de troca iônica catiônica forte na forma H^+ (DOWEX 50WX4, Dow Inc., Midland, MI, EUA) para a substituição dos íons sódio pelos de íons de cálcio [Watanabe et al., 1998], com fluxo de 1,0 mL/min. Após a passagem pela coluna (pH 1,11), foi adicionado ao filtrado o sobrenadante de 4,39 g de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, Cód. HC09743RA, Exôdo, Sumaré, SP, Brasil) diluído em 800 mL de água deionizada até atingir o mesmo valor de pH da solução de NaTMP antes da troca iônica. A solução foi mantida em estufa por 24 horas a 37°C para precipitação do CaNaTMP [Griffith, 1962], seguido pela filtragem usando papel filtro quantitativo (Quanty JP42, J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e funil de Buchner conectado a um sistema de vácuo (-600 mmHg) [Amaral et al., 2018]. O precipitado foi mantido em estufa por 24 horas a 70°C para secagem, e o pó, homogeneizado em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 5 minutos [Amaral et al., 2018].

A seguir, os pós de NaTMP e CaNaTMP foram depositados sobre suportes recoberto com fita de carbono, submetidos a vácuo e pulverização catódica para uma fina cobertura com ouro (Quorum - Q150T E, West Sussex, UK). A morfologia das partículas do NaTMP e NaCaTMP foram obtidas por microscopia eletrônica de

varredura (MEV, Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Germany) a 20 kV e aumento de 3.000 ×. A composição química das amostras foi determinada por espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS, Oxford Instruments, INCAx - act, 133 eV, England) com 20 keV, resolução espacial de ~2 µm e tempo de contagem de 150 s. Os elementos químicos analisados foram fósforo (P), oxigênio (O), sódio (Na) e cálcio (Ca).

Análise da capacidade em prevenir lesões erosivas iniciais do esmalte

Preparo e seleção dos blocos de esmalte

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

Foram selecionados blocos com superfície plana, sem riscos, trincas ou hipoplasias, e com dureza de superfície inicial (SHi) entre 351,0 e 367,0 KHN. A dureza de superfície (SH) foi determinada a uma distância de 200 µm do vértice direito de uma impressão de referência feita a 1000 µm (Knoop, 500 g, 10 segundos, Shimadzu HMT-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) na região central do

bloco de esmalte (Figura 1). Foram realizadas cinco impressões separadas por uma distância de 100 μm utilizando uma ponta Knoop, com carga de 25 g e tempo de 10 s [Danelon et al., 2018].

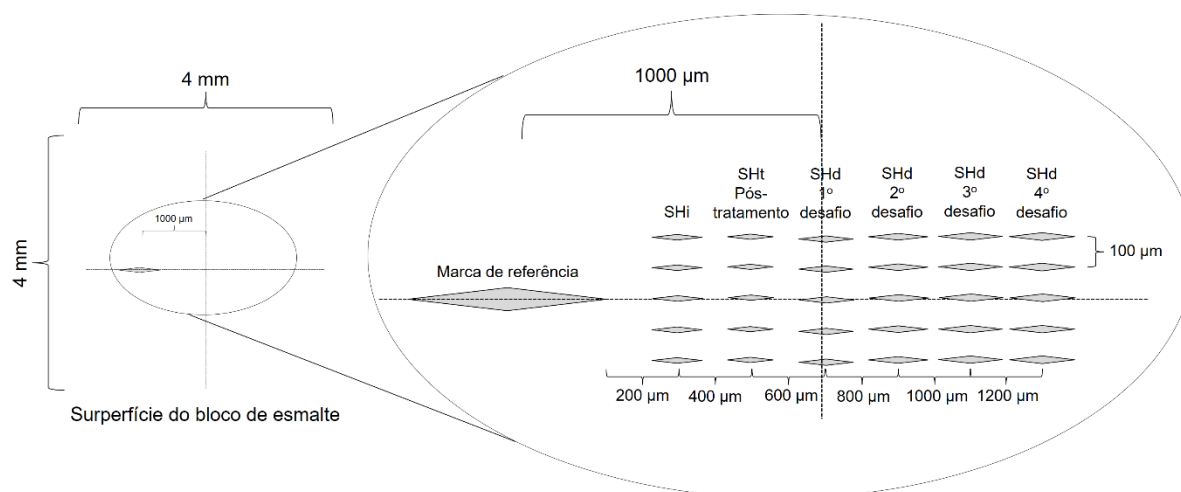


Figura 1. Ilustração da análise da dureza de superfície após a preparação dos blocos de esmalte (SHi), pós-tratamento (SHt), e após o 1º, 2º, 3º e 4º desafio erosivo (SHd).

Grupos experimentais e determinação do pH, F, TMP e Ca nas soluções

Soluções foram preparadas contendo NaTMP ou CaNaTMP nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1%, e fluoreto a 0,24% (NaF, Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brazil). Os blocos de esmalte foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos experimentais: controle (água deionizada), 0,24% NaF (1100 ppm F), 0,25% CaNaTMP, 0,5% CaNaTMP, 1% CaNaTMP, 0,25% NaTMP, 0,5% NaTMP e 1% NaTMP. O número de 12 blocos/grupo foi baseado em estudo piloto (n=6), considerando a diferença média da dureza de superfície entre os grupos de 12 KHN e o desvio-padrão de 6 KHN, erro α de 0,05 e erro β de 0,85, utilizando programa estatístico SigmaPlot (versão 12.0, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, USA).

O TMP nas soluções experimentais foi determinado pela quantificação do fósforo (P) utilizando método colorimétrico do molibdato, em leitora de microplaca (EON™ Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) e comprimento de onda, de 660 nm [Fiske & Subbarow, 1925], após hidrólise ácida

(HCl 1,0 mol/L) a 100°C por 1 h [Amaral et al., 2018]. As concentrações de Ca foram determinadas em alíquotas de 5 µL das soluções experimentais de acordo com o método colorimétrico do Arsenazo III e comprimento de onda de 650 nm [Vogel et al., 1983; Amaral et al., 2018]. Para determinação das concentrações de F [Amaral et al., 2018], utilizou-se eletrodo íon-seletivo (9609 BN; Orion Research Inc., Beverly, Mass., USA) e medidor específico de íons (Orion 720 A plus; Orion Research Inc.), calibrado com padrões contendo 0,25 a 4,0 µg F/mL e TISAB II. O pH das soluções foi medido utilizando eletrodo de pH (Gel-Filled Plastic pH Electrode 13-620-290, Fisher Scientific accumet® Electrodes, Ottawa, Ontario, Canada), calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

Coleta da saliva humana

Previamente aos desafios erosivos, a saliva humana estimulada com parafilme (Parafilm® M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi coletada no período da manhã, 1 h após a refeição da manhã, de voluntários de ambos os gêneros (idade entre 20-30 anos, n=6). Para realização da coleta, o estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa para prévia autorização (CAEE:17281319.3.0000.5420). Imediatamente após a coleta, as amostras das salivas foram combinadas e centrifugadas durante 10 minutos, a 4°C e $2.000 \times g$. Os sobrenadantes foram estocados a -72° C em frascos plásticos com 50 mL [Schipper et al., 2007].

Desafios erosivos

Blocos hígidos foram imersos (4 mL/bloco) em saliva humana apenas uma vez durante 1 hora sob agitação (100 rpm), sendo posteriormente lavados em água deionizada por 30 s [Buzalaf et al., 2012]. Imediatamente após, os blocos foram imersos individualmente em 4 mL das soluções de tratamento durante 2 minutos sob agitação (100 rpm) e lavados em água deionizada por 30 s. O desafio erosivo consistiu em imergir individualmente cada bloco de esmalte em 4 mL de ácido cítrico (0,75%, pH 3,5, Synth, Diadema, SP, Brasil) sob agitação (100 rpm) durante 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de lavagem com água deionizada durante 30 s. No total, foram realizados quatro desafios erosivos individuais, após os tratamentos com as soluções experimentais (Figura 1). As medidas de dureza da superfície final (SHf) foram realizadas após os tratamentos (t) e após o 1º, 2º, 3º e 4º desafio erosivo (d)

para calcular a porcentagem de alteração da dureza de superfície ($\%SH = [(SH_t, d - SH_i) / (SH_i)] \times 100$) [Baumann et al., 2016; Baumann et al., 2017].

Análise de microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte

Após a determinação da dureza de superfície, blocos de esmalte (n=3) de cada grupo, foram revestidos com uma camada de ouro de ~ 5 nm por 90 s (Quorum - Q150T E, West Sussex, Reino Unido). A desmineralização da superfície do esmalte e a presença de material amorfo foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (SEM, Carl Zeiss, EVO ILS15, Carl Zeiss NTS LTD, Alemanha) a 20 kV, em imagens com aumento de 5.000 ×.

Análise estatística

Os grupos experimentais (Controle, 0,24% NaF, 0,25% CaNaTMP, 0,5% CaNaTMP, 1% CaNaTMP, 0,25% NaTMP, 0,5% NaTMP, 1% NaTMP) e as condições do esmalte (pós-tratamento, 1º, 2º, 3º e 4º desafios erosivos) foram considerados como fatores de variação. A %SH foi usada como variável. Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogênea (teste de Cochran) e, portanto, foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas a dois critérios seguida do teste de Tukey. A análise foi realizada no software SigmaPlot (versão 12.0, SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA, EUA) com nível de significância de 5%.

Resultados

As imagens de MEV mostraram cristais de granulação maior e irregular para NaTMP (Figura 2A) e grãos menores e mais regulares para CaNaTMP (Figura 2B). A análise de EDS identificou os picos dos elementos químicos Na a 1,04 keV, O a 0,52 keV e P a 2,02 comum para as amostras de NaTMP e CaNaTMP (Figura 2C e 2D) e a presença dos picos a 0,26 e 3,69 keV característico do elemento Ca somente em CaNaTMP (Figura 2D). A porcentagem (%) da massa de P e Na nas amostras de CaNaTMP foi menor quando comparada ao NaTMP (Figura 2C e 2D) e a % de O foi maior para o CaNaTMP.

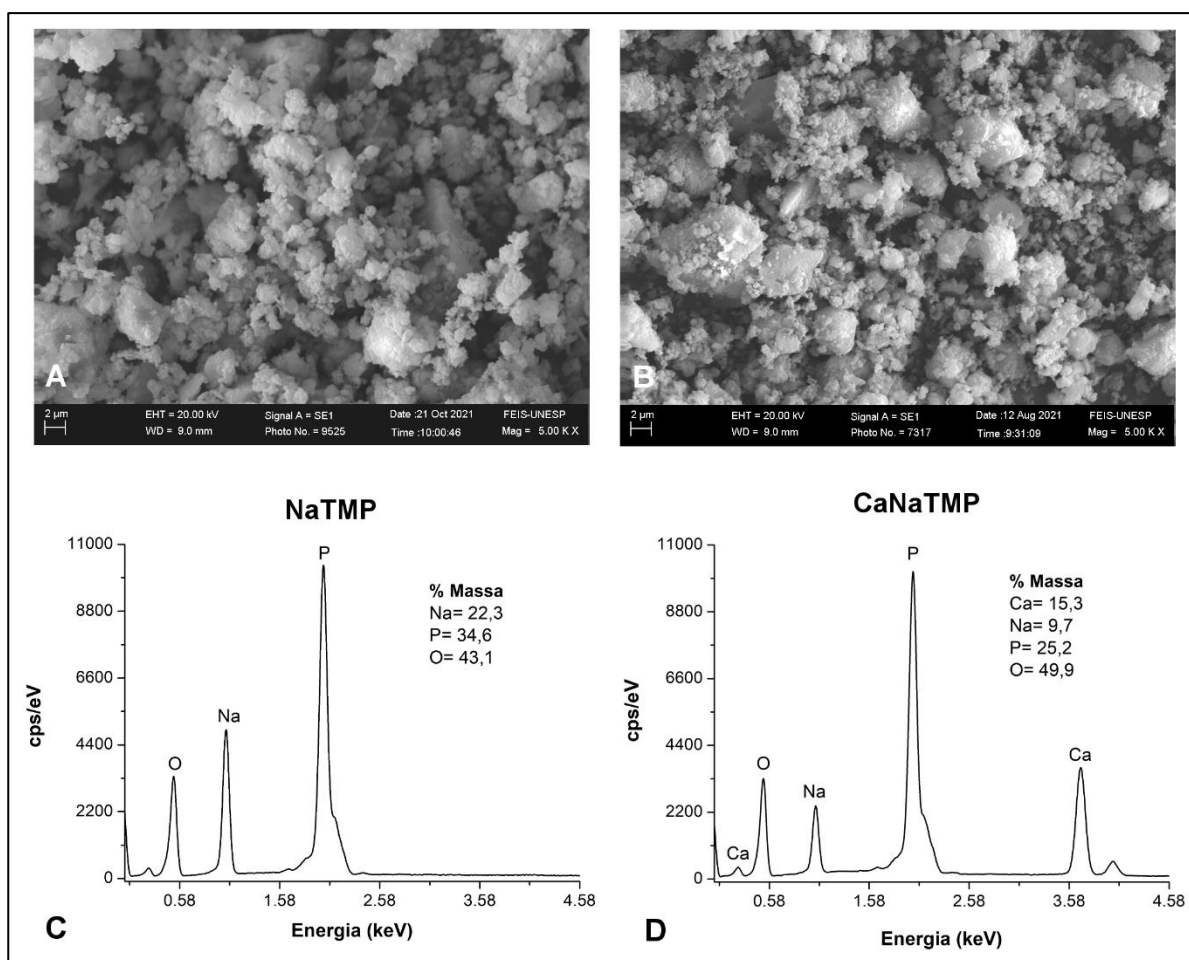


Figura 2. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura das amostras NaTMP (A) e CaNaTMP (B), e respectivos histogramas de EDS (C e D).

A concentração de fluoreto no grupo 0,24% NaF mostrou-se dentro do esperado, assim como a quantidade de TMP e Ca nos grupos contendo NaTMP e CaNaTMP (Tabela 1). O pH da solução contendo fluoreto foi neutro enquanto os demais líquidos apresentaram pH fracamente ácido (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios (DP) de trimetafosfato (TMP), cálcio (Ca), fluoreto (F) e pH nos grupos experimentais

Grupos		Análises			
		TMP (µg/mL)	Ca (µg/mL)	F (µg/mL)	pH
0,24%	Controle	–	–	3,2 (0,2)	5,51 (0,08)
	NaF	–	–	1153,8 (145,9)	6,13 (0,20)
0,25%	NaTMP	745,2 (38,2)	–	5,8 (0,2)	5,73 (0,21)
	CaNaTMP	656,1 (18,6)	255,3 (221,6)	6,9 (0,5)	5,89 (0,06)
0,5%	NaTMP	1569,1 (137,1)	–	4,6 (0,5)	5,64 (0,03)
	CaNaTMP	1205,3 (11,8)	601,3 (377,0)	15,7 (0,5)	5,66 (0,04)
1,0%	NaTMP	3076,6 (517,6)	–	4,2 (0,8)	5,49 (0,03)
	CaNaTMP	2463,2 (30,8)	1379,6 (867,6)	16,8 (0,5)	5,50 (0,06)

(–): valor não detectável pela técnica.

Os tratamentos com as soluções contendo F ou TMP levaram ao aumento da dureza quando comparado ao grupo controle ($p=0,002$; Figura 3). Os valores de dureza dos grupos 0,24% NaF, 0,25% CaNaTMP e 0,5% CaNaTMP não diferiram entre si ($p\geq 0,179$) após os tratamentos. O tratamento com 1% CaNaTMP levou a maior dureza de superfície ($p<0,001$), o grupo controle apresentou a maior perda de dureza durante os desafios ácidos ($p<0,001$). O tratamento com 0,24% NaF mostrou maior proteção contra o 1º desafio ácido quando comparado aos tratamentos contendo NaTMP ($p\geq 0,024$), porém este efeito foi reduzindo ao longo dos desafios até não haver diferença após o 4º desafio ($p\geq 0,144$). A perda de dureza não diferiu entre os tratamentos contendo 0,5% e 1% de CaNaTMP durante os desafios ($p\geq 0,251$) e levaram as menores perda de dureza que os demais grupos ($p<0,001$).

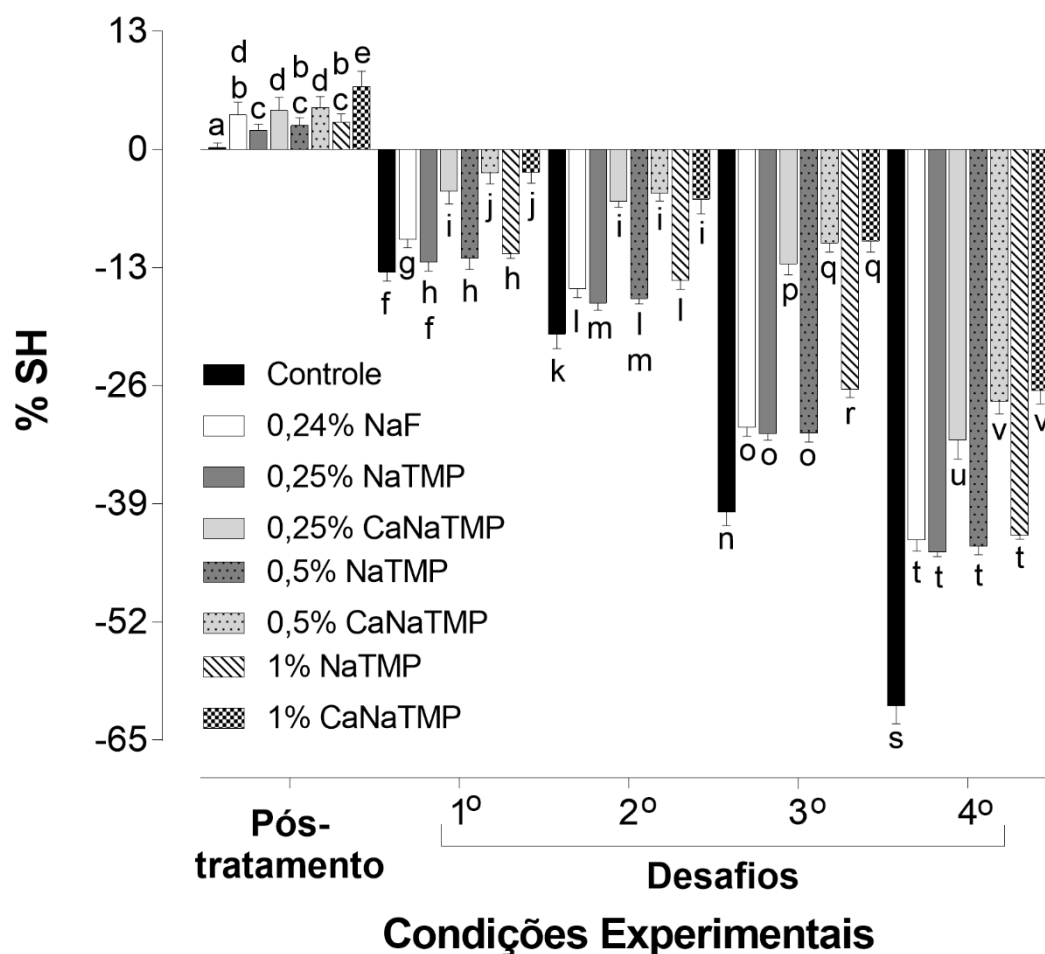


Figura 3. Valores médios (DP) da porcentagem de alteração da dureza de superfície no esmalte de acordo com os grupos e condições experimentais. Letras minúsculas distintas indicam uma diferença significativa entre os tratamentos e as condições experimentais (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n = 12$).

A análise da superfície do esmalte no grupo Controle após os desafios erosivos mostra prismas de esmalte e esmalte interprismático, com os cristalitos de apatita totalmente expostos, compatível com "buracos de fechadura" ou estruturas em favo de mel (Figura 4). O grupo tratado com 0,25% de NaTMP apresentou os prismas de esmalte removidos e a manutenção do esmalte interprismático, e cristalitos de apatita expostos. Este aspecto foi menos pronunciado com o tratamento com o fluoreto. Os grupos contendo CaNaTMP apresentaram uma camada amorfa cobrindo os prismas e esmalte interprismáticos, mais pronunciado nas concentrações de 0,5% e 1%.

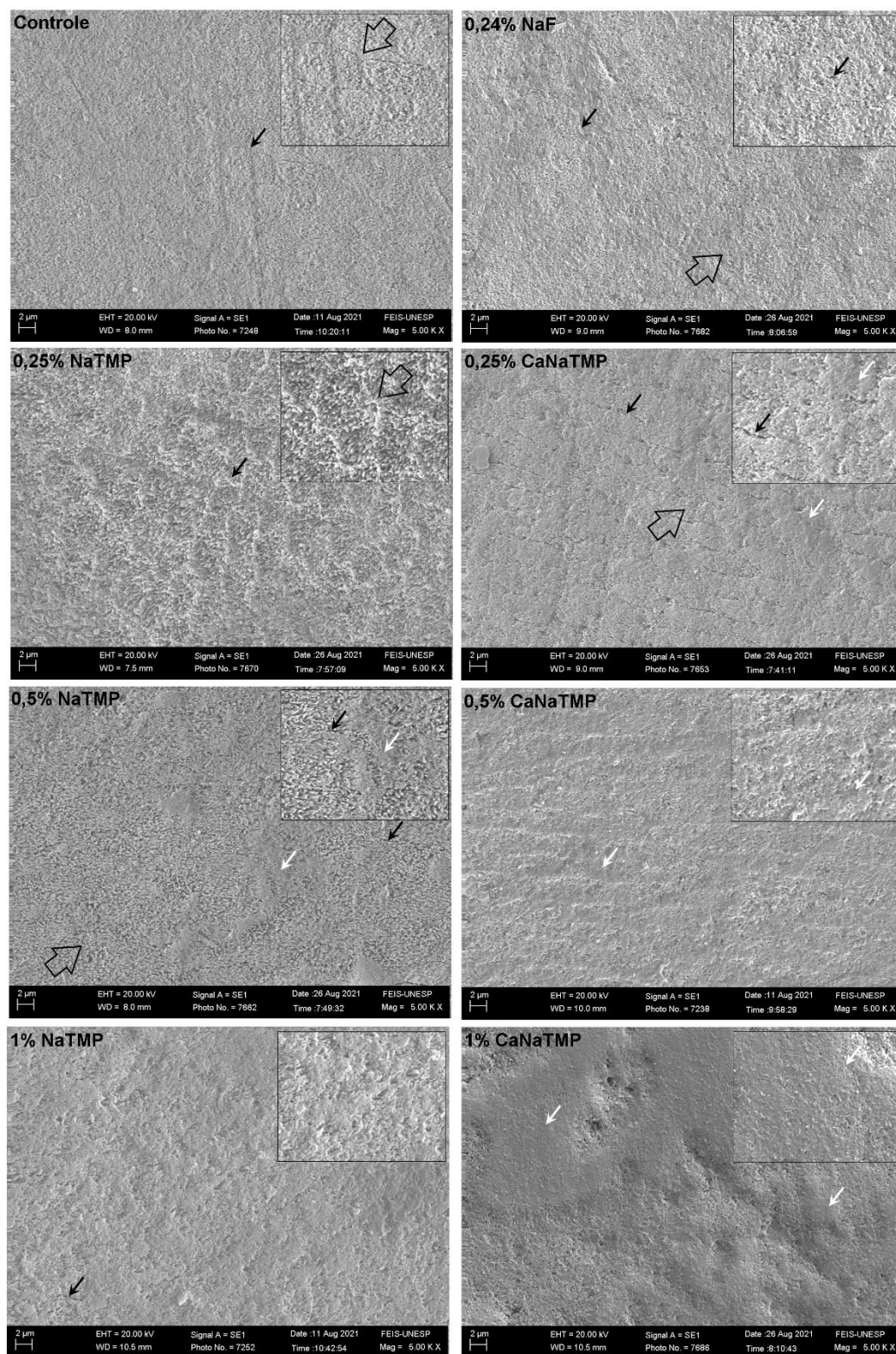


Figura 4. Fotomicrografias representativas obtidas pela microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte após os desafios erosivos (Aumento de 5000×). As setas pretas indicam esmalte interprismáticos. Setas abertas indicam os prismas de esmalte. Setas brancas indicam material amorfo depositado na superfície do esmalte.

Discussão

A adição do trimetafosfato de sódio a produtos fluoretados tem mostrado reduzir a desmineralização e o desgaste erosivo do esmalte dentário quando comparado a sua contraparte sem trimetafosfato de sódio [Moretto et al., 2010; Manarelli et al., 2011; Manarelli et al., 2013; Cruz et al., 2015; Danelon et al., 2018]. Entretanto, não foi avaliado o efeito do trimetafosfato de sódio na dissolução do esmalte e se a substituição do sódio pelo cálcio melhoraria a ação do ciclotrifosfato. Os resultados deste estudo mostraram que soluções contendo CaNaTMP promoveram menor dissolução do esmalte quando comparado com NaTMP e 1100 ppm F; assim a hipótese nula foi rejeitada.

Os dados do presente estudo reforçam as hipóteses anteriores de que o NaTMP age reduzindo a difusão do ácido para o interior do esmalte minimizando seu amolecimento em profundidade [Manarelli et al., 2013; Pancote et al., 2014; Danelon et al., 2018]. Nestes estudos, a associação NaTMP/F apresenta efeito superior à sua contraparte sem NaTMP. A adsorção do NaTMP ao esmalte forma uma camada protetora [Amaral et al., 2016; Amaral et al., 2018; Nalin et al., 2021] com polaridade negativa que favorece a deposição de fosfato de cálcio [Favretto et al., 2018; Nalin et al., 2021]. Durante os ataques ácidos, a camada de TMP apresenta a capacidade de reter cálcio e fosfato proveniente da dissolução do esmalte [Nalin et al., 2021]. Estudos prévios demonstraram que o NaTMP é adsorvido à hidroxiapatita e reduz sua dissolução [Amaral et al., 2016; Manarelli et al., 2017; Amaral et al., 2018]. Ao final do desafio ácido observou-se a presença de uma camada amorfa contendo fosfato de cálcio (CaPO_4) e TMP que envolve os cristalitos de hidroxiapatita e prismas do esmalte (Figura 4). Assim, quanto maior a concentração de NaTMP maior sua capacidade de reduzir a difusão de ácidos e de reter cálcio em sua estrutura, e maior a formação de CaPO_4 -TMP envolvendo cristais e prismas do esmalte.

O tratamento com fluoreto também reduziu a perda da dureza de superfície tanto quanto os grupos NaTMP. O fluoreto leva a deposição do fluoreto de cálcio (“ CaF_2 ”) no esmalte formando uma barreira contra os ácidos [Magalhães et al., 2011] e atuando nos processos de endurecimento [Buzalaf et al., 2012]. O maior amolecimento observado no grupo controle reforça esta afirmação. Entretanto, o efeito do CaF_2 é limitado, pois seu pH de dissolução é 4,5 e os desafios erosivos ocorrem em $\text{pH} < 4,0$ e em meio subsaturado em relação a hidroxiapatita [Barbour

et al., 2011]. Assim, o CaF_2 é perdido ao longo dos desafios ácidos e o seu efeito reduzido. O mesmo ocorre com os agentes que induzem a deposição de cristais de apatita, pois seu pH de dissolução é menor do que 5,5 [Barbour et al., 2011; Lussi et al., 2011]. Ao final dos desafios ácidos, os cristalitos e prismas de esmalte tratados com fluoreto apresentaram-se menos expostos quando comparado ao grupo controle. Porém, para obter resultados superiores, os estudos prévios mostram a necessidade de associar o NaTMP ao fluoreto [Amaral et al., 2016; Manarelli et al., 2017].

Tendo em vista se tratar de um trabalho inicial, o presente estudo demonstrou a viabilidade de sintetizar NaTMP contendo cálcio (CaNaTMP) utilizando resina de troca iônica. Na análise de EDS, foi possível verificar uma redução do pico do Na e presença do pico de Ca (Figura 2D) comprovando a substituição de pelo menos um Na por Ca, considerando os dados de % de massa do EDS. Esse novo composto levou ao menor amolecimento do esmalte com efeito superior aos grupos NaTMP e NaF, independente da sua concentração. A proteção contra a lesão erosiva inicial utilizando 0,5% e 1% de CaNaTMP foi 4 vezes maior após o 1º desafio ácido quando comparado ao tratamento com NaF 0,24% (1100 ppm F). Após os 2º e 3º desafios ácidos, esta proteção foi 3 vezes maior do que o tratamento com NaF (Figura 3). O material amorfo produzido pelo CaNaTMP envolvendo os cristais de hidroxiapatita e prismas de esmalte (Figura 4) apresentou dureza maior do que os grupos sem cálcio na composição (Figura 3). O material amorfo teoricamente é fruto da dissolução do esmalte (Ca e PO_4) retido na estrutura reticulada do CaNaTMP ao final dos desafios ácidos. Provavelmente, no processo de substituição do Na, cada átomo de Ca se ligue a duas moléculas do TMP formando uma estrutura reticular [Pancote et al., 2014]. Esta alteração nas ligações entre as moléculas de TMP aumentou a capacidade do CaNaTMP em reduzir a penetração dos ácidos para o interior do esmalte e a perda mineral (Figura 3), e favoreceu uma maior presença de material amorfo envolvendo os cristais de hidroxiapatita e prismas de esmalte (Figura 4), após os desafios ácidos.

A saliva humana foi utilizada neste estudo, visando melhor simular uma condição clínica e a formação da película salivar adquirida. A presença da película adquirida não permite o contato direto com o ácido e o esmalte reduzindo a dissolução do esmalte [Magalhães et al., 2009; Buzalaf et al., 2012]. De acordo com Manarelli et al. [2017], a presença da película adquirida não interfere no efeito dos

fosfatos e melhora sua capacidade em reduzir a dissolução da hidroxiapatita. Este modelo experimental de erosão inicial fornece informações valiosas sobre a ação do novo composto sintetizado na superfície do esmalte após a exposição aos desafios ácidos. Os ensaios de dureza de superfície são adequados para analisar o amolecimento do esmalte sem perda quantitativa de substância [Stenhagen et al., 2010]. Assim, o modelo permite determinar o quanto o esmalte está amolecido e o quanto é suscetível de reparo e perda de substância na continuidade do processo erosivo ou em presença de abrasão. No entanto, é necessário analisar os resultados deste estudo em um experimento de longo prazo, realizar a avaliação do produto depositado na superfície que provavelmente promoveu o efeito protetor na erosão. Além disso, deve-se observar possíveis limitações dos resultados, como a ausência do efeito abrasivo da escovação e o uso de esmalte bovino mais suscetível a ataques de ácidos.

Conclusão

Com base nos resultados da metodologia *in vitro*, concluiu-se que ocorreu substituição parcial do elemento sódio pelo elemento cálcio na síntese e as soluções contendo CaNaTMP promoveram efeitos protetores superiores em comparação ao grupo 1100 ppm F e aos grupos contendo NaTMP na erosão inicial do esmalte.

Referências bibliográficas

- Amaral JG, Delbem ACB, Pessan JP, Manarelli MM, Barbour ME. Effects of polyphosphates and fluoride on hydroxyapatite dissolution: A pH-stat investigation. *Arch Oral Biol* 2016;63:40–46.
- Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106(7):2553–2564.
- Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res* 2011;45:24–32.
- Baumann T, Bereiter R, Lussi A, Carvalho TS. The effect of different salivary calcium concentrations on the erosion protection conferred by the salivary pellicle. *Sci Rep* 2017;7:12999.

- Baumann T, Kozik J, Lussi A, Carvalho TS. Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Sci Rep* 2016;6:34760.
- Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2012;20:493–502.
- Cruz NV, Pessan JP, Manarelli MM, Souza MD, Delbem AC. In vitro effect of lowfluoride toothpastes containing sodium trimetaphosphate on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2015;60(9):1231–1236.
- 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(2):119–124.
- Delbem ACB, Pessan JP. Alternatives to enhance the anticaries effects of fluoride. In: Coelho Leal S, Takeshita E. (eds) *Pediatric restorative dentistry*. Springer, Cham. 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93426-6_6.
- Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, de Toledo PTA, Pedrini D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2018;22(9):3021–3029.
- Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375–400.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Pessan JP, Romero GDA, Cannon ML, Danelon M. Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2021;122:105001.
- González-Cabezas C, Fernández CE. Recent advances in remineralization therapies for caries lesions. *Adv Dent Res* 2018;29(1):55–59.
- Griffith EJ. The structure of salt sodium calcium metaphosphate ($\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$). *Inorg Chem* 1962;1(4):962.
- Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:2-12. doi: 10.1159/000325915.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A. Fluoride in dental erosion. In Buzalaf MA (ed): *Fluoride in the oral cavity*. Monogr Oral Sci. Basel, Karger, 2011.

- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2009;17(2):75–86.
- Manarelli MM, Moretto MJ, Sassaki KT, Martinhon CC, Pessan JP, Delbem AC. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion. *Am J Dent* 2013;26(6):307–312.
- Manarelli MM, Pessan JP, Delbem AC, Amaral JG, Paiva MF, Barbour ME. Protective effect of phosphates and fluoride on the dissolution of hydroxyapatite and their interactions with saliva. *Caries Res* 2017;51(2):96–101.
- Manarelli MM, Vieira AEM, Matheus AA, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. *Caries Res* 2011;45:506–509.
- Moretto MJ, Magalhães AC, Sassaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44(2):135–140.
- Nalin EKP, Danelon M, da Silva ES, Hosida TY, Pessan JP, Delbem ACB. Surface free energy, interaction, and adsorption of calcium and phosphate to enamel treated with trimetaphosphate and glycerophosphate. *Caries Res* 2021; doi:10.1159/000518943.
- Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB. Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol* 2018; 90:108–112.
- Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: In vitro study. *Arch Oral Biol* 2014;59:336–340.
- Philip N. State of the art enamel remineralization systems: The next frontier in caries management. *Caries Res* 2019;53(3):284–295.
- Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? *Aust Dent J* 2008;53:268–273.
- Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003;82:206–211.
- Schipper R, Loof A, De Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. SELDITOFMS of saliva: methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B* 2007;847:45–53.

- Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. *Caries Res* 2010;44(6):555–561.
- Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing potential of a low fluoride toothpaste with sodium trimetaphosphate: An in situ study. *Caries Res* 2016;50(6):571–578.
- Takeshita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res* 2011;45(5):494–497.
- Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization. *Caries Res* 2010;44:349–357.
- 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.
- Watanabe M, Yoshida K, Sakurai M, Sato S. Synthesis and thermal behaviour of alkaline earth cyclo-octaphosphates. *J Mater Sci* 1998;33:5601–5606.

ANEXOS

ANEXO A – Síntese de ciclotrifosfatos com substituição do sódio pelo cálcio



Diluição de 30 g de NaTMP ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em 200 mL de água deionizada (pH 5,6).



Tratamento da solução em uma coluna de vidro (2 cm × 30 cm) contendo resina de troca iônica catiônica forte na forma H^+ (DOWEX 50WX4, Dow Inc., Midland, MI, EUA) para a substituição dos íons sódio pelos de íons de cálcio [Watanabe et al., 1998], com fluxo de 1,0 mL/min.



Adição do sobrenadante de 4,39 g de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, Cód. HC09743RA, Exôdo, Sumaré, SP, Brasil) ao filtrado.



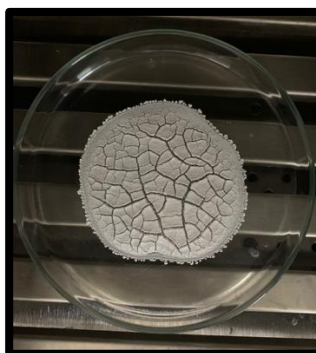
Solução mantida em estufa por 24 horas a 37°C para precipitação do CaNaTMP.



Filtragem usando papel filtro quantitativo (Quanty JP42, J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e funil de Buchner conectado a um sistema de vácuo (-600 mmHg).



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



Aspecto do precipitado após a secagem na estufa a 70°C.

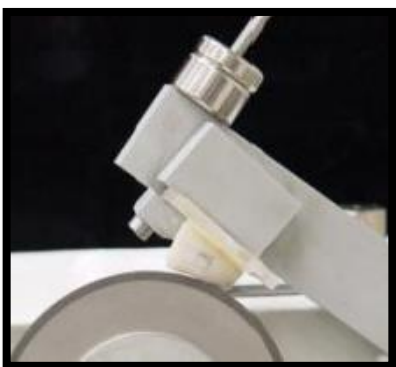


Moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) para a homogeneização do pó por 5 minutos.

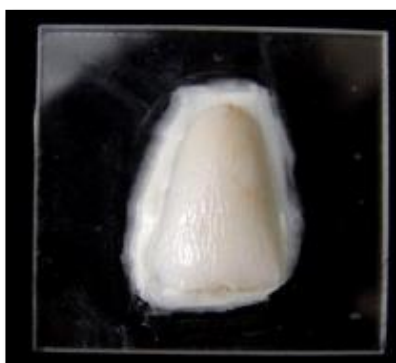
ANEXO B – Obtenção e preparo dos blocos de esmalte



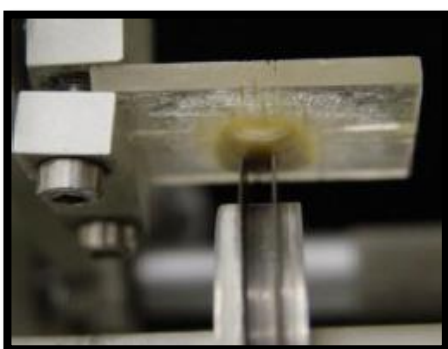
Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água deionizada).



Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



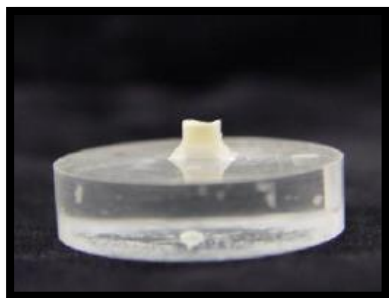
Face vestibular fixada na placa de acrílico.



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



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



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



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



Bloco fixado com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual foi polida para análise de dureza.

ANEXO C – Comitê de ética

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: 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

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

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

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Os objetivos do estudo serão sintetizar ciclotrifosfatos com substituição parcial do sódio pelo cálcio, e caracterizar morfologicamente 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 ciclotrifosfatos 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_P ROJETO_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

Aldiéri A. Pesqueira

Assinado por:
Aldiéri Alves Pesqueira
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

UF: SP

Município: ARACATUBA

CEP: 16.015-050

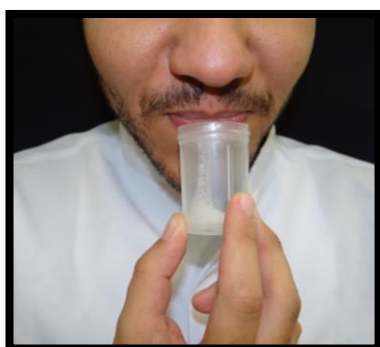
Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

ANEXO D – Coleta de saliva humana

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



Voluntário doando saliva



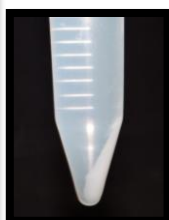
Transferência da saliva doada para tubos do tipo Falcon



Centrifugação da saliva em 2.000 $\times g$ por 10 minutos



Separação do líquido sobrenadante e pellet

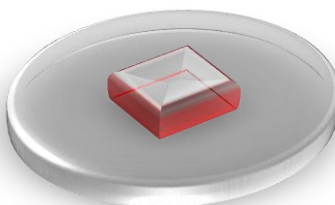


Líquido sobrenadante armazenado em frascos de 50 mL e mantido em freezer a -72°C

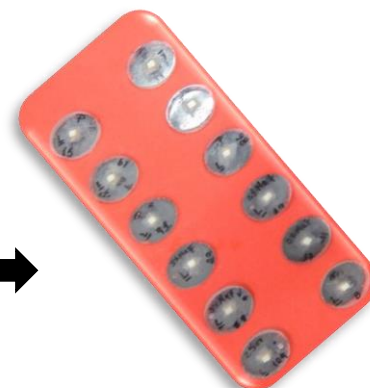
ANEXO E – Tratamento com as soluções e análise do efeito protetor em lesões erosivas iniciais



Proteção do bloco de esmalte bovino com esmalte cosmético



Fixação dos blocos em bases de resina acrílica



Bases fixadas em dispositivo para realização do tratamento e desafios



Descongelamento da saliva humana em banho maria a 37°C



Imersão (4 mL/bloco) em saliva humana durante 1 hora sob agitação



Lavagem com água deionizada por 30 segundos



Tratamento com as soluções experimentais por 2 minutos



Lavagem com água deionizada por 30 segundos



4 desafios erosivos com duração de 1 minuto cada



Lavagem com água
deionizada por 30 segundos a
cada desafio