

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANDRÉIA ROSA LARA

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
POTENCIALIZAÇÃO DA REMINERALIZAÇÃO E NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA
DO BIOFILME FORMADO *IN SITU*

Porto Alegre

2018

ANDRÉIA ROSA LARA

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
POTENCIALIZAÇÃO DA REMINERALIZAÇÃO E NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA
DO BIOFILME FORMADO *IN SITU*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de Cirurgiã-
Dentista.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Lara , Andréia Rosa
EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO
ARGININA NA POTENCIALIZAÇÃO DA REMINERALIZAÇÃO E NA
COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO BIOFILME FORMADO IN SITU /
Andréia Rosa Lara . -- 2018.
47 f.
Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. Efeito de um dentifrício fluoretado contendo
arginina na potencialização da remineralização do
esmalte dental e na quantificação microbiana do
biofilme dental formado in situ. . I. Arthur,
Rodrigo Alex, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por tudo que conquistei. Aos meus pais, Aldanira e Eder, e a minha irmã, Alessandra, por todo amor e confiança que me conduziram durante minha jornada acadêmica.

Ao meu professor orientador, Rodrigo, e à mestrandia Maria Eduarda que, muito mais que me passarem conhecimentos científicos, se tornaram meus exemplos de dedicação e perseverança.

RESUMO

Arginina é um aminoácido que tem sido incorporado ao dentifrício fluoretado para potencializar seu efeito anti-cárie. Esse aminoácido é convertido em amônia pela atuação de sistemas enzimáticos arginina deiminase (ADS) e Agmatina Deiminase (AgDS) presentes em bactérias do biofilme dental. A amônia poderia atuar como acceptora de íons hidrogênio no biofilme, exercendo assim efeito tampão de controle de pH, o que, em termos de prevenção de cárie dental seria benéfico. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na ativação da remineralização do esmalte dental e na composição microbiana do biofilme dental formado *in situ* por um período de 14 dias. Este foi um estudo experimental *in situ* cruzado e duplo cego (em relação ao uso de dentifrício) que foi conduzido em duas fases experimentais de 14 dias cada uma. Catorze voluntários adultos utilizaram um dispositivo intrabucal palatino em cada fase experimental contendo 4 blocos de esmalte dental bovino (2 blocos de cada lado do dispositivo) sobre os quais solução de sacarose 20% foi gotejada numa frequência de 3x/dia em horários pré-estabelecidos. Dois meses antes do início do estudo (período pré-experimental), os voluntários foram aleatorizados em relação ao tipo de dentifrício com o qual a escovação dental foi ser realizada: dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF) (DF) (Colgate Máxima Proteção Anticáries) ou dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo 1,5% de arginina (DFA)(Colgate Neutraçúcar). Então, DF ou DFA foi ser usado 3x/dia durante esse período de 2 meses. Ao final do período pré-experimental, deu-se início à primeira fase experimental *in situ*, durante a qual os voluntários continuaram o uso do respectivo dentifrício fluoretado (alocado na fase pré-experimental) 3x/dia. Ao final dessa primeira fase experimental, e considerando um desenho experimental do tipo cruzado, os voluntários usaram DF ou DFA por um período de 2 meses (wash-out) também 3x/dia. Ao final desse período de wash-out, iniciou-se a segunda fase experimental, na qual o respectivo dentifrício usado durante o wash-out também foi usado 3x/dia. Ao final de cada fase experimental *in situ*, o biofilme formado sobre os blocos dentais foi coletado e analisado em relação à sua composição microbiológica (contagem de microrganismos totais – MT) e os blocos de esmalte dental foram avaliados em relação à porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS). Os resultados foram avaliados considerando limite de significância de 5%. Como resultados, observou-se que a média de %RDS na presença de DF foi estatisticamente semelhante à %RDS encontrada na presença de DFA (média±ep; 24,09±4,25 e 26,82±4,25, respectivamente). Também não observou-se diferença estatística nas contagens de MT (log₁₀ UFC/mg; média±ep) entre os biofilmes formados na presença de DF ou DFA (6,46±0,21 e 5,88±0,51, respectivamente). Os resultados desse estudo sugerem que a presença de arginina no dentifrício não potencializa seu efeito remineralizador quando comparado ao dentifrício fluoretado convencional. Ainda, não foram observadas diferenças nas contagens de microrganismos totais nos biofilmes formados na presença ou ausência de arginina.

Palavras-chave: Cárie dental. Remineralização. Dentifrícios fluoretados. Esmalte dental.

ABSTRACT

Arginine is an amino acid that has been incorporated into toothpaste to enhance its anti-caries effect. This amino acid is converted into ammonia by the enzymatic activity of arginine deiminase system (ADS) and Arginine deiminase (AgDS) present in biofilm dental bacteria. Ammonia could act as acceptor of hydrogen ions in the biofilm, thus exercising pH buffering effect, which in terms of prevention of dental caries would be beneficial. The purpose of this study was to evaluate the effect of a toothpaste containing arginine in the activation of the remineralization of the dental enamel and in the microbial composition of the dental biofilm formed *in situ* for a period of 14 days. This was an experimental double blind crossed-over study that was conducted in two experimental phases of 14 days each. Twenty adult volunteers wore a palatal appliance in each experimental phase containing 4 blocks of bovine dental enamel with artificial caries lesions (2 blocks on each side of the device) over which 20% sucrose solution was dripped at a frequency of 3x/day. Two months before the start of the study (before the experiment period), the volunteers were randomized in relation to the type of toothpaste with which the dental brushing should be performed: conventional toothpaste (1,450 ppmF) (DF) (Colgate maximum caries protection) or toothpaste (1,450 ppmF) containing 1.5% arginine (DFA) (Colgate Neutraçúcar). Then, DF or DFA was used 3x/day during that 2-month period. Then, the first experimental phase *in situ* began, during which the volunteers continued the use of the respective toothpaste varnish (allocated in the before the experiment phase) 3x/day. At the end of this first phase experimental, and considering a crossed-over design, volunteers used DF or DFA for an additional period of 2 months (as a wash-out period) 3x/day. At the end of this wash-out period, the second experimental phase began, in which the respective toothpaste used during wash-out was also used 3x/day. At the end of each experimental *in situ* phase, the biofilm formed on the dental blocks was collected and analyzed in relation to its microbiological composition (total microorganisms count; and dental enamel blocks were evaluated in relation to the percentage of surface mineral recovery. The results will be evaluated considering 5% significance limit. As result, it was observed that the average of %SHR (surface hardness recovery) in the presence of DF was statistically similar to the % SHR found in the presence of DFA (average \pm se; 24.09 ± 4.25 and 26.82 ± 4.25 , respectively). There was also no statistical difference in the TM (total microorganisms) counts (log₁₀ UFC/mg; average \pm se) between the biofilms formed in the presence of DF or DFA (6.46 ± 0.21 and 5.88 ± 0.51 , respectively). The results of this study suggest that the presence of arginine in the toothpaste does not enhance its remineralizing effect when compared to conventional varnish toothpaste. Also, no differences were observed in the counts of total microorganisms in the biofilms formed in the presence or absence of arginine.

Keywords: Dental caries. Remineralization. Toothpastes fluorinated. Dental enamel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	22
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	23
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	24
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	24
3.3.1 Critérios de Inclusão	24
3.3.2 Critérios de Exclusão	24
3.4 PROCEDIMENTOS E COLETA DE DADOS	25
3.4.1 Preparo dos Blocos de Esmalte	25
3.4.2 Determinação da Microdureza de Superfície e Seleção dos Blocos de Esmalte	26
3.4.3 Indução de lesão cáriosa artificial em esmalte	27
3.4.4 Determinação da Microdureza de Superfície após a indução de lesão de cárie e Seleção dos Blocos para a etapa <i>in situ</i>	27
3.4.5 Confecção dos Dispositivos Intrabucais	28
3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
3.5.1 Período pré-experimental	28
3.5.2 Primeira fase experimental	29
3.5.3 Wash-out	29
3.5.4 Segunda fase experimental	30
3.6 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	30
3.7 ANÁLISES	31
3.7.2 Análise Microbiológica do Biofilme	31
3.7.3 Determinação da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS)	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS	33

6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Uma das doenças que mais afeta a população mundial tem sido a cárie dental; estima-se que 95% da população já foi acometida por essa doença multifatorial causada pelo desequilíbrio no balanço entre o conteúdo mineral do dente e o fluido do biofilme (KRASSE, 1998; KASSEBAUM et al., 2015). Em vista disso, apesar dos avanços na odontologia preventiva, a cárie dentária ainda permanece como um problema de saúde pública em diversos países (SINGLA et al., 2016). Estudos de Fure (2003) e Broadbent (2006) apontam a cárie dentária como uma das principais causas de perda dentária, atingindo majoritariamente jovens e adultos. A doença cárie apresenta desenvolvimento de progressão lenta para a maioria dos indivíduos, sendo raramente auto-limitante e, quando não tratada, pode evoluir a ponto de destruir totalmente a estrutura dentária (FEJERSKOV, KIDD, 2005).

Sendo assim, para que haja a instalação da doença cárie é necessária a interação de alguns fatores, sendo estes o hospedeiro a partir da estrutura dentária e saliva, a microflora bucal, carboidratos fermentáveis advindos da dieta e que servem como substrato cariogênico, além do fator tempo (KEYES, 1962; KRASSE, 1998; NEWBRUN, 1988). Porém, sabe-se que alguns outros determinantes como nível sócio-econômico, e o ambiental, também exercem grande influência no desenvolvimento da doença, visto que trazem à tona questões como o grau de informação do indivíduo em relação a saúde bucal, seu acesso a meios de controle de cárie como escova dental e dentifrícios fluoretados além do acesso ao abastecimento público com água fluoretada (FEJERSKOV, 2008).

Em 2004, a Organização Mundial da Saúde realizou um estudo sobre a carga de doença bucal no mundo e, para tanto, levando em consideração 188 países, observou-se que a experiência média mundial de cárie (considerando dentes cariados, obturados ou perdidos por cárie) aos 12 anos foi de 1,6. Na região correspondente às Américas, a média ficou em 2,8 e, na Europa, em 1,6. As regiões responsáveis pela baixa média mundial são a África e o Sudeste Asiático, que apresentam valores médios baixos, de modo geral associados ao baixo consumo de açúcares (WHO, 2004). Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (SB BRASIL, 2010), crianças brasileiras com 5 anos de idade possuem em média 2,43

dentes com experiência de cárie, e aos 12 anos de idade apresentam uma média de 2,07 dentes com experiência de cárie e adolescentes entre 15 a 19 anos apresentam índice de 4,25 dentes com experiência de cárie dentária, sendo os menores índices dessa faixa etária encontrados nas regiões Sudeste e Sul, enquanto médias mais elevadas encontram-se nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Já para a população adulta, a faixa etária de 35 a 44 anos possui em média 16,75 dentes com experiência de cárie, sendo que 44,7% desses dentes foram perdidos por cárie. A faixa de 65 a 74 anos possui em média 27,53 dentes com experiência de cárie, sendo que 92% desses dentes foram perdidos por cárie (SB BRASIL, 2010).

Sobre a superfície dentária forma-se um micro ecossistema, o biofilme dental, composto principalmente por comunidades bacterianas heterogênicas que apresentam interações metabólicas e fisiológicas de forma a permitir o crescimento simultâneo de espécies microbianas que possuem exigências nutricionais distintas (MARSH, 1994). A presença frequente de carboidratos fermentáveis na dieta e consequente produção de ácidos pelas bactérias do biofilme dental ocasiona desmineralização na superfície dentária, uma vez que, quando o pH diminui biofilme dentário e a saliva tornam-se subsaturados em relação à superfície dentária, provocando a perda de íons cálcio e fosfato do dente em direção ao biofilme/saliva (CURY, TENUTA, 2008). Nesse sentido, fatores de proteção, como a capacidade tampão da saliva e sua concentração supersaturante de íons cálcio e fosfato permitem que os minerais perdidos durante as quedas de pH sejam parcialmente repostos na superfície dental quando o pH salivar e do biofilme aumenta, num evento denominado de remineralização (CURY, TENUTA, 2008). Dessa forma, é importante que eventos de desmineralização e de remineralização estejam em equilíbrio, limitando assim o desenvolvimento da lesão de cárie.

Quando o desequilíbrio entre o biofilme dentário e a superfície dentária ocorre de modo mais intenso por um período maior, o processo de desmineralização acentua-se, havendo perda de estrutura dental atingindo, primeiramente, esmalte, progredindo para formação de cavidade e exposição e acometimento dentinário (BJORN DAL, MJOR, 2001). Inicialmente, a desmineralização acontece em nível subclínico. Na medida em que a desmineralização progride a destruição tecidual torna-se clinicamente visível. Todo esse processo de iniciação e progressão da doença cárie possui tempo e intensidade relativos à cada paciente, devido aos

fatores envolvidos no processo saúde-doença (BJORNDAL, MJOR, 2001). Para tanto, a dieta do hospedeiro tem papel fundamental nesse processo, tendo em vista estar diretamente correlacionada à produção de ácidos por microrganismos que compõem o biofilme e que utilizam como substratos açúcares e carboidratos da dieta (BOWEN, 2002; CUMMINS, BOWEN, 2006).

Especificamente em relação à dieta, seu potencial cariogênico é determinado pela presença de carboidratos, principalmente a sacarose, que servem de substrato para que os microrganismos da cavidade bucal sintetizem polissacarídeos extracelulares com um importante papel na formação do biofilme, além da produção de ácidos orgânicos que promovem a desmineralização do esmalte com as quedas de PH e que dessa forma podem desencadear o processo de desenvolvimento de cárie quando em alta frequência (SREEBNY, 1982; BURT, 1988; MANJI, FEJERSKOV, 1990). Os polissacarídeos extracelulares insolúveis produzidos pelos microrganismos através da sacarose, tornam o biofilme mais poroso e auxiliam na difusão das substâncias ácidas por toda a matriz microbiana, o que faz com que as quedas de pH sejam mais rápidas e intensas na interface dente/biofilme. Por induzir essas alterações na matriz do biofilme dental, a sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico da dieta (PAES LEME et al., 2006). Para tanto, a dieta do hospedeiro compõe parte fundamental das condições que se aplicam aos eventos de baixas de pH e, desse modo, ocasionando a perda mineral da superfície dentária, sendo assim, de extrema importância na determinação do processo de desenvolvimento da doença cárie (CURY et al., 2016).

Em decorrência das frequentes quedas de pH no biofilme, a comunidade microbiana passa por um processo de adaptação fisiológica e de seleção de microrganismos acidúricos e acidogênicos, o que favorece o desenvolvimento da lesão cariosa, já que esses microrganismos são capazes de ativamente produzirem ácidos mesmo em ambientes de reduzido pH, o que é uma vantagem frente aos microrganismos ácido-sensíveis (MARSH et al., 1994).

Durante muitos anos, existiam duas escolas de pensamento que discutiam o papel das bactérias na etiologia da cárie. A “Hipótese da Placa Específica”, propunha que independente da diversidade de microorganismos que compreendem o biofilme dental, apenas um número muito reduzido de espécies, dentre elas os *Streptococcus mutans*, estaria envolvido com o desenvolvimento da doença. Contrastando com essa teoria, a “Hipótese da Placa Não-Específica” considerava,

porém, que a doença era o resultado de uma atividade geral de toda microbiota formadora do biofilme, e não apenas daquelas bactérias acidogênicas. Sendo assim, uma mistura heterogênea de microrganismos poderia ter participação na doença cárie.

Mais recentemente uma outra hipótese foi proposta por Marsh (1994; 2003), que reconcilia os elementos fundamentais das duas outras hipóteses já descritas. A “Hipótese da Placa Ecológica” propõe que os organismos associados à doença também podem estar presentes em sítios saudáveis, mas em níveis muito baixos para serem clinicamente relevantes. A doença é o resultado de uma mudança no equilíbrio da microbiota residente, guiada por uma transformação nas condições ambientais. No caso da cárie dentária, condições repetidas de pH baixo no biofilme dental após a ingestão frequente de açúcar favorecerão o crescimento de espécies acidogênicas (capazes de produzir ácidos a partir da fermentação de carboidratos da dieta) e acidúricas ou ácido-tolerantes (capazes de crescerem em condições de baixo pH) (MARSH et al., 1994; 2003). Nesse sentido, em adição aos *S. mutans*, microrganismos como *Rothia* ssp, *Scardovia* ssp, *Propionibacterium* ssp e outros também têm sido encontrados em biofilmes de indivíduos cárie-ativos sugerindo que desempenham papel no desenvolvimento da lesão de cárie (THOMAS et al., 2012; WOLFF et al., 2013), levando ao entendimento de que a cárie dental é resultado de uma disbiose induzida pela dieta.

Tendo em vista os muitos aspectos que envolvem o processo de desenvolvimento da doença cárie, em relação ao ponto de vista preventivo e terapêutico, o flúor tem sido considerado como o principal agente cariostático disponível, e nesse contexto, o dentífrício fluoretado (com concentração de 1.100 à 1.500 ppm F) tem sido considerado o agente fundamental na redução de prevalência de cárie dental no mundo (CURY et al., 2004). Através de dentífrício e água fluoretados, temos a principal medida de exposição a concentrações terapêuticas de flúor (MARINHO, 2009). Segundo Limeback et al. (1998) e Featherstone (1999), o mecanismo de ação do flúor se dá através do seu efeito tópico, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização da estrutura dentária. Após o uso de qualquer produto fluoretado cuja concentração de flúor seja superior a 100 ppm (como no caso de dentífrícios), há formação de glóbulos de fluoreto de cálcio sobre a superfície dental que atua como um reservatório mineral. No momento em que houver queda no pH na cavidade bucal, esses glóbulos se dissolvem, liberando

flúor que inibe a desmineralização e potencializa a remineralização do tecido dentário (DUSCHNER et al., 1997; ROLLA, 1989). Dessa forma, o flúor aumenta a rapidez com que o processo de remineralização ocorre, visto que adsorve ao cristal parcialmente dissolvido da superfície dentária, atraindo íons cálcio livres no meio em solução, intensificando a remineralização da lesão cariosa. Para que isso aconteça, o flúor deve ser mantido em concentrações mínimas e constantes na cavidade bucal, principalmente entre biofilme e esmalte, e saliva e esmalte (FEATHERSTONE, 1999; TEN CATE, 1997), o que é conseguido pelo uso frequente do dentifrício fluoretado pelo paciente ou pela ingestão de água de abastecimento otimamente fluoretada.

No entanto, o fluoreto não impede a produção de ácido pelas bactérias presentes no biofilme cariogênico, que é o primeiro passo para desenvolvimento de lesões cárie (PAGE, 1991; LYNCH et al., 2004). Em vista disso, novos métodos devem ser estudados em busca de um agente com potencial de complementar e reforçar os efeitos do fluoreto, levando em consideração especificamente o biofilme dental cariogênico, com o intuito de reduzir a sua patogenicidade (SILVA, 2015).

Nesse sentido, diversos produtos têm sido formulados com o objetivo de melhorar os fatores que atuam na prevenção de lesões de cárie a partir de uma abordagem com combinação de dois agentes, um tendo como alvo o biofilme afim de combater seus efeitos nocivos, e outro visando a proteção da superfície dentária, como o fluoreto que já possui seu efeito comprovado (SILVA, 2015).

Desse modo, recentemente alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo elaborar novos compostos que atuem de maneira a complementar e potencializar o efeito anticárie do flúor. Dentre essas novas concepções, dentifrícios fluoretados com 1.450ppm de flúor e que têm 1,5% de arginina e cálcio insolúvel em sua composição têm sido implementados e merecem destaque (CUMMINS, 2013).

A justificativa para o uso da arginina nesses dentifrícios baseia-se na capacidade de bactérias arginolíticas, como *Streptococcus salivarius*, de catabolizar esse aminoácido (através de uma enzima denominada de *arginina deiminase*) levando à produção de amônia. O propósito da quebra da arginina em amônia por esses microrganismo não acidogênicos é de neutralizar ácidos produzidos por microrganismo acidogênicos que também compõe o biofilme e, dessa forma, preservar o meio em que estão inseridos sobre a superfície dentária em um estado favorável para aqueles não têm afinidade pelo ambiente ácido, mantendo o biofilme

compatível com um ambiente saudável após o desafio cariogênico (WIJEYEWEERA, KLEINBERG, 1989; NASCIMENTO et al., 2009).

A amônia atua como aceptora de íons hidrogênio promovendo assim um aumento do pH do biofilme neutralizando os efeitos deletérios dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano (HUANG et al., 2012; CUMMINS, 2013). Isso acarretaria numa modulação do processo de desmineralização dental, visto que haveria um maior controle do pH na interface dente/biofilme. Esse processo de conversão da arginina em amônia é mediado pelos sistemas ADS (arginina deiminase) ou pelo sistema AgDS (agmatina deiminase) presentes em bactérias arginolíticas e ureolíticas. Já o cálcio disponível no dentifrício atua como reserva iônica para ser absorvido na estrutura dental durante o processo de remineralização (SOUZA et al., 2013; YIN et al., 2013).

Nessa perspectiva, como os mecanismos de ação da arginina e fluoreto são complementares, a adição de arginina a uma base de cálcio e a um dentifrício fluoretado de 1450ppm aumentaria a eficácia anticárie em comparação com a eficácia de dentifrícios de fluoreto com a mesma concentração de flúor isoladamente (SILVA, 2015). Estudos foram realizados e demonstraram que dentifrícios contendo 1,5% de arginina e 1450ppm de flúor modulam o metabolismo do biofilme ao aumentar a produção de amônia, e que isso auxilia no processo de neutralização dos ácidos produzidos por bactérias a partir da sacarose, aumentando o pH da placa e criando um ambiente mais saudável para os dentes (CANTORE et al., 2013; WOLFF et al., 2013).

Souza e colaboradores (2013) compararam a eficácia de dois dentifrícios em paralisar e reverter lesões de cárie primária. Um desses dentifrícios continha 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1450ppm de flúor, como monofluorofosfato de sódio. O outro dentifrício como controle positivo continha apenas 1450ppm de flúor. Obteve-se uma amostra de 284 indivíduos com pelo menos uma lesão primária de cárie radicular, sendo selecionada uma lesão para cada indivíduo, sendo essa avaliada no início do estudo, após 3 e 6 meses. Ao final do estudo a amostra foi de 253, com 129 de 144 indivíduos do grupo que utilizou o dentifrício com arginina e 124 de 140 do grupo de controle positivo. Após 6 meses de uso do produto, 70,5% das lesões de cárie radicular se tornaram mais mineralizadas em indivíduos que usaram o dentifrício contendo arginina, em comparação com 58,1% para indivíduos que usaram o controle positivo. A diferença

no número de lesões de cárie radicular tornando-se endurecidas nos dois grupos foi estatisticamente significativa de forma que o dentifrício contendo 1,5% de arginina obteve eficácia estatisticamente superior em relação ao grupo que utilizou o controle positivo com 1450ppm de flúor apenas.

Em dois estudos (YIN et al., 2013; SRISILAPANAN et al., 2013) foi utilizado o método de qualificação de lesões de cáries de superfície lisa por laser-fluorescência (QLF) para medir alterações em lesões cariosas iniciais em crianças. Em ambos, demonstrou-se o dentifrício contendo 1,5% de arginina e 1450ppm de F sendo significativamente mais eficaz em reverter lesões ativas de cárie. Yin e colaboradores (2013) compararam uma formulação de dentifrício com dois dentifrícios controles; um controle positivo contendo 1.450ppm de fluoreto e um controle negativo sem fluoreto. Após seis meses de uso dos dentifrícios, melhorias da linha de base no parâmetro DQ (volume de lesão) foram 50,6%, 34,0% e 13,1% para o novo dentifrício contendo arginina, controle positivo e o dentifrício controle negativo, respectivamente. Mais uma vez, as diferenças entre o controle negativo e dois dentifrícios contendo fluoreto ($p < 0,001$), bem como as diferenças entre a nova formulação de dentifrício e o controle positivo ($p = 0,008$), foram estatisticamente significantes. Srisilapanan e colaboradores (2013) realizaram um estudo onde um dentifrício contendo arginina foi comparada com um controle positivo contendo 1.450 ppm de fluoreto. Após seis meses, o volume de lesão para o grupo de dentifrício contendo arginina apresentou uma diminuição do volume da lesão em 44,6%. Para o grupo controle positivo de fluoreto somente, o volume reduziu em 28,9% em relação à média inicial. A diferença entre o dentifrício contendo arginina 1,5% e o controle positivo com 1.450 ppm de fluoreto foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Hu e colaboradores (2013) compararam o dentifrício contendo arginina com dois dentifrícios controles; um controle positivo contendo 1450 ppm F e um dentifrício não fluoretado, como controle negativo. Após seis meses de uso, medidas clínicas de avaliação da dureza da lesão cariiosa demonstraram que apenas uma lesão (0,7%) não foi revertida no grupo do dentifrício contendo arginina em comparação a 9,0% e 18,2% dos grupos controle positivo e negativo, respectivamente. Ademais, 61,7% das lesões mostraram melhora para o dentifrício contendo arginina, 56,0% para o dentifrício fluoretado (controle positivo) e 27,0% para dentifrício não fluoretado (controle negativo), corroborando com a perspectiva de maior eficácia do dentifrício contendo 1,5 % de arginina.

Kraivaphan e colaboradores (2013) realizaram um estudo clínico duplo-cego, randomizado, de dois anos de acompanhamento com três grupos paralelos e que comparou a eficácia anticárie de três dentifrícios, um contendo 1,5% de arginina, 1,450 ppm F e um composto insolúvel de cálcio ou fosfato dicálcico (dentifrício 1); outro contendo 1,5% de arginina, 1,450 ppm F como sódio monofluorofosfato e carbonato de cálcio (dentifrício 2); e um dentifrício controle contendo 1.450 ppm F a base de sílica (dentifrício 3). Foram 6.000 participantes de Bangkok, na Tailândia e com idades entre 6 e 12 anos inicialmente, e que foram instruídos a escovar duas vezes ao dia, de manhã e à noite, com o dentifrício designado aleatoriamente. Para a avaliação, três dentistas treinados e calibrados examinaram as crianças antes e após um e dois anos de acompanhamento, por meio do índice CPO-D e CPO-S. O número de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) e as superfícies (CPO-S) para os três grupos de estudo eram muito semelhantes no início do estudo, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Após um ano, não houve diferenças estatisticamente significantes no incremento de cárie entre os grupos. Ao final de dois anos, os grupos que utilizaram os dentifrícios 1 e 2 que contém 1,5% de arginina e 1450 ppm de F em comum, obtiveram os incrementos estatísticos significativamente mais baixos de CPO-D ($p < 0,02$) (21,0% e 17,7% de redução, respectivamente) que o grupo contendo apenas 1.450 ppm de F. Em relação ao CPO-S, tanto o grupo que utilizou o dentifrício 1 e quanto o grupo que utilizou o dentifrício 2, apresentaram reduções estatisticamente significantes (16,5% e 16,5% de redução, respectivamente), quando comparado ao grupo que foi alocado o dentifrício controle. A partir disso, os resultados desse estudo apontaram que o dentifrício contendo 1,5% de arginina e 1450 ppm de fluoreto foi significativamente mais eficaz na prevenção da formação de lesões de cárie do que um dentifrício contendo apenas 1.450 ppm de F, dando suporte a concepção de que o dentifrício pode proporcionar uma proteção superior contra lesões de cárie quando sua composição é combinada a 1,5% de arginina. Apesar do incremento ter sido estatisticamente menor em relação àquele encontrado no grupo que usou dentifrício sem arginina, a relevância clínica desses achados é questionada devido ao pequeno efeito clínico observado. Em vista disso, os resultados obtidos em termos de prevenção de cárie dental após uso de dentifrício contendo arginina são questionáveis clinicamente.

Petersen et al. (2015), também testaram o efeito anticárie do dentifrício fluoretado contendo arginina em comparação ao dentifrício fluoretado sem arginina num grupo de crianças com idade entre 4 a 6 anos. O grupo de crianças que usou o dentifrício contendo arginina também recebeu orientações frequentes de higiene bucal e a escovação dental na escola era realizada de forma supervisionada. Em contraste, o grupo de crianças que usou dentifrício fluoretado sem arginina não recebeu qualquer orientação/supervisão de escovação, e ainda, dentifrício de baixa concentração de flúor também poderia ser usado por elas. Ao final de 2 anos de estudo, observou-se menor incremento de cárie no grupo que usou dentifrício fluoretado contendo arginina. Contudo, esse estudo possui viés metodológico, principalmente em relação ao inadequado grupo controle. Apesar de melhor efeito em termos de redução no incremento de cárie dental ter sido encontrado mediante uso de dentifrício fluoretado contendo arginina, o delineamento adotado pelos pesquisadores não permite excluir o efeito da orientação de higiene e supervisão de escovação recebidos pelos pacientes. Além disso, o mal desempenho do dentifrício fluoretado convencional na redução do incremento de cárie pode ter sido devido ao uso de dentifrícios de baixa concentração pelas crianças além de carência de orientação quanto à uma correta higiene bucal.

Li et al. (2015), fizeram um estudo randomizado, duplo cego, com 5.500 crianças, na Província de Sichuan na China, e teve por objetivo também comparar o efeito anti-cárie de dentifrícios fluoretados contendo ou não arginina. Após 1 ano de uso dos dentifrícios (2x/dia), não foi possível observar diferenças estatísticas nos índices CPOS e CPOD entre os grupos. Após os dois anos de acompanhamento, o CPOS e o CPOD das crianças que usaram dentifrício fluoretado contendo arginina apresentaram redução de cerca de 19,6% e 20,5%, respectivamente, quando comparados com o grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina. A revelância clínica dessa redução no desenvolvimento de cárie também tem sido questionada, uma vez que, embora as porcentagens de redução nos índices acima sejam significativas, a diferença entre os grupos foi menor do que 1 dente ou superfície acometidos por cárie.

Wolff e Schenkel (2018) relatam que a cárie dentária continua sendo uma doença mundial, apesar da distribuição global de flúor, e que isso evidenciou que a introdução de níveis significativos de açúcar (carboidrato fermentável) na dieta resultou em uma mudança no biofilme, promovendo a produção de ácido. Segundo

esses pesquisadores, houve uma mudança na microbiota do biofilme para uma flora que produz ácidos e que prospera e se reproduz nesse ambiente. A partir disso, apresentaram 8 estudos clínicos com diferentes delineamentos, medindo diferentes desfechos clínicos, para uma população diversa e mundial. Como resultado, cada um desses estudos demonstrou maior redução na formação de cárie pelo dentífrico contendo arginina do que o observado com flúor apenas, sendo que alguns apresentaram a reversão de lesões precoces de cárie. Para tanto, pesquisas clínicas significativas demonstraram que 1,5% de arginina combinada com dentífrico fluoretado tem eficácia superior contra a cárie dentária em relação ao creme dental contendo somente flúor. No entanto, dentre os conflitos de interesse, a companhia Colgate-Palmolive - detentora da marca Colgate Neutraçúca que contém 1,5% de arginina - financia atividades, consultorias e palestras do Dr. Mark Wolff, autor dessa pesquisa.

Cabezas e Fernandez (2018) relatam que numerosos estudos demonstraram a eficácia de remineralização de terapias com flúor, bem como suas limitações em alguns grupos da população. Por conseguinte, o desenvolvimento de novas terapias para repor a perda mineral das lesões cariosas têm sido uma prioridade nas últimas duas décadas. Nesse sentido, os autores citados acima realizaram uma revisão de literatura com o intuito de resumir e discutir brevemente alguns dos mais recentes avanços nas terapias de remineralização de lesões cariosas. A maioria das novas terapias tenta aumentar o efeito do flúor adicionando outros ingredientes potencialmente ativos à formulação, como cálcio, fosfato, estanho, xilitol e arginina. Para tanto, embora muitas das novas estratégias de remineralização tenham progredido significativamente nos últimos anos, para a maioria delas, as evidências ainda são insuficientes para avaliar seu verdadeiro potencial clínico.

Em demais revisões sistemáticas também é discutido o fato que os dentífricos com arginina, de modo geral, possuem um custo cerca de 40% superior em relação ao dentífrico que não possui esse aminoácido na sua composição (LI et al., 2015; ASTVALDSDOTTIR et al., 2016). Além disso, os autores abordam que não seria adequado realizar um estudo clínico no qual os indivíduos sejam privados de uso de dentífrico fluoretado, como observado no grupo controle de alguns dos estudos clínicos citados acima onde os indivíduos usaram dentífrico placebo. Ademais, considera-se prematuro dizer que a arginina quando incluída na formulação de dentífricos melhora o efeito anti-cárie do flúor, uma vez que muitos

autores das pesquisas feitas até agora fazem parte do corpo de pesquisadores da empresa que detém a patente do produto. Em razão disso, torna-se indispensável, um maior número de estudos sobre a arginina no controle da doença cárie, com menor dependência de interesses comerciais e que sejam delineados de forma independente. Apesar do nível de evidência fornecido por estudos *in situ* ser menor quando comparado aos estudos clínicos controlados e randomizados, os estudos *in situ* permitem que fatores relacionados ao desenvolvimento da lesão de cárie sejam estudados de forma mais controlada. Sendo assim, o efeito anti-cárie do flúor (tanto sob o ponto de vista de redução de desmineralização, quanto de ativação da remineralização) presente no dentifrício poderia ser potencializado o que contribuiria para avaliar o seu mecanismo de ação.

Um estudo *in situ* sugere que o dentifrício fluoretado contendo arginina apresenta potencial de inibição de desmineralização similar ao observado pelo uso de dentifrício fluoretado sem arginina (SANCHEZ et al., 2018). Nesse estudo, mesmo em condições de elevado desafio cariogênico de exposição à sacarose 8x/dia (simulando indivíduos com alto risco de desenvolvimento de cárie dental) ambos dentifrícios apresentaram o mesmo efeito em termos de redução de desenvolvimento de cárie em esmalte. Para tanto, ainda se torna necessário esclarecer se este dentifrício contendo arginina apresenta efeito benéfico em termos de ativar a remineralização do esmalte dental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na potencialização da remineralização do esmalte dental e na quantificação microbiana do biofilme dental formado in situ por um período de 14 dias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se a presença de arginina no dentifrício fluoretado exerce algum efeito no processo de remineralização do esmalte dental com lesão cáriosa, em termos de recuperação da dureza de superfície em comparação ao dentifrício fluoretado convencional;
- b) Avaliar se a presença de arginina no dentifrício fluoretado exerce algum efeito na quantidade de bactérias no biofilme dental, em termos de microrganismos totais em comparação ao dentifrício fluoretado convencional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este foi um estudo experimental *in situ* cruzado e duplo cego (em relação ao uso de dentifrício) conduzido em duas fases experimentais de 14 dias cada uma. Catorze voluntários adultos utilizaram um dispositivo intrabucal palatino em cada fase experimental contendo 4 blocos de esmalte dental bovino (2 blocos de cada lado do dispositivo) sobre os quais solução de sacarose 20% foi gotejada numa frequência de 3x/dia em horários pré-estabelecidos. O voluntário foi orientado a manter o dispositivo intra-oral fora da boca por 5 minutos após o gotejamento das soluções. Nesse momento, os dispositivos foram guardados dentro de caixas porta-aparelho. Então, o excesso de solução que eventualmente estivesse presente no dispositivo foi limpo com uma gaze e o dispositivo reinsertado na boca do voluntário.

Dois meses antes do início do estudo (período pré-experimental), os voluntários foram aleatorizados em relação ao tipo de dentifrício com o qual a escovação dental foi realizada: dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF) (DF) (Colgate Máxima Proteção Anticáries) ou dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo 1,5% de arginina (DFA)(Colgate Netraçúcar). Então, DF ou DFA foi usado 3x/dia durante esse período de 2 meses. Ao final do período pré-experimental, iniciou-se a primeira fase experimental *in situ*, durante a qual os voluntários continuaram com o uso do respectivo dentifrício fluoretado (alocado na fase pré-experimental) 3x/dia.

Ao final dessa primeira fase experimental, e considerando um desenho experimental do tipo cruzado, os voluntários usaram DF ou DFA por um período de 2 meses (wash-out) também 3x/dia. Ao final desse período de wash-out, iniciou-se a segunda fase experimental, na qual o respectivo dentifrício usado durante o wash-out também foi usado 3x/dia.

Um dos pesquisadores foi o responsável por revestir os dentifícios com uma fita adesiva branca-opaca de alta-fixação, de forma a impossibilitar sua identificação, e codificá-los para que os demais pesquisadores e os voluntários fossem incapazes de identificar qual produto está sendo usado. Ao final de cada fase experimental *in situ*, o biofilme formado sobre os blocos dentais foi coletado e analisado em relação à sua composição microbiológica (contagem de microrganismos totais e os blocos

de esmalte dental foram avaliados em relação à porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS).

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra foi composta por catorze voluntários, adultos, alunos do Programa de Pós-Graduação e do curso de graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A amostra foi escolhida por conveniência. A idade dos voluntários variou de 19 a 35 anos. O número de voluntários necessário para esse estudo foi estimado baseados em outros estudos *in situ* previamente realizados (REZENDE et al., 2017; FERNANDEZ et al., 2017; CALVO et al., 2012, VALE et al., 2011; AIRES et al., 2008).

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

3.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no presente estudo alunos da Faculdade de Odontologia, com mais de 18 anos de idade, que apresentaram condições de saúde bucal e sistêmicas favoráveis e disponibilidade para comparecerem ao local da pesquisa quando solicitados. Os voluntários também deveriam estar em bom estado de saúde geral e não apresentar doenças sistêmicas. Além disso, os voluntários não deveriam ser fumantes, não deveriam apresentar xerostomia, não deveriam utilizar qualquer tipo de aparelho ortodôntico ou que ter feito uso de medicamentos antibióticos por no mínimo dois meses anteriores ao período pré-experimental.

3.3.2 Critérios de Exclusão

Seriam excluídos do estudo aqueles indivíduos que não fossem colaborativos com a utilização dos dispositivos intrabucais e aqueles que fizessem uso de medicamentos antibióticos ou de enxaguatórios em geral a partir do período pré-experimental.

3.4 PROCEDIMENTOS E COLETA DE DADOS

3.4.1 Preparo dos Blocos de Esmalte

Os blocos de esmalte foram preparados a partir de incisivos bovinos. Foram excluídos da amostra os dentes que apresentaram fraturas na superfície externa do esmalte, bem como rachaduras e hipocalcificações. Antes do preparo dos blocos, os dentes foram submetidos à remoção de restos teciduais. Os dentes foram armazenados em uma solução de formol a 2% e pH 7,0, preparada com tampão fosfato, por um período mínimo de 30 dias para esterilização (CURY et al., 1997).

Os blocos de esmalte foram preparados com dimensões de 6mm diâmetro por 2mm de espessura. Os dentes foram seccionados 2 mm acima da junção amelocementária, para separar as coroas das raízes, através do uso de discos de carborundum acoplados em peça reta e motor de baixa rotação.

Para obtenção de um bloco de esmalte com 2 mm de altura e com maior área possível de esmalte plano, primeiramente a porção dentinária do bloco foi aplainada. Para tal, a maior área de esmalte foi fixada com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3 cm x 8 mm). A dentina foi aplainada utilizando-se lixa de granulação 320 (CARBIMET® Paper Discs – n.30-5108-320 - BUEHLER®) e politriz APL-4 AROTEC®. As dimensões dos blocos foram conferidas com auxílio de um paquímetro digital (DIGIMESS® - CHINA).

Após o aplainamento da dentina o bloco foi removido, sendo a seguir fixado novamente no centro do disco com a superfície da dentina voltada para o acrílico. Foi utilizada na politriz, baixa rotação, lixa de granulação 600, 1 peso, o tempo de 7 segundos e refrigeração a água. Após o polimento com a lixa 600, os blocos de esmalte foram submetidos ao ultrassom em água deionizada (200mL) para cada 12 blocos, durante 2 minutos. A seguir, foi colocada na politriz, baixa rotação, lixa de granulação 1200, durante 15 segundos. Novamente os blocos de esmalte foram submetidos ao ultrassom, imersos em água deionizada durante 2 minutos. Para o polimento final, foi utilizado na politriz disco de papel feltro e suspensão de diamante, baixa velocidade, por 1 minuto. Nesta fase não foi utilizada água para refrigeração, apenas uma quantidade de suspensão de diamante suficiente para umedecer totalmente o papel feltro, quantidade esta que permitiu o polimento de 12 blocos de esmalte. Após o polimento com suspensão diamantada, os blocos de

esmalte foram lavados em água deionizada corrente, durante 3 minutos. A seguir, foram submetidos ao ultrassom, durante 2 minutos, imersos em solução ULTRAMET® SONIC CLEANING SOLUTION diluída na proporção de 20:1 em água destilada. Finalmente os blocos de esmalte foram lavados em água deionizada corrente, durante 3 minutos, identificados e armazenados em recipientes plásticos fechados, com 100% de umidade, conservados em geladeira a 4°C até serem realizadas as análises de microdureza de superfície do esmalte (CURY et al., 2001).

3.4.2 Determinação da Microdureza de Superfície e Seleção dos Blocos de Esmalte

A determinação inicial da microdureza de superfície do esmalte teve o objetivo de selecionar os blocos de esmalte para o estudo e, além disso, permitir o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície após os experimentos.

Após o polimento, foi medida a microdureza superficial dos blocos de esmalte. As endentações foram feitas no centro da região planificada com o longo eixo do diamante Knoop paralelo à superfície externa do esmalte, sob um peso estático de 50 gramas, que foi aplicado por 10 segundos em microdurômetro HMV-2T (Shimadzu, Japan). A partir do centro do bloco de esmalte, 1000 µm abaixo do limite superior e 1500 µm à direita do limite esquerdo foi realizada uma endentação de referência, utilizando-se carga estática de 100 g durante 10 segundos. Foram realizadas cinco endentações em sequência, separadas entre si por uma distância de 100 µm. As leituras da diagonal maior da endentação foram transformadas no número de dureza Knoop (KHN) pela fórmula:

$$KHN = \frac{14224 \times C}{L^2}$$

KHN: número de dureza Knoop
 C= carga aplicada em gramas
 L²= comprimento da diagonal em µm

As medições de microdureza determinaram a perda ou ganho de mineral. O comprimento da endentação aumentou conforme maior foi a perda mineral.

Foram incluídos no estudo blocos de esmalte que obtiveram valores de dureza de superfície igual à média geral dos blocos com variação de 10% acima ou

abaixo da média, com o objetivo de reduzir a variabilidade nos valores referenciais de microdureza de esmalte.

3.4.3 Indução de lesão cariiosa artificial em esmalte.

Previamente à indução da lesão de cárie, uma área de aproximadamente 2 mm² da superfície dos blocos de esmalte foi recoberta com verniz de unha ácido-resistente afim de manter uma parte da superfície de esmalte hígida. Os blocos foram individualmente suspensos em tubos plásticos de 50mL (tipo Falcon) por meio de um fio de arame preso às tampas dos tubos, de forma que apenas a superfície de esmalte ficasse exposta, sendo as demais áreas protegidas com cera pegajosa. Para indução da lesão de cárie, os blocos permaneceram em solução de tampão acetato 0,05mol/L, pH 5,0, contendo 1,28 mmol/L de cálcio, 0,74 mmol/L fósforo e 0,03 µg de F/ml por 24 horas à 37°C (modificado de QUEIROZ et al., 2008 e NOBREGA et al., 2016) numa proporção de 2mL de solução para cada mm² de área de esmalte exposta.

3.4.4 Determinação da Microdureza de Superfície após a indução de lesão de cárie e Seleção dos Blocos para a etapa *in situ*

Ao final da fase de indução das lesões cariosas, a dureza de superfície dos blocos de esmalte foi novamente avaliada por meio de cinco endentações em sequência, separadas entre si por uma distância de 100 µm e distantes 100 µm das endentações iniciais. Calculou-se então a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) após a indução da lesão de cárie de acordo com a seguinte fórmula (CURY et al., 2001):

$$\% \text{ PDS} = ((\text{DC} - \text{DI}) / \text{DI}) \times 100$$

Onde:

PDS = Perda de dureza superficial

DI = microdureza de superfície inicial

DC = microdureza de superfície após indução de cárie

Foram incluídos no estudo blocos de esmalte que obtiveram valores de %PDS igual à média geral dos blocos com variação de 15% acima ou abaixo da média, com o objetivo de reduzir a variabilidade nos valores referenciais de microdureza de esmalte.

3.4.5 Confeção dos Dispositivos Intrabucais

Foram confeccionados dispositivos intrabucais palatinos removíveis, semelhantes a aparelhos ortodônticos (sem grampos de fixação), sobre o modelo de gesso da arcada superior dos voluntários. Em cada dispositivo intrabucal foram confeccionadas 2 cavidades para alocar dois blocos de esmalte medindo 14 x 8 x 2 mm, sendo 2 cavidades para cada lado do aparelho (SANCHEZ et al., 2018). Os blocos de esmalte ficaram voltados para o meio ambiente bucal livre e estarão localizados o mais perto possível dos dentes posteriores. Cada cavidade possuía 1 dos blocos de esmalte com dureza de superfície previamente determinada e com lesão artificial de cárie. Após a inserção dos blocos de esmalte nas cavidades, estes foram protegidos por uma tela plástica de forma a se ter 1,0 mm de distância entre a superfície do bloco e a tela plástica para proteção do biofilme que foi formado (HARA et al., 2003).

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Período pré-experimental

Dois meses antes do início da primeira fase experimental, os voluntários foram aleatorizados em relação ao tipo de dentifício com o qual a escovação dental foi realizada: dentifício fluoretado convencional (1450ppmF) (DF) (Colgate Máxima Proteção Anticáries) ou dentifício fluoretado (1450ppmF) contendo 1,5% de arginina (DFA) (Colgate Netraçúcar). Então, DF ou DFA foi usado 3x/dia por um período de 2 meses. A aleatorização foi realizada com uma tabela de números aleatórios fornecida pelo website OpenEpi.

3.5.2 Primeira fase experimental

Decorridos 2 meses de período pré-experimental, aos voluntários foram fornecidas orientações para a realização dos procedimentos experimentais. Cada voluntário recebeu um aparelho palatino contendo 4 blocos de esmalte dental (dispostos 2 de cada lado do dispositivo) e um frasco na cor branca, identificado com a letra “S” contendo solução de sacarose à 20%. As soluções foram fornecidas diariamente em frascos do tipo conta-gotas. A solução de sacarose 20% foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental na frequência de 3x/dia (às 08:00h, 14:00h e 19:00h) (FERNANDEZ et al., 2017).

Após o gotejamento da solução de sacarose, os voluntários secaram o excesso das soluções, quando foi necessário, com uma gaze. O dispositivo foi guardado numa caixa do tipo porta-aparelho por 5 minutos, e então foi reinserido na cavidade bucal. Os dispositivos foram utilizados durante 14 dias, por 24 horas diárias, sendo removidos apenas para gotejamento das soluções, realização da higiene bucal e alimentação.

Não foram fornecidas instruções de higiene bucal nem de dieta. Os voluntários não utilizaram nenhuma fonte adicional de flúor, além de ingestão de água de abastecimento fluoretada (0,8ppmF). Os voluntários foram orientados para escovarem os dispositivos com escova dental e dentifrício utilizado na fase experimental 3x/dia, sem encostar a escova sobre a tela plástica para evitar que o biofilme formado sobre os blocos fosse desorganizado e removido. Ao final da primeira fase experimental os voluntários receberam remoção mecânica profissional de biofilme supragengival com uso de escovas Robinson e de taças de borracha com pasta profilática e cálculo supragengival foi removido com uso de curetas.

3.5.3 Wash-out

Ao final da primeira fase experimental, teve início o período de wash-out no qual os voluntários usarão DF ou DFA de acordo com a randomização realizada no item 3.5.1. Os dentifrícios foram usados 3x/dia por um período de 2 meses.

3.5.4 Segunda fase experimental

Após o período de wash-out, novos dispositivos intra-orais foram confeccionados para cada voluntário. Quatro novos blocos de esmalte dental foram colocados em cada dispositivo, esses blocos foram recobertos com uma tela plástica e os voluntários utilizaram o dispositivo durante 14 dias. Cada voluntário recebeu um frasco na cor branca, identificado com a letra “S” contendo solução de sacarose à 20%. As soluções foram fornecidas diariamente em frascos do tipo conta-gotas. A solução de sacarose 20% (presente no frasco branco e identificada com a letra “S”) foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental da mesma forma descrita anteriormente.

Não foram fornecidas instruções de higiene bucal nem de dieta. Os voluntários não utilizaram nenhuma fonte adicional de flúor, além de ingestão de água de abastecimento fluoretada (0,8ppmF). Os voluntários foram orientados para escovarem os dispositivos com escova dental e dentifrício utilizado na fase experimental 3x/dia, sem encostar a escova sobre a tela plástica para evitar que o biofilme formado sobre os blocos fosse desorganizado e removido. Ao final da segunda fase experimental os voluntários receberam remoção mecânica profissional de biofilme supragengival com uso de escovas Robinson e de taças de borracha com pasta profilática e cálculo supragengival foi removido com uso de curetas.

3.6 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Ao final de cada fase experimental, as telas plásticas sobre os blocos de esmalte foram removidas com lâmina de bisturi número 15, e então foi coletado utilizando-se uma espátula plástica estéril. As coletas de biofilme foram sempre realizadas após uma noite de jejum. Alíquotas dos biofilmes foram imediatamente transferidas para tubos de microcentrífuga pré-pesados, estéreis e identificados com o número do voluntário e a condição experimental correspondente. O peso úmido do biofilme foi determinado utilizando-se balança analítica ($\pm 10 \mu\text{g}$) e o biofilme foi ressuspensionado em 1mL de solução salina estéril e essa suspensão foi utilizada para determinação microbiológica.

3.7 ANÁLISES

3.7.2 Análise Microbiológica do Biofilme

Após a resuspensão do biofilme em 1 mL de solução salina estéril, uma alíquota foi coletada e seriadamente diluída. A seguir, duas gotas de cada diluição foram semeadas em meio ágar Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de sangue de carneiro na concentração final de 5% para crescimento de microorganismos totais. As placas de BHI foram incubadas a 37°C em microaerofilia durante 48 horas. Depois desse período houve a contagem das unidades formadoras de colônias com auxílio de um estereomicroscópio. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônia por miligrama (UFC/mg).

3.7.3 Determinação da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS)

Após o término dos experimentos, foi medida a microdureza superficial final dos blocos de esmalte com dureza de superfície previamente determinadas (2 blocos por voluntário). Foram realizadas 5 endentações (após o tratamento com DF ou DFA), localizadas 100 µm à esquerda das endentações previamente realizadas com carga de 50g, por 10 segundos. A partir do valor médio das 5 endentações de cada bloco foi calculada a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS) para cada voluntário em cada uma das fases experimentais *in situ*. A porcentagem de recuperação de dureza de superfície foi calculada pela seguinte fórmula (CURY et al., 2004):

$$\%RDS = ((DF - DC) / (DI - DC)) \times 100$$

Onde:

RDS = Recuperação de dureza de superfície

DF: Microdureza de superfície final após fase *in situ*

DC: Microdureza de superfície após indução de lesão de cárie

DI: Microdureza de superfície inicial

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias, medianas, erro-padrão, intervalos de confiança e quartis 25 e 75 para as variáveis em estudo (%RDS e contagem de microrganismos totais) foram calculados em cada uma das condições testadas e analisados estatisticamente. Os dados de microrganismos totais (MT Log UFC/mg) foram transformados em logaritmo. Os dados foram analisados usando a Equação de Estimativa Generalizada (GEE). O software Statistical Package for Social Science v.18 (SPSS, PASW Statistics for Windows; SPSS inc., Chicago, IL, USA) foi usado para a análise estatística e o nível de significância foi de 5%. Todas as análises foram feitas com base nos dados obtidos de cada voluntário, em cada fase.

5 RESULTADOS

Os resultados da Tabela 1 sugerem que as contagens de microrganismos totais nos biofilmes foram estatisticamente iguais entre os diferentes dentifrícios ($p>0,05$). Além disso, não foi observada diferença estatística na %RDS entre os dentifrícios fluoretados convencional e contendo arginina ($p>0,05$).

Tabela 1. Contagem de microrganismos totais (MT) e porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS) nos blocos de esmalte de acordo com o tipo de dentifrício:

Variáveis	Tipo de dentifrício							
	DF				DFA			
	Média (EP)	Mediana (quartil 25/75)	95% IC	n	Média (EP)	Mediana (quartil 25/75)	95% IC	n
MT (log UFC/mg)	6,46 (0,21)	6,85 (6,14/7,03)	(6,01 - 6,91)	13	5,88 (0,51)	6,26 (5,63 - 6,93)	(4,79 - 6,97)	1 4
%RDS	24,09 (4,25)	19,64 (10,33 - 42,12)	(14,91 - 33,27)	14	26,82 (4,25)	20,56 (13,12/41,96)	(16,98 - 36,67)	1 4

IC: Intervalo de Confiança de Wald (95%); DF: Dentifrício fluoretado convencional; DFA: Dentifrício Fluoretado contendo arginina.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo *in situ* demonstrou que o dentifrício convencional com 1450ppm de flúor e o dentifrício com 1,5% de arginina e 1450ppm de flúor apresentaram efeito remineralizador semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa e, não sendo, dessa forma, promovido efeito adicional no processo de remineralização pelo o dentifrício contendo 1,5% de arginina. Nóbrega e colaboradores (2016) avaliaram o efeito do dentifrício fluoretado no processo de remineralização. Nesse estudo cruzado, duplo-cego, *in situ*, realizado em 4 fases de 14 dias cada, 18 voluntários utilizaram aparelhos palatinos contendo blocos de esmalte e dentina, cariados e não cariados. O acúmulo de biofilme na superfície bloco foi possibilitada, e uma solução de sacarose a 20% foi gotejada 3 e 8 vezes por dia nos blocos cariados e nos blocos não cariados, respectivamente. Os voluntários usaram dentifrício fluoretado (1.100 µg F / g) nas frequências 0 (dentifrício com flúor-placebo), 1, 2 e 3 vezes por dia. A remineralização ocorrida nos blocos cariados foi estimada pela porcentagem de recuperação de dureza de superfície (% SHR). Para tanto, como resultado desse estudo, obteve-se, aproximadamente, 30% de ganho de minerais com a utilização do dentifrício fluoretado. Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo quando foi utilizado dentifrício fluoretado convencional, mostrando que o modelo é reproduzível e que pode ser utilizado com o propósito de se avaliar a remineralização da superfície de blocos de esmalte.

Sanchez e colaboradores (2018) ressaltam que estudos *in situ* com exposição frequente à sacarose favorecem o processo de desmineralização. Isso se deve ao fato que, apesar do carbonato de cálcio presente no dentifrício contendo arginina fornecer íons de cálcio livres que atuam como reservatório e auxiliam na paralização e na reversão da cárie dentária, aumentando o grau de saturação mineral de saliva e fluido de biofilme, as quedas frequentes de pH produzidas pela exposição sucessiva a desafios cariogênicos somada ao acesso limitado a saliva com os dispositivos palatais, acarretam dificuldades para o processo de remineralização

Dois estudos clínicos de longa duração (2 anos) mostram efeito anti-cárie superior do dentifrício contendo arginina quando comparado ao dentifrício convencional sem arginina. Embora tenha apresentado efeito anti-cárie superior

com o uso de dentifrício com arginina 1,5%, o incremento de cárie encontrado na presença de dentifrício com arginina foi muito próximo do encontrado na presença de dentifrício fluoretado convencional, além de apresentarem resultados clínicos questionáveis. O estudo de Kraivaphan e colaboradores (2013), comparou a eficácia anti-cárie de três dentifrícios, um contendo 1,5% de arginina, 1,450ppm F e um composto insolúvel de cálcio ou fosfato dicálcico; outro contendo 1,5% de arginina, 1,450ppm F como sódio monofluorofosfato e carbonato de cálcio; e um dentifrício controle contendo 1.450ppm F a base de sílica. Ao final do acompanhamento de dois anos, os indivíduos que usaram os dentifrícios com 1,5% de arginina em sua composição, obtiveram incrementos estatísticos significativamente mais baixos de CPO-D ($p < 0,02$), com reduções de 21,0% e 17,7%, respectivamente, em relação ao grupo contendo apenas 1.450ppm de F. Quanto ao CPO-S, os grupos que fizeram uso dos dentifrícios com 1,5% de arginina apresentaram reduções estatisticamente significantes de 16,5% quando comparados ao grupo que foi alocado o dentifrício controle. Os resultados desse estudo apontaram que o dentifrício contendo 1,5% de arginina e 1450ppm de fluoreto teve significativamente mais eficácia na prevenção da formação de lesões de cárie do que um dentifrício contendo apenas 1.450 ppm de F. No entanto a relevância clínica desses achados é questionada devido ao pequeno efeito clínico observado. Em outro estudo, de Petersen et al. (2015), também foi realizado teste referente ao efeito anti-cárie do dentifrício fluoretado contendo arginina em comparação ao dentifrício fluoretado sem arginina num grupo de crianças com idade entre 4 a 6 anos. O nível de significância estatística foi $p < 0,05$. O grupo de crianças que usou o dentifrício contendo arginina recebeu orientações frequentes de higiene bucal e a escovação dental na escola era realizada de forma supervisionada. Em contraste, o grupo de crianças que usou dentifrício fluoretado sem arginina não recebeu qualquer orientação/supervisão de escovação, e ainda, dentifrício de baixa concentração de flúor também poderia ser usado por elas. Ao final de 2 anos de estudo, observou-se menor incremento de cárie no grupo que usou dentifrício fluoretado contendo arginina. Em relação ao número de dentes com lesões de cárie em esmalte e dentina, a redução do incremento foi de 12,6% ($p=0,005$). O percentual de incremento reduziu 26,9% para dentes com lesões de cárie apenas em esmalte ($p=0,005$). O número de superfícies dentárias com lesões de cárie em esmalte e dentina teve redução em seu incremento de 16,8% ($p=0,001$), e para superfícies com lesões de cárie apenas em

esmalte a redução foi de 34,1% ($p=0,001$). No entanto, o delineamento adotado pelos pesquisadores não permite excluir o efeito da orientação de higiene e supervisão de escovação recebidos pelos pacientes.

Yin e colaboradores (2013) realizaram um estudo clínico comparando a eficácia do dentifrício com 1450 ppm de flúor com o dentifrício com 1,5% de arginina, um composto insolúvel de cálcio e 1450ppm de flúor, em relação a paralisação e reversão de lesões cáries em 438 crianças chinesas. O método de fluorescência induzida por luz quantitativa (QLF) foi utilizado para avaliar lesões de cárie bucal no início e após 3 e 6 meses de uso do produto. Esse estudo demonstrou eficácia estatisticamente superior do dentifrício contendo arginina em paralisar e reverter lesões de cárie comparado ao dentifrício convencional contendo 1450ppm de flúor apenas. Em um estudo clínico, duplo cego, randomizado (LI et al., 2015), também foi comparada a eficácia anti-cárie de dois dentifrícios, um contendo 1,5% de arginina, 1450ppm e cálcio insolúvel, e o outro um dentifrício com 1450ppm apenas. Esse estudo teve acompanhamento de 2 anos. O grupo que utilizou o dentifrício que continha arginina apresentou superior eficácia de proteção contra cáries em relação ao dentifrício com somente 1450ppm de flúor. Em 2013, Cummins também demonstrou superioridade do mecanismo de proteção contra cárie em dentifrícios acrescidos de arginina em relação aos convencionais. O autor relata em sua revisão que a arginina vem sendo identificada para prevenção do desenvolvimento e progressão de lesões de cárie, reduzindo os fatores patológicos do biofilme dental. Hu e colaboradores (2013) também atestaram a perspectiva de maior eficácia do dentifrício contendo 1,5% de arginina na paralisação de lesões cáries radiculares, realizando-se um estudo comparativo entre um dentifrício contendo arginina e dois dentifrícios controles: um controle positivo contendo 1450 ppm F e um dentifrício não fluoretado, como controle negativo, após 6 meses de uso. Os resultados demonstraram que apenas uma lesão (0,7%) não foi revertida no grupo do dentifrício contendo arginina em comparação a 9,0% e 18,2% das lesões presentes nos grupos controle positivo e negativo, respectivamente. Ademais, 61,7% das lesões mostraram melhora para o dentifrício contendo arginina, 56,0% para o dentifrício fluoretado (controle positivo) e 27,0% para dentifrício não fluoretado (controle negativo).

Cantore e colaboradores (2013), realizaram três estudos *in situ* onde foi avaliada a eficácia de dentifrícios contendo 1,5% de arginina, um composto de cálcio

insolúvel e flúor em sua capacidade de promover a remineralização do esmalte desmineralizado e evitar a perda mineral de amostras de esmalte. Também foram analisados os efeitos no metabolismo do biofilme com relação à conversão de arginina em amônia e sacarose em ácido láctico. No Estudo 1, um modelo clínico de remineralização / desmineralização intra-oral foi utilizado para avaliar a capacidade de promover remineralização do esmalte de dois dentifrícios contendo 1,5% de arginina e 1450 ppm de flúor, como o monofluorofosfato de sódio (MFP), em relação ao controle positivo com dicálcio fosfato di-hidratado (Dical) e 1450 ppm de fluoreto, e um controle negativo com Dical e 250 ppm de fluoreto. Um dos dentifrícios com arginina continha Dical e o outro continha carbonato de cálcio como fonte de cálcio insolúvel. Microrradiografia e análise de imagens foram usadas para medir as mudanças minerais. O estudo utilizou um desenho cruzado duplo-cego, com um período de experimento de duas semanas. Cada período de tratamento foi precedido por um período de wash-out de uma semana. Cada produto foi usado duas vezes ao dia por duas semanas. Nos outros dois estudos, a capacidade dos dentifrícios contendo 1,5% de arginina e flúor para prevenção da desmineralização dos blocos de esmalte foi avaliada usando um modelo clínico de desmineralização / remineralização intraoral e um desenho cruzado duplo-cego com um período de tratamento de cinco dias. Um período de wash-out mínimo de uma semana precedeu cada fase de tratamento. A microdureza foi usada para avaliar as mudanças minerais. Os desafios cariogênicos foram procedidos mergulhando-se cada retentor intraoral em uma solução de 10% de sacarose quatro vezes por dia. Cada dentifrício foi usado duas vezes por dia durante o período de tratamento. O biofilme dental formado foi recolhido dos espécimes para medir sua capacidade para converter arginina em amônia (Estudos 2 e 3) e sacarose em ácido láctico (Estudo 3) no final de cada período de tratamento. No Estudo 2, um dentifrício contendo 1,5% de arginina, Dical e 1450 ppm de fluoreto como MFP foi comparado com um controle positivo combinado contendo 1450 ppm de fluoreto e com um controle negativo correspondente contendo 250 ppm de fluoreto. No Estudo 3, um dentifrício contendo 1,5% de arginina, carbonato de cálcio e 1000 ppm de fluoreto como MFP foi comparado com um controle positivo combinado contendo 1000 ppm de fluoreto e com um controle negativo correspondente contendo 0 ppm de fluoreto. Como resultados, no Estudo 1, as alterações minerais percentuais mostraram os dois produtos teste contendo arginina foram estatisticamente significativamente melhores

do que o controlo positivo ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada na eficácia dos dois produtos, indicando que a eficácia na promoção da remineralização foi independente da escolha de cálcio ou carbonato de cálcio como fonte de cálcio insolúvel. Nos Estudos 2 e 3, foi demonstrado que o dentifrício contendo arginina mostrou ser estatisticamente significativamente melhor na prevenção da desmineralização do esmalte do que o controle positivo. Os resultados dos três estudos mostram que estes dentifrícios contendo arginina 1,5%, um composto de cálcio insolúvel, e fluoreto tem uma capacidade significativamente melhorada para promover a remineralização e desmineralização do esmalte em relação a dentifrícios com a mesma percentagem de flúor apenas. Duas fontes diferentes de cálcio insolúvel foram avaliadas, Dical e carbonato de cálcio, e para ambas, uma em combinação com 1,5% de arginina e fluoreto, proporcionou uma eficácia superior, em relação ao dentifrício que apresentava apenas o fluoreto, e os dois produtos demonstraram eficácia na promoção da remineralização. Os resultados destes estudos demonstram que a adição de 1,5% de arginina para fluoreto de base Dical ou carbonato de cálcio, fornece eficácia superior na prevenção da desmineralização e promoção da remineralização, além de indicar que dentifrícios contendo arginina aumentam a capacidade do biofilme de metabolizar a arginina em amônia.

Apesar da literatura reportar eficácia superior do dentifrício com 1,5% de arginina, Li et al. (2015) e Ástvaldsdóttir et al. (2016) relatam em suas revisões sistemáticas que grande parte dos estudos foram realizados por autores que fazem parte do corpo de pesquisadores da empresa que detém a patente do produto, apresentando recorrentes conflitos de interesses e que idealmente esses estudos deveriam ser independentes de interesses comerciais. Além disso, também nas revisões sistemáticas de Li et al. (2015) e Ástvaldsdóttir et al. (2016) é mencionado que, em muitos estudos, os voluntários são privados do uso de dentifrícios fluoretados, fazendo uso de dentifrícios placebo, o que não é indicado para uma adequada comparação de eficácia, posto que o dentifrício livre de fluoretos não possui eficácia na prevenção e tratamento de lesões cariosas. Esses autores também relatam que os estudos deveriam ser mais rigorosos em sua metodologia. A maioria dos estudos clínicos publicados usa o método de fluorescência QLF para quantificar as lesões de cárie. Esse método apresenta algumas limitações, como relatado por Saches et al. (2018), onde na análise de lesões incipientes foram

encontradas diferenças clínicas pequenas quando avaliado profundidade e volume da lesão em esmalte, pondo em questão sua significância clínica para essas lesões, que por outro lado, apresentaram resultados clínicos similares a outros estudos prévios quando avaliadas pelo método de ensaio de dureza superficial para análise da perda mineral de superfície (PAES LEME et al., 2004; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007), sugerindo que o método de ensaio de dureza superficial é mais o apropriado para avaliar lesões incipientes.

Além de induzir uma maior atividade do sistema arginina-deiminase, o uso prolongado de arginina também induz alterações microbianas na cavidade bucal, levando à seleção de uma comunidade microbiana mais saudáveis como as espécies bacterianas arginolíticas *S. sanguinolinis* e *S. gordonii* (NASCIMENTO et al., 2014). A quebra da arginina em amônia por bactérias argenolíticas neutraliza os ácidos produzidos por microrganismo acidogênicos como o *S. mutans*, que também compõem o biofilme e provem, desse modo, a preservação do meio em que estão inseridos sobre a superfície dentária em um estado favorável para aqueles não têm afinidade pelo ambiente ácido, mantendo o biofilme compatível com um ambiente saudável após o desafio cariogênico (WIJEYEWEERA, KLEINBERG, 1989; NASCIMENTO et al., 2009).

Cantore et al. (2013) e Wolff et al. (2013) demonstraram que a presença de arginina no dentifício modula o metabolismo do biofilme ao aumentar a produção de amônia, e que isso auxilia no processo de neutralização dos ácidos produzidos por bactérias a partir da sacarose, aumentando o pH da placa e criando um ambiente mais saudável para os dentes. Existe um equilíbrio dinâmico com as defesas do hospedeiro e as comunidades microbianas colonizadoras que, de modo geral, se expressam em níveis compatíveis com saúde bucal. Há uma forte correlação entre a alterações da composição microbiana do biofilme a transição para o estado de doença da cárie dentária. (MARSH, 1994; BRADSHAW, MARSH, 1997). No entanto, no presente estudo, a contagem total de microrganismos foi semelhante para ambos os grupos e, em vista disso, se houve alteração qualitativa do biofilme, não foi possível detectá-la. Dentre as razões pode estar o fato de terem ocorrido seguidos desafios cariogênicos devido à exposição regular à sacarose, que promoveu frequentes quedas de pH que produziram um ambiente constantemente ácido. Isso foi demonstrado previamente no estudo de Sanches et al. (2018), onde os constantes desafios de baixa de pH não permitiram uma alteração para um biofilme

menos cariogênico, sendo mantida a prevalência de microrganismos acidogênicos. Em contrapartida, alguns estudos que avaliam essas alterações, como o de Nascimento et al. (2014), relacionam apenas a introdução de arginina no ambiente bucal, sem o acréscimo de desafios cariogênicos nesse desenvolvimento. Sendo assim, parece que em condições de cariogenicidade produzida pelos frequentes desafios ácidos na cavidade bucal podem ter se sobreposto à qualquer alteração microbiológica qualitativa que fosse capaz de reduzir o potencial cariogênico do biofilme e de viabilizar a remineralização dos blocos com lesão artificial de cárie.

7 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que a presença de arginina no dentifrício não potencializa seu efeito remineralizador quando comparado ao dentifrício fluoretado convencional. Ainda, não foram observadas diferenças nas contagens de microrganismos totais nos biofilmes formados na presença ou ausência de arginina.

REFERÊNCIAS

- AIRES, C.P. et al. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. **Caries Res.** v. 40, p. 28–32, 2006.
- AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res.**, v. 42, no. 5, p. 380-386, 2008.
- ÁSTVALDSDÓTTIR, A., et al. Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. **Caries Research. Basel**, v. 50, no. 4, p. 383–393, 2016.
- BJORNDAL, L.; MJÖR, I.A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries-Characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence International**, v. 32, no 9, p. 717-736. Oct. 2001.
- BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.** v. 13, p. 126–131, 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. SB Brasil 2010. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal.** Resultados Principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BROADBENT, J.M.; THOMSON, W.M.; POULTON, R. Progression of dental caries and tooth loss between the third and fourth decades of life: a birth cohort study. **Caries Res.**, v. 40, no. 6, p. 459-465, 2006.
- BURT, B.A. et al. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. **Journal of Dental Research**, v. 67, no. 11, p. 1422-1429. Nov. 1988.
- CABEZAS, C. G.; FERNÁNDEZ, C. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. **Advances in Dental Research.**, v. 29, p. 55-59, 2018.
- CALVO, A.F.B. et al. Effect of acidulated phosphate fluoride gel application time on enamel demineralization of deciduous and permanent teeth. **Caries Res.**, v, 46, p. 31-37. 2012.
- CANTORE, R. et al. *In situ* effects of a new dentifrice containing 1,5% arginine and 1450ppm fluoride on enamel de – and remineralization and plaque metabolism. **Journal of clinical dentistry.**, v. 24 (spec. Iss. A): A32-44, 2013.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A. et al. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, v. 41, p. 9–15, 2007.

CHAKRABORTY, B; BURNE, R. Effects of Arginine on Growth, Virulence Gene Expression, and Stress Tolerance by *Streptococcus mutans*. Applied and Environmental Microbiology. **Journal Article**. May 2017. No prelo.

COCHRANE, N.J. et al. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. **J Dent Res**. v. 89, p. 1187-1197, 2010.

CUMMIS, D.; BOWEN, W.H. Biotechnology in oral care. In: Lad R. **Cosmetic science and technology series**: Biotechnology in personal care. New York: Taylor and Francis, p. 323–352. 2006.

CUMMINS, D. et al. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century- the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. **The journal of clinical dentistry**. Carolina do Norte, v. 24, Spec. no. A: A1 – 14, 2013.

CURY, J. A, REBELLO, M.A., DEL BEL CURY, A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**. v. 31, p. 356-360, 1997.

CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: **BARATIERI, L.N. et al. Odontologia restauradora**. São Paulo: Santos, p.33-68, 2001.

CURY, J.A. et al. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Brazilian Dental Journal**. v.15, p.167–174, 2004.

CURY, J. A., TENUTA, L. M. A. How drinking water or dentifrice maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. **Adv. Dent. Res**. v. 20, p. 13-16, 2008.

CURY, J.A.; SEILS, J.; KOO, H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. **Braz Oral Res.**, v. 22, no. 3, p. 216-22, July/Sept. 2008.

CURY, J.A. et al. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dental Materials**, v. 32, no. 3, p. 323-333. 2016.

DUSCHNER, H.; GÖTZ, H.; OGAARD, B. Fluoride-induced precipitates on enamel surface and subsurface areas visualised by electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, p. 466-472. 1997.

FEATHERSTONE, JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 27, no. 1, p. 31-40, Feb. 1999.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005.

FEJERSKOV, O. et al. Pathology of dental caries. In **Dental Caries** - The disease and its clinical management. 2. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. 640 p.

FERNANDEZ, C.E. et al. Effect of 5,000 ppm Fluoride Dentifrice or 1,100 ppm Fluoride Dentifrice Combined with Acidulated Phosphate Fluoride on Caries Lesion Inhibition and Repair. **Caries Res.**, v. 51, p.179–187. Feb. 2017.

FURE, S. Ten-year incidence of tooth loss and dental caries in elderly Swedish individuals. **Caries Res.**, v. 37, no. 6, p. 462-469, 2003.

HARA, A. T. et al. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. **Caries Res.**, v. 37, p. 339–344, 2003.

HU, D.Y. et al. A clinical investigation of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1,450ppm fluoride, as sodium monofluorophosphate in a calcium base, on primary root caries. **J Clin Dent.**, v. 24, p. A23–A31, 2013.

HUANG, X.; EXTERKATE, R.A.M.; ten Cate, J.M. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. **J Dent Res.**, v.12, p. 1130-1134, 2012.

KASSEBAUM, N.J. et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. **Journal of Dental Research**, v. 94, no. 5, p. 650–658. March, 2015.

KEYES, P.H. Recent advances in dental caries. Bacteriological finding and biological implications. **Int. Dente. J.**, v. 12, no. 4, p. 443-464, Dec. 1962.

KRAIVAPHAN, P. et al. Two-Year Caries Clinical Study of the Efficacy of Novel Dentifrices Containing 1.5% Arginine, an Insoluble Calcium Compound and 1,450 ppm Fluoride. **Caries Research Basel**, v. 47, no. 6, p. 583–590, 2013.

KRASSE, B.O. Risco de cárie. In:____. **Guia prático para controle e assessoramento**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 1988.

LI, X., et al. Randomized clinical trial of the efficacy of dentifrices containing 1,5% arginine, an insoluble calcium compound and 1450 ppm fluoride over two years. **The journal of clinical dentistry**, v. 26, no. 1, p. 7–12, 2015.

LIU, Y.L.; NASCIMENTO, M; BURNE, R. A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. **International Journal of Oral Science**. Bangalore, v. 4, no. 3, p. 135–140, 2012.

LIMEBACK H. et al. Canadian Consensus Conference on the appropriate use of fluoride supplements for the prevention of dental caries in children. **J Can Dent Assoc.** v.64, no. 9, p. 636-639, 1998.

LYNCH, R.J.M.; NAVADA, R.; WALIA, R. Low levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the de-mineralization and re-mineralization of enamel: role of fluoride toothpastes. **International Dental Journal.**, v.5 (Suppl. 1), p. 304–309, 2004.

MANJI, F.; FEJERSKOV, O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 69, no. 2 (Suppl.), p. 733–741. Feb. 1990.

MARINHO, V.C.C. et al. One topical fluoride (toothpastes, or mouthrinses, or gels, or varnishes) versus another for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Data base of Systematic Reviews**. 2004.

MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res.**, v. 8, p. 263-271, July, 1994.

MASH, P.H.; BRADSHAW, D.J. Physiological approaches to the control of oral biofilm. **Adv Dent Res.**, v. 11, p. 176-185, 1997.

MARSH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.149 (Pt 2), p. 279-294, 2003.

NARVAI, P.C. et al. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. **Rev. Panam. Salud. Publica**. Washington, v. 19, n. 6, p. 385–393, Jun. 2006.

NASCIMENTO, M.M.; GORDAN, V.V.; GARVAN, C.W.; BROWNGARDT, C.M.; BURNE, R.A. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, p. 89-95, 2009.

NASCIMENTO, M.M. et al. The effect of arginine on oral biofilm communities. **Mol Oral Microbiol.**, v. 29, p. 45–54, 2014.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. 2ed. São Paulo: Ed Santos. 1988.

NÓBREGA, D.F. et al. Frequency of Fluoride Dentifrice Use and Caries Lesions Inhibition and Repair. Piracicaba. **Caries Res.**, v. 50, p.133–140, 2016.

PAES LEME, A.F. et al. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **J Dent Res.**, v. 83, p. 71–75, 2004.

PAES LEME, A.F.: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **J Dent Res.**, v. 85, p. 878–887, 2006.

PAGE, D.J.A study of the effects of fluoride delivered from solution and dentifrice on enamel de-mineralization. **Caries Research**, v. 25, p. 251–255, 1991.

PETERSEN, P.E., et al. School-based interventions for improving the oral health of children in southern Thailand. **Community Dent Health**, v. 32, no. 1, p.44–50, 2015.

REZENDE, G. et al. Cariogenic potential of sucrose associated or not with maltodextrin on dental enamel. **Caries Res.**, v. 51, p.129–135, 2017.

ROLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res.**, v. 97, p. 115-119, 1989.

SANCHEZ, A.Y. et al. *In situ* Effect of Arginine-Containing Dentifrice on Plaque Composition and on Enamel Demineralization under Distinct Cariogenic Conditions. **Caries Res.**, v. 52, no. 6, p. 588–597, 2018.

SINGLA, D. et al. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque of Indian Pre-School Children Using PCR and SB-20M Agar Medium. **J Clin Diagn Res.**, v. 10, no. 11, p. ZC60–ZC63, Nov. 2016.

SILVA, A.F.; BRIZON, V.S.C. Dentifrícios fluoretados contendo arginina e cárie dental: revisão de literatura. **Dissertação-UEC**. Piracicaba, 2015.

SOUZA, M.L.R., et al. Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. **Journal of Dentistry.**, v. 41, Suppl. 2, p. 35S–41S, Aug. 2013.

SREEBNY, L.M. The sugar-caries axis. **International Dental Journal**, v. 32, no. 1, p. 1-12. Mar.1982.

SRISILAPANAN, P., et al. Comparison of efficacy of a dentifrice containing 1,5% arginine and 1450ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using quantitative light-induced fluorescence. **Journal dentistry.**, v. 41, no. 2, p. 29–34, 2013.

TEN CATE, J.M. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **Eur J Oral Sci.** v. 105, p. 461–465, 1997.

THOMAS, R.Z.; ZIJNGE, V.; CIÇEK, A.; DE SOET, J.J.; HARMSEN, H.J.M.; HUYSMANS, M.C.D.N.J.M. Shifts in the Microbial Population in Relation to *in situ* Caries Progression. **Caries Res.** v. 46, p. 427–431, 2012.

VALE, G.C. et al. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Res.** v. 41, p. 406–412, 2007.

VALE, G.C. et al. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 90, no. 1, p. 77 – 81. Oct. 2010.

WIJEYEWEERA, R.L.; KLEINBERG, I. Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque in vitro. **Arch Oral Biol.**, v. 34, no. 1, p. 43-53,1989.

WOLFF M, CORBY P, KLACZANY G: In vivo effects of a new dentifrice containing 1.5% arginine and 1,450ppm fluoride on plaque metabolism. **J Clin Dent.**, v. 24, p. 45–54, 2013.

WOLFF, M.; SCHENKEL, A.B. The Anticaries Efficacy of a 1.5% Arginine and Fluoride Toothpaste. **Advances in Dental Research.**, v. 29, p. 93-97, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease.** 2004.

YIN, W., et al. The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). **Journal dentistry**, v. 41, no. 2, p. 22–28, 2013.