



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

GABRIEL PEREIRA NUNES

**ANÁLISE *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE SOLUÇÕES
CONTENDO FLUORETO E/OU TRIMETAFOSFATO NA
REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA E NA INIBIÇÃO DA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ
DENTINÁRIA**

ARAÇATUBA - SP

2021

GABRIEL PEREIRA NUNES

**ANÁLISE *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE SOLUÇÕES
CONTENDO FLUORETO E/OU TRIMETAFOSFATO NA
REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA E NA INIBIÇÃO DA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ
DENTINÁRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica – Biomateriais.

Orientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

ARAÇATUBA - SP

2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Nunes, Gabriel Pereira.

N972a Análise in vitro da capacidade de soluções contendo fluoreto e/ou trimetafosfato na remineralização da dentina e na inibição da atividade de metaloproteinases da matriz dentinária / Gabriel Pereira Nunes. - Araçatuba, 2021
71 f.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientadora: Profa. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessan

1. Dentina 2. Fosfatos 3. Fluoretos 4. Remineralização dentária 5. Metaloproteinases da Matriz 6. Enzimas

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

GABRIEL PEREIRA NUNES

Nascimento	14/07/1994 Guanambi-BA
Filiação	José Bemvindo Nunes Vanderlene Pereira Nunes
2013/2017	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
2017/2018	Curso de Graduação Sanduíche em Odontologia pela Universidad de Santiago de Compostela – USC/Espanha
2014/2017	Desenvolvimento de Projetos de Iniciação Científica, com bolsas FAPESP.
2018/Atual	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – Biomateriais nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP
Associações	CROSP- Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO- Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

Dedicatória

Dedicatória

Dedico a minha família por sempre ter acreditado em mim e ter depositado toda confiança e apoio para que eu chegasse até aqui. Especialmente a minha mãe Vanderlene e o meu pai José (*in memoriam*) por serem minha inspiração para conquistar meus objetivos e superar os obstáculos que encontrei nesta jornada. A minha avó Maria, pelas orações e a incondicional demonstração de amor por mim. Também dedico a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

Agradecimentos especiais

A Deus

Por sempre ter guiado os meus passos e abençoado os caminhos que trilhei. Por nunca ter deixado de ser meu fiel amigo e verdadeiro. A Ele minha gratidão pela minha existência e pelas dádivas que concedeu a mim, mesmo não sendo merecedor. Graças a Ele também por ter sido minha fortaleza, quando minhas fraquezas se pronunciavam. Por sempre ter mostrado sua presença quando me sentia sozinho, inseguro e desamparado. Por ter me dado ânimo para enfrentar as adversidades quando minhas forças não eram suficientes para seguir esta caminhada.

Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja vacas: todavia, eu me alegrarei no Senhor, exultarei no Deus da minha salvação. (Habacuque 3:17-18)

Aos meus pais

Vocês foram e são minha base e parâmetro de vida. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ser filho de vocês. Minha mãe Vanderlene, peço sempre a Deus que te abençoe pela mulher guerreira e batalhadora que tu és; eu e meus irmãos somos extremamente honrados pela mulher de fibra que és e por Deus ter a escolhida para ser nossa mãe. Agradeço por tudo que ofereceu a mim, desde laços sentimentais como a preocupação em me fazer feliz. Por ter me dado coisas que, às vezes, nem merecia e, por ter sacrificado suas vontades para construir a minha felicidade. A meu pai José (*in memoriam*), hoje fisicamente não está ao meu lado, mas sua presença estará sempre habitando o meu coração. Obrigado por ter sido o meu exemplo, por ter me ensinado os princípios e morais que me tornaram a ser uma pessoa digna e melhor. Deus te abençoe por ter me proporcionado (mesmo que somente por catorze anos) amor, companheirismo, amizade e lições que marcaram a minha vida. Não pude me despedir de ti, mas creio que estás sempre velando por mim e acompanhando meus passos. Metade de mim é saudade e a outra também.

A glória dos filhos são seus pais. (Provérbios 17:06)

Aos meus irmãos: Leonardo, Thaís e Larissa

Por sempre estarem ao meu lado, me dando forças para nunca desistir dos meus sonhos. Meu amor por vocês nunca acabará e serão meus amigos por toda a vida. Eu amo vocês.

Ao meu orientador prof. Alberto Delbem

Obrigado por tudo que fez por mim. Tenho uma satisfação e gratidão gigante em ter sido teu orientado. No início, eu tinha um pouco de vergonha, receio, insegurança em conversar com o professor, talvez pelo medo em falar algo que parecesse besteira rs. Mas com o tempo eu fui admirando mais ainda sua sabedoria e, principalmente, a maneira como trata as pessoas e como conduz as coisas. Obrigado por toda paciência, atitudes humanas e por me ouvir sempre que precisei. O senhor é um exemplo pra mim. Agradeço imensamente por todas oportunidades concedidas e, por apoiar meus objetivos, mesmo quando eles não pareciam ser possíveis e viáveis. Obrigado pela confiança e, principalmente, por eu poder chamá-lo de amigo, porque assim o considero. Minha eterna gratidão por tudo!!!

“Bons pais corrigem erros, pais brilhantes ensinam a pensar.”

Augusto Cury

A profa. Marcelle Danelon

Obrigado por ser a pessoa que você é. Sempre me inspirarei em seu comportamento pessoal e profissional. Você é a primeira pessoa que recorro em quaisquer dúvidas, receios, dificuldades ou inseguranças quanto a vida científica. Eu confio inteiramente em você. Tenho um grande orgulho em ter sua amizade e saber que você sempre estará de coração e braços abertos para me ajudar. Tudo isso é recíproco. Eu te admiro muito, e tenho muito orgulho por ser, ou ter sido, seu orientado. Torço para a professora, como torço para uma amiga muito especial. Não tenho palavras pra te agradecer por tudo que você faz por mim e por tudo que sua existência representa em minha formação. Com sua ternura, mansidão, generosidade você me ensina a ser uma pessoa melhor.

Muitas vezes você nem percebe...

Mas a sua luz ilumina o caminho de muita gente!

A Sara Felipe

Você é a irmã que a vida me presenteou. Minha amizade mais presente de todos os tempos. Sinto uma extrema dificuldade em escrever sobre você, porque tudo que eu disser não suprirá realmente o meu sentimento de gratidão a Deus por ter colocado você em meu caminho. Confiamos inteiramente um no outro, compartilhamos todas as vivências: multiplicamos nossas alegrias e dividimos nossas tristezas. Com você a vida é mais leve, mais animada e melhor pra ser vivida. Você tem um coração gigante, uma alma muito humana e é uma das melhores pessoas que conheci em toda minha vida. Minhas melhores lembranças da graduação e do mestrado são com você. E quando você partiu de Araçatuba, as coisas nunca foram iguais. Você é a amizade que eu quero pra vida toda. Nunca esquecerei tudo que você e sua mãe já fizeram por mim. Tudo que faço e farei por você é uma forma singela de reconhecer as pessoas maravilhosas e importantes que vocês são. Eu amo toda sua família e, obrigado por ter feito minha estadia no estado de São Paulo melhor.

Amigo a gente não procura, o coração que encontra.

A Beatriz Pirovani

Obrigado por toda amizade. Você é uma das pessoas que posso contar sempre e sei que sempre estará disposta a me ajudar. Você tem um coração generoso e possui qualidades raras. Aprendi com você ser cada vez mais sincero, verdadeiro, empático e sobretudo: leal. Você é corajosa, determinada, otimista e sempre tem uma palavra amiga em momentos de angústia. Compartilhar a vida com você é um privilégio e prazer. Saiba que sempre estarão estendidas para você, e independente de onde estejamos sempre te ajudarei, e sei que isso é recíproco. Obrigado por ter me acolhido tão bem, também posso dizer que você faz parte da minha família.

A Aniele Lacerda

Nunca que eu te esqueceria. Mesmo após a faculdade, quando geralmente muitos se afastam, você esteve ao meu lado, preocupada comigo e torcendo sempre por mim. Você é verdadeira, incrível, do bem e que emana luz para todos ao seu redor. Nossa amizade é muito fácil, porque temos o mesmo histórico de vida, pensamos as mesmas coisas, defendemos e lutamos pelas mesmas causas. Você é um orgulho pra mim. Amo você e o Bruno!

A Amanda Scarpin

A melhor IC que nosso laboratório já teve. Você é responsável, eficiente, inteligente e não mede esforços para ir em busca de seus objetivos. Muitas vezes você minha inspiração para fazer os experimentos do dia a dia. Eu tenho muita confiança e orgulho de ti. É muito bom trabalhar contigo, porque eu sei que farás tudo da melhor maneira possível e não me deixas nunca em preocupação. Faz tudo com maestria e pra você nunca há tempo ruim (a versão discípula da Sara rs). Suas qualidades são inúmeras e te torna uma pessoa especial. Seus pais estão de parabéns pela filha maravilhosa que você é.

Ao Nilson Nunes

Obrigado por toda a amizade desde a graduação. Você é uma pessoa diferenciada. Seus pais estão de parabéns pela forma que te educaram. Desconheço alguém tão educado e respeitador. Seu modo de agir, paciência e a maneira que se comporta frente as circunstâncias que a vida nos põe, me inspira e me faz querer sempre ser uma pessoa melhor. Além disso, você é companheiro, é leal. É uma honra trabalhar contigo e maior ainda ser teu amigo!

A Maria Juliana

Você é uma das melhores pessoas que eu convivi e “reforcei” a amizade durante o mestrado. Verdadeira, confiável, honesta, ética e com uma grande empatia pelas pessoas. Por ser séria, muitas pessoas não conhecem e não sabem do ser humano incrível que você é. Obrigado por ter compartilhado comigo nesses 2 anos: as alegrias, decepções, preocupações e nossos momentos de “glória” rs. r. Você sabe de todos os meus anseios, de todas as minhas angústias, de todas as minhas vitórias, assim como eu sei de todas as suas batalhas e todas suas conquistas. Conte comigo pra tudo e pra sempre!

A Letícia Capalbo

Antes de tudo... Você foi a pessoa selecionada pra dividir todas as histórias e momentos deste trabalho rs. Foram meses preocupantes e desgastantes, mas ao mesmo tempo tudo não era tão pesado porque a gente tornava esses momentos engraçados e os aproveitava para sorrir e, não para chorar rs. Já te conhecia desde a graduação, mas no

mestrado conheci melhor a pessoa humana e do bem que você é. Respeitosa, educada e dona de um caráter íntegro, que facilmente a diferencia nesse mundo da pós-graduação. Você é um exemplo pra mim. Com certeza, Deus vai entregar as melhores coisas em sua vida, porque você batalha por elas e você é merecedora. Conte sempre comigo pra tudo.

Ao Leonardo Moraes

Obrigado por ser um amigo companheiro e presente em todos os momentos. Passamos por todos processos do mestrado juntos, ora dificuldades ora vitórias, você esteve comigo em todos eles. Obrigado por toda paciência e por ter sido tão importante em minha vida. Educado, resiliente e com grande empatia. Você é uma das pessoas mais fáceis de conviver que já conheci em toda minha vida. Possui um coração generoso e uma integridade exemplar. Foi meu companheiro de todos os dias na PG, e das horas também, quando saíamos às 23h45 do laboratório (detalhe: quase todos os dias kkk). Eu tenho certeza que você é um orgulho para sua família. Muito obrigado por tudo!!!

Ao Diego Mardegan

Conheci mais de perto já no meio do mestrado, mas não diminui em nada a grande importância que significa também para mim. Obrigado por toda convivência e por ter sido fundamental durante a pandemia, você foi meu psicólogo durante esse longo período rs. Temos um histórico de vida parecido. Pensamos muitas coisas semelhantes e acreditamos em muitos ideais. Você merece conquistar tudo que almeja e torcerei para que isso aconteça logo. Conte sempre comigo!!!

A Liliana Baez

Gratidão por sua amizade. Seu retorno ao Brasil fez com que a pós-graduação se tornasse mais animada, feliz e melhor. Você é a estrangeira mais brasileira que conheço. Obrigado por tantos momentos bons compartilhados, conversas, viagens, encontros e as inúmeras vezes que nos acompanhavam para os melhores cafés. Você é muito especial, marcou o mestrado e estará sempre em minha mente e coração. Torço muito por você. Seja muito feliz, porque você merece.

A Luciana, Karina e Marina

Minhas grandes amizades da FOAr/UNESP. Tive a oportunidade de trabalhar com vocês e fazer amizade com três pessoas muito especiais. Luciana, antiga conhecida da FOA, uma pessoa esforçada, educada e que só agrega o bem para quem a conhece. Karina, engraçada, coração do bem, alma pura. Possui um grande valor: empatia pelo próximo. Marina, a melhor nordestina cientista que conheço. Amigável e que recebe todos com seu bom coração.

Primeira vez que as vi, já parecia que éramos amigos de longa data. Possuem as virtudes grandiosas de um ser humano: Caridade e Humildade, eu as admiro!!!

A Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti

Obrigado por ser tão gentil, receptiva e querida por todos. Você me ensinou tudo que sei sobre buscas científicas, bases de dados e estratégias de buscas. Conseguiu transmitir com maestria todo vasto conhecimento que você possui, independentemente da via remota ou presencial. Para mim, você é a funcionária exemplar da FOA, e tornou uma grande amiga que sempre lembrarei e terei orgulho e honra em dizer: “Muitas coisas aprendi com a Aninha”. Obrigado por toda paciência, dedicação e amor que você exerce em seu trabalho. Você é uma inspiração pra mim. Que Deus a abençoe sempre, você e sua família.

Aos meus amigos Saulo e Thiago

Os grandes e melhores amigos CCB – Araçatuba. Vocês foram presentes de Deus em minha vida. Obrigado por cada preocupação, e por toda importância que dão a nossa amizade. Saulo, sinônimo de paciência, mansidão, resiliência, empatia e humildade. Você é um exemplo pra mim. Thiago, uma referência em verdade, lealdade, companheirismo, solidariedade e hombridade. Cada um com sua personalidade, comportamentos e pensamentos. De onde eu tinha os melhores conselhos e podia compartilhar tudo que sentia e pensava. Vocês são os melhores amigos que eu poderia ter. Araçatuba, jamais, seria a mesma sem vocês. Que Deus os abençoe muito e, contem sempre comigo!!!

Ao professor Juliano Pessan,

Obrigado pela coorientação deste trabalho e, claro, por todo aprendizado e contribuição para minha formação no mestrado. Suas aulas foram importantíssimas para todo processo de evolução durante a PG. O professor é extremamente dedicado e desempenha seu papel com maestria, é um exemplo. Obrigado por está sempre disponível e acessível quando precisei. Muito obrigado!!!

A professora Cristiane Duque,

Sinto uma grande admiração pessoal e profissional pela professora. Você é uma pessoa maravilhosa. É muito bom conversar contigo, seu papo sempre é agradável, seja relacionado a PG ou a quaisquer outros assuntos. Você também me inspira, por ser tão dedicada, aplicada, por “viver” para a ciência e por conseguir fazer de tudo ao mesmo tempo, inclusive fazer aulas de violino comigo. Precisamos retomar Rsrs. Muito obrigado por torcer por mim e por todo carinho. Conte sempre com minha amizade, pois eu a considero especial!!!

Aos amigos de turma: Malena, Ronaldo, Leonardo Raniel, Heitor, Pedro, Sandy, Erika.

Eu os agradeço por estarmos sempre por perto. Nem sempre fisicamente, mas o mais importante é que sempre torcendo pelo outro. Que a gente possa conquistar muitas coisas e se alegrar por elas. Contem sempre com minha amizade.

Aos amigos do laboratório e pós graduação: Francienne, José Antônio, Rafaela, Thayse, Isa Catanoze, Amanda Andolfatto, Caio, Nayara, Ana Paula, Karina, Marcela, Vanessa, Viviane, Tamires, Pedro.

Obrigado por todos os momentos vividos e compartilhados. Tenho inúmeras histórias para recordar e ser feliz por elas, graças a vocês. Cada um com suas particularidades, todavia importantíssimos em tudo que vivi na PG. Obrigado por toda amizade.

Agradecimentos

Agradecimentos

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”*, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao programa de **Pós-Graduação em Ciência Odontológica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador **Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada e Cristiane Regina Lui Matos**, pela eficiência e profissionalismo.

Aos funcionários do prédio da Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Luizinho, Mário e Ricardo**, pela ajuda, atenção e suporte prestados a mim.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo #2018/19505-9 e a **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Ao **Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia** (MUBIO, FOA-UNESP e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, FINEP/CT-INFRA – Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011) por permitir o uso do sistema de microtomografia computadorizada de alta resolução (modelo 1272 SkyScan, Brucker).

Ao **Frigorífico Friboi- Andradina**, que disponibilizaram os dentes bovinos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho,

Minha gratidão!

Epígrafe

Epígrafe

“Desistir...

*eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a
sério;*

*É que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas
minhas pernas,*

*mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus
ombros,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”*

Cora Coralina

Resumo

Resumo

Nunes, GP. **Análise *in vitro* da capacidade de soluções contendo fluoreto e/ou trimetafosfato na remineralização da dentina e na inibição da atividade de metaloproteinases da matriz dentinária.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar o potencial anti-proteolítico contra MMP-2 e MMP-9 e a capacidade de induzir a remineralização da dentina, através de soluções contendo diferentes concentrações de TMP (na sua forma cíclica), diferentes concentrações de F e associação TMP/F. **Métodos:** Blocos de dentina radicular (6mmx4mmx2mm, n = 130) foram selecionados e divididos aleatoriamente em 13 grupos/soluções experimentais (n = 10): 1) Placebo (sem F/TMP); 2) 0,3% TMP hidrolisado; 3) 1% TMP hidrolisado; 4) 3% TMP hidrolisado; 5) 0,3% TMP; 6) 1% TMP; 7) 3% TMP; 8) 250 ppm F; 9) 500 ppm F; 10) 1100 ppm F; 11) 250 ppm F associado a 0,3% TMP; 12) 500 ppm F associado a 1% TMP e 13) 1100 ppm F associado a 3% TMP. A avaliação do potencial anti-proteolítico das soluções experimentais contra as metaloproteinases da matriz dentinária (-2 e -9) foi realizado por meio da análise zimográfica. Para as análises mecânicas, três áreas foram determinadas para cada espécime: 1- controle (sem tratamento); 2- desmineralizado (cárie artificial); 3- tratado (desmineralizado e submetido a ciclagem de pH por 7 dias, e tratado por 1 min com as soluções experimentais). Os espécimes de dentina foram analisados quanto à porcentagem de recuperação de dureza superficial (%SHR), em dureza transversal (%CSHR) e por microtomografia computadorizada (Δ IMC). Para os dados de dureza e Micro-CT, os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). **Resultados:** A análise zimográfica mostrou que 1100 ppm F + 3% de TMP promoveu inibição completa da atividade gelatinolítica (MMP-2; MMP-9). Os grupos com TMP não hidrolisados apresentaram efeito remineralizador (%SHR e %CSHR) superior aos grupos hidrolisados. O grupo 1100F + TMP promoveu a maior %SHR e %CSHR entre todos os grupos ($p < 0,001$), sendo respectivamente 15,4 e 10,5%, superior ao grupo 1100F. Os grupos contendo 1100F e 1100F + 3%TMP apresentaram maior concentração mineral. **Conclusão:** Com base nos resultados, 3% TMP atua como um agente antiproteolítico contra metaloproteinases da matriz dentinária. Além disso, quando suplementado com 1100F, 3% TMP potencializa a remineralização, aumentando

Resumo

significativamente as propriedades mecânicas da dentina tratada. Os tratamentos com TMP não hidrolisado e associado ao F maior que as soluções fluoretadas sem o TMP. Significância clínica: Dessa forma, uma potencial estratégia preventiva e terapêutica pode ser considerada na clínica odontológica, principalmente na terapia da cárie radicular, como também para método preventivo de lesões iniciais de cárie dentinária ou no pré-tratamento da dentina, utilizando-os como agentes cross-linker em procedimentos restauradores.

Palavras-chave: Dentina. Flúor. Fosfato. Metaloproteinases da Matriz. Remineralização Dentária.

Abstract

Abstract

Nunes, GP. ***In vitro* analysis of the capacity of solutions containing fluoride and/or trimetaphosphate in the remineralization of dentin and in the inhibition of the activity of dentin matrix metalloproteinases.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

Objective: The aim of this study was to investigate the anti-proteolytic potential against MMP-2 and MMP-9 and the ability to induce dentin remineralization, through solutions containing different concentrations of TMP (in its cyclic form), different concentrations of F and TMP / F association. **Methods:** Root dentin blocks (6mmx4mmx2mm, n = 130) were selected and randomly divided into 13 groups / experimental solutions (n = 10): 1) Placebo (without F / TMP); 2) 0.3% hydrolyzed TMP; 3) 1% hydrolyzed TMP; 4) 3% hydrolyzed TMP; 5) 0.3% TMP; 6) 1% TMP; 7) 3% TMP; 8) 250 ppm F; 9,500 ppm F; 10) 1100 ppm F; 11) 250 ppm F associated with 0.3% TMP; 12) 500 ppm F associated with 1% TMP and 13) 1100 ppm F associated with 3% TMP. The evaluation of the anti-proteolytic potential of experimental solutions against dentin matrix metalloproteinases (- 2 and -9) was carried out by means of zymographic analysis. For mechanical analysis, three areas were determined for each specimen: 1- control (without treatment); 2- demineralized (artificial caries); 3- treated (demineralized and subjected to pH cycling for 7 days, and treated for 1 min with the experimental solutions). The dentin specimens were analyzed for the percentage of recovery of superficial hardness (% SHR), in cross-sectional hardness (% CSHR) and by computed microtomography (Δ IMC). For the hardness and Micro-CT data, the results were analyzed by repeated measures ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). **Results:** The zymographic analysis showed that 1100 ppm F + 3% TMP promoted complete inhibition of gelatinolytic activity (MMP-2; MMP-9). The groups with non-hydrolyzed TMP showed a remineralizing effect (% SHR and % CSHR) superior to the hydrolyzed groups. The 1100F + TMP group promoted the highest % SHR and % CSHR among all groups ($p < 0.001$), being 15.4 and 10.5%, respectively, higher than the 1100F group. The groups containing 1100F and 1100F + 3% TMP showed higher mineral concentration. **Conclusion:** Based on the results, 3% TMP acts as an antiproteolytic agent against dentinal matrix metalloproteinases. In addition, when supplemented with 1100F, 3%

Abstract

TMP enhances remineralization, significantly increasing the mechanical properties of the treated dentin. Treatments with non-hydrolyzed TMP and associated with F greater than fluoridated solutions without TMP. Clinical significance: Thus, a potential preventive and therapeutic strategy can be considered in the dental clinic, mainly in the treatment of root caries, as well as for the preventive method of initial lesions of dental caries or in the pretreatment of dentin, using them as agents cross-linker in restorative procedures.

Keywords: Dentin. Fluoride. Phosphate. Matrix metalloproteinases. Tooth Remineralization.

Lista de abreviaturas e símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
Ca⁺²	<i>Cálcio</i>
CaCl₂	<i>Cloreto de cálcio</i>
CaF₂	<i>Fluoreto de cálcio</i>
Ca(OH)₂	<i>Hidróxido de cálcio</i>
Ca(NO₃)₂	<i>Nitrato de cálcio</i>
°C	Graus Celsius
F	<i>Fluoreto</i>
g	Grama
H₂O	<i>Água</i>
KCL	<i>Cloreto de potássio</i>
KHN	Knoop Hardness Number/ <i>Número de Dureza Knoop</i>
KH₂PO₄	<i>Fosfato Monopotássico</i>
L	Litro
Log₁₀	Logaritmo na base 10
mL	Mililitro
M	Molar
Micro CT	Microtomografia Computadorizada
Mm	Mili Molar
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mmol	Milimol
MMPs	<i>Metaloproteinases da matriz</i>
MMP-2	<i>Metaloproteinase da matriz 2</i>
MMP-9	<i>Metaloproteinase da matriz 9</i>
MWM	<i>Marcador de Peso Molecular</i>
NaF	<i>Fluoreto de sódio</i>
NaH₂-PO₄	<i>Fosfato Monossódico</i>
NaN₃	<i>Azida sódica</i>
µm	Micrometro

μM	Micro molar
p	Probabilidade
pH	<i>Potencial Hidrogeniônico</i>
PO₄⁻³	<i>Fosfato</i>
Ppm	Parte por milhão
SD	Standard Deviation
SH	Surface hardness
S	<i>segundos</i>
TISAB	Total Ionic Strenght Adjustment Buffer/ <i>Tampão de Ajuste da Força Iônica Total</i>
TMP	<i>Trimetafosfato de sódio</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
ΔKHN	Integrated subsurface hardness/ <i>Dureza integrada de subsuperfície</i>
ΔCMI	Concentração Mineral Integrada
%CSHL	Perda de Dureza em Secção Longitudinal
%CSHR	Recuperação de Dureza em Secção Longitudinal

Lista de Figuras

FIGURAS

Figura 1: Blocos de dentina protegido com verniz ácido-resistente [30].

Figura 2: Imagem representativa do gel de ensaio de zimografia mostrando o efeito da presença das soluções experimentais contra a atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9. Em todos os géis: MWM - marcador de peso molecular (kDa), MMP-2 e MMP-9 recombinante humana.

Figura 3: Atividade de MMP-2 recombinante (%) de acordo com as soluções experimentais utilizadas.

Figura 4: Atividade de MMP-9 recombinante (%) de acordo com as soluções experimentais utilizadas.

Figura 5: Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral (gHAp $\times$ cm⁻³) em função da profundidade (μ m) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: Placebo, 250 ppm F, 500 ppm F e 1100 ppm F.

Figura 6: Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral (gHAp $\times$ cm⁻³) em função da profundidade (μ m) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: 250 ppm F + 0.3% TMP, 500 ppm F + 1% TMP e 1100 ppm F + 3% TMP.

Figura 7: Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral (gHAp $\times$ cm⁻³) em função da profundidade (μ m) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: 0,3% 1% e 3%.

Lista de Tabelas

TABELAS

Tabela 1: Valores de fluoreto (F), fósforo total (P) e pH (média $\pm$ dp) das soluções experimentais

Tabela 2: Porcentagem média (dp) de perda da dureza de superfície (%SHL) e em secção longitudinal (%CSHL), após indução da cárie artificial, e recuperação da dureza de superfície (%SHR) e em secção longitudinal (%CSHR), após tratamento e ciclagem de pH, de acordo com os grupos experimentais (n=10)

Tabela 3: Valores médios (DP) da Δ CMI ($\text{g}_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) e da profundidade da lesão (μm) após indução da cárie artificial em dentina e pós-tratamento de acordo com os grupos experimentais (n=10)

Sumário

SUMÁRIO

1.RESUMO.....	34
2. INTRODUÇÃO	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO	44
6. REFERÊNCIAS.....	50
 7. APÊNDICES	
7.1 APÊNDICE A	63
7.2 APÊNDICE B	64
7.3 APÊNDICE C	65
7.4 APÊNDICE D	66
7.5 APÊNDICE E	67
7.6 APÊNDICE F	68
7.7 APÊNDICE G	69
7.8 APÊNDICE H	70
7.9 APÊNDICE I	71

**ANÁLISE IN VITRO DA CAPACIDADE DE SOLUÇÕES CONTENDO FLUORETO E/OU
TRIMETAFOSFATO NA REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA E NA INIBIÇÃO DA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ DENTINÁRIA**

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar o potencial anti-proteolítico contra MMP-2 e MMP-9 e a capacidade de induzir a remineralização da dentina, através de soluções contendo diferentes concentrações de TMP (na sua forma cíclica), diferentes concentrações de F e associação TMP/F. **Métodos:** Blocos de dentina radicular (6mmx4mmx2mm, n = 130) foram selecionados e divididos aleatoriamente em 13 grupos/soluções experimentais (n = 10): 1) Placebo (sem F/TMP); 2) 0,3% TMP hidrolisado; 3) 1% TMP hidrolisado; 4) 3% TMP hidrolisado; 5) 0,3% TMP; 6) 1% TMP; 7) 3% TMP; 8) 250 ppm F; 9) 500 ppm F; 10) 1100 ppm F; 11) 250 ppm F associado a 0,3% TMP; 12) 500 ppm F associado a 1% TMP e 13) 1100 ppm F associado a 3% TMP. A avaliação do potencial anti-proteolítico das soluções experimentais contra as metaloproteinases da matriz dentinária (-2 e -9) foi realizado por meio da análise zimográfica. Para as análises mecânicas, três áreas foram determinadas para cada espécime: 1- controle (sem tratamento); 2- desmineralizado (cárie artificial); 3- tratado (desmineralizado e submetido a ciclagem de pH por 7 dias, e tratado por 1 min com as soluções experimentais). Os espécimes de dentina foram analisados quanto à porcentagem de recuperação de dureza superficial (%SHR), em dureza transversal (%CSHR) e por microtomografia computadorizada (Δ IMC). Para os dados de dureza e Micro-CT, os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). **Resultados:** A análise zimográfica mostrou que 1100 ppm F + 3% de TMP promoveu inibição completa da atividade gelatinolítica (MMP-2; MMP-9). Os grupos com TMP não hidrolisados apresentaram efeito remineralizador (% SHR e % CSHR) superior aos grupos hidrolisados. O grupo 1100F + TMP promoveu a maior %SHR e %CSHR entre todos os grupos ($p < 0,001$), sendo respectivamente 15,4 e 10,5%, superior ao grupo 1100F. Os grupos contendo 1100F e 1100F + 3%TMP apresentaram maior concentração mineral. **Conclusão:** Com base nos resultados, 3% TMP atua como um agente antiproteolítico contra metaloproteinases da matriz dentinária. Além disso, quando suplementado com 1100F, 3% TMP potencializa a remineralização, aumentando

significativamente as propriedades mecânicas da dentina tratada. Os tratamentos com TMP não hidrolisado e associado ao F maior que as soluções fluoretadas sem o TMP. Significância clínica: Dessa forma, uma potencial estratégia preventiva e terapêutica pode ser considerada na clínica odontológica, principalmente na terapia da cárie radicular, como também para método preventivo de lesões iniciais de cárie dentinária ou no pré-tratamento da dentina, utilizando-os como agentes cross-linker em procedimentos restauradores.

Palavras-chave: Dentina. Flúor. Fosfato. Metaloproteinases da Matriz. Remineralização Dentária.

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença conceituada como biofilme-açúcar-dependente [1,2], resulta da colonização da superfície do esmalte por microrganismos, especialmente os *Streptococcus mutans* que, metabolizando carboidratos fermentáveis, produzem ácidos, os quais desmineralizam a superfície dentária [3]. Assim muitos estudos têm avaliado o uso de técnicas e produtos que induzam a remineralização da estrutura dentária afetada.

No tratamento das lesões de cárie, o uso do fluoreto (F) é uma estratégia bem estabelecida para evitar e inibir a desmineralização, assim como favorecer o processo de remineralização, com respostas efetivas no esmalte dentário [4,5]. No entanto, em tecido dentinário, este processo se torna mais complexo devido à heterogeneidade e dinâmica da dentina onde os componentes orgânicos exercem grande influência mecânica e biológica. Além do colágeno do tipo I, fosfoproteínas e proteoglicanas (proteínas não colagênicas) [6,7] representam os principais constituintes orgânicos. Além disso, no processo carioso dentinário há a atividade das metaloproteinases (MMPs), que são capazes de degradar quase todos os componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno [8,9]. Devido a isso, é constante a busca por alternativas promissoras relacionadas a fluoroterapia, destacando-se a incorporação de outros agentes aos produtos fluoretados de modo que vise a potencialização de seu efeito remineralizador sobre os substratos dentários, bem como a inibição da atividade proteolítica da matriz orgânica, controlando a progressão da cárie dentária [10,11]. Dentre esses agentes, o trimetafosfato de sódio (TMP) é um polifosfato cíclico inorgânico que tem sido amplamente testado em diversos veículos fluoretados [12-14].

Estudos recentes têm demonstrado que o TMP pode atuar ajudando na remineralização em esmalte desmineralizado [13,15]. Essa ação torna-se ainda maior, quando o fosfato se encontra em uma proporção molar adequando em relação ao F (F/TMP), aumentando assim o efeito na remineralização, pois ambos irão agir de forma sinérgica [16,17]. Sua ação no esmalte está baseada na hipótese de que este produto forma uma barreira protetora na superfície impedindo a difusão de ácidos [15,18], além de contribuir na permeabilidade seletiva, facilitando a difusão de cálcio (Ca) e F [15,18].

A adição do TMP não hidrolisado em dentifrícios convencionais (1100 ppm F) ou com reduzida concentração de F (250 e 500 ppm F) mostraram efeitos anticárie superiores ou equivalentes aos dentifrícios 1100 ppm F, respectivamente [12,16,19-21]. Efeito protetor superior contra a erosão do esmalte também foi observado quando o TMP foi associado ao F [17,22]. Tanto ação anticárie quanto a anti-erosiva foram fortemente dependente da proporção molar TMP:F na formulação. Na dentina, estudos têm mostrado que a adição do TMP em dentifrícios fluoretados (1100 ppm F) contendo TMP não-hidrolisado, permitiu a precipitação de fosfato de cálcio sobre o colágeno da dentina, resultando na obliteração dos túbulos dentinários [23]. Este efeito é devido à capacidade do TMP em adsorver aos tecidos dentinários e aumentar os sítios doadores de elétrons que, conseqüentemente, induzem a precipitação de fosfatos de cálcio [24].

Diante do exposto, novas terapias para prevenir e reduzir a progressão da cárie em dentina devem ser exploradas a fim de evitar a degradação da matriz orgânica e promover sua remineralização, desenvolvendo condutas clínicas terapêuticas reparadoras. Considerando a abordagem biomimética, o uso de TMP associado ao F pode ser uma nova estratégia para estabilizar e fortalecer a matriz dentinária, de modo que possa induzir remineralização, diminuir as taxas de biodegradação e aumentar a nucleação mineral [23]. Portanto, o objetivo deste estudo *in vitro* foi investigar a capacidade de soluções contendo TMP e F, isoladamente ou em associação, em inibir a atividade proteolítica de metaloproteínases da matriz dentinária e em induzir a remineralização da dentina em um protocolo *in vitro*. A hipótese nula do estudo foi que o uso das soluções-teste (contendo F e TMP) não levaria a inibição de metaloproteínases da matriz dentinária e não levaria a taxas de remineralização diferentes quando comparadas as suas contrapartes (soluções somente com F).

2 Material e Métodos

2.1 Protocolo Experimental

O potencial antiproteolítico de soluções contendo fluoreto e/ou TMP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) contra MMPs foi avaliado por análise zimográfica usando MMP-2 e MMP-9 humana purificadas. Foram estudadas 13 soluções experimentais: placebo (sem F / TMP); 250 ppm F (250F); 500 ppm F (500F); 1100 ppm F (1100F); 0,3% TMP; 1% TMP; 3% TMP; 0,3% TMP hidrolisado (0,3% TMP

hl); 1% TMP hidrolisado hidrolisado (1% TMP hl); 3% TMP hidrolisado hidrolisado (3% TMP hl); 250F + 0,3% TMP (250F/TMP); 500F + 1% de TMP (500F/TMP); 1100F + 3% TMP (1100F/TMP), e a variável resposta foi o efeito antiproteolítico das soluções experimentais contra a atividade gelatinolítica da dentina. Posteriormente, essas soluções foram analisadas quanto seu potencial remineralizador em lesões de cárie dentinária de acordo com as alterações nas propriedades mecânicas.

2.2 *Preparo, dosagem e determinação de pH das soluções*

Foram preparadas e dosadas as seguintes soluções:

- Solução de água deionizada (Placebo);
- Soluções de TMP hidrolisado (TMP hl) ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, Sigma-Aldrich Co., USA) em hidróxido de sódio (NaOH) nas concentrações de 0,3%; 1,0% e 3%. O TMP foi hidrolisado em pH 12 por 5 h, seguido por neutralização a pH 7,4 com redução mínima em seu potencial de fosforilação [25];
- Soluções de TMP sem hidrólise ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, Sigma-Aldrich Co., USA) nas concentrações de 0,3%; 1,0% e 3%; concentrações baseadas em estudos prévios [12,16,19-22].
- Soluções de fluoreto de sódio (NaF, Merck, Alemanha) nas concentrações de 250, 500 e 1100 ppm F.
- Soluções contendo 250 ppm F e 0,3% de TMP não hidrolisado, 500 ppm F e 1,0% de TMP não hidrolisado, e 1100 ppm F e 3% de TMP não hidrolisado.

A concentração de F nas soluções foi determinada usando um eletrodo específico para o íon F (9609 BN; Orion Research Inc., Beverly, Mass., EUA), anexado a um analisador de íons (Orion 720 A plus; Orion Research Inc.) e calibrado com padrões contendo 0,125- 2,000 $\mu\text{g F/mL}$. Inicialmente 1,0 mL de cada produto foi diluído em água deionizada e transferido para um balão volumétrico. O volume foi ajustado para 100 mL usando água deionizada. Para cada solução, foram feitas três diluições. Posteriormente, duas amostras de 1 mL foram tamponadas com TISAB II [26].

A determinação do TMP foi realizada através da quantificação do fósforo (P) utilizando espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EON, Biotek, USA) e o

método colorimétrico do molibdato com comprimento de onda de 660 nm [27]. Para isto, foi determinado o P total (PT) utilizando alíquotas de 0,2 mL das diluições acrescidas de 0,2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol/L e aquecidas em banho fervente, a 100°C, por 1 hora [12,28]. Também foi determinado o P iônico (PI) utilizando 100 µL das amostras que subtraído do PT representará a quantidade de TMP (µg/g) nas soluções. Tanto as amostras quanto os padrões de P (1,5; 3; 6; 12 e 24 µg P/mL) foram acrescidos com 50 µL de molibdato e 20 µL de reativo redutor em placas de 96 poços [28].

O pH das soluções foi determinado utilizando um 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 and 7.0 [29]. Após homogeneização (agitador magnético, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil), 5 mL de cada solução (n = 3) foi colocada em becker plástico e o pH foi medido após 5 minutos após o valor estar estabilizado.

2.3 Análise Zimográfica

Para avaliar o efeito das soluções contendo TMP e/ou F (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) como potenciais inibidores de MMP, MMP-2 humana purificada (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e MMP-9 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) foram diluídos em tampão de amostra a uma proporção de 4: 1 e submetidos à eletroforese sob condições não reduzidas em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) contendo 1 mg/mL de gelatina de pele suína (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) [30]. Padrões SDS-PAGE pré-corados de baixo peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram usados como marcadores de peso molecular. Após a eletroforese, os géis foram lavados por 1 h em 2% Triton X-100 e foram incubados por 18 h a 37°C em solução de ativação (50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0,02% (w / v) NaN₃, pH 7,4) contendo ou não F (250ppm F, 500ppm F e 1100ppm F), TMP hidrolisado ou não hidrolisado (0,3%, 1% e 3%), e F/TMP não hidrolisado. Após a incubação, os géis foram corados em 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-25 por 30 min e descorados (30% de metanol, 10% de ácido acético diluído em DW). A atividade gelatinolítica pode ser detectada como bandas claras. Os géis foram escaneados (Imagescanner, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e as bandas avaliadas por densitometria (unidades arbitrárias) usando o software ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os experimentos

foram realizados em triplicata, e a inibição através das soluções experimentais foi expressa em porcentagem de acordo com a atividade de MMPs sem pré-tratamento com os agentes (controle negativo) [30].

2.4 Preparo dos espécimes de dentina

Blocos de dentina radicular (6 mm x 4 mm x 2 mm, n = 130) foram obtidos de incisivos bovinos e mantidos em solução de timol 0,1% por 30 dias. Após esse período, os blocos foram preparados, desmineralizados para formar lesões de cárie subsuperficiais e distribuídos aleatoriamente nos 13 grupos (n = 10 / grupo). Os blocos foram submetidos para ciclagem de pH e tratamento com as soluções acima descritas. Em seguida, foram determinados a porcentagem de recuperação de dureza de superfície, em seção longitudinal e concentração mineral da dentina.

2.5 Formação da lesão de cárie artificial

Os espécimes foram cobertos com duas camadas consecutivas de um verniz ácidosistente (esmalte de unha - Colorama Ltd., SP, Brazil), deixando apenas a superfície de dentina **polida livre** para contato com os tratamentos. Os espécimes foram divididos em 3 áreas, sendo elas: 1- área Hígida (área H) – 1/3 da superfície foi coberta com verniz ácido resistente não entrando em contato com a solução desmineralizante e com os tratamentos propostos; 2- área Cárie artificial (área CA) – após ser colocada em solução desmineralizante, esta foi coberta com verniz ácido resistente não entrando em contato com as soluções de tratamento e, 3- área Tratada (área T) – após ser desmineralizada, esta área foi submetida a uma das soluções de tratamento (Figura 1).

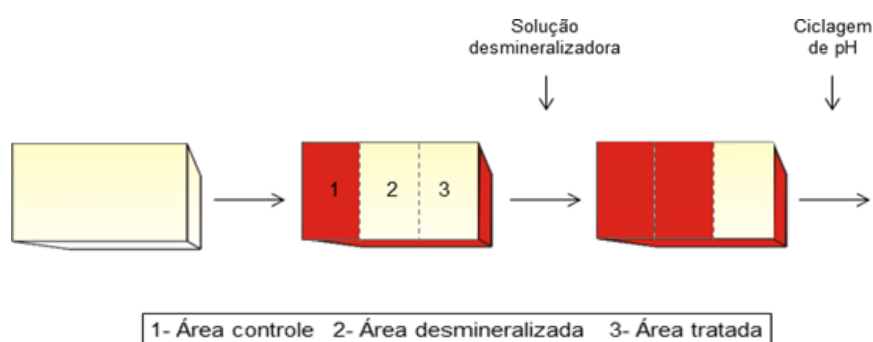


Figura 1- Blocos de dentina protegido com verniz ácido-resistente [30].

Para indução da lesão de cárie artificial em dentina, estes espécimes foram colocados em uma solução desmineralizadora (50 mmol/L de tampão acetato contendo 2,2 mmol/L CaCl_2 ; 2,2 mmol/L KH_2PO_4 ; 0,04 $\mu\text{g F/mL}$, pH 5,0) por 30 minutos, em seguida em solução remineralizadora (1.5 mmol/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$; 0.9 Mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 150 Mmol/l KCl em 0.02 mol/l tampão cacodilato de sódio; 0,04 $\mu\text{g F/mL}$, pH 7.0) [31] por 2 h, um total de três ciclos diários (na terceira imersão em solução RE, os blocos permaneciam por 18h30, até o outro dia de desafio) durante dois dias. Após isso, os espécimes foram imersos em solução desmineralizadora por mais cinco dias, totalizando sete dias o protocolo.

2.6 Tratamento e ciclagem de pH

Cento e trinta blocos de dentina foram divididos aleatoriamente em 13 grupos experimentais ($n = 10$ / grupo) de acordo com o tratamento proposto e submetidos a um regime de ciclagem de pH de 7 dias a 37 °C [30,31]. Os espécimes foram tratados por um minuto e, em seguida, imersos em solução desmineralizadora (1.5 mM CaCl_2 , 0.9 mM KH_2PO_4 , e 50 mM tampão láctico; pH 5,0) por 8 h. Em seguida, os blocos foram tratados novamente, seguido por imersão em solução remineralizante (5 mM CaCl_2 , 0.9 mM KH_2PO_4 , 130 mM KCl, 20 mM HEPES, and 5 mM NaN_3 ; pH 7.0) por 16 h dias [32,33]. Entre todas as etapas, as amostras de dentina foram lavadas com água deionizada.

2.7 Análise da dureza em superfície e em secção longitudinal da dentina

Após a ciclagem de pH de 7 dias, a dureza de superfície (SH) foi mensurada utilizando microdurômetro Micromet 5114 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), penetrador de diamante Knoop (KHN) sob carga de 10 g por 10 segundos [citar]. Foram realizadas cinco indentações espaçadas entre si 100 μm no centro de cada área de análise: Hígida (H), Cárie artificial (CA) e Tratada (T). A porcentagem da perda de SH, após indução da cáries artificial, foi calculada pela fórmula: $\%SHL = ((SH_{CA} - SH_H)/SH_H) \times 100$. Para o cálculo da porcentagem de recuperação da SH utilizou-se a formula: $\%SHR = ((SH_T - SH_{CA})/(SH_H - SH_{CA})) \times 100$.

Para determinação da dureza em secção longitudinal (CSH), os blocos de dentina foram seccionados longitudinalmente, e uma das partes seccionadas foi incluída em

resina acrílica com a face cortada na parte superior e polida serialmente. Quatorze indentações foram realizadas em cada área das amostras (H, CA e T) em diferentes profundidades (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm) sob carga de 3 g aplicada por 10 s. A área integrada (CSHI) abaixo da curva do perfil da dureza em secção longitudinal foi calculada utilizando a regra trapezoidal (GraphPad Prism®, versão 7.00) em cada área de análise. A perda da CSH após a indução da cárie artificial foi calculada pela formula: $\%CSHL = ((CSHI_{CA} - CSHI_H)/CSHI_H) \times 100$. Para o cálculo da porcentagem de recuperação da CSH utilizou-se a formula: $\%CSHR = ((CSHI_T - CSHI_{CA})/(CSHI_H - CSHI_{CA})) \times 100$ [30,34].

2.8 *Análise das concentrações minerais da dentina*

Blocos de dentina (6 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm), obtidos da parte central das fatias seccionadas de cada grupo foram analisados por microtomografia computadorizada (MicroCT) operada a 60 kV, 166 μA , filtro de alumínio de 0,25 mm, com 3 μm de resolução espacial, passo de rotação a 0,400° e movimento aleatório em 0. As projeções das imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (versão 1.6.10.2, Skyscan 1272, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) e suavização em 5, correção de artefato de anel em 12 e correção de endurecimento de feixe em 62% [23,35]. Após a reconstrução da imagem, fatias virtuais bidimensionais no plano coronal foram adquiridas usando o software Data Viewer (versão 1.5.1.2, Skyscan 1272, Bruker MicroCT). Fatias virtuais bidimensionais empilhadas foram importadas para o software Image J para produzir o perfil de concentração mineral (CM; $\text{g}_{\text{Hap}} \times \text{cm}^{-3}$; Figuras 1, 2 e 3) em função da profundidade (μm) baseado em curva de calibração (regressão linear, $R^2 > 0,9985$) calculada com padrões de referência mineral (0, 0,25 e 0,75 $\text{g}_{\text{Hap}} \times \text{cm}^{-3}$). Os perfis diferenciais de concentração mineral (Figuras 1, 2 e 3) em cada bloco de dentina foram calculados: (1) para determinar a perda mineral de subsuperfície, pela subtração da área desmineralizada (Cárie artificial) da área controle (Hígido); e (2) para determinação da recuperação mineral de subsuperfície, pela subtração da área tratada e ciclada (Tratada) pela área desmineralizada. A seguir, a área integrada dos perfis diferenciais foi calculada pela regra trapezoidal (GraphPad Prism®, versão 7.00) resultando na concentração mineral integrada (ΔCMI ; $\text{g}_{\text{HAP}} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) da Cárie artificial e Tratada [23,35]. A ΔCMI da área tratada foi calculada em duas zonas de profundidade: área mais externa

da lesão de subsuperfície (área A) e área mais profunda da lesão de subsuperfície (área B), definidas pela interceptação do perfil diferencial no eixo “x”. A profundidade das lesões na área Cárie artificial e Tratada foi calculada (μm) pela interceptação mais externa e interna do perfil diferencial no eixo “x”.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente considerando como fatores de variação as soluções experimentais e a área de análise (H, CA e T) e como variáveis os valores de porcentagem da dureza (%SHL, %SHR, %CSHL e %CSHR) e de concentração mineral integrada ($\Delta\text{CMI}_{\text{CA}}$, $\Delta\text{CMI}_{\text{TA}}$ e $\Delta\text{CMI}_{\text{TB}}$). Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogênea (teste de Cochran) e foram submetidos a ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, seguido do teste de comparação múltiplas de Student-Newman-Keuls. As análises foram realizadas usando o software SigmaPlot (versão 12.0) com nível de significância de 5%.

3. Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados da determinação de fluoreto (F), fósforo (P) e pH nos grupos experimentais manipulados previamente ao ensaio experimental. Os valores médios de F e P apresentaram-se dentro do esperado, exceto os valores de P para os grupos de TMP hidrolisado. O valor de pH nos grupos variou de 6,2 a 7,4.

Na análise da atividade enzimática do grupo placebo (sem F e TMP) observou-se as bandas de 72 e 66 kDa, que correspondem às formas pró-ativa e ativa da MMP-2 e as bandas de 92 e 77 kDa, correspondentes às formas pró-ativa e ativa de MMP-9, respectivamente (Fig. 2). As soluções contendo 3% de TMP (com ou sem hidrólise), 500 ppm F, 1100 ppm F e 1100 ppm F + 3% TMP inibiram totalmente a atividade da MMP-2 e as concentrações menores, parcialmente (Fig. 3). Para a MMP-9, somente o grupo 1100 ppm F + 3% TMP inibiu completamente sua atividade (Fig. 4).

A análise da dureza, após a indução de lesão de cárie artificial, mostrou não haver diferença ($p>0,05$) nos valores de perda da dureza de superfície (%SHL) e em secção longitudinal (%CSHL) entre os grupos experimentais (Tabela 2). Relação dose-resposta foi observada entre concentrações de F nas soluções experimentais e a %SHR e %CSHR, com valores maiores que os grupos placebo ou contendo somente TMP

hidrolisado ou não ($p < 0,05$) -. Os menores valores de %SHR e %CSHR ocorreram na ausência de F nas soluções. A hidrólise do TMP levou a menores valores de %SHR do que o não hidrolisado ($p < 0,05$), independente da concentração. As soluções contendo TMP e F apresentaram os maiores valores de %SHR e %CSHR quando comparados as suas contrapartes sem TMP ($p < 0,05$). O grupo contendo 1100 ppm F + 3% TMP mostrou a maior capacidade ($p < 0,05$) de remineralização da dentina (%SHR e %CSHR).

Os valores da ΔCMI ($g_{HAP} \times cm^{-3} \times um$) e da profundidade da lesão, após indução da cárie artificial, não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 3). Houve perda de estrutura dentinária e formação de uma lesão de subsuperfície após a indução da cárie artificial (Fig. 5, 6 e 7), como observado através do perfil da concentração mineral em secção longitudinal e diferencial. O tratamento com 1100 ppm F levou a formação de uma lesão de subsuperfície laminar (Fig. 5). Os grupos sem F apresentaram as maiores perdas minerais na região mais externa (área A) da lesão de subsuperfície, porém um ganho mineral na parte mais profunda (área B) ($p < 0,001$). Fenômeno contrário ocorreu nos grupos contendo F. O ganho mineral na área A mostrou dose-resposta em função da concentração de F ($p < 0,001$) e não diferiu de sua contraparte contendo TMP ($p > 0,05$). A associação F/TMP levou a menor perda mineral na região mais profunda da lesão quando comparada a sua contraparte sem TMP ($p < 0,001$). A profundidade da lesão, após a indução da cárie artificial, não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). As soluções contendo 3% TMP (hidrolisado ou não), 250 ppm F (com ou sem TMP), 500 ppm F (com ou sem TMP) e 1100 ppm F + 3% TMP não diferiram entre si ($p > 0,05$) para os valores de profundidade da lesão (Tabela 3; Fig. 5 e 6), e apresentaram os menores valores quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$), mas foi menor após a ciclagem de remineralização ($p < 0,001$). O grupo 1100 ppm F apresentou um aumento na profundidade da lesão não diferindo ($p > 0,05$) dos grupos placebo e 0,3% e 1% TMP (hidrolisado ou não).

Discussão

A Fluoterapia é preconizada como conduta e/ou método preventivo para controle da cárie dentária. Desse modo, a busca por estratégias de otimização dos produtos fluoretados, assim como a redução de seus efeitos colaterais têm sido amplamente pesquisadas. Dentre essas abordagens, a investigação do uso de F

associado a fosfatos inorgânicos tem sido reportada com resultados promissores [12-17]. Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito remineralizador de soluções fluoretadas contendo TMP não hidrolisado em lesões de cárie dentinária. Como a adição de TMP às soluções de F resultou em um potencial de inibição de MMPs e favorecimento de remineralização superior às suas contrapartes (sem TMP), a hipótese nula do estudo foi rejeitada.

É pertinente ressaltar que a cárie dentinária é de progressão rápida e seu tratamento geralmente é estabelecido pela utilização de produtos com altas concentrações de F [10]. Entretanto, essa terapêutica ainda requer avanços potenciais e mecanismos de aprimoramento, principalmente devido as propriedades dinâmicas da dentina. Estudos recentes têm demonstrado que a adição do TMP a dentifrícios fluoretados levou a uma maior obliteração dos túbulos dentinários, aumento na concentração de minerais na dentina [23], assim como reduziu a condutância hidráulica da dentina [36] quando comparado aos dentifrícios sem a incorporação desse fosfato. Em adição a isso, Gonçalves et al. [30] evidenciaram que o TMP hidrolisado em NaOH apresenta efeito anti-proteolítico sobre a degradação de colágeno ao inibir a atividade de metaloproteinases dentinárias (-2 e -9). Além disso, também reportaram o efeito remineralizador do TMP (1,5%) associado com solução saturada de cálcio ($\text{Ca} [\text{OH}]_2$) em lesões artificiais de cárie. Entretanto, associação de 1,5%TMP e 1100F não se mostrou eficaz em promover a remineralização da dentina, diferentemente do presente estudo. A ineficiência remineralizadora dessa associação possivelmente se atribuiu a ausência de proporção molar F/TMP adequada. Os estudos mais recentes mostraram que uma proporção fosfato/fluoreto adequada deve ser objetivada para obter um maior efeito anticárie. As concentrações de TMP testadas neste estudo foram baseadas na proporção F/TMP avaliadas em estudos prévios sobre o esmalte dentário [12,16,19-22], os quais demonstraram que a adição dessas concentrações de TMP aumentaram significativamente o efeito anticárie de produtos fluoretados quando comparado aos homólogos convencionais, em estudos *in vitro* e *in situ* [19-21].

Além disso, os estudos conduzidos por Gonçalves et al. [30,37] avaliaram o TMP em hidrólise alcalina observando baixo potencial remineralizante. Esses achados são corroborados com os resultados obtidos com as três concentrações (0,3%, 1% e 3%) de TMP hidrolisado verificadas neste estudo. Uma possível justificativa da ineficiente performance deste fosfato quando hidrolisado em NaOH estar relacionado a sua baixa

disponibilidade para o desafio cariogênico, em contrapartida fornece fosfato, principalmente na concentração de 3%, para se ligar as proteínas da dentina, o que justifica o efeito na inibição enzimática. Em detrimento disso, os grupos de TMP hidrolisados não obtiveram a mesma capacidade remineralizadora na dentina previamente cariada, em superfície e em profundidade, quando comparados aos grupos que não foram submetidos a hidrólise. No entanto, o mesmo não foi observado para capacidade anti-proteolítica sobre as metaloproteinases da matriz, uma vez que a concentração de 3% de TMP (hidrolisado ou não) inibiu totalmente a atividade de MMP-2 e, somente o TMP hidrolisado reduziu em torno de 40% a atividade da MMP-9. É pertinente ressaltar que o efeito sinérgico de TMP/F foi observado somente na concentração de 1100F e 3%TMP, para MMP-9. A maior resistência de MMP-9 verificada sobre esses agentes é reportada na literatura [30,37].

É pertinente mencionar que as concentrações mais baixas (0,3% ou 1,0%) de TMP não produziram inibição significativa ou completa de MMPs. Estes resultados devem-se provavelmente a uma concentração insuficiente de TMP no meio de incubação e ao pequeno número de grupos fosfato disponíveis. Desse modo, não foram capazes de promover depleção de todos os íons de cálcio presentes no meio de incubação, não permitindo assim a inativação das proteases. É sabido que a presença de Ca^{2+} é importante para manter a configuração tridimensional necessária para a atividade enzimática [38]. Além disso, a presença de F^- pode formar um complexo não apenas com o cálcio ionizado ligado à enzima, mas também com o cálcio no meio de incubação para formar um CaF_2 fortemente complexado [39]. A solução contendo 3% de TMP apresentou melhor atividade anti-proteolítica e, com base nos resultados de dureza e concentração mineral, o uso da solução de 3%TMP por si só não foi suficiente para reduzir significativamente a perda mineral. Entretanto, quando esta solução foi associada ao 1100 ppm F foram observadas diferenças significativas nos valores de dureza e teor mineral em comparação com a condição desmineralizada e a solução 1100 ppm F sem o fosfato.

A indução de lesões de cárie artificiais de subsuperficiais em dentina bovina é uma ferramenta importante para investigar o uso de F e/ou TMP como estratégia para estabilizar e fortalecer a matriz dentinária para induzir remineralização, diminuir as taxas de biodegradação e aumentar a nucleação mineral. Sendo assim, verificar a relação dose-resposta é um passo importante na avaliação da eficácia de qualquer

suplemento adicionado ao F, como também validar o protocolo experimental utilizado [40]. Os resultados obtidos nas análises mecânicas para os grupos Placebo, 250 ppm F, 500 ppm F e 1100 ppm F mostram uma relação dose-reposta e validam o modelo de ciclagem de pH adotado (Tabela 2). Além disso, foi possível constatar a otimização do efeito remineralizador de todas as soluções fluoretadas suplementadas com TMP quando comparadas com as suas contrapartes (soluções somente com F).

Os bons resultados decorrentes da adição do TMP, principalmente no grupo 1100 ppm F + 3% TMP, estão provavelmente relacionados à retenção de íons carregados de CaF^+ e Ca^{2+} pela substituição do Na^+ da estrutura cíclica deste sal inorgânico [14]. Em pH ácido, essas ligações são rompidas liberando Ca^{2+} e CaF^+ que podem reagir com H_2PO_4^- levando à formação de CaHPO_4^0 e HF^0 [41]. A difusão desses íons neutros no substrato dentário é mil vezes maior do que a dos íons carregados potencializando o processo de remineralização. Ademais, os grupos aniônicos do TMP (P-O^-) podem se ligar aos grupos amino (NH_2) [42,43] ou hidroxila (OH) [44,45] da proteína de colágeno, tornando a superfície da dentina mais aniônica e, portanto, mais propensa para a ligação de cátions. Uma vez adsorvido à dentina, o TMP atua como um agente de nucleação para a precipitação de fosfatos de cálcio [42,43].

Nesse sentido, tem sido sugerido que o TMP fornece locais de nucleação para precipitação de apatita, melhorando a remineralização da dentina, uma vez que a deposição de apatita no colágeno é difícil devido à falta de sítios de nucleação para sua formação [42]. Além disso, como mencionado anteriormente a quebra da formação reticular do TMP, há retenção em sua estrutura H^+ reduzindo a difusão do ácido para os tecidos duros dentais diminuindo sua desmineralização. Isso tem um impacto direto na incorporação de F e cálcio no substrato dentário, aumentando a remineralização principalmente em profundidade [19,21,23]. Um fator importante que promove os efeitos do TMP é ser liberado lentamente no meio de modo adjunto ao flúor [16] e sua capacidade de permanecer ligado aos tecidos dentários por mais tempo [18], o que facilita o transporte de íons para a lesão [18,21]. Essas particularidades do sal quando associado ao F reforça o efeito de redução da profundidade lesão de cárie mostrada pela análise do MicroCT principalmente no grupo 1100 ppm F + 3% TMP (Tabela 4).

O mecanismo mencionado tem impacto direto na incorporação desses íons pelo esmalte e dentina, impulsionando a remineralização em subsuperfície. De acordo com

o estudo de Favretto et al. [23], o aumento do conteúdo mineral produzido pela combinação TMP/F não se restringiu à superfície externa da dentina, mas também ocorreu em profundidade como comprovado no presente estudo. Isso reforça a afirmação que há precipitação no interior dos túbulos dentinários e não apenas na superfície. Além disso, na literatura científica já há relatos que após desafio ácido e processo de dissolução da dentina, a re-precipitação do fosfato de cálcio leva a uma maior concentração de minerais nos túbulos dentinários após tratamento com dentifrícios fluoretados incorporados com TMP [36].

Dessa forma, os bons resultados obtidos nesse estudo para todas as associações de F e TMP pode ser atribuído a permanência da alta mineralização do colágeno e obliteração de túbulos dentinários, sugerindo uma maior interação entre as partes minerais (fosfato de cálcio) e proteínas da matriz dentinária [23]. Assim, como o TMP promove uma dentina mais aniônica, há maior fluxo de cálcio e fosfato para os túbulos dentinários, potencializando o efeito remineralizador, uma vez que conforme relatado por Kawasaki et al. [46] a remineralização da dentina também ocorre pelo crescimento de cristais inorgânicos residuais no corpo da lesão, de modo que a presença do TMP ao íon F justifica esse maior favorecimento na remineralização dentinária.

A indução de lesões semelhantes à cárie na dentina bovina é um método relevante para desenvolver novas terapias preventivas e/ou terapêuticas para cárie dentinária [47,48]. Vale ressaltar que o substrato dentinário apresenta diferenças importantes em relação ao esmalte, principalmente em sua estrutura e composição. Na dentina, essas diferenças estão ligadas diretamente a presença de matriz orgânica, redução dos cristais de hidroxiapatita, menores níveis de organização cristalina e solubilidade, esta última merece destaque atentando principalmente a importância clínica, uma vez que o tecido dentinário sofre dissolução em queda de pH bucal em torno de 6,2, enquanto o esmalte dentário necessita de um valor de pH aproximado a 5,5 [49]. Entretanto, a dentina é mais reativa que o esmalte [50]. Além disso, a dentina apresenta mais sítios de ligação de hidroxiapatita (OH) e colágeno (NH₂), que oferece mais possibilidades de adsorção de TMP. Devido a essas características do substrato dentinária não é viável estabelecer uma comparação similar com o efeito em esmalte, ou esperar uma resposta padrão/semelhante aos resultados já reportados para esse tecido.

Embora saiba-se que os modelos de ciclagem de pH são adequados para a avaliação do impacto de novos ingredientes ativos em produtos fluoretados, bem como

sua associação com outros tratamentos anticárie, os protocolos *in vitro* apresentam limitações, pois não abordam o impacto da saliva/biofilme e agentes colagenolíticos sobre a interação do TMP com a dentina, não reproduzindo assim todas as condições intraorais. Assim os resultados devem ser avaliados com cautela, preconizando modelos de estudo *in situ* de cárie e estudos clínicos para elucidar seu efeito no processo des-remineralização.

Levando em consideração os dados obtidos e as limitações do modelo experimental, podemos concluir que: (1) 3% TMP atua como um agente antiproteolítico contra metaloproteinases da matriz dentinária. A associação com 1100F inibe totalmente a atividade gelatinolítica de MMPs -2/-9. (2) os tratamentos de lesões artificiais de cárie dentinária com TMP não hidrolisado apresentaram melhores efeitos remineralizantes que os tratamentos com TMP hidrolisado; (3) a adição de TMP não hidrolisado a soluções fluoretadas produziu efeito remineralizador significativamente maior em lesões artificiais de cárie na dentina quando comparadas as soluções fluoretadas sem o TMP. Dessa forma, uma potencial estratégia preventiva e terapêutica pode ser considerada na clínica odontológica, principalmente na terapia da cárie radicular, como também para método preventivo de lesões iniciais de cárie dentinária ou no pré-tratamento da dentina, utilizando-os como agentes cross-linker em procedimentos restauradores.

Agradecimentos

O autor agradece a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo (FAPESP, Processo #2018/19505-9) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro (CAPES, PROCAD/2013 - Proc. 88881.068437/2014–2001). Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO, FOA-UNESP) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, FINEP/CT-INFRA – Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011) por permitir o uso do sistema de microtomografia computadorizada de alta resolução (modelo 1272 SkyScan, Brucker).

References

- [1] A. Sheiham, W.P.T. James, Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized, *J. Dent. Res.* 94 (2015) 1341–1347. <https://doi.org/10.1177/0022034515590377>.
- [2] S. Twetman, Prevention of dental caries as a non-communicable disease, *Eur. J. Oral Sci.* 1 (2018) 19–25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>.
- [3] O. Fejerskov, B. Nyvad, E.A.M. Kidd, Dental caries: what is it?, in: *Dental Caries : The Disease and Its Clinical Management*, 2015.
- [4] Y. Mukai, M.D. Lagerweij, J.M. ten Cate, Effect of a solution with high fluoride concentration on remineralization of shallow and deep root surface caries in vitro, *Caries Res.* 35 (2001) 317–324. <https://doi.org/10.1159/000047469>.
- [5] S. Fure, P. Lingström, Evaluation of different fluoride treatments of initial root carious lesions in vivo, *Oral Health Prev. Dent.* 7 (2009) 147–154. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a15521>.
- [6] A. Linde, Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification, *Anat. Rec.* 224 (1989) 154–166. <https://doi.org/10.1002/ar.1092240206>.
- [7] W.T. Butler, Dentin matrix proteins and dentinogenesis, *Connect. Tissue Res.* 33 (1995) 59–65. <https://doi.org/10.3109/03008209509016983>.
- [8] L. Tjaderhane, H. Larjava, T. Sorsa, V.J. Uitto, M. Larmas, T. Salo, The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions, *J. Dent. Res.*, 77 (1998) 1622–1629.
- [9] M. Toledano, R. NietoAguilar, R. Osorio, A. Campos, E. Osorio, F.R. Tay, M. Alaminos, Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine, *J. Dent.* 38 (2010) 635–640.
- [10] M. M. A.C. Velo, A.C. Magalhães, A. Shiota, A.L.H. Faria et al. Profile of high-fluoride toothpastes combined or not with functionalized tri-calcium phosphate on root dentin caries control. An in vitro study *Am. J. Dent.* 31 (2019) 290–296.
- [11] F.M.C. Gonçalves, A.C.B. Delbem, L.F. Gomes et al., Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin. Oral Invest.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03597-7>
- [12] E.M. Takeshita, L.P. Castro, K.T. Sasaki, A.C.B. Delbem, In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate, *Caries Res.* (2009). <https://doi.org/10.1159/000196507>.
- [13] M.M. Manarelli, A.C.B. Delbem et al. In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate, *Caries Res.* 48 (2014) 299–305. <https://doi.org/10.1159/000356308>.
- [14] L.P. Pancote, M.M. Manarelli, M. Danelon, A.C.B. Delbem. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: In vitro study. *Arch. Oral Biol.* 59 (2014) 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.12.007>
- [15] E.M. Takeshita, R.A. Exterkate, A.C.B. Delbem, J.M. ten Cate, Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro, *Caries Res.* 45 (2011) 494–497.

<https://doi.org/10.1159/000331209>.

- [16] L.P. de Castro, A.C. Delbem, M. Danelon, A. Passarinho, C. Percinoto. In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin. Oral Investig.* 19 (2015) 1683-1687. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1446-z>
- [17] M. Danelon, J.P. Pessan, V.R.D. Santos, E.K.Chiba, L.S.G. Garcia, E.R. de Camargo, A.C.B. Delbem. Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro, *Acta Odontol. Scand.* 76 (2018)119-124. <https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1388442>
- [18] J.W. Van Dijk, J.M. Borggreven, F.C. Driessens, The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel, *Arch. Oral Biol.* 25 (1980) 591-595. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(80\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(80)90072-2)
- [19] E.M.Takeshita, M. Danelon, L.P. Castro, K.T. Sasaki, A.C. Delbem, Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ, *Caries Res.* 49 (2015) 394-400. <https://doi.org/10.1159/000381960>
- [20] E.M. Missel, R.F. Cunha, A.E.M.Vieira, N.V. Cruz, F.C. Castilho, A.C.B. Delbem, Sodium Trimetaphosphate enhances the effect of 250 ppm fluoride toothpaste against enamel desmineralization in vitro, *Eur. J. Oral Sci.* 124 (2016) 124: 343-348. <https://doi.org/10.1111/eos.12277>
- [21] E.M.Takeshita, M. Danelon, L.P. Castro, R.F. Cunha, A.C. Delbem, Remineralizing potential of a low fluoride toothpaste with sodium trimetaphosphate: an in situ study, *Caries Res.* 6 (2016) 571-578. <https://doi.org/10.1159/000449358>
- [22] M.J. Moretto, A.C. Magalhães, K.T. Sasaki et al. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion, *Caries Res.* 44 (2010) 135-140. <https://doi.org/10.1159/000302902>
- [23] C.O. Favretto, A.C.B. Delbem, J.C.S. Moraes, E.R. Camargo, P.T.A. de Toledo, D. Pedrini D, Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin. Oral Investig.* 80 (2018)1-9. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2384-3>
- [24] L.Q.C. Oliveira, In vitro evaluation of free surface energy of dentin after treatment with sodium trimetaphosphate associated or not to fluoride, exposed or not to calcium, Master thesis (Mestrado em Ciência Odontológica,) - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba (2018) <http://hdl.handle.net/11449/153120>.
- [25] C.Y. Shen, Alkaline hydrolysis of sodium trimetaphosphate in concentrated solutions and its role in built detergents, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 5 (1966) 660–672. <https://doi.org/10.1021/i360019a015>
- [26] A.C. Delbem, G.C.Tiano, K.M. Alves, R.F. Cunha, Anticariogenic potential of acidulate solutions with low fluoride concentration, *J. Appl. Oral Sci.* 14 (2006) 233-237. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572006000400004>
- [27] C.H. Fiske, Y. Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.* 66 (1925) 375-400. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0260292>
- [28] J.G. Amaral, J.P. Pessan, J.A.S. Souza, J.C.S. Moraes, A.C. Delbem, Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (2018), <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.34072>.
- [29] A.C.B. Delbem, K.T. Sasaki, A.M. de Castro et al., Assesment of the fluoride

- concentration and pH in different mouthrinses on the brazilian market, *J. Appl. Oral Sci.* 11 (2003) 319–323. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572003000400008>
- [30] R. Gonçalves, P.C. Scaffa, M.C. Giacomini, M.A.R. Buzalaf, H.M. Honório, L. Wang, Use of sodium trimetaphosphate in the inhibition of dentin matrix metalloproteinases and as a remineralizing agent, *J. Dent.* 68 (2018) 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.10.009>
 - [31] A.E. de Mello Vieira, A.C. Botazzo Delbem, K.T. Sasaki, E. Rodrigues, J.A. Cury, R.F. Cunha, Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel, *Caries Res.* (2005), <https://doi.org/10.1159/000088189>.
 - [32] J.M. Ten Cate, J. Arends, Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. II. Determination of activation energy and reaction order, *Caries Res.* 12 (1978) 213–222. <https://doi.org/10.1159/000260335>
 - [33] M.D. Lagerweij, J.M. ten Cate, Acid susceptibility at various depths of pH-cycled enamel and dentine specimens, *Caries Res.* 40 (2006) 40:33–37. <https://doi.org/10.1159/000088903>.
 - [34] D.A. Spiguel M.H., Tovo M.F., Kramer P.F., Franco K.S., Alves K.M., Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study, *Caries Res.* 43 (2009) 302–307. <https://doi.org/10.1159/000218094>
 - [35] G. Dalpasquale, Delbem A.C.B., Pessan J.P. et al., Effect of the addition of nano-sized sodium hexametaphosphate to fluoride toothpastes on tooth demineralization: an in vitro study, *Clin. Oral Investig.* 21(2017):1821–1827. doi:10.1007/s00784-017-2093-3
 - [36] C.O Favretto, A.C.B. Delbem, P.T.A. Toledo et al., Hydraulic conductance of dentin after treatment with fluoride toothpaste containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles, *Clin. Oral Invest.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03516-w>
 - [37] R.S. Gonçalves, P.M.C. Scaffa, M.C. Giacomini, C.D.M.P. Vidal, H.M. Honório, L. Wang, Sodium Trimetaphosphate as a Novel Strategy for Matrix Metalloproteinase Inhibition and Dentin Remineralization, *Caries Res.* 52 (2018) 189–198. <https://doi.org/10.1159/000484486>.
 - [38] R. Visse, H. Nagase Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry *Circ. Res.*, 92 (2003) 827–839.
 - [39] M.G. Brackett, K.A. Agee, W.W. Brackett, W.O. Key, C. Sabatini, M.T. Kato, M.A. Buzalaf, L. Tjäderhane, D.H. Pashley Effect of sodium fluoride on the endogenous MMP Activity of dentin matrices *J Nat Sci.*, 1 (2015) e118.
 - [40] J.M.Ten Cate, S.A. Mundorff-Shrestha, Working group report 1: laboratory models for caries (in vitro and animal models), *Adv. Dent. Res.* 9 (1995) 332–334. <https://doi.org/10.1177/08959374950090032001>
 - [41] H.J. Cochrane, S. Saranathan, F. Cai, K.J. Cross, E.C. Reynolds, Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilized solutions of calcium, phosphate and fluoride, *Caries Res.* 42 (2008) 88–97. <https://doi.org/10.1159/000113161>
 - [42] X. Li, J. Chang, Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen, *J. Biomed. Mater. Res. A* 85 (2008) 293–300. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31397>.
 - [43] G. Leone, P. Torricelli, R. Giardino, R. Barbucci, New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity, *Polym. Adv.*

- Technol. 19 (2008) 824–830. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.010>
- [44] J.A.S. Souza, J.G. Amaral, J.C.S. Moraes, K.T. Sasaki, A.C.B. Delbem, Effect of sodium trimetaphosphate on hydroxyapatite solubility: an in vitro study, *Braz. Dent. J.* 24 (2013) 235–240. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302000>
 - [45] A.C.B. Delbem, J.A.S. Souza, A.C.S.F. Zaze, E.M. Takeshita, K.T. Sasaki, J.C.S. Moraes, Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro, *Braz. Dent. J.* 25 (2014) 479–484. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300174>
 - [46] K. Kawasaki, J. Ruben, I. Stokroos, O. Takagi, J. Arends, The remineralization of EDTA-treated human dentine, *Caries Res.* 33 (1999) 275–280. <https://doi.org/10.1159/000016529>.
 - [47] B.M. Moron, L.P. Comar, A. Wiegand, W. Buchalla, H. Yu, M.A.R. Buzalaf, A.C. Magalhães, Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: Hardness and mineral content correlation, *Caries Res.* 47 (2013) 162–170. <https://doi.org/10.1159/000345362>.
 - [48] S. Pavan, Q. Xie, A.T. Hara, A.K. Bedran-Russo, Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin- rich agent, *Caries Research.* (2011). <https://doi.org/10.1159/000330599>.
 - [49] G.S. Maltz M, Cury J, Tenuta L, Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador, Érie Abeno: Odontologia Essencial – Parte Clínica. (2016).
 - [50] M.A.R. Buzalaf, J.P. Pessan, H.M. Honório, J.M. ten Cate, Mechanisms of action of fluoride for caries control, *Monogr. Oral Sci.* 22 (2011) 97–114. <https://doi.org/10.1159/000325151>

Figura 2. Imagem representativa do gel de ensaio de zimografia mostrando o efeito da presença das soluções experimentais contra a atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9. Em todos os géis: MWM - marcador de peso molecular (kDa), MMP-2 e MMP-9 recombinante humana.

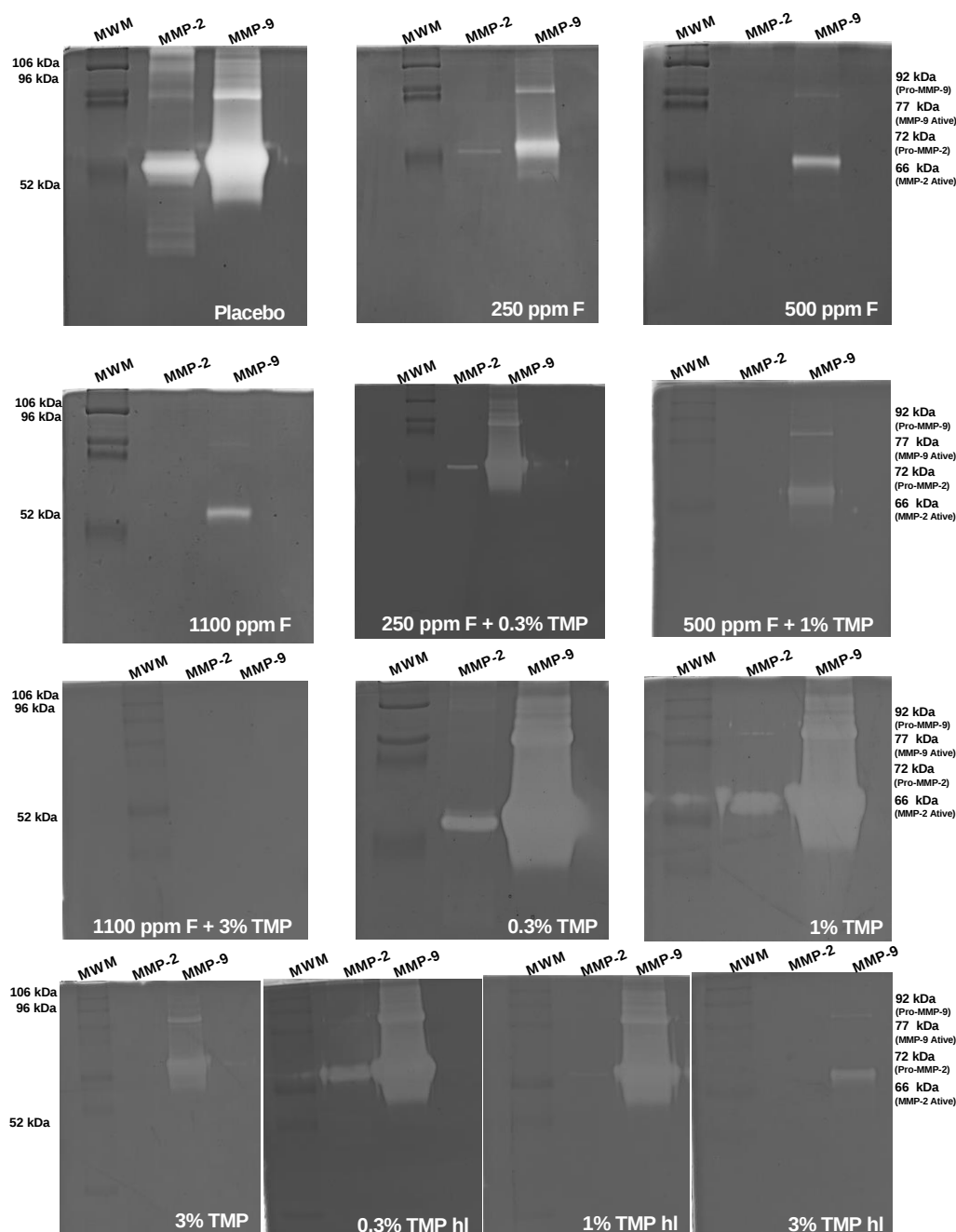


Figura 3. Porcentagem (%) da atividade de MMP-2 recombinante de acordo com as soluções experimentais utilizadas.

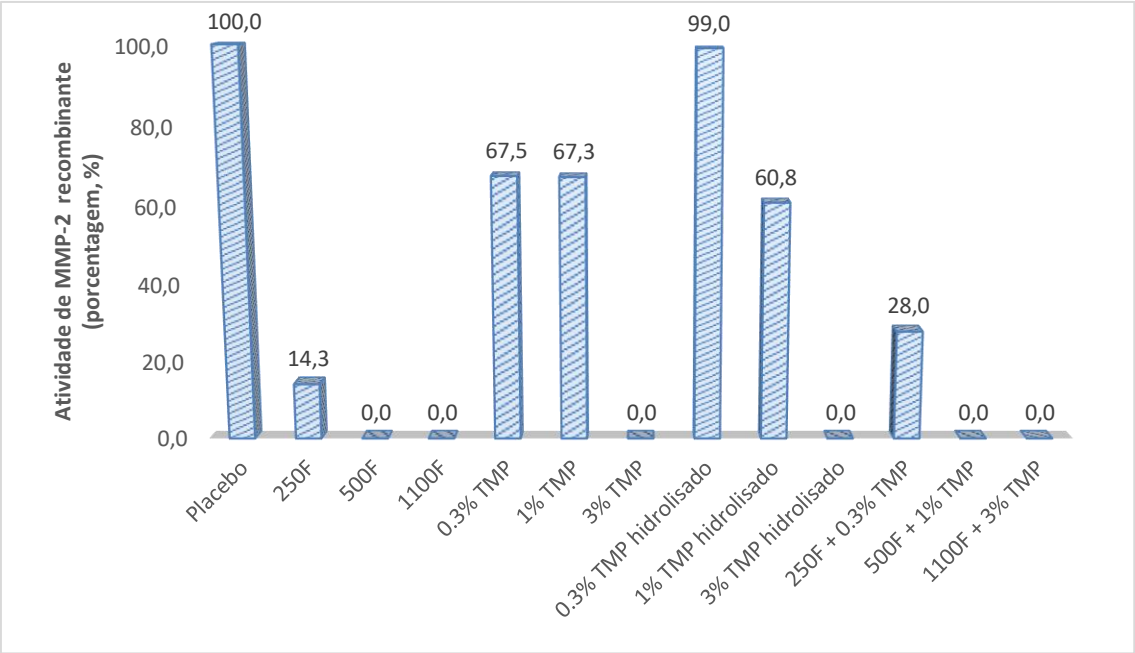


Figura 4. Porcentagem (%) da atividade de MMP-9 recombinante de acordo com as soluções experimentais utilizadas.

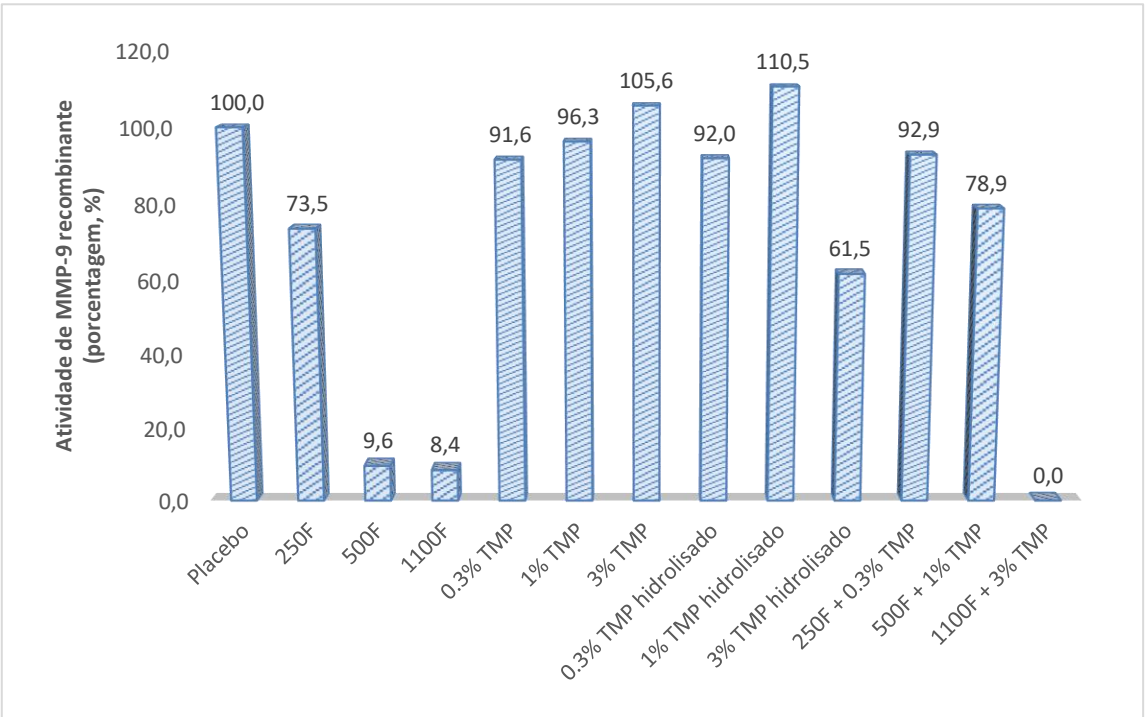


Figura 5. Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) em função da profundidade (μm) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: Placebo, 250 ppm F, 500 ppm F e 1100 ppm F.

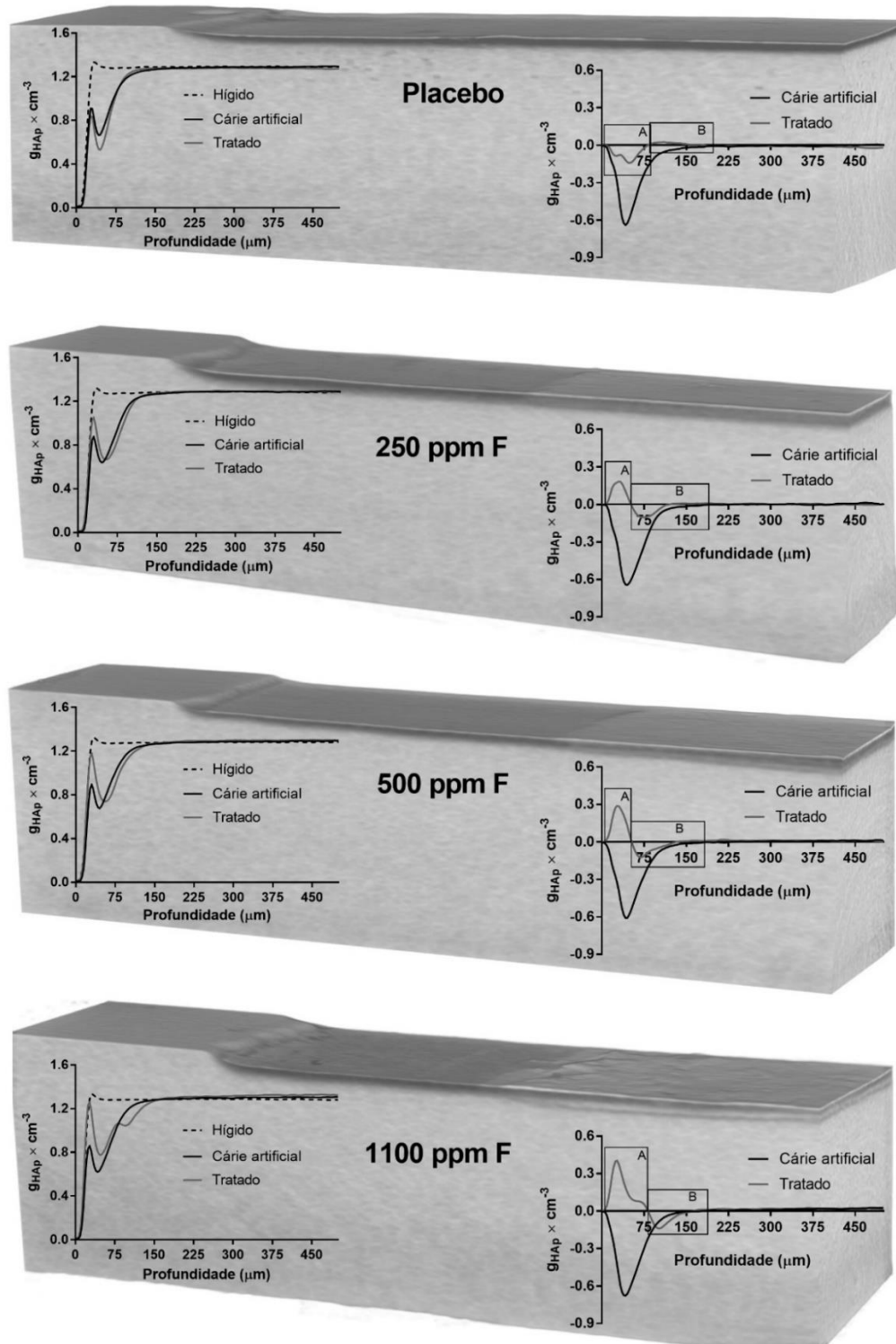


Figura 6. Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) em função da profundidade (μm) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: 250 ppm F + 0.3% TMP, 500 ppm F + 1% TMP e 1100 ppm F + 3% TMP.

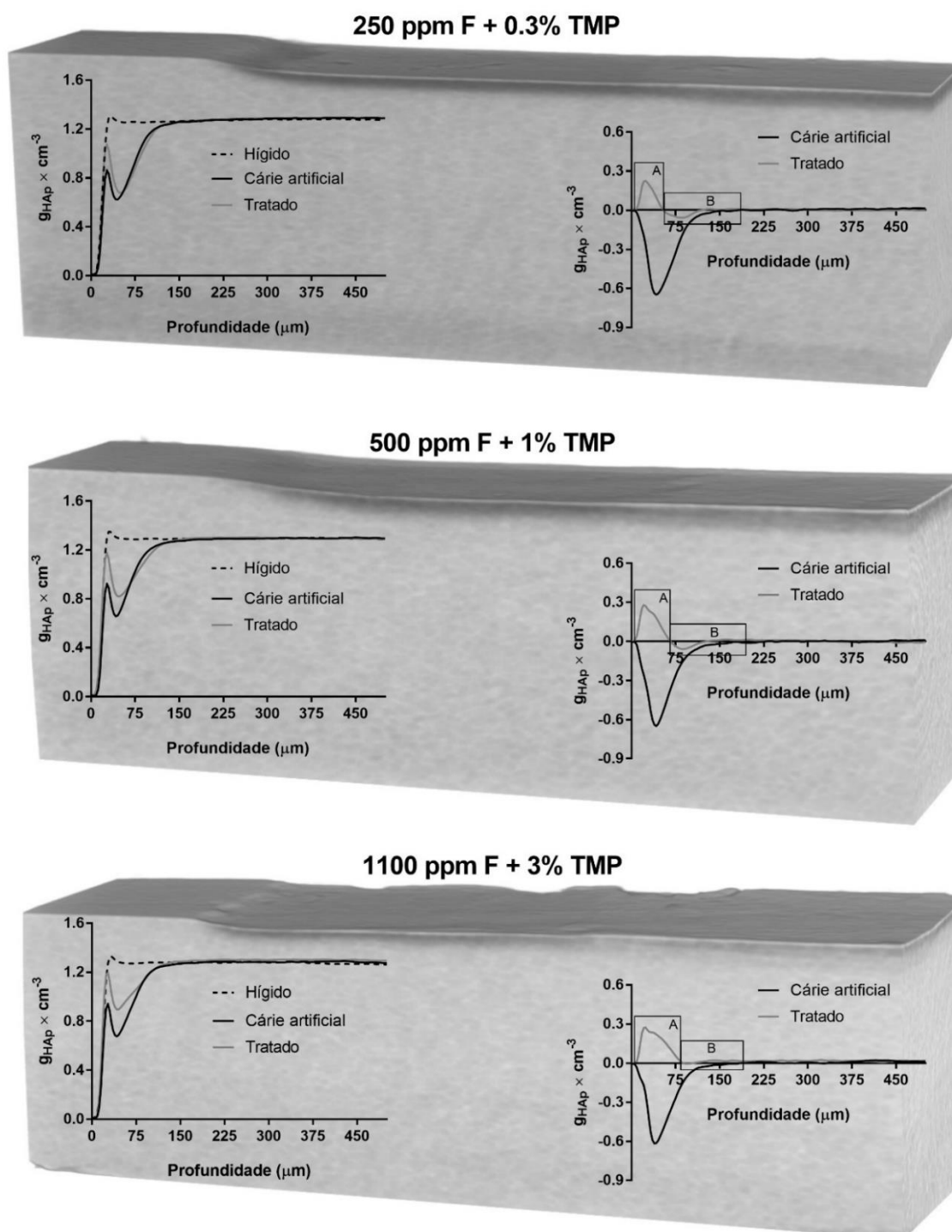


Figura 7. Fotomicrografias da renderização de volume 3D pelo software CTVox (versão 3.00, Brucker Micro-CT) das projeções dos blocos de dentina (região central), perfil em secção longitudinal e diferencial da concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) em função da profundidade (μm) nas distintas áreas da dentina: hígida, cárie artificial e tratada com as soluções experimentais: 0,3% 1% e 3%.

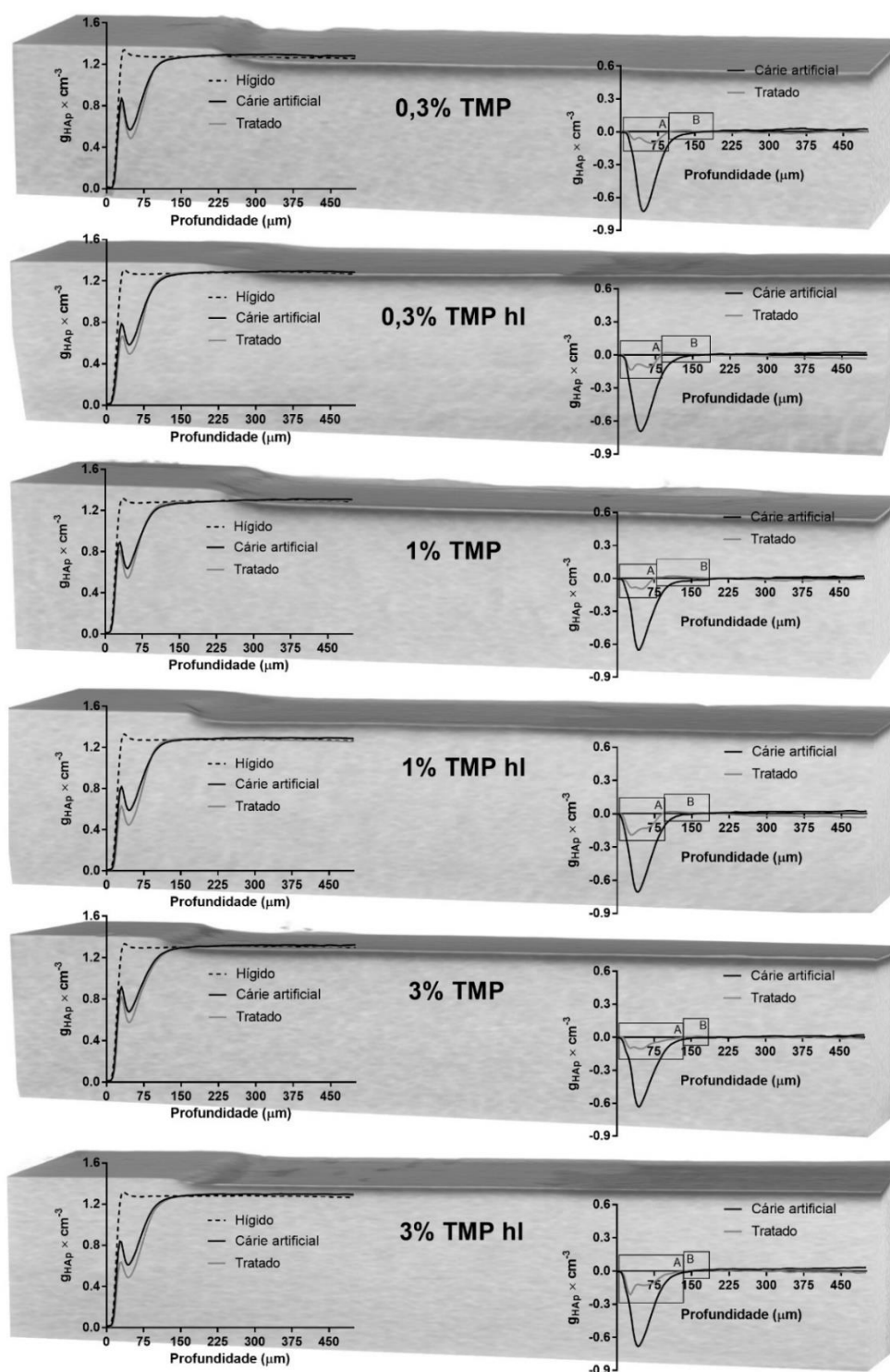


Tabela 1 – Valores de fluoreto (F), fósforo total (P) e pH (média $\pm$ dp) das soluções experimentais

Solução	F ($\mu\text{g/mL}$)	P ($\mu\text{g/mL}$)	pH
Placebo	14,15 $\pm$ 0,29	-0,33 $\pm$ 0,03	6,53 $\pm$ 0,14
0,3% TMP	14,22 $\pm$ 2,54	835,2 $\pm$ 13,34	6,58 $\pm$ 0,22
1% TMP	14,31 $\pm$ 2,08	2884,3 $\pm$ 17,82	6,44 $\pm$ 0,18
3% TMP	14,17 $\pm$ 0,53	8823,9 $\pm$ 88,91	6,22 $\pm$ 0,13
0,3% TMP hl	13,54 $\pm$ 3,46	9,0 $\pm$ 0,42	7,40 $\pm$ 0,10
1% TMP hl	14,49 $\pm$ 2,93	7,5 $\pm$ 0,13	7,40 $\pm$ 0,10
3% TMP hl	13,73 $\pm$ 3,17	0,02 $\pm$ 0,02	7,40 $\pm$ 0,06
250 ppm F	257,18 $\pm$ 0,89	-0,39 $\pm$ 0,01	6,41 $\pm$ 0,14
500 ppm F	511,49 $\pm$ 1,13	-0,26 $\pm$ 0,11	6,82 $\pm$ 0,16
1100 ppm F	1155,91 $\pm$ 6,89	-0,23 $\pm$ 0,03	7,04 $\pm$ 0,28
250 ppm F + 0,3% TMP	256,02 $\pm$ 2,33	860,4 $\pm$ 13,34	6,47 $\pm$ 0,32
500 ppm F + 1% TMP	516,11 $\pm$ 1,72	2896,9 $\pm$ 17,85	6,19 $\pm$ 0,15
1100 ppm F + 3%TMP	1141,68 $\pm$ 10,18	8984,2 $\pm$ 89,54	6,21 $\pm$ 0,13

Tabela 2 – Porcentagem média (dp) de perda da dureza de superfície (%SHL) e em secção longitudinal (%CSHL), após indução da cárie artificial, e recuperação da dureza de superfície (%SHR) e em secção longitudinal (%CSHR), após tratamento e ciclagem de pH, de acordo com os grupos experimentais (n=10)

Tratamentos	Dureza de Superfície		Dureza em Secção Longitudinal	
	%SHL	%SHR	%CSHL	%CSHR
Placebo	-61,4 ^{a,A} (4,6)	9,5 ^{a,b,B} (3,1)	-50,2 ^{a,A} (4,0)	4,8 ^{a,B} (1,1)
0,3% TMP	-61,4 ^{a,A} (5,3)	10,4 ^{a,B} (4,2)	-50,2 ^{a,A} (4,3)	6,5 ^{a,B} (1,4)
1% TMP	-61,8 ^{a,A} (5,8)	15,8 ^{a,B} (3,0)	-48,1 ^{a,A} (2,0)	12,4 ^{b,B} (3,1)
3% TMP	-56,6 ^{a,A} (3,1)	15,5 ^{a,B} (4,3)	-44,1 ^{a,A} (2,6)	12,3 ^{b,B} (2,5)
0,3% TMP hl	-62,8 ^{a,A} (6,1)	4,2 ^{b,B} (3,4)	-46,0 ^{a,A} (3,2)	4,5 ^{a,B} (1,2)
1% TMP hl	-58,8 ^{a,A} (4,6)	5,9 ^{b,B} (3,5)	-46,7 ^{a,A} (4,7)	5,8 ^{a,B} (2,0)
3% TMP hl	-60,9 ^{a,A} (5,4)	4,4 ^{b,B} (3,7)	-44,8 ^{a,A} (3,1)	5,2 ^{a,B} (1,5)
250 ppm F	-59,7 ^{a,A} (5,6)	26,9 ^{c,B} (3,5)	-50,8 ^{a,A} (2,2)	17,5 ^{c,B} (2,9)
500 ppm F	-57,6 ^{a,A} (4,4)	40,7 ^{d,B} (4,7)	-48,8 ^{a,A} (4,8)	26,0 ^{d,B} (3,7)
1100 ppm F	-61,9 ^{a,A} (6,2)	53,5 ^{e,B} (4,5)	-48,1 ^{a,A} (4,3)	44,1 ^{e,B} (8,0)
250 ppm F + 0,3% TMP	-60,1 ^{a,A} (7,3)	37,3 ^{d,B} (3,8)	-45,5 ^{a,A} (2,3)	28,8 ^{d,B} (2,9)
500 ppm F + 1% TMP	-58,3 ^{a,A} (5,6)	49,1 ^{e,B} (4,6)	-46,9 ^{a,A} (3,1)	36,9 ^{f,B} (3,2)
1100 ppm F + 3% TMP	-58,5 ^{a,A} (5,4)	68,9 ^{f,B} (4,2)	-47,1 ^{a,A} (3,3)	54,6 ^{g,B} (9,4)

Letras minúsculas iguais indicam não haver diferença entre os grupos experimentais em cada momento de análise (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre o período de análise (pós indução de cárie vs. pós ciclagem/tratamento) para cada grupo experimental (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios (DP) da ΔCMI ($\text{g}_{\text{HAP}} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) e da profundidade da lesão (μm) após indução da cárie artificial em dentina e pós-tratamento de acordo com os grupos experimentais (n=10)

Tratamentos	ΔCMI ($\text{g}_{\text{HAP}} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$)			Profundidade da Lesão (μm)	
	Cárie artificial	Tratado		Cárie artificial	Tratado
		área A	área B		
Placebo	-31,2 ^a (8,7)	-6,6 ^{a,A} (3,1)	2,4 ^{a,B} (1,3)	183,0 ^{a,A} (23,3)	162,0 ^{a,B} (82,2)
0,3% TMP	-36,5 ^a (6,2)	-7,1 ^{a,A} (3,0)	0,9 ^{a,B} (0,5)	156,9 ^{a,A} (17,6)	168,9 ^{a,B} (50,1)
1% TMP	-32,4 ^a (8,3)	-5,8 ^{a,A} (2,1)	2,4 ^{a,B} (1,4)	181,5 ^{a,A} (15,3)	167,7 ^{a,B} (45,8)
3% TMP	-32,9 ^a (10,4)	-6,9 ^{a,A} (1,4)	0,7 ^{a,B} (0,7)	164,7 ^{a,A} (34,1)	118,5 ^{b,B} (32,3)
0,3% TMP hl	-36,3 ^a (5,5)	-7,0 ^{a,A} (3,2)	1,4 ^{a,B} (1,3)	148,5 ^{a,A} (16,3)	162,6 ^{a,B} (38,8)
1% TMP hl	-36,6 ^a (3,8)	-9,6 ^{b,A} (3,2)	1,5 ^{a,B} (1,4)	145,8 ^{a,A} (26,8)	165,3 ^{a,B} (35,3)
3% TMP hl	-35,3 ^a (6,8)	-10,6 ^{b,A} (2,0)	0,5 ^{a,B} (0,2)	147,9 ^{a,A} (19,1)	118,8 ^{b,B} (26,3)
250 ppm F	-34,7 ^a (8,9)	6,1 ^{c,A} (1,7)	-5,0 ^{b,B} (2,0)	170,7 ^{a,A} (22,9)	114,6 ^{b,B} (29,7)
500 ppm F	-32,0 ^a (8,6)	8,9 ^{d,A} (2,3)	-5,3 ^{b,B} (2,7)	183,3 ^{a,A} (31,4)	119,4 ^{b,B} (30,0)
1100 ppm F	-35,6 ^a (8,4)	13,5 ^{e,A} (2,8)	-6,0 ^{b,B} (2,9)	147,9 ^{a,A} (19,0)	156,9 ^{a,B} (29,5)
250 ppm F + 0,3% TMP	-34,7 ^a (9,1)	6,6 ^{c,A} (1,7)	-2,9 ^{c,B} (1,9)	157,8 ^{a,A} (21,0)	108,6 ^{b,B} (22,4)
500 ppm F + 1% TMP	-33,9 ^a (7,6)	10,5 ^{d,A} (2,0)	-2,5 ^{c,B} (1,6)	174,3 ^{a,A} (25,1)	112,8 ^{b,B} (22,4)
1100 ppm F + 3% TMP	-31,8 ^a (8,6)	13,7 ^{e,A} (3,9)	-0,4 ^{d,a,B} (0,6)	174,9 ^{a,A} (26,5)	107,0 ^{b,B} (17,4)

Letras minúsculas iguais indicam não haver diferença entre os grupos experimentais em cada momento de análise (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre o período ou área de análise (pós indução de cárie vs. pós ciclagem/tratamento) para cada grupo experimental (Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Apêndices

APÊNDICE A

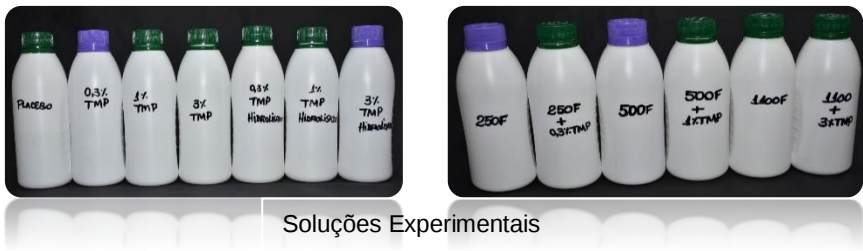
PREPARO E DOSAGEM DAS SOLUÇÕES



As 13 soluções foram preparadas e, em seguida, as dosagens de fósforo e fluoreto foram realizadas.

- **Água deionizada** (Placebo – controle negativo);
- **Soluções de TMP hidrolisado e não hidrolisado** (Sigma-Aldrich Co., USA), nas concentrações de 0,3%; 1% e 3%;
- **Soluções de F** (NaF, Merck, Alemanha), nas concentrações de 250, 500 e 1100 ppm F;
- **Soluções** contendo 250 ppm F e 0,3% TMP; 500 ppm F e 1% TMP; e 1100 ppm F e 3% de TMP.

APÊNDICE B
ANÁLISE ZIMOGRÁFICA

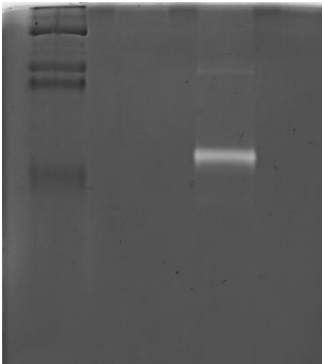


Poço								
Amostra		MWM	MMP-2	MMP-9		MWM	MMP-2	MMP-9

Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia.



Tampão de Incubação



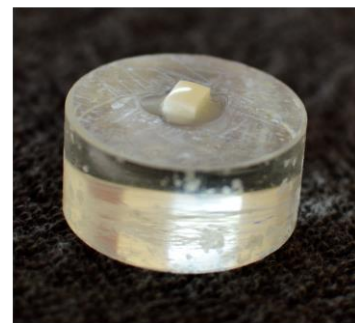
Análise por densitometria: MMP-2 e MMP-9

APÊNDICE C

PREPARO DOS BLOCOS DE DENTINA



1. Bloco de dentina bovina medindo $6 \times 4 \times 2$ mm, obtido após secção longitudinal em cortadeira.



2. Bloco fixado com cera pegajosa em suporte de acrílico antes (esquerda) e após (direita) polimento.

APÊNDICE D

PREPARO DOS BLOCOS E INDUÇÃO DAS LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE



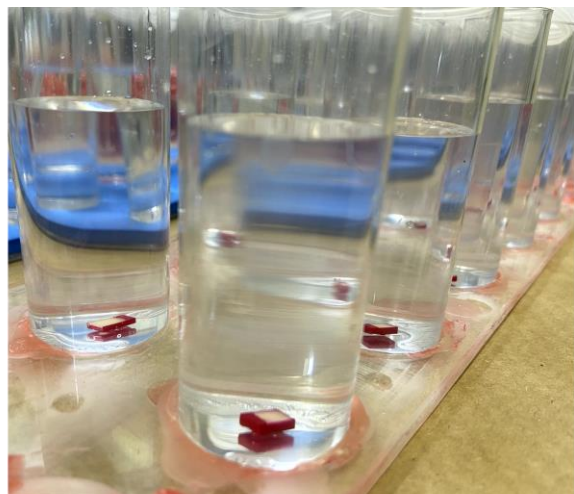
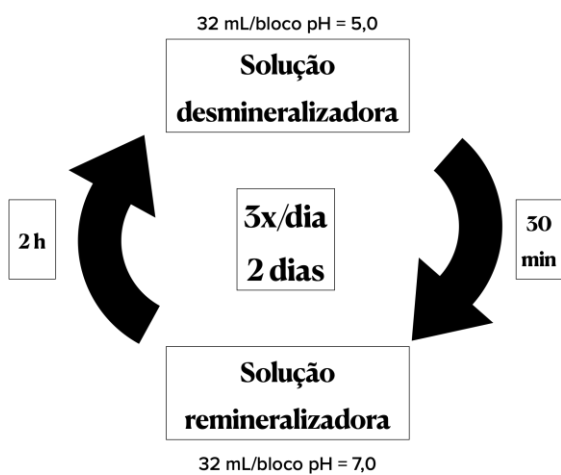
Bloco de dentina



1/3 do bloco protegido com verniz ácido-resistente

1 = Área controle 2 = Área desmineralizada

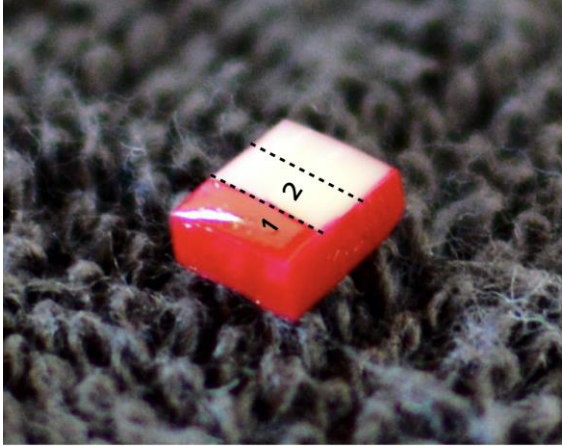
1/3 de cada bloco foi protegido com verniz ácido-resistente (imagem da direita) e em seguida foi realizada a indução das lesões artificiais de cárie.



Imersão em solução desmineralizadora por 5 dias, completando 7 dias de indução de lesão de cárie artificial

APÊNDICE E

TRATAMENTOS E CICLAGEM DE pH



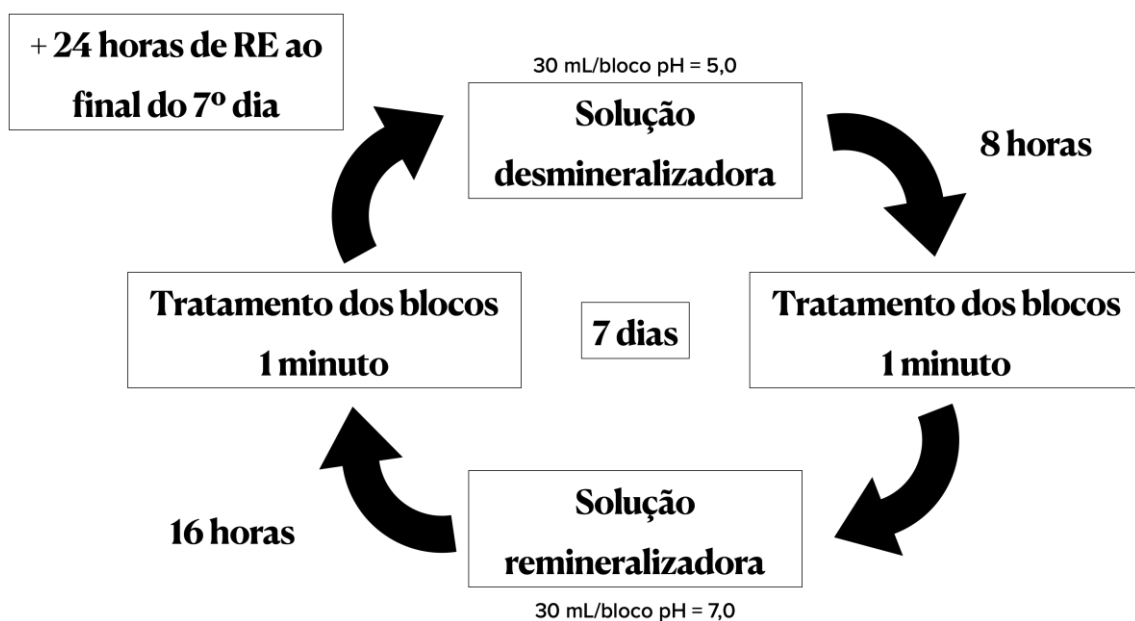
1/3 do bloco protegido com verniz ácido-resistente (controle)



1/3 do bloco protegido com verniz ácido-resistente (área desmineralizada)

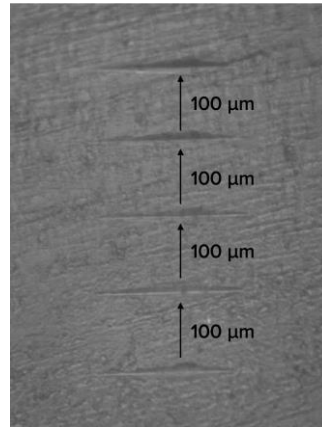
1 = Área controle 2 = Área desmineralizada 3 = Área tratada

Mais 1/3 de cada bloco foi protegido com verniz ácido-resistente e, em seguida, foram realizados a ciclagem de pH e os tratamentos.



APÊNDICE F

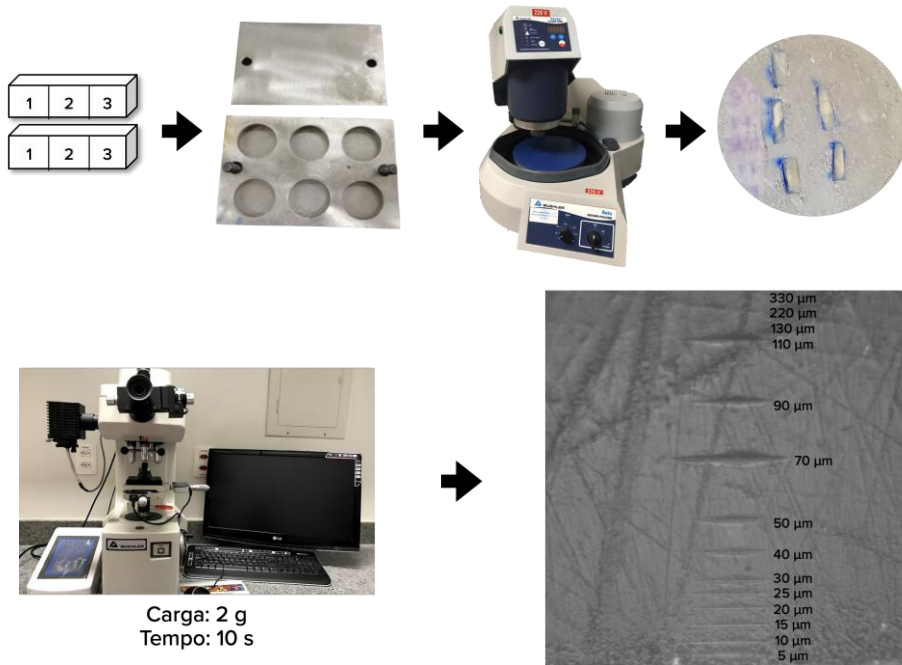
ANÁLISE QUANTO À RECUPERAÇÃO DE DUREZA DE SUPERFÍCIE



Cinco endentações realizadas em cada uma das três áreas dos blocos, com 100 μm entre elas. A carga utilizada foi de 10 g, por 10 segundos.

APÊNDICE G

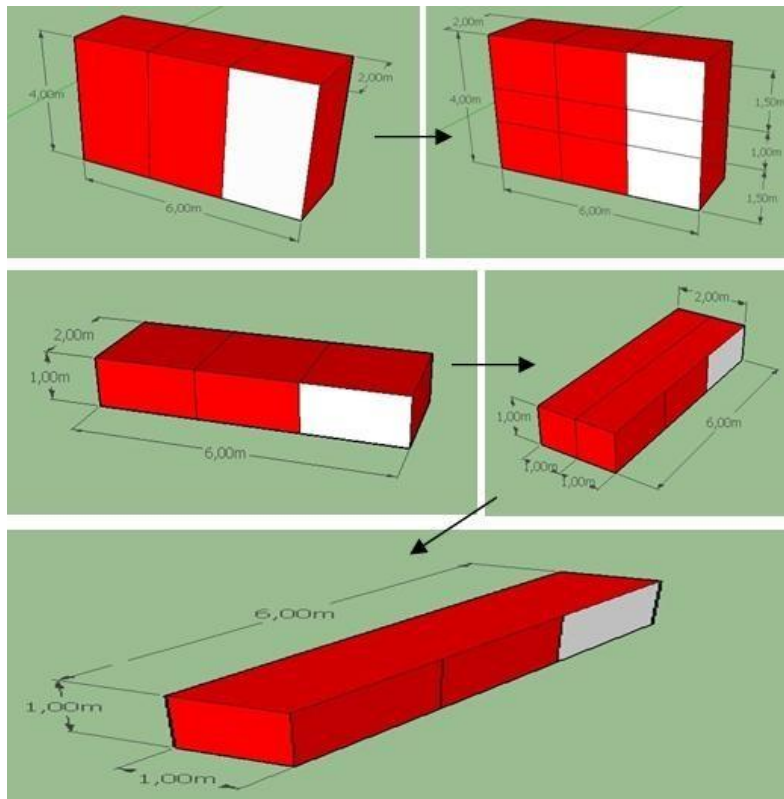
ANÁLISE DA DUREZA DA DENTINA EM SECÇÃO LONGITUDINAL (Δ KHN)



Os blocos foram seccionados longitudinalmente e embutidos em resina acrílica a frio. Em seguida, foram avaliados quanto à dureza em secção longitudinal em microdurômetro, com carga de 3g, durante 10 segundos.

APÊNDICE H

ANÁLISE PELA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA



Preparo da amostra de 6 mm × 1 mm × 1 mm para análise pelo Micro-CT



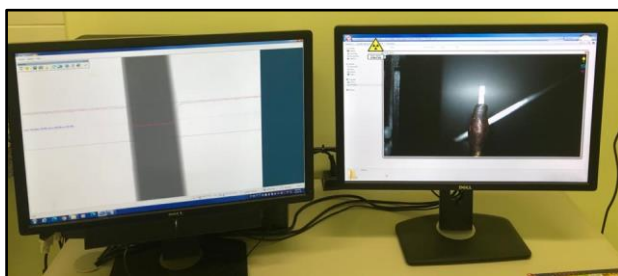
Fixação dos blocos



Bruker Micro-CT



Blocos no interior do
Micro-CT



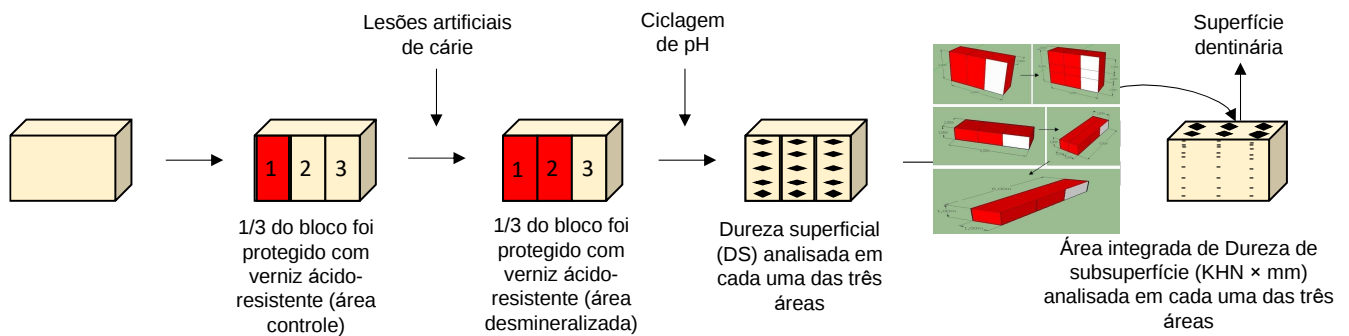
Software de escaneamento



Projeção gerada da amostra

APÊNDICE I

FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES MECÂNICAS



Blocos de dentina preparados e divididos em três áreas. Após a indução das lesões artificiais de cárie e a ciclagem de pH com tratamento, as análises de dureza superficial, em secção longitudinal e por microtomografia computadorizada foram realizadas.