

Francyenne Maira Castro Gonçalves

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE TRATAMENTOS COM
FOSFOPEPTÍDEO DE CASÉINA - FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO E
TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO SOBRE A DESMINERALIZAÇÃO E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE: ESTUDOS *IN VITRO***

Araçatuba – SP
2020

Francyenne Maira Castro Gonçalves

Francyenne Maira Castro Gonçalves

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE TRATAMENTOS COM FOSFOPEPTÍDEO DE CASEÍNA - FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO E TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO SOBRE A DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE: ESTUDOS *IN VITRO*

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

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

Coorientador: Prof^o. Titular. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP
2020

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Gonçalves, Francienne Maira Castro.

G635e Efeito da associação de tratamentos com fosfopeptídeo de caseína- fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização e remineralização do esmalte: estudos in vitro / Francienne Maira Castro Gonçalves. –
Araçatuba, 2020
103 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Marcelle Danelon

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Esmalte dentário 2. Fluoretos 3. Fosfatos I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Francyenne Maira Castro Gonçalves

Nascimento	22.03.1993 – Ribeirão Preto- SP
Filiação	Anderson Gambassi Gonçalves Regivânia Castro Sousa Gonçalves
2013/2017	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.
2014/2017	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica
2018/2020	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. IADR- International Association for Dental Research.

Dedicatória

Francienne Maira Castro Gonçalves

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Anderson e Regivânia**

Que não mediram esforços para que eu pudesse realizar o meu sonho. Devo tudo a vocês, se cheguei até aqui foi porque vocês vieram segurando a minha mão, me doando amor e confiança na certeza de que todos os esforços valeriam a pena no final. Minha eterna gratidão e todo o meu amor as duas pessoas mais importantes da minha vida, palavras são poucas para expressar a gratidão que eu tenho por vocês.

Agradecimentos Especiais

Francienne Maira Castro Gonçalves

A Deus

Que iluminou meu caminho e minha vida nesta jornada, que me deu saúde e força para superar as dificuldades, sem ele nada seria possível.

Ao meu noivo Gustavo,

Obrigada por compartilhar todos esses anos comigo, por estar ao meu lado em todos os momentos, por fazer do meu sonho, nosso sonho. Essa conquista também é sua, que não poupou esforços para que o sorriso que hoje tenho no rosto fosse possível, que nos dias de fracasso sempre esteve ao meu lado e me incentivou a continuar. Obrigada por ser minha fortaleza e pelo amor dedicado a mim.

Às minhas irmãs Chayenne, Lohayenne, Rayenne,

A vocês eu agradeço por sempre serem meu apoio e fortaleza, se cheguei até aqui é porque sempre tive em vocês o apoio para continuar e acreditar, e com a certeza de que essa vitória não é só minha e sim nossa, pois sem vocês nada disso faria sentido algum. Em especial a você Chay, que além de uma irmã maravilhosa, é com certeza aquela melhor amiga que sempre estava ali pronta para me ajudar, aconselhar, socorrer e apoiar, essa vitória é nossa. Eu amo vocês.

A minha sobrinha Lorena,

Você foi um presente para nossa família, desde seu nascimento, todos dias são dias de felicidade. Nossa pequena, amor da vida da madrinha. Leonardo e Lohaynne, obrigada por me darem esse presente lindo e entenderem tão bem toda minha ausência. Amo vocês.

A toda família e amigos,

Obrigada pela força, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Vocês são tudo para mim, obrigada por fazerem parte da minha vida.

*“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo para si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre desde cedo aprender a reconhecer a sua voz
É sobre o amor infinito que sempre existiu entre nós
É saber que vocês estão comigo nos momentos
Que eu mais preciso para me acompanhar
Então fazer valer a pena
Cada verso daquele poema sobre o que é amar”*

Ana Vilela

*A minha querida Orientadora,
Professora Dra. Marcelle Danelon,*

Ao celebrar o final desta longa caminhada, quero prestar minha homenagem a você, que além de orientadora se tornou uma grande amiga. Que compartilhou suas experiências e seu saber. Que se dedicou a transmitir-me uma das maiores virtudes que se pode ter: o conhecimento. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos colaboraram para que eu fosse além dos meus medos e limites. Você me ensinou a aprender, a refletir, a pesquisar, a decidir e interrogar... mostrou-me um caminho que não tem fim, meu muito obrigada.

*Ao meu Coorientador,
Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem*

Por toda a colaboração durante a execução do trabalho, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar. A sua contribuição é essencial para concretização de todas as pesquisas desenvolvidas neste programa de pós-graduação. Muito obrigada!

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria,

Ao Professor Robson Frederico Cunha, obrigada por transmitir toda sua experiência e conhecimento, ao Professor Juliano Pelim Pessan, por toda a ajuda na condução do meu trabalho, a Professora Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar, por todo o conhecimento compartilhado, Professora Cristiane Duque, por estar sempre pronta a nos ajudar.

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos
gigantes”*

Isaac Newton

Aos Meus Queridos amigos,

Priscila e Igor,

Pri, obrigada por ter se tornado minha grande amiga e parceira, tenho muito orgulho de você e toda sua caminhada até aqui, sua força de vontade me impressionam e sua amizade e companhia me faz bem. Igor, obrigada por ser um amigo tão dedicado e presente, ter te conhecido e convivido com você foi um presente para mim. Levarei vocês dois para sempre em meu coração, foi com vocês que sorri e comemorei dias bons, chorei e desabafei os dias ruins, ter vocês todos os dias comigo, tornou essa jornada bem mais fácil. Amo vocês.

Nayara,

Obrigada por me ajudar em tudo desde o início dessa jornada, por ter tido paciência todas vezes que eu precisei de você e por ter participado ativamente para que esse trabalho fosse concluído com sucesso. Tenho muito orgulho de fazer parte do team Danelon e sei que seu futuro será de muito sucesso. Conte sempre comigo Nay.

Aos amigos da pós-graduação,

Aos amigos Sara, Mayra, Heitor, Renan e Gabriel por serem tão presentes e importantes na minha vida. Com vocês sempre há alegrias e risadas, agradeço por toda ajuda que me deram durante esse tempo e saibam que podem contar comigo, estarei sempre torcendo pelo sucesso e felicidade de vocês. Amigos do departamento: Leonardo, Caio, Amanda, Laís, Ana Paula, Gabriela, Jesse, Karina, Vanessa, Rafaela, Letícia, José Antônio, Letícia, Marcela, Thayse, Isabel, Jorge muito obrigada por toda forma de ajuda, pela convivência alegre e por terem me recebido com tanto carinho e atenção, vocês tornaram esta jornada mais agradável.

Aos alunos de iniciação científica Giovana, Matheus e Júlia,

Obrigada por toda dedicação e empenho de vocês, espero que tenham tido aprendizados e boas experiências nesses anos de Iniciação Científica.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Infantil e Social,

Luizinho, Mário e Ricardo, por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

A seção de Pós-Graduação,

Cristiane, Lilian e Valéria, muito obrigada por toda atenção e paciência.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Na pessoa dos professores: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem digníssimo Vice-Diretor.

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

Na pessoa do Coordenador Prof. Adj. Luciano Tavares Angelo Cintra.

Ao Frigorífico FRIBOI,

Pela permissão da coleta dos dentes bovinos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Pela concessão de recursos a mim e aos alunos de iniciação Científica Giovana Azevedo e Matheus dos Passos Silva.

Epígrafe

“Determinação, coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Resumo Geral

Francienne Maira Castro Gonçalves

Gonçalves, FMC. **Efeito da associação de tratamentos com fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização e remineralização do esmalte: estudos *in vitro***. 2019 103f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

A proposição geral do presente estudo foi avaliar *in vitro* a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) em promover a remineralização e reduzir a desmineralização, respectivamente, do esmalte dentário. Blocos de esmalte bovinos (12/grupo) foram selecionados através da dureza de superfície inicial (SH) e divididos em 5 grupos experimentais: 1) Dentifrício sem F (Placebo); 2) Dentifrício com 1100 ppm F (1100F), 3) MI Paste Plus[®], 4) Dentifrício com 1100 ppm F associado a MI Paste Plus[®] (1100F-MI Paste Plus[®]) e 5) Dentifrício com 1100 ppm F + 3%TMP associado a MI Paste Plus[®] (1100F-TMP-MI Paste Plus[®]). Para o Artigo 1 de **Remineralização (RE>DES)**, blocos de esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície pós-lesão de cárie artificial (SH1) e submetidos a 6 ciclagens de pH por 6 dias. Após as ciclagens de pH, foram determinadas dureza de superfície final (SH2), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície através da microscopia de luz polarizada (PLM), microscopia confocal de varredura à laser (MCVL), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Os dados foram submetidos à ANOVA (1-critério), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). Os grupos 1100F e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentaram valores semelhantes de %SHR ($p = 0,150$). A menor profundidade de lesão (Δ KHN e PLM) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais ($p < 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentou superfície mais uniforme e íntegra em relação aos demais tratamentos (MCVL e MEV). A concentração de F foi similar entre os grupos 1100F, 1100F-MI Paste Plus[®] e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$). O tratamento com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento na concentração de Ca no esmalte em $\square$ 51% e $\square$ 21% respectivamente, quando comparado aos grupos 1100F e MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$). Valores semelhantes de P no esmalte foram observados nos grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$), exceto o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], que apresentou alta concentração ($p < 0,001$). Para o Artigo 2 de **Desmineralização (DES>RE)**, blocos de

esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície inicial (SHi) e a seguir submetidos a 5 ciclagens de pH por 7 dias. Após determinou-se dureza de superfície final (SHf), porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície através da microscopia de luz polarizada (PLM), microscopia confocal de varredura à laser (MCVL), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Os dados foram submetidos à ANOVA (1-critério), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). Para a %SHR, o grupo Placebo apresentou os menores valores ($p > 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] remineralizou a superfície do esmalte em ~ 38% em relação ao MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$). A menor profundidade da lesão (Δ KHN) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais ($p < 0,001$), sendo inferior em 32% quando comparado ao grupo 1100F. A concentração de F, Ca e P foi maior para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$). Diante dos resultados parciais obtidos, é possível concluir que a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) (1100F-TMP-MI Paste Plus[®]) promoveu um efeito adicional significativo no processo de des-mineralização, podendo ser uma alternativa de tratamento para pacientes em risco e atividade de cárie.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoreto, Fosfato, Desmineralização, Remineralização, ACP-CPP.

General Abstract

Gonçalves, FMC. **Effect of the combination of treatments with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on desmineralization and enamel remineralization: *in vitro* studies.** 2019 103 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2019.

General Abstract

The general purpose of this study was to evaluate *in vitro* the association of treatments with fluoridated toothpastes and supplemented with sodium trimetaphosphate (TMP) and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) (MI Paste Plus®) in promoting remineralization and reduce demineralization, respectively, of tooth enamel. Bovine enamel blocks (12/group) were selected through the initial surface hardness (SH) and divided into 5 experimental groups: 1) Toothpaste without F (Placebo); 2) Toothpaste with 1100 ppm F (1100F), 3) MI Paste Plus®, 4) Toothpaste with 1100 ppm F associated with MI Paste Plus® (1100F-MI Paste Plus®) and 5) Toothpaste with 1100 ppm F + 3% TMP associated with MI Paste Plus® (1100F-TMP-MI Paste Plus®). For Remineralization Manuscript 1 (RE>DES), blocks of bovine enamel were selected for the surface hardness after artificial caries lesion (SH1) and subjected to 6 pH cycles for 6 days. After pH cycling, final surface hardness (SH2) was determined to calculate the percentage of surface hardness recovery (%SHR), integrated loss of subsurface hardness (Δ KHN), profile analysis and depth of the lesions of subsurface through polarized light microscopy (PLM), confocal laser scanning microscope (MCVL), scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS), fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) concentration in the enamel. The data were submitted to ANOVA (1-criterion), followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). 1100F and 1100F-TMP-MI Paste Plus® groups showed similar values of %SHR ($p = 0.150$). The lowest depth of lesion (Δ KHN and PLM) was observed for the 1100F-TMP-MI Paste Plus® group when compared to the others ($p < 0.001$). The 1100F-TMP-MI Paste Plus® group showed a more uniform and complete surface in relation to the other treatments (MCVL and SEM). The F concentration was similar between the 1100F, 1100F-MI Paste Plus® and 1100F-TMP-MI Paste Plus® groups ($p > 0.001$). The treatment with 1100F-TMP-MI Paste Plus® promoted an increase in the concentration of Ca in the enamel by $\square$ 51% and $\square$ 21% respectively, when compared to

the 1100F and MI Paste Plus[®] groups ($p < 0.001$). Similar values of P in the enamel were observed in the MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] groups ($p > 0.001$), except for the 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] group, which presented high concentration ($p < 0.001$). For demineralization Manuscript 2 (DES > RE), bovine of enamel blocks were selected for their initial surface hardness (SHi) and then subjected to 5 pH cycles for 7 days. After final surface hardness (SHf), percentage of loss of surface hardness (%SH), integrated loss of subsurface hardness (Δ KHN), analysis of the profile and depth of subsurface lesions through polarized light microscopy (PLM), confocal laser scanning microscopy (MCVL), scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS), fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) concentration in the enamel. The data were submitted to ANOVA (1-criterion), followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). For %SHR, the Placebo group had the lowest values ($p > 0.001$). The 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] group remineralized the enamel surface by $\sim 38\%$ compared to MI Paste Plus[®] ($p < 0.001$). The lowest depth of the lesion (Δ KHN) was observed for the 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] group when compared to the others ($p < 0.001$), being 32% lower when compared to the 1100F group. The F, Ca and P concentration was higher for the 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] group ($p > 0.001$). In view of the partial results obtained, it is possible to conclude that the combination of treatments with fluoridated toothpastes and supplemented with sodium trimetaphosphate (TMP) and amorphous calcium phosphate casein-phosphate (ACP-CPP) (MI Paste Plus[®]) (1100F-TMP -MI Paste Plus[®]) promoted a significant additional effect in the de-remineralization process, and could be an alternative treatment for patients at risk and caries activity.

Keywords: Dental enamel, Fluoride, Phosphate, Demineralization, Remineralization, ACP-CPP.

Lista de Abreviatura

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP Fosfato de Cálcio Amorfo

ANOVA Análise de Variação

°C Graus Celsius

Ca Cálcio

Ca^{+2} Íon Cálcio

CaF^+ Íon Fluoreto de Cálcio

CaF_2 Fluoreto de Cálcio

CaPO_4^- Íon Fosfato de Cálcio

CaHPO_4^0 Fosfato de Cálcio Hidrogenado neutro

$\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ Fosfato de Cálcio di-Hidrogenado

cm Centímetros

CPP Caseína fosfopeptídeo

CPP-ACP Fosfopeptídeo de Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo

EDS Espectroscopia de Energia Dispersiva

F Fluoreto

FI Fluoreto Iônico

FT Fluoreto Total

g Grama

g/cm^3 Grama por Centímetro Cúbico

h Hora

HA Hidroxiapatita

HCl Ácido Clorídrico

HF⁰ Fluoreto de Hidrogênio Neutro

HPO₄⁻² Íon Fosfato Hidrogenado

H₂PO₄⁻ Íon Fosfato di- Hidrogenado

K⁺ Íon Potássio

KCl Cloreto de Potássio

KHN Unidade de Dureza Knoop

L Litro

IA Atividades Iônicas

M Molar

MCVL Microscopia Confocal de Varredura a Laser

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

Min Minutos

mg Milligrama

mg/g Milligrama por grama

ml Mililitro

mm Milímetro

mmol/l Milimol por Litro

Mol/l Mol por Litro

mol L⁻¹ Mol por Litro

mol/kg Mol por Quilograma

mV Milivolts

Na⁺ Íon Sódio

NaF Fluoreto de Sódio

NaOH Hidróxido de Sódio

nm Nanômetros

P Fósforo

pH Potencial de Hidrogênio

ppmF Partes por Milhão de Fluoreto

PLM Microscopia de Luz Polarizada

s Segundos

SEM Microscopia Eletrônica de Varredura

SH Dureza de Superfície Inicial

SH₁ Dureza de Superfície pós Lesão de Cárie

SH₂ Dureza de Superfície Final

%SHR Percentual de Recuperação de Dureza de Superfície

FT Fluoreto Total

TISAB Tampão de Ajuste de Força Iônica Total

TMP Trimetafosfato de sódio

µg Micrograma

µg/mm³ Micrograma por Milímetro Cúbico

µL/mg Microlitros/miligrama

µm Micrômetros

ΔKHN Perda Integrada de Dureza de Subsuperfície

Lista de Figuras

FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 40).

Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 100).

Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 5000).

FIGURAS CAPÍTULO 2

Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 40).

Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 100).

Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 5000).

Lista de Tabelas

TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1: Média ($\pm$ dp) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tabela 2: Média ($\pm$ dp) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamentos

TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela 1: Média ($\pm$ dp) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tabela 2: Média ($\pm$ dp) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamentos

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	30
2 ARTIGO 1 -	
2.1 RESUMO	35
2.2 INTRODUÇÃO	37
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.4 RESULTADOS	45
2.5 DISCUSSÃO	46
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
3 ARTIGO 2 -	
3.1 RESUMO	65
3.2 INTRODUÇÃO	66
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.4 RESULTADOS	72
3.5 DISCUSSÃO	73
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
4 CONCLUSÃO GERAL	92
5 ANEXOS	
5.1 ANEXO A: Preparo dos blocos de esmalte	94
5.2 ANEXO B: Dosagem de fluoreto nos dentifrícios experimentais	95
5.3 ANEXO C: Indução de lesão de cárie artificial	96
5.4 ANEXO D: Análise da dureza inicial, pós-desmineralização/remineralização	97
5.5 ANEXO E: Análise da perda integrada de dureza de subsuperfície	98
5.6 ANEXO F: Ciclagem de pH	99
5.7 ANEXO G: Análise de fluoreto, cálcio e fósforo no esmalte	100

Introdução Geral

Francyenne Maira Castro Gonçalves

1 Introdução Geral

A cárie dentária é uma doença conceituada como biofilme-açúcar-dependente [Novais et al., 2004; Sheiham & James, 2015], sendo a doença bucal mais comum na infância [Martins et al., 2013]. 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 [Fejerskov & Kidd, 2005].

A partir do século XX, o fluoreto (F) foi o principal agente utilizado na prevenção da cárie dentária em todo o mundo, sendo oferecido à população de maneiras diversas, contribuindo para um declínio da prevalência da doença, principalmente devido à sua introdução nas águas de abastecimento público. O F age como um importante auxiliar para a manutenção do equilíbrio mineral dos dentes, atuando diretamente sobre a dinâmica do processo de desmineralização e remineralização [ten Cate, 1990]. Além do F, atualmente, novos agentes ativos contendo cálcio (Ca) e fosfato (P), veem sendo estudados no sentido de se obter formulações que apresentem maior eficácia e efetividade em paralisar as lesões cariosas o mais precocemente possível [Reynolds, 2009; Danelon et al., 2019].

A caseína fosfopeptídeo, conhecida pela sigla CPP, se liga ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), formando o complexo CPP-ACP (fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo). Esta ligação, é pH-dependente, ocorrendo quando há queda no pH bucal.

A CPP apresenta a capacidade de se ligar aos íons Ca e ao P, prevenindo, dessa forma, que os cristais cresçam até um tamanho crítico e se precipitem na superfície do dente, saliva e biofilme, mantendo-os numa forma amorfa, ou seja, biodisponível, conhecida como ACP. O ACP apresenta a capacidade de liberar íons Ca e P no biofilme dental para manter um estado supersaturado, favorecendo, desta maneira, o processo de remineralização [Tanbiri et al., 2008]. Portanto, o CPP-ACP funciona como um reservatório desses íons, aumentando a concentração livre dos mesmos, colaborando para

¹ Novais, SMA, Batalha RP, Grinfeld S, Fortes TM, Pereira MAS. The relationship between dental caries and sweetness preference: Prevalence in children. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2004;4:199-203.

² Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res* 2015;94:1341-1347.³

³ Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries--a systematic review. *J Dent* 2013;41:2-8.

⁴ Fejerskov O; Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 2005.

⁵ Ten Cate, JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res* 1990;69:614-619.

⁶ Reynolds EC, Walsh LJ. Additional aids to the remineralisation of tooth structure//Mount GJ, Hume WR. Preservation and restoration of tooth structure. 2nd ed. Brisbane: Knowledge Books and Software 2005:111-118.

⁷ Danelon M, Garcia, LG, Pessan JP, Passarinho A, Camargo ER, Delbem ACB. Effect of fluoride toothpaste containing Nano-Sized sodium hexametaphosphate on enamel remineralization: An in situ study *Caries Res* 2019;53:260-267.

a manutenção de um estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário [Adebayo et al., 2008]. O CPP-ACP foi demonstrado ter atividade anticariogênica em estudos *in vitro* e *in situ* incluindo ensaio clínico randomizado controlado [Reynolds et al., 2003; Reynolds et al., 2008; Reynolds, 2009]. Quando associado ao F na concentração de 900 ppm, é disponível como uma pasta de uso profissional (MI Paste Plus[®], GC Corporation, Tóquio, Japão). Foi relatado que a associação de F ao CPP-ACP (CPP-ACPF) apresenta maior potencial de remineralização do que o CPP-ACP [Reynolds et al., 2008]. Isto se deve, pois, o CPP-ACP interage com íons F, produzindo um efeito aditivo anticariogênico, por meio da formação de uma fase amorfa estabilizada de fosfato de cálcio fluoretado. Sabe-se que o mecanismo anticariogênico do CPP-ACP e do F são distintos. Enquanto o primeiro se dissocia quando há queda no pH, formando íons que atuam prevenindo a desmineralização, o F age formando fluorapatita, promovendo remineralização e reduzindo a desmineralização dentária [Reynolds et al., 2008].

Além de CPP-ACPF, o trimetafosfato de sódio (TMP) tem sido testado em diferentes concentrações de F e veículos, mostrando reduzir a perda mineral e aumentar o processo de remineralização, pois apresenta capacidade de modificar a superfície da hidroxiapatita, através de sua adsorção [Manarelli et al., 2011; Danelon et al., 2014]. Quando TMP é adsorvido sobre o esmalte, essa interação pode alterar a permeabilidade seletiva e a difusão de íons para seu interior [Takeshita et al., 2009; Danelon et al., 2014]. Assim, o TMP possivelmente retém íons carregados positivamente de fluoreto de cálcio (CaF^+) e Ca^{2+} , substituindo o íon sódio (Na^+) da estrutura cíclica e promovendo a redução na difusão de ácido [Takeshita et al., 2009; Danelon et al., 2014], bem como durante os processos de remineralização levando à formação e ao fluxo de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0) no esmalte, as quais apresentam alto coeficiente de difusão, sendo maior do que os seus homólogos carregados [Cochrane et al., 2008].

⁸ Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. J Dent 2008;36:74-79.

⁹ Adebayo OA, Burrow MF, Tyas MJ. Dentine bonding after CPP-ACP paste treatment with and without conditioning. J Dent 2008;36:1013-1024.

¹⁰ Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum J Dent Res 2003;82:206-211.

¹¹ Reynolds EC. Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. Adv Dent Res 2009;21:25-29

¹² Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ et al. Fluoride and casein phosphopeptide– amorphous calcium phosphate. J Dent Res 2008; 87:344-348.

¹³ Manarelli MM, Vieira AEM, Matheus AA, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. Caries Res 2011;45:506-509.

¹⁴ Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. Clin Oral Investig 2014;18:1119-1127.

¹⁵ Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem, ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. Caries Res 2009;43:50-56.

Takeshita et al. [2009] demonstraram *in vitro*, que a suplementação com 1%TMP em um dentifrício de reduzida concentração de F (500 ppm F) proporcionou ação semelhante à de um dentifrício padrão (1100 ppm F) em reduzir a desmineralização do esmalte. Takeshita et al. [2015] avaliaram a ação do mesmo dentifrício na redução da desmineralização do esmalte e biofilme, *in situ*. Na análise do esmalte, a perda de dureza de superfície (%SH) e em profundidade (Δ KHN) o efeito foi similar para os dentifrícios 1100 ppm F e 500 ppm F associado à 1%TMP (500 1%TMP). Para a análise do biofilme, similares valores de F, Ca e polissacarídeos extracelulares (PEC) foram observados para 1100 ppm F e 500 1%TMP, sendo significativamente mais baixo quando comparado com o de 500 ppm F, apenas. Pensando em pacientes que possuem alto risco de desenvolvimento da lesão, de Castro et al. [2015] demonstraram em um estudo *in vitro* que a adição de TMP na concentração de 3% à dentifrícios convencionais (1100 ppm F) possui eficácia superior em reduzir a desmineralização quando comparado ao 1100 ppm F. Apesar da existência de inúmeras fontes de F, ainda existem populações infantis que concentram uma alta prevalência da doença [Cruz & Narvai, 2018]. Sabendo-se das boas propriedades do TMP e ACP-CPPF, seria interessante avaliar protocolos de tratamentos que visem potencializar o efeito de dentifrícios fluoretados sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário, principalmente àqueles pacientes com alto risco e atividade de cárie.

¹⁶ Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem, ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. Caries Res 2009;43:50-56.

¹⁷ Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. Clin Oral Investig 2014;18:1119-1127.

¹⁸ Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content

Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. Caries Res 2015;49:394- 400.

¹⁹ de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C. In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. Clin Oral Investig 2015;19:1683-1687.

²⁰ Narvai CP, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 2006;19:386-393.

Artigo 1

2.0 Efeito da associação de tratamentos com fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a remineralização de lesões de cárie: estudo *in vitro*

Gonçalves F.M.C^a, Delbem A.C.B^a, Gomes L.F^b, Emerenciano N.G^a, Pessan J.P^a, Romero G.D.A^a, Cannon M.L^c, Danelon M^{a,c}.

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Pediatric Dentistry and Public Health
Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - Cep 16015-050 – Brazil

^bFederal University of São Carlos - UFSCar, Department of Materials Engineering, São Carlos, SP - Cep 13565-905 – Brazil

^cNorthwestern University, Feinberg School of Medicine, Ann and Robert Lurie Children's Hospital, Chicago, IL, USA

^{a,c}School of Dentistry, University of Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP – Cep 14096-900 – Brazil

Título curto: Associação de fosfatos em lesões de cárie

Autor correspondente:

Marcelle Danelon

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Pediatric Dentistry and Public Health

^cSchool of Dentistry, University of Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP – Cep 14096-900 – Brazil

Email:marcelledanelon@hotmail.com

***De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research.**

2.1 Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar se a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídio de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACPF) (MI Paste Plus[®]) podem aumentar a remineralização de lesões iniciais de cárie. Blocos de esmalte bovinos (4 mm × 4 mm, n = 60) foram selecionados pela dureza de superfície inicial (SH). A seguir foram submetidos à indução de lesões de cárie artificial e determinada a dureza pós-desmineralização (SH1). Os blocos foram divididos em 5 grupos de tratamentos (n=12): 1) Dentifrício sem F-TMP-MI Paste Plus[®] (Placebo); 2) Dentifrício com 1100 ppm F (1100F), 3) MI Paste Plus[®], 4) Dentifrício com 1100 ppm F associado a MI Paste Plus[®] (1100F-MI Paste Plus[®]) e 5) Dentifrício com 1100 ppm F + 3%TMP associado a MI Paste Plus[®] (1100F-TMP-MI Paste Plus[®]). Os blocos foram submetidos a 6 ciclagens de pH por 6 dias. Para todos os grupos, os tratamentos foram realizados 2x/dia por 1 minuto, exceto para os grupos 4 e 5, o quais após o tratamento com 1100F e 1100F-TMP, foi aplicado MI Paste Plus[®] por 3 minutos. Após as ciclagens de pH, foram determinadas a dureza de superfície final (SH2), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície através da microscopia de luz polarizada (PLM), microscopia confocal de varredura à laser (MCVL), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Os dados foram submetidos à ANOVA (1-critério), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). Os grupos 1100F e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentaram valores semelhantes de %SHR ($p = 0,150$). A menor profundidade da lesão (Δ KHN e PLM) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais ($p < 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentou superfície mais uniforme e íntegra em relação aos demais tratamentos (MCVL e MEV). Os grupos 1100F-0,5%CaGPm e 1100F-0,25%CaGPn apresentaram superfície mais uniforme e íntegra em relação aos demais tratamentos (MEV). A concentração de F foi similar entre os grupos 1100F, 1100F-MI Paste Plus[®] e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$). O tratamento com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento na concentração de Ca no esmalte em $\sim 51\%$ e $\sim 21\%$ respectivamente, quando comparado aos grupos 1100F e MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$). Valores semelhantes de P no esmalte foram observados nos grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$), exceto o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], que apresentou alta concentração ($p < 0,001$). Concluiu-se que a associação de 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento significativo na

remineralização de lesões iniciais de cárie, podendo ser uma alternativa efetiva para melhorar a saúde bucal dos indivíduos, especialmente aqueles com alto risco e atividade de cárie dentária.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoreto, Fosfato, Remineralização, ACP-CPP.

2.2 Introdução

A cárie dentária permanece o principal problema da Odontologia devido à alta prevalência entre a população mundial [Golubnitschaja et al., 2016], sendo que na infância, tem sido considerada a doença bucal mais comum e prevalente [AAPD, 2018/2019]. Ela resulta da dissolução da estrutura dentária por metabólitos ácidos da fermentação bacteriana do açúcar no biofilme [Nyvad et al., 2013], sendo caracterizada como uma doença de caráter multifatorial, biofilme-açúcar-dependente [Sheiham & James, 2015]. Ainda, na ausência de remoção de biofilme, consumo de dieta cariogênica, baixo fluxo salivar, em associação com fatores secundários, inicia-se as primeiras evidências macroscópicas em esmalte da cárie (lesão de mancha branca) [Bowen et al., 2018]. Manchas brancas são evidentes quando a quantidade de minerais subsuperficiais perdidos excede a quantidade de minerais ganhos por um longo período de tempo [Bröchner et al., 2010; Bertassoni et al., 2011]. Quando nenhuma medida preventiva é instituída nesse estágio, a desmineralização da subsuperfície progride e, eventualmente, a camada superficial entrará em colapso levando a formação de cavidade. Nesse sentido, esforços têm sido direcionados para buscar avanços em métodos de promoção da remineralização de lesões iniciais de cárie [Braga et al., 2019]. Dessa forma, novos agentes com potencial anticárie, como os fosfatos cíclicos, em especial o trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo associado ao fluoreto (F) (ACP-CPPF) têm sido estudados, contribuindo assim para o declínio da doença [Takeshita et al., 2016; Danelon et al., 2015; de Castro et al., 2015; Danelon et al., 2017; Zamperini & Bedran-Russo, 2018; Attiguppe et al., 2019].

Nos últimos anos têm-se observado estudos avaliando a associação do TMP e F em formulações dentifrícias [de Castro et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018], mostrando um efeito benéfico e adicional em relação às formulações contendo apenas F. No estudo de Danelon et al. [2015], os autores avaliaram *in situ* uma formulação dentifrícia contendo 1100 ppm F associado à 3% de TMP, observando um efeito remineralizador adicional em lesões artificiais de cárie, sendo superior em 17% (Δ KHN: dureza de subsuperfície) quando comparado ao dentifrício contendo apenas 1100 ppm F. Já Emerenciano et al. [2018], avaliaram a ação do mesmo dentifrício no processo de desmineralização dentária e formação do biofilme, concluindo que essa formulação reduziu consideravelmente a desmineralização do esmalte (22%, Δ KHN: dureza de subsuperfície), e afetou significativamente a composição do biofilme formado *in situ* quando comparado ao dentifrício contendo 1100 ppm F, podendo ser uma alternativa viável para pacientes com alto risco de desenvolvimento da lesão de cárie. Sobre o mecanismo de ação do TMP, pode ser sugerido que após sua adsorção ao esmalte ocorra maior ligação de Ca^{+2} e CaF^{+} em sua

estrutura carregada negativamente, sendo que em pH ácido, essas ligações são quebradas, liberando esses íons ao meio e formando grande quantidade de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0), que apresentam um coeficiente de difusão mais elevado para o esmalte [Cochrane et al., 2008; Emerenciano et al., 2018].

A caseína fosfopeptídeo, conhecida pela sigla CPP, se liga ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), formando o complexo CPP-ACP (caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo). Esta ligação, é pH-dependente, ocorrendo quando há queda no pH bucal. O ACP apresenta a capacidade de liberar íons Ca e P no biofilme dental para manter um estado supersaturado, favorecendo, desta maneira, o processo de remineralização [Tantbiroin et al., 2008]. Portanto, o CPP-ACP funciona como um reservatório de Ca e P, aumentando a concentração desses íons livres, colaborando para a manutenção de um estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário [Reynolds et al., 2008; Meyer-Lueckel, et al., 2015; Oliveira et al., 2016], e quando associado ao F na concentração de 900 ppm, é disponível como uma pasta de uso profissional (MI Paste Plus[®], GC Corporation, Tóquio, Japão). Foi relatado que a associação de F ao CPP-ACP (CPP-ACPF) apresenta maior potencial de remineralização do que o CPP-ACP [Reynolds et al., 2008; Oliveira et al., 2016]. Isto se deve, pois, o CPP-ACP interage com íons F, produzindo um efeito aditivo anticariogênico, por meio da formação de uma fase amorfa estabilizada de fosfato de cálcio fluoretado. Sabe-se que o mecanismo anticariogênico do CPP-ACP e do F são distintos. Enquanto o primeiro se dissocia quando há queda no pH, formando íons que atuam prevenindo a desmineralização, o F age formando fluorapatita, promovendo remineralização e reduzindo a desmineralização dentária [Reynolds et al., 2008].

Apesar da existência de inúmeras fontes de F, ainda existem populações infantis que concentram uma alta prevalência da doença [Cruz & Narvai, 2018]. Sabendo-se das boas propriedades do TMP e ACP-CPPF, seria interessante avaliar protocolos de tratamentos que visem potencializar o efeito de dentifrícios fluoretados sobre a remineralização do esmalte dentário, principalmente àqueles pacientes com alto risco e atividade de cárie.

2.3 Objetivo

O objetivo desse estudo foi avaliar a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) em remineralizar lesões artificiais de cárie. A hipótese nula do estudo foi:

- A associação de tratamentos: 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] não promoveria um aumento na remineralização de lesões iniciais de cárie quando comparado aos tratamentos: a) Dentifrício 1100 ppm F e b) MI Paste Plus[®].

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Preparação dos Blocos de Esmalte

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=60) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricados (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Cera Bastão Kerr ou Cera em Bastões Horus), com a superfície dentinária voltada para cima, sendo este conjunto levado à politriz BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). Para o desgaste foram utilizadas lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), peso de 2 lbs, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima sendo polidos de acordo com a seguinte sequência: lixa de granulação 600, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 4 lbs, 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os blocos foram submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), em água deionizada durante 2 minutos. Na sequência, o esmalte foi polido com papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER 40-7618) e suspensão de diamante (METADI Diamond Suspension 1 micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 4 lbs, 1 minuto. A seguir, os blocos foram lavados com jato de água deionizada durante 30 segundos e submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), durante 2 minutos, imersos em solução de limpeza (ULTRAMET Sonic Cleaning Solution, BUEHLER) diluída na proporção 20:1 em água destilada. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com formol 2% pH 7,0 [Vieira et al., 2005].

2.4.2 Formulação, Determinação do pH e Concentração de F nos Dentifrícios Experimentais e MI Paste Plus[®]

Os dentifrícios foram manipulados e avaliados no laboratório de Odontopediatria da FOA-UNESP, com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p- hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foi preparado dentifrício contendo TMP (Aldrich Chemistry, CAS 68915-31-1, Reino Unido) na concentração de 3% com adição de F na concentração de 1100 ppm F sob a forma de NaF (Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Um dentifrício sem adição de F (Placebo) e um dentifrício com 1100 ppm F (sem TMP) foram preparados utilizando a mesma formulação que os demais, e foi utilizada uma pasta comercial contendo CPP-ACP associado à 900 ppm F - MI Paste Plus[®] (MI Paste Plus[®], GC Corporation, Tóquio, Japão).

Para determinação do pH cada dentifrício e MI Paste Plus[®] foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 (peso:peso) e foi realizada a leitura através do eletrodo de pH (Orion 290A, Orion Research Inc., Boston, EUA), sob agitação constante [Moretto et al., 2010]. O fluoreto dos produtos foi dosado de acordo com o método descrito por Delbem et al. [2012]. Foram pesados 100-110 mg de cada produto em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais foi acrescentada água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem de fluoreto total (FT), 0,25 mL dessa suspensão foi mantido sob agitação durante 1h a 45°C com 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Em seguida foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e acrescentado 1,0 mL de TISAB II (Tampão ajustador de força iônica total). Para a dosagem de F foi utilizado um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A), previamente calibrado com cinco padrões (1, 2, 4, 8 e 16 µg F/mL). Para a dosagem de fluoreto iônico (FI), o restante da suspensão dos produtos foi submetido à centrifugação a 906 ×g durante 20 min. Foi pipetado 0,25 mL do sobrenadante e acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II e o F dosado da mesma forma que o FT.

2.4.3 Indução das lesões de cárie artificial nos blocos de esmalte

Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha com exceção da superfície externa de esmalte, para a indução das lesões de cárie artificial [Queiroz et al., 2008] e colocados individualmente em solução desmineralizadora (1,3 mmol.L⁻¹ Ca, 0,78 mmol.L⁻¹ P em tampão acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03 ppm F; 32 mL/bloco) por um período de 16 h, a 37°C. Após, foi determinada a dureza de superfície pós-desmineralização (SH1).

2.4.4 Ciclagem de pH (RE>DES) e tratamento com os dentifrícios

Os blocos foram submetidos em frascos individuais, a 6 ciclagens de pH, à temperatura de 37°C, durante 6 dias [Vieira et al., 2005]. Os tratamentos ocorreram 2x/dia por 1 minuto, exceto os grupos 4 e 5, os quais após o tratamento com 1100F e 1100F-TMP, foi aplicado MI Paste Plus[®] por mais 3 minutos, e a seguir os blocos foram lavados com água deionizada. Imediatamente os blocos (n=60) foram imersos na solução remineralizadora (RE – Ca 1,5 mmol L⁻¹, P 0,9 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mol L⁻¹, em tampão cacodilato 0,02 mol L⁻¹, 0,05 µg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²) a qual foi trocada 2 vezes ao dia (8 e 16 h). Os desafios cariogênicos foram realizados com a solução DES (Ca e P 2,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 µg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm²) durante 2 horas (das 12 às 14 h). Os blocos foram lavados com jatos de água deionizada por 30 segundos, após serem removidos das soluções DES-RE, sendo secos em seguida com papel absorvente [Vieira et al., 2005]. Após 6 dias de ciclagem de pH, foi determinada a dureza de superfície pós-ciclagem (SH2) para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR).

2.4.5 Análise da dureza do esmalte

A dureza de superfície foi determinada utilizando-se o microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 segundos. Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 µm, foram realizadas na região central de cada bloco, para a análise da dureza de superfície inicial (SH). Após a indução de lesão de cárie outras cinco impressões foram realizadas (SH1) a 100 µm das impressões de SH. Após as ciclagens de pH foram realizadas outras cinco impressões para a análise da dureza final (SH2) distantes a 100 µm das impressões de SH1, e a seguir calculado a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR). Para a análise da dureza longitudinal, uma secção foi realizada no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Foi utilizado microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 14 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos [Spiguel et al., 2009]. A área integrada da dureza (KHN x µm) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (Graph Pad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN).

2.4.6 Análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície pela microscopia de luz polarizada (MLP)

Para a análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície, após a determinação da perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN), as bases contendo os blocos de esmalte foram seccionadas, obtendo-se inicialmente slices de 300 μm de espessura, os quais foram desgastados até uma espessura de $\sim 100 \mu m$. O desgaste inicial das fatias foi realizado com lixa de granulação 400 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER) em uma politriz BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob constante refrigeração. Posteriormente, os slices de esmalte foram manualmente polidos utilizando lixas de granulação 600, 800 e 1200, respectivamente. Imediatamente após, foram colocados em lâminas de vidro, imersos em água deionizada, sendo as bordas vedadas com resina sintética (Entellan, Merck, Darmstadt, Alemanha) e levados para visualização e recuperação de imagens em ampliação de 400X em MLP (AxioPhot, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para a obtenção das lesões de subsuperfície. Ainda, três áreas nas regiões centrais das fatias foram analisadas para verificar a presença e espessura (micrômetro) da camada superficial do esmalte (MLP superficial) e a profundidade de desmineralização (MLP profundidade) [Afonso et al., 2013; Danelon et al., 2014; Medeiros et al., 2018].

2.4.7 Análise da concentração de F, Ca e P presente no esmalte

Uma das metades dos blocos seccionados longitudinalmente foi seccionada novamente a fim de se obter blocos com espessura de 2 mm x 2 mm. Um dos blocos foi fixado com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte ($\sim 50 \mu m$) foi removida por microabrasão [Weatherell et al., 1985]. Utilizou-se uma base de microscópio modificada com manômetro acoplado (Pantec, São Paulo, Brazil) e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de granulação 400 (silicon-carbide, Buehler) em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Ao pó do esmalte adicionou-se 0,5 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹, e os frascos foram mantidos sob agitação constante durante 1 hora sendo por fim adicionado 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. As concentrações de F, Ca e P foram determinadas e os resultados expressos em $\mu g/mm^3$.

Para análise de F foi utilizado um eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Os eletrodos foram previamente calibrados com 5 padrões contendo 1, 2, 4, 8 e 16 $\mu g F/mL$, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas, em duplicata, com alíquotas de 500 μL da

solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II. O cálcio foi determinado pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, como descrito por Vogel et al. [1983]. Para calibração, foram utilizados padrões contendo 40 a 200 µg Ca/mL. Alíquotas de 3 µL (duplicata) foram dispostas em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 – TPP, Switzerland) acopladas em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), utilizando comprimento de onda de 650 nm. O P foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow [1925]. As leituras em duplicata foram realizadas em placas de 96 poços da mesma forma que na dosagem de Ca, utilizando-se espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) no comprimento de onda de 660 nm.

2.4.8 Análise da morfologia e composição química do esmalte através do CLSM e MEV/EDS

Blocos de esmalte (n = 2) foram analisados por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM, Olympus LEXT OLS 4000- Carl Zeiss, Alemanha) com ampliação de 100 × para obter imagens topográficas tridimensionais da superfície do esmalte. Imagens altamente ampliadas da superfície dos blocos de esmalte foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todos os blocos foram desidratados gradualmente em uma série de etanol ascendente (50, 60, 70, 80 e 100%) e banhados a ouro (Quorum - Q150T E). O modo de operação de elétrons secundários foi realizado para identificar a morfologia dos blocos de esmalte após a ciclagem de pH e tratamentos. O instrumento utilizado para isso foi um MEV-PHILIPS (XL-30 FEG, Philips, Amsterdã, Holanda) equipado com EDS (Energy dispersive spectroscopy). A microsonda EDS anexada ao MEV apresenta análise qualitativa e quantitativa da composição química com uma típica resolução lateral de um micrometro e uma resolução de profundidade típica de alguns décimos de micrometro e foi utilizada para verificar as composições químicas na superfície dos blocos de esmalte [Bakry & Abbassy, 2018]. Ambos equipamentos localizados no Laboratório de Caracterização Estrutural-Departamento de Materiais-UFSCar (LCE-UFSCar/DEMa).

2.4.9 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot® versão 12.0 (versão 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), com significância ao nível de 5%. Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de %SHR, ΔKHN, PLM, F, Ca e P presente no

esmalte; e como fator de variação o tipo tratamento. Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogêneo (teste de Cochran) e, portanto, foram analisados por ANOVA 1-critério, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

2.5 Resultados

A concentração média (DP) de fluoreto total (FT) e fluoreto iônico (FI) (n=3) foi: Placebo - 10,5 (0,1) e 10,0 (1,2), 1100 ppm F - 1186,0 (33,2) e 1102,4 (28,5), 1100F-TMP - 1112,6 (13,2) e 1110,3 (17,6) e MI Paste Plus[®] - 918,3 (18,4) e 913,3 (18,4). O valor de pH dos grupos foi de 7,4 (0,1) variando de 7,3 a 7,5.

A média de dureza de superfície(SH) para todos os blocos foi de 367,5 (2,5), variando de 365,3 (7,9) e 371,2 (5,2) KHN nos grupos experimentais (p = 0,051). A média (DP) da dureza de superfície pós- desmineralização (SH1) foi 58,4 KHN (5,2), variando de 50,4 e 64,6 (p = 0,093). Não houve diferenças significativas entre os grupos após a distribuição (p = 0,077). Para a %SHR, o grupo Placebo apresentou os menores valores (p > 0,001). Os grupos 1100F e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentaram valores semelhantes (p = 0,150), assim como os grupos MI e 1100F-MI Paste Plus[®] (p = 0,065). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] remineralizou a superfície do esmalte em ~ 38% em relação ao MI Paste Plus[®] (p < 0,001) e similar ao tratamento com 1100F (p > 0,001). A fotomicrografia da microscopia de luz polarizada mostrou lesões de subsuperfície em todos os grupos, mas estas estavam presentes em menor extensão no grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (Tabela 1, Figura 1). A menor profundidade da lesão (Δ KHN) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais (p < 0,001), sendo inferior em 32% quando comparado ao grupo 1100F (Tabela 1 e Figura 1).

A concentração de F foi similar entre os grupos 1100F, 1100F-MI Paste Plus[®] e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (p > 0,001). O tratamento com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento na concentração de Ca no esmalte em $\square$ 51% e $\square$ 21% quando comparado aos grupos 1100F e MI Paste Plus[®] (p < 0,001), respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] (p > 0,001) (Tabela 2). Valores semelhantes de P no esmalte foram observados nos grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] (p > 0,001), exceto o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], que apresentou alta concentração (p < 0,001).

A morfologia da superfície do esmalte de acordo com os tratamentos é mostrada por CLSM e MEV (Figura 2A-2E; Figura 3A-3E). Os blocos tratados com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentaram uma superfície mais lisa e plana e menos erodida, em relação aos demais

tratamentos. Além disso, mesmo na presença de Ca e P as superfícies também se mostraram muito rugosas, porém em menor grau do que no grupo Placebo. Não foi observado aumento significativo na razão Ca/P (EDS) na superfície do esmalte após os diferentes tratamentos (Figura 3A-3E).

2.6 Discussão

Diversas terapias no controle à cárie têm sido propostas na literatura, dentre elas destacam-se a utilização F em associação com Ca e P, uma vez que a presença desses íons no meio salivar e biofilme interferem positivamente nos processos de remineralização e desmineralização dentária [Cochrane et al., 2008; Cochrane et al., 2012; Rechmann et al., 2018; Danelon et al., 2019]. A hipótese nula do estudo foi a de que a associação de tratamentos: 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ou seja, fontes ricas de Ca e P, não promoveria um aumento na remineralização do esmalte quando comparado aos tratamentos com dentifrício 1100 ppm F e MI Paste Plus[®]. Diante dos resultados obtidos a hipótese nula foi negada.

O CPP-ACP é um composto bioativo de fosfopeptídeos de caseína/fosfato de cálcio amorfo obtido a partir da caseína do leite, que ao sofrer digestão enzimática na cavidade bucal forma fosfopeptídeo de caseína (CPP). O CPP estabiliza o Ca e P mantendo-os em uma forma amorfa (ACP) causando um aumento nas concentrações desses íons no esmalte dentário, favorecendo também a formação de espécies neutras como HF^0 e CaHPO_4^0 permitindo a difusão dos mesmos em profundidade, induzindo a remineralização em todo o corpo da lesão [Reynolds et al., 2003]. Pesquisas anteriores mostraram que o CPP-ACP apresenta boa capacidade de penetrar e remineralizar o corpo da lesão em relação a outros agentes remineralizantes [Reynolds et al., 2008; Wu et al., 2010]. Sugere-se que o Ca e P liberados pelo CPP-ACP apresentam capacidade de formar nano-complexos no biofilme adjacente a lesão inicial de cárie, tornando o esmalte mais resistente a ácidos a qualquer ataque ácido adicional [Manoharan et al., 2018]. Ainda, quando o F é associado ao CPP-ACP (CPP-ACPF) fornece efeitos superiores na remineralização e maior resistência a desmineralização dentária [Oliveira et al., 2016]. Entretanto, nossos resultados mostraram que o uso isolado da MI Paste Plus[®], apenas, levou à uma remineralização superior ao tratamento com o dentifrício Placebo, e inferior quando associado ao regime convencional de escovação (1100F; 2x/dia-representando a condição clínica), tanto em superfície quanto em profundidade (ou seja: corpo da lesão), sendo cerca de 60% inferior em relação ao dentifrício 1100F, mesmo apresentando maior concentração de Ca e P no esmalte.

Pode ser especulado que os íons F quando associado ao ACP-CPP possam ter retardado a penetração dos íons Ca e P para as áreas mais profundas das lesões de mancha branca causando precipitação precoce dos mesmos na superfície externa do esmalte, como verificado no estudo Bakry et al. [2014], dificultando assim a difusão de HF^0 e CaHPO_4^0 na lesão do esmalte. Uma outra especulação seria a redução da quantidade de F solúvel disponível [Karlinsey et al., 2009; Oliveira et al., 2017]. Dessa forma, uma possível alternativa para aumentar a capacidade remineralizadora da MI Paste Plus[®], seria o aumento de aplicações diárias nos regimes de remineralização, sendo que essa alternativa corrobora com os achados de Thepyou et al. [2013], que avaliaram diferentes tempos de regime de remineralização, confirmando que a aplicação por 4 semanas leva à uma remineralização significativa do esmalte desmineralizado. Em nosso modelo de ciclagem de pH, houve aplicação 2x/dia por 6 dias, dessa forma novos regimes de tratamentos devem ser comparados em estudos futuros.

Em situações de alto risco de cárie, a combinação de métodos tópicos pode ser sugerida [Zimer et al., 2001]. Durante o desenvolvimento desse trabalho, não foi possível encontrarmos na literatura estudos que associassem o uso do dentifrício convencional (1100F) com a MI Paste Plus[®], sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie o que é de grande significância, uma vez que simularia a condição clínica cotidiana de um indivíduo. Meyer-Lueckel et al. [2015] avaliaram em um estudo *in situ* os efeitos remineralizantes induzidos pela aplicação da MI Paste, sem F, após o uso de dentifrício fluoretado (1400 ppm F), sobre a remineralização de lesões de cárie em esmalte. Os autores concluíram que o uso adicional de uma pasta CPP-ACP parece ser menos eficaz em remineralizar lesões de cárie do que o uso contínuo com dentifrício fluoretado. Estudo realizado por Reynolds et al. [1995] mostraram que ratos que receberam 0,5% de CPP-ACP e a seguir 500 ppm F apresentaram escores de cárie significativamente mais baixos do que aqueles que recebem 0,5% de CPP-ACP ou apenas 500 ppm F. Já Sinfiteli et al. [2017] avaliaram o efeito da MI Paste Plus[®] com dentifrício fluoretado (1100 ppm F) em prevenir a desmineralização do esmalte, usando um modelo de ciclagem de pH. Os autores concluíram que o dentifrício fluoretado associado a MI Paste Plus[®] inibiu a desmineralização do esmalte apenas em subsuperfície. Nossos achados mostram que a associação de 1110F-MI Paste Plus[®] não aumentou a remineralização das lesões tanto em superfície como em profundidade, evidenciando ainda, que essa associação pode piorar o efeito do uso diário de 1100F (Tabela 1 e Figura 1). Acredita-se que ao ocorrer precipitação desses íons rapidamente nas zonas superficiais da lesão, haja impedimento de que o processo de remineralização ocorra no corpo da lesão [Oliveira et al., 2014]. Esses dados evidenciam que é importante repensar nos protocolos que são propostos na literatura visando potencializar tratamentos na remineralização de lesões de mancha branca.

No presente estudo, para minimizar as diferenças entre metodologias, a MI Paste Plus[®] foi aplicada por três minutos (seguindo a recomendação do fabricante) 2x/dia, entretanto esse protocolo não trouxe efeito adicional quando a MI Paste Plus[®] foi associada ao dentifrício 1100F na remineralização dentária. O tratamento com MI Paste Plus[®] e 1100F-MI Paste Plus[®], embora tenha contribuído para maior concentração de Ca (aproximadamente 25%) no esmalte em relação ao dentifrício 1100F, levou às maiores lesões de subsuperfície (exceto quando comparado ao Placebo) (Tabela 1 e Tabela 2). Para esta observação, vários fatores importantes devem ser considerados: modelos de ciclagem de pH não simulam fielmente a situação bucal, o que acaba interferindo diretamente nas trocas iônicas do ambiente e superfície dentária; a ausência de biofilme e, conseqüentemente, um melhor ambiente para a atuação do ACP-CPPF para criar um estado de supersaturação de íons Ca e P poderia ter impedido que este sistema exercesse adequadamente ação remineralizadora; período de tratamento [Hegde & Moany, 2012]. Esses resultados estão de acordo Karlinsey et al. [2009] e Souza et al. [2014], sugerindo que pode ocorrer uma reação química entre ACP e F tornando os dois componentes inorgânicos ineficazes [Karlinsey et al., 2009]. Especula-se também, que tenha ocorrido uma maior liberação de Ca e P na superfície do esmalte desmineralizado no experimento atual, porém houve precipitação desses íons na superfície, retardado a penetração em profundidade e conseqüentemente reduzindo a remineralização [Bakry & Abbassy, 2018].

Já a adição de TMP em produtos de aplicação tópica de F, especialmente dentifrícios, tem demonstrado melhorar o seu efeito sobre a desmineralização e remineralização do esmalte [Danelon et al., 2015; Takeshita et al., 2015; Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018]. Danelon et al. [2015] avaliaram o efeito de dentifrício contendo 1100F associado a 3%TMP sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie através de um estudo *in situ*, onde foi possível observar uma remineralização cerca de ~ 24% superior ao dentifrício com 1100F. Em nosso estudo, a associação 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] levou à maior remineralização do esmalte ~ 32% e 58% em relação aos tratamentos com 1100F e MI Paste Plus[®] (Tabela 1 e Figura 1). Além da maior remineralização houve maior fluxo de Ca e P para o interior da lesão (Tabela 2). Esses achados podem ser explicados devido ao possível mecanismo de ação proposto ao TMP, ou seja: quando o TMP é adsorvido ao esmalte por meio da interação entre os sítios aniônicos do TMP e grupos hidroxila da hidroxiapatita [Delbem et al., 2014; Amaral et al., 2018] uma maior quantidade de Ca^{++} e CaF^+ em sua estrutura carregada negativamente é retida. Na presença do ACP-CPPF, essa reatividade é aumentada (principalmente devido a capacidade desse complexo em reduzir a precipitação de cálcio e fosfato) havendo maior formação não só das espécies iônicas mencionadas acima, mas também a formação de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0), assim a precipitação dessas espécies não ocorre diretamente no

esmalte, mantendo os poros na superfície abertos, o que facilita a difusão dos mesmos para o interior da lesão, influenciando positivamente na remineralização da lesão de cárie [Cochrane et al., 2008; Takeshita et al., 2016; de Castro et al., 2015; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017]. Esses achados também estão de acordo com Reynolds [2008] o qual relatou um aumento na relação Ca/ P no esmalte desmineralizado após 10 dias de tratamento com várias soluções contendo CPP-ACP, o que foi atribuído à deposição mineral na forma de hidroxiapatita e a formação das espécies acima mencionadas.

A avaliação da remineralização *in vitro* também pode ser verificada utilizando outros métodos, além da dureza. Os métodos MEV/EDS e CLSM foram utilizados em nosso estudo com o objetivo principal de comparar as alterações após remineralização mediante os diferentes tratamentos. A morfologia da superfície do esmalte das amostras de cada grupo de tratamento é mostrada por imagens em 3D (CLSM) na Figura 2A-2E. Para o 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], a imagem por CLSM mostrou superfícies muito mais suaves e menos erodidas, em relação aos demais grupos. Além disso, mesmo na presença de Ca e P (grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®]), as superfícies também se mostraram rugosas, porém em menor grau do que no grupo Placebo, no qual também foi verificado além de defeitos de superfície como áreas ásperas, espaços vazios e rachaduras em maior intensidade.

No aumento de $\times 5000$ (MEV-EDS), foram reveladas numerosas depressões no esmalte, com um padrão de favo de mel nos cristais de hidroxiapatita, que correspondiam às observações feitas por outros investigadores [Arends & Christoffersen, 1986; Kamath et al., 2017]. O potencial para induzir remineralização foi verificado em todos os grupos fluoretados, independente da presença ou não de Ca e P na formulação. As Figuras 2E e 3E mostram que o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentou uma superfície mais uniforme e íntegra em relação aos demais tratamentos. Pequenas diferenças na morfologia da superfície para os demais grupos puderam ser observadas atribuindo-se a seus diferentes mecanismos de remineralização [Huang et al., 2009; Roveri & Iafisco, 2010]. Ainda Mendes et al. [2003] também relataram a maior porosidade (consequentemente maior exposição, assim como aumento, nos espaços interprismáticos) com a diminuição do conteúdo mineral, colaborando com nossos achados (Tabela 1, Figura 2A e Figura 3A). O EDS foi utilizado com o intuito de estimar o conteúdo mineral em superfície pós-remineralização. A razão Ca/P na superfície após os diferentes tratamentos não aumentou. Esses achados sugerem que apenas o F provoca modificações estruturais nos cristais de apatita, restritas à substituição parcial do grupo hidroxila por íons F, sem afetar consideravelmente a rede estrutural de Ca/P assim como seu teor. Além disso, isso reforça o fato de que o F na presença de Ca e P é mais eficaz na condução

do mineral para remineralização, o que pode ser comprovado devido ao aumento na concentração de Ca e P no esmalte (Tabela 2).

É importante ressaltar que muitos protocolos que utilizam a MI Paste Plus[®] para o tratamento de lesões de cárie, não associam ao tratamento com dentifrício convencional, e dessa forma não se simula a ideal condição clínica de escovação. Outro aspecto importante é que a MI Paste Plus[®] não é um dentifrício que deva ser diluído e aplicado durante a escovação; segundo o fabricante a mesma deve ser aplicada após a higiene bucal do paciente, usando o dedo nas áreas dentárias afetadas [Behnan et al., 2010], o que a diferencia da aplicação dos dentifrícios utilizados em nosso trabalho. Ainda, estudos *in vitro* não podem simular todas as complexidades de um ambiente cariogênico bucal *in vivo*. Portanto, os resultados obtidos neste estudo são a evidência inicial para encorajar uma maior exploração da filosofia de múltiplos mecanismos que atuam em conjunto para a prevenção da cárie. Alguns exemplos de estudos futuros que devem ser conduzidos destacam-se: 1) quantidade do produto retido no esmalte após enxague bucal; 2) presença de saliva humana; 3) diferentes protocolos (tempo de aplicação x quantidade/dia); 4) presença de biofilme e, conseqüentemente, um ambiente propício ao CPP-ACPF para que contribua a um estado de supersaturação de íons Ca e P, através de estudos *in situ* e *in vivo* e 5) verificar se o efeito dessa associação também pode ser modulado por diferentes tempos de aplicação.

2.7 Conclusão

Conclui-se que a associação de 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento significativamente maior na remineralização de lesões iniciais de cárie, podendo ser uma alternativa efetiva para melhorar a saúde bucal dos indivíduos, especialmente aqueles com alto risco e atividade de cárie dentária.

2.8 Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo: 2017/21018-6 e 2018/24761-4) pelo apoio financeiro.

2.9 Referências Bibliográficas

- 1) Afonso RL, Pessan JP, Igreja BB, Cantagallo CF, Danelon M, Delbem ACB. In situ protocol for the determination of dose response effect of low-fluoride dentifrices on enamel remineralization. *J App Oral Sci* 2013;21:525-532.
- 2) Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
- 3) Akabane S, Delbem AC, Pessan J, Garcia L, Emerenciano N, Gonçalves DF, Danelon M. In situ effect of the combination of fluoridated toothpaste and fluoridated gel containing sodium trimetaphosphate on enamel demineralization. *J Dent* 2018;68:59-65.
- 4) Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106:2553-2564.
- 5) American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategie. *AAPD* 2018/2019;40:60-62.
- 6) Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986;65:2-11.
- 7) Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and Fluoride: A Synergism to Combat Caries. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019;2:120-125.
- 8) Bakry AS, Marghalani HY, Amin OA, Tagami J. The effect of a bioglass paste on enamel exposed to erosive challenge. *J Dent* 2014;42:1458-14563.
- 9) Bakry AS, Abbassy MA. Increasing the efficiency of CPP-ACP to remineralize enamel white spot lesions. *J Dent* 2018;76:52-57.
- 10) Behnan SM, Arruda AO, González-Cabezas C, Sohn W, Peters MC. Invitro evaluation of various treatments to prevent demineralization next to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:712e1-7.
- 11) Bertassoni, LE, Habelitz, S, Marshall, SJ, Marshall, GW. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro—an indentation study. *J Biomech* 2011;44:176-181.

- 12) Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol* 2018; 26:229-242.
- 13) Braga AS, Girotti LD, de Melo Simas LL, Pires JG, Pelá VT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of commercial herbal toothpastes and mouth rinses on the prevention of enamel demineralization using a microcosm biofilm model. *Biofouling* 2019;35:796-804.
- 14) Bröchner, A, Christensen, C, Kristensen, B, Tranaeus, S, Karlsson, L, Sonnesen, L, Twetman, S. Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig* 2010; 15:369-373.
- 15) Cochrane HJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008;42:88-97.
- 16) Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides—mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res* 2012;24:41-47.
- 17) Cruz MGBD, Narvai PC. Caries and fluoridated water in two Brazilian municipalities with low prevalence of the disease. *Rev Saude Publica* 2018;9;52:28.
- 18) Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 2015;43:806-813.
- 19) Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2017;78:82-87.
- 20) Danelon M, Garcia LG, Pessan JP, Passarinho A, Camargo ER, Delbem ACB. Effect of Fluoride Toothpaste Containing Nano-Sized Sodium Hexametaphosphate on Enamel Remineralization: An in situ Study. *Caries Res* 2019;53:260-267.
- 21) Delbem ACB, Bergamaschi M, Rodrigues E, Sasaki KT, Vieira AEM, Missel EMC. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *J Appl Oral Sci* 2012;20:94-98.
- 22) Delbem ACB, Souza JAS, Zaze ACSF, Takeshita EM, Sasaki KT, Moraes JCS. Effect of trimetaphosphate and fluoride association on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Braz Dent J* 2014;25:479-484.
- 23) de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C. In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 2015;19:1683-1687.
- 24) Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, de Camargo ER, Danelon M. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-

- sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol* 2018;96:223-229.
- 25) Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
 - 26) Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, et al. Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation—EPMA position paper 2016. *EPMA J* 2016;7:23.
 - 27) Hegde MN, Moany A. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptideamorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning electron microscopy: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2012;15:61-67.
 - 28) Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 2009;4:034104.
 - 29) Kamath P, Nayak R, Kamath SU, Pai D. A comparative evaluation of the remineralization potential of three commercially available remineralizing agents on white spot lesions in primary teeth: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2017;35:229-237.
 - 30) Karlinsey RL, Mackey AC, Stookey GK, Pfarrer AM. In vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium phosphate technology. *Am J Dent* 2009;22:180-184.
 - 31) Manoharan V, Kumar RK, Sivanraj AK, Arumugam SB. Comparative Evaluation of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Fluoride Phosphate and Novamin on Artificially Demineralized Human Enamel: An In vitro Study. *Contemp Clin Dent* 2018;9:S58-S63.
 - 32) Medeiros MID, Carlo HL, Santos RLD, Sousa FB, Castro RD, França RCS, Carvalho FG. TiF4 varnish protects the retention of brackets to enamel after in vitro mild erosive challenge. *J Appl Oral Sci* 2018;14.
 - 33) Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. *Caries Res* 2003;37:442-444.
 - 34) Meyer-Lueckel H, Wierichs RJ, Schellwien T, Paris S. Remineralizing efficacy of a CPP-ACP cream on enamel caries lesions in situ. *Caries Res* 2015;49:56-62.
 - 35) Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. *Caries Res* 2010;44:135-140.
 - 36) Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular

- microbiological perspective. *Caries Res* 2013;47:89-102.
- 37) Oliveira GM, Ritter AV, Heymann HO, Swift E Jr, Donovan T, Brock G, Wright T. Remineralization effect of CPP- ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *J Dent* 2014;42:1592-1602.
 - 38) Oliveira P, Fonseca A, Silva EM, Coutinho T, Tostes MA. Remineralizing potential of CPP-ACP crèmes with and without fluoride in artificial enamel lesions. *Aust Dent J* 2016;61:45-52.
 - 39) Oliveira PRA, Coutinho TCL, Portela MB, Paula VCA, Tostes MA. Influence of biofilm formation on the mechanical properties of enamel after treatment with CPP-ACP crème. *Braz Oral Res* 2017;31:e84.
 - 40) Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J* 2008;19:21-27.
 - 41) Rechmann P, Bekmezian S, Rechmann BMT, Chaffee BW, Featherstone JDB. MI Varnish and MI Paste Plus in a caries prevention and remineralization study: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig* 2018;22:2229-2239.
 - 42) Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res* 1995;74:1272-1279.
 - 43) Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003;82:206-211.
 - 44) Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker G, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008;87:344-248.
 - 45) Roveri N, Iafisco M. Evolving application of biomimetic nanostructured hydroxyapatite. *Nanotechnol Sci Appl* 2010;3:107-125.
 - 46) Sinfiteli PP, Coutinho TCL, Oliveira PRA, Vasques WF, Azevedo LM, Pereira AMB, Tostes MA. Effect of fluoride dentifrice and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride in preventing enamel demineralization in a pH cyclic study. *J Appl Oral Sci* 2017;25:604-611.
 - 47) Souza CC, Cury JL, Coutinho TC, Da Silva EM, Tostes MA. Effect of different application frequencies of CPP-ACP and fluoride dentifrice on demineralized enamel: a laboratory study. *Am J Dent* 2014;27:215-219.
 - 48) Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. 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* 2009;43:302-307.

- 49) Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem, ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;43:50-56.
- 50) Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res* 2016;50:571-578.
- 51) Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *J Dent* 2008;36:74-79.
- 52) Thepyou R, Chanmitkul W, Thanatvarakorn O, Hamba H, Chob-Isara W, Trairatvorakul C, Tagami J. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and glass ionomer show distinct effects in the remineralization of proximal artificial caries lesion in situ. *Dent Mater J* 2013;32:648-653.
- 53) Vieira AE, Delbem AC, Sassaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520.
- 54) Vogel GL, Chow LC, Brow WL. 1983. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23-31.
- 55) Zamperini CA1, Bedran-Russo AK. Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in Artificially Induced Root Caries. *Caries Res* 2018;52:331-338.
- 56) Zimmer S, Bizhang M, Seemann R, Witzke S, Roulet JF. The effect of a preventive program, including the application of low-concentration fluoride varnish, on caries control in high-risk children. *Clin Oral Investig* 2001;5:40-44.
- 57) Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H. Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
- 58) Wu G, Liu X, Hou Y. Analysis of the effect of CPP-ACP tooth mousse on enamel remineralization by circularly polarized images. *Angle Orthod* 2010;80:933-938.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Média ($\pm$ dp) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tabela 2: Média ($\pm$ dp) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamentos

Lista de figuras

Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 40).

Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 100).

Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 5000).

Tabela 1: Média ($\pm$ dp) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tratamentos	%SHR (KHN)	Δ KHN (KHN $\times$ μ m)	PLM Superficial (μ m)	PLM Depth (μ m)
Placebo	14,8 ^a (3,0)	7.451,0 ^a (1.112,4)	1,3 ^a (0,3)	27,0 ^a (5,3)
1100F	36,4 ^b (6,1)	3.513,9 ^b (710,6)	3,3 ^b (0,4)	17,6 ^b (4,3)
MI Paste Plus [®]	24,2 ^c (3,3)	5.607,4 ^c (519,6)	2,5 ^b (0,6)	17,0 ^b (4,0)
1100F- MI Paste Plus [®]	28,4 ^c (3,8)	4.769,6 ^d (950,5)	2,7 ^b (0,8)	12,6 ^c (2,4)
1100F-TMP-MI Paste Plus [®]	33,4 ^b (6,2)	2.388,0 ^e (681,1)	3,7 ^b (1,0)	11,4 ^c (2,6)

Letras sobrescritas distintas indicam significância estatística entre os tratamentos em cada análise (ANOVA, 1 critério, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$). Valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média. %SHR: porcentagem de recuperação de dureza de superfície. Δ KHN: perda integrada de dureza de subsuperfície. PLM superficial: espessura da camada superficial de esmalte. Profundidade PLM: espessura da profundidade de desmineralização. KHN: Dureza Knoop. μ m: micrômetros.

Tabela 2: Média ($\pm$ dp) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamentos

Tratamentos	F ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	Ca ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	P ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
Placebo	1,5 ^a (0,2)	277,8 ^a (50,7)	296,4 ^a (44,2)
1100F	3,5 ^b (1,4)	501,0 ^b (85,2)	424,5 ^b (46,1)
MI Paste Plus [®]	2,2 ^c (0,6)	622,4 ^c (133,1)	536,8 ^c (96,4)
1100F- MI Paste Plus [®]	3,1 ^b (0,9)	626,1 ^c (173,9)	518,9 ^c (97,7)
1100F-TMP-MI Paste Plus [®]	3,4 ^b (0,8)	755,6 ^d (154,9)	674,9 ^d (98,4)

Letras sobrescritas distintas indicam significância estatística entre os tratamentos em cada análise (ANOVA, 1 critério, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$). Valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média. F: fluoreto no esmalte. Ca: cálcio no esmalte. P: fósforo no esmalte.

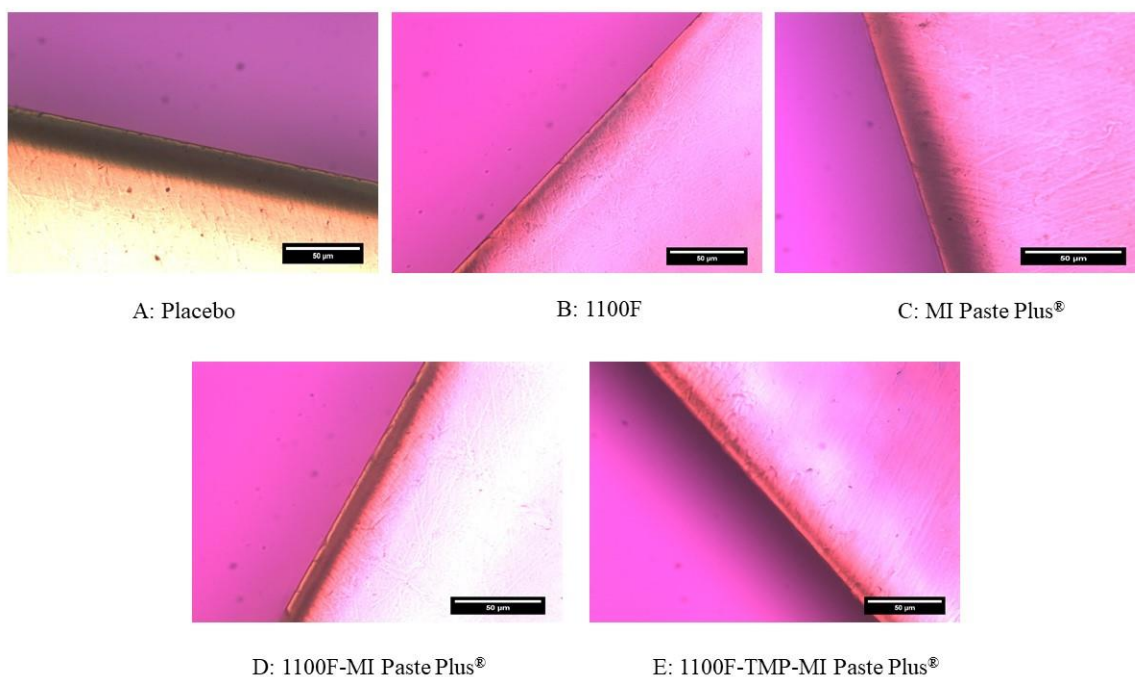


Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus®; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus® ($\times 40$).

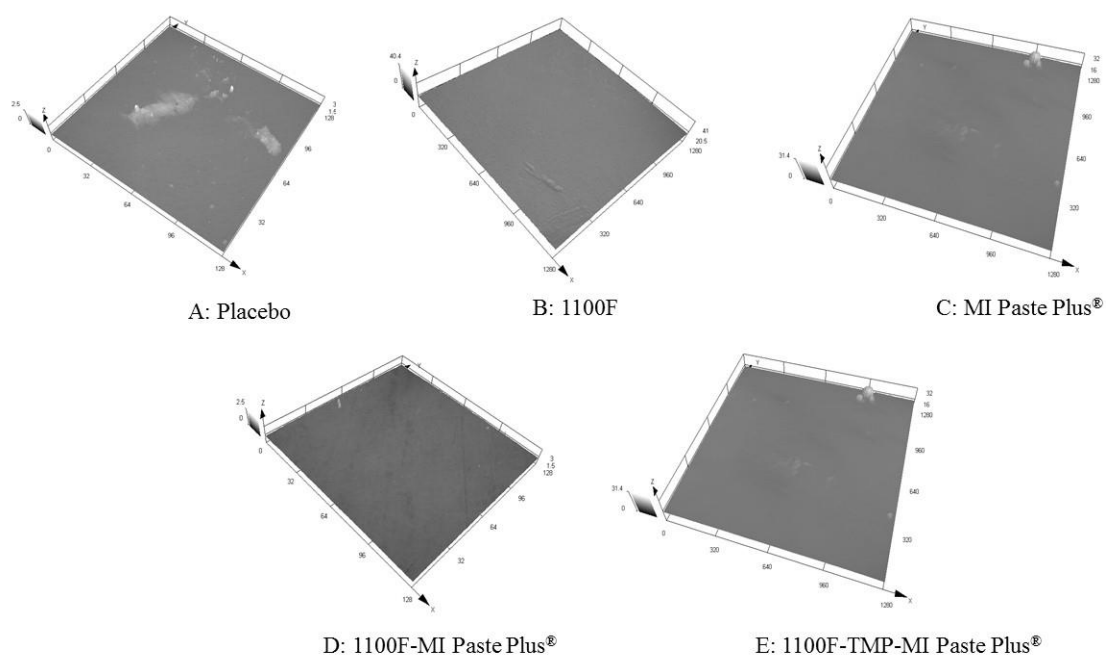


Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus®; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus® ($\times 100$).

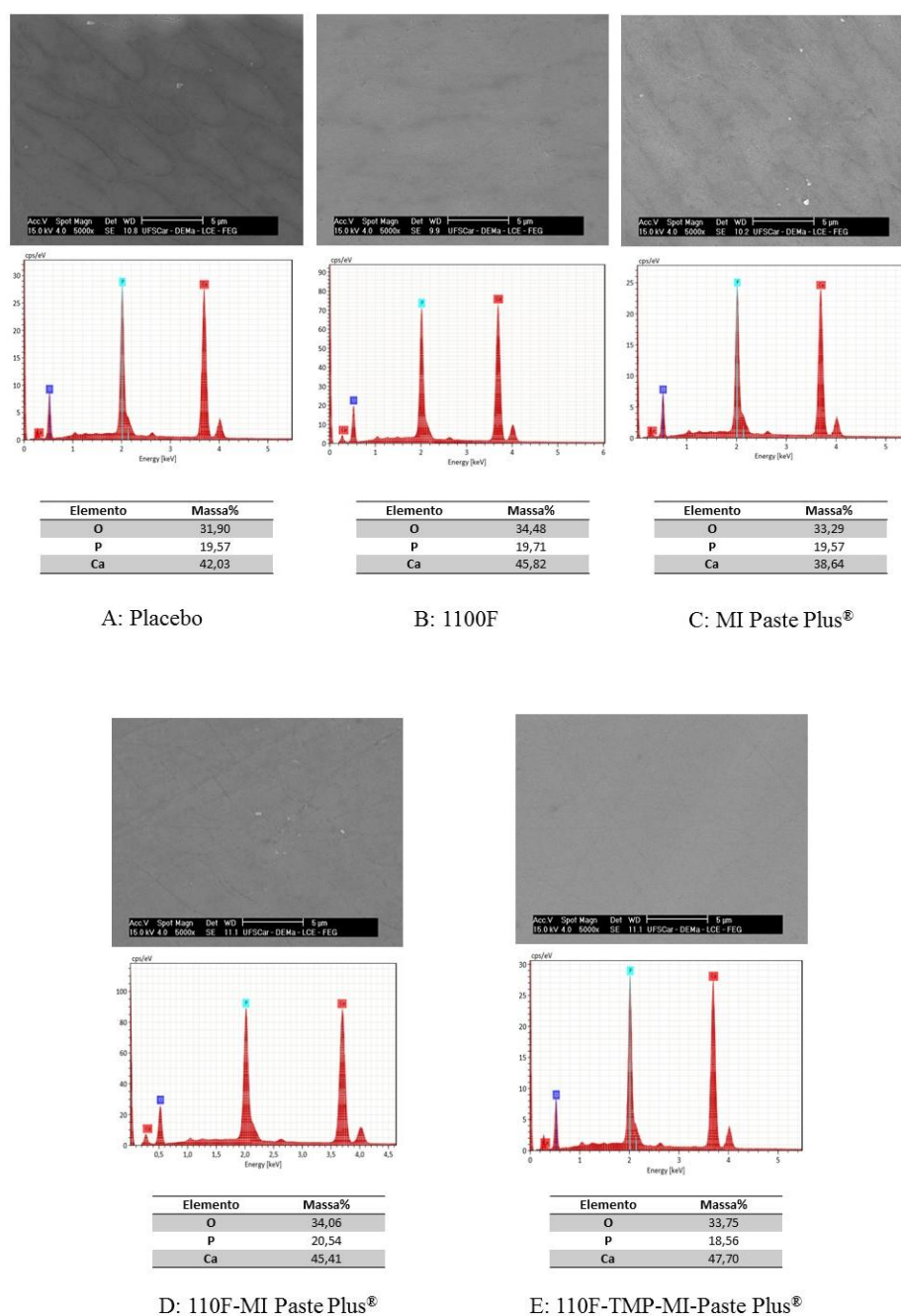


Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus®; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus® ($\times 5000$).

Artigo 2

3.0 Avaliação da eficácia da associação de tratamentos com fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio em reduzir a desmineralização do esmalte dentário: estudo *in vitro*

Gonçalves F.M.C^a, Delbem A.C.B^a, Gomes L.F^b, Emerenciano N.G^a, Pessan J.P^a, Silva M.P^a, Cannon M.L^c, Danelon M^{a,d}.

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Pediatric Dentistry and Public Health
Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - Cep 16015-050 – Brazil

^bFederal University of São Carlos - UFSCar, Department of Materials Engineering, São Carlos, SP - Cep 13565-905 – Brazil

^cNorthwestern University, Feinberg School of Medicine, Ann and Robert Lurie Children's Hospital, Chicago, IL, USA

^{a,d}School of Dentistry, University of Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP – Cep 14096-900 – Brazil

Título curto: Ação de fosfato e cálcio sobre a desmineralização

Autor correspondente:

Marcelle Danelon

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Pediatric Dentistry and Public Health

^dSchool of Dentistry, University of Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP – Cep 14096-900 – Brazil

Email:marcelledanelon@hotmail.com

***De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research.**

3.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) sobre a redução da desmineralização do esmalte dentário. Blocos de esmalte bovinos (4 mm × 4 mm, n = 60) foram selecionados pela dureza de superfície inicial (SHi) e a seguir divididos em 5 grupos de tratamentos (n=12): 1) Dentifrício sem F-TMP-MI Paste Plus[®] (Placebo); 2) Dentifrício com 1100 ppm F (1100F), 3) MI Paste Plus[®], 4) Dentifrício com 1100 ppm F + MI Paste Plus[®] (1100F-MI Paste Plus[®]) e 5) Dentifrício com 1100 ppm F + 3%TMP + MI Paste Plus[®] (1100F-TMP-MI Paste Plus[®]). Os blocos foram tratados 2x/dia com os dentifrícios e/ou MI Paste Plus, sendo submetidos a 5 ciclagens de pH durante 7 dias. Para todos os grupos, os tratamentos foram realizados 2x/dia por 1 minuto, exceto para os grupos 4 e 5, o quais após o tratamento com 1100F e 1100F-TMP, foi aplicado MI Paste Plus[®] por 3 minutos. Após a ciclagem de pH, foram determinadas a dureza de superfície final (SHf) para o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície através da microscopia de luz polarizada (PLM), microscopia confocal de varredura à laser (MCVL), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Os dados foram submetidos à ANOVA (1-critério), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em 20% e 30% quando comparado aos tratamentos 1100F e 1100F-MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$), respectivamente. A menor profundidade da lesão (Δ KHN, PLM) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais ($p < 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentou a maior concentração de F quando comparado aos grupos MI Paste Plus[®], 1100F, 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$). O tratamento com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento na concentração de Ca no esmalte em $\square$ 30% e $\square$ 20% quando comparado aos grupos 1100F e MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$), respectivamente. Valores semelhantes de P no esmalte foram observados nos grupos 1100F, MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$), exceto o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], que apresentou a maior concentração ($p < 0,001$). Conclui-se que a associação de 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu uma redução significativa na desmineralização do esmalte, podendo ser uma alternativa para crianças com alto risco e atividade de cárie dentária.

Palavras-chave: Esmalte dentário, Fluoreto, Fosfato, Desmineralização, ACP-CPP.

3.2 Introdução

A cárie dentária ainda continua sendo um problema de saúde pública [Golubnitschaja et al., 2016]. As superfícies dentárias são colonizadas por microrganismos cariogênicos, capazes de produzir ácidos orgânicos através do metabolismo dos carboidratos. A troca de minerais (perda ou ganho) continua na superfície do esmalte, desde que o biofilme na superfície crie um ambiente favorável à desmineralização ou remineralização. Dessa forma fatores como: concentração de cálcio, fosfato, íons hidroxila presentes na saliva e pH do biofilme associados a fatores secundários, podem determinar a mudança do equilíbrio e o desenvolvimento ou não da lesão cariosa [Bandekar et al., 2019]. A lesão inicia-se com aspecto de mancha branca, sendo a primeira manifestação clínica. Normalmente, a camada superficial do esmalte permanece intacta durante a desmineralização da subsuperfície, mas sem tratamento, a perda da subsuperfície continuará e, eventualmente, a camada superficial entrará em colapso e levará a uma formação de cavidade [Mann & Dickinson, 2006; Featherstone, 2008].

Existem muitas possibilidades de intervir no processo de desmineralização do esmalte com o objetivo de interromper ou até reverter o progresso da lesão [Featherstone, 2008; Thierens et al., 2019]. O fluoreto (F) tem sido o principal agente usado na prevenção da cárie dentária em todo o mundo. O uso de dentifrícios fluoretados é considerado o principal motivo da redução da prevalência de cárie observada nas últimas décadas [Walsh et al., 2019]. No entanto, o F como o único agente de prevenção de cárie não fornece uma solução completa, uma vez que a formação dos reservatórios de F e o potencial de remineralização da saliva são limitados pela disponibilidade de íons cálcio e fosfato. Portanto, para aumentar o potencial de prevenção de foram adicionados íons cálcio e fosfato em formulações com o objetivo de aumentar a retenção desses íons no ambiente oral [Danelon et al., 2017; Attiguppe et al., 2019; Danelon et al., 2019].

O sistema fosfopeptídio de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) usa fosfopeptídeos de caseína (CPP) para estabilizar íons de cálcio e fosfato (e F) em altas concentrações como fosfato de cálcio amorfo (ACP) ou fosfato de fluoreto de cálcio CPP-amorfo (CPP-ACPF) [Rechmann et al., 2018]. O mecanismo de ação do CPP-ACP baseia-se nos seguintes princípios: (1) supersaturação de íons de fosfato e íons de cálcio na saliva de forma a modular a sua biodisponibilidade; (2) capacidade de tamponar o biofilme dentário e a saliva através da manutenção dos níveis iônicos altos, impedindo quedas no pH; (3) promoção da remineralização da hidroxiapatita (HA); (4) prevenção e redução da desmineralização da HA; (5) atuação nos microrganismos do biofilme dentário e (6) manutenção da concentração iônica sob a superfície da lesão cariosa com intuito de remineralização da mesma [Cochrane & Reynolds, 2012; Shetty et al., 2014].

O trimetafosfato de sódio (TMP), um polifosfato cíclico, também tem sido estudado com a proposta de interferir na dinâmica do processo de des-remineralização, reduzindo a incidência de lesões de cárie [Takeshita et al., 2015; Danelon et al., 2017]. Seu principal mecanismo está associado a diminuição da solubilidade da HA e troca mineral [Amaral et al., 2018] e alterando a afinidade entre a superfície do esmalte e proteínas salivares [Nordbö e Rölla, 1972]. Takeshita et al. [2015, 2016] comprovaram que a adição de TMP em dentifrícios com reduzida concentração de F (500 ppm F) resultou em uma eficácia semelhante à de um dentifrício convencional (1100 ppm F) na remineralização e desmineralização *in situ* do esmalte dentário. Na tentativa de potencializar dentifrícios convencionais, Danelon et al. [2015] e Gonçalves et al. [2018], avaliaram o efeito de dentifrícios convencionais, suplementados com 3% de TMP sobre a remineralização e desmineralização *in situ* do esmalte dentário. Ambos os estudos demonstraram que essa associação potencializou o efeito da nova formulação dentifrícia, interferindo não só nos processos de des-remineralização, mas também afetando significativamente a composição do biofilme dentário, podendo ser uma alternativa viável para pacientes com alto risco de desenvolvimento da lesão de cárie. Diante dos bons resultados obtidos com o uso do ACP-CPPF e TMP na cárie dentária, seria interessante avaliar se a associação desses agentes ativos poderia ser uma estratégia viável na redução de lesões de cárie.

3.3 Objetivo

O objetivo do estudo foi avaliar a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) em reduzir a desmineralização do esmalte dentário. A hipótese nula do estudo foi:

- A associação de tratamentos: 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] não promoveria uma redução na desmineralização do esmalte dentário quando comparado aos tratamentos: a) Dentifrício 1100 ppm F e b) MI Paste Plus[®].

3.4 Materiais e Métodos

3.4.1 Preparação dos Blocos de Esmalte

Foram utilizados dentes incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos em recipientes plásticos com solução de formol a 2% pH 7,0 durante 1 mês. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=60) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura $\pm$ 2 mm). Os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricados ($\pm$ 3 cm de diâmetro por $\pm$ 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Cera Bastão Kerr ou Cera em Bastões Horus), com a superfície dentinária voltada para cima, sendo este conjunto levado à politriz BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA). Para o desgaste foram utilizadas lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), peso de 2 lbs, durante 30 segundos sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima sendo polidos de acordo com a seguinte sequência: lixa de granulação 600, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 4 lbs, 30 segundos, refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), em água deionizada durante 2 minutos. Na sequência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento (Polishing Cloth BUEHLER 40-7618) e suspensão de diamante (METADI Diamond Suspension 1 micron Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530), 4 lbs, 1 minuto. A seguir, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada durante 30 segundos e submetidos ao ultra-som (BRANSON 2210), durante 2 minutos, imersos em solução de limpeza (ULTRAMET Sonic Cleaning Solution, BUEHLER) diluída na proporção 20:1 em

água destilada. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com formol 2% pH 7,0 [Vieira et al., 2005].

3.4.2 Formulação, Determinação do pH e Concentração de F nos Dentifrícios Experimentais e MI Paste Plus®

Os dentifrícios foram manipulados e avaliados no laboratório de Odontopediatria da FOA-UNESP com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, lauril sulfato de sódio e água. Foram preparados dentifrícios contendo TMP microparticulado (Aldrich Chemistry, CAS 68915-31-1, Reino Unido) na concentração de 3% com adição de F na concentração de 1100 ppm F sob a forma de NaF (Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha). Um dentifrício sem adição de F/TMP/ACP-CPPF (Placebo) e um dentifrício com 1100 ppm F (sem TMP) foram preparados utilizando a mesma formulação que os demais, e foi utilizada uma pasta comercial contendo CPP-ACP associado a 900 ppm F - MI Paste Plus® (MI Paste Plus®, GC Corporation, Tóquio, Japão).

Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 (peso:peso) e foi realizada a leitura através do eletrodo de pH (Orion 290A, Orion Research Inc., Boston, EUA), sob agitação constante [Moretto et al., 2010]. O F dos dentifrícios foi dosado de acordo com o método descrito por Delbem et al. [2012]. Foram pesados 100-110 mg de cada dentifrício em triplicata, em tubos de polipropileno aos quais foi acrescentado água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do flúor total (FT), 0,25 mL dessa suspensão foi mantido sob agitação durante 1h a 45°C com 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. Em seguida foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e acrescentado 1,0 mL de TISAB II (Tampão ajustador de força iônica total). Para a dosagem de F foi utilizado um eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A), previamente calibrado com cinco padrões (1, 2, 4, 8 e 16 µg F/mL). Para a dosagem de flúor iônico (FI), o restante da suspensão de dentifrício foi submetido à centrifugação a 906 ×g durante 20 min. Foi pipetado 0,25 mL do sobrenadante e acrescentado 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, 0,5 mL de NaOH mol L⁻¹ e 1,0 mL de TISAB II e o F dosado da mesma forma que o FT.

3.4.3 Ciclagem de pH (DES>RE) e Tratamento com os Dentifrícios

Os blocos foram submetidos, em frascos individuais durante sete dias, a cinco ciclagens de pH, à temperatura de 37 °C, permanecendo os últimos dois dias em solução remineralizadora [Vieira et al., 2005]. Os tratamentos ocorreram 2x/dia por 1 minuto, exceto os grupos 3 e 6, os

quais após o tratamento com 1100F e 1100F/TMP, foi aplicado MI Paste Plus[®] por mais 3 minutos, e a seguir os blocos foram lavados com água deionizada. Após os tratamentos os blocos foram imersos em solução desmineralizadora (6 horas – Ca e P 2,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 µg F/mL em pH 4,7 – 2,2 mL/mm²) e remineralizadora (18 horas – Ca 1,5 mmol L⁻¹, P 0,9 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mol L⁻¹ em tampão cacodilato de sódio 0,02 mol L⁻¹, 0,05 µg F/mL em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos, tanto após remoção das soluções de ciclagem como das suspensões de dentifrício/água.

3.4.4 Análise da Dureza de Superfície do Esmalte

A dureza de superfície foi determinada utilizando-se o microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 segundos. Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 µm, foram realizadas na região central de cada bloco, para a análise da dureza de superfície inicial (SHi). Após a ciclagem de pH foram realizadas outras cinco impressões para a análise da dureza final (SHf) distantes a 100 µm das impressões de SHi e a seguir calculado a porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH). Para a análise da dureza em secção longitudinal, uma secção foi realizada no centro de cada bloco e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Foi utilizado microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, USA) e o software Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, USA), carga de 5 g por 10 s. Uma sequência de 14 impressões nas distâncias de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos [Spiguel et al., 2009]. A área integrada da dureza (KHN x µm) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (Graph Pad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN).

3.4.5 Análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície pela microscopia de luz polarizada (MLP)

Para a análise do perfil e profundidade das lesões de subsuperfície, após a determinação da perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN), as bases contendo os blocos de esmalte foram seccionadas, obtendo-se inicialmente slices de 300 µm de espessura, os quais foram desgastados até uma espessura de ~ 100 µm. O desgaste inicial das fatias foi realizado com lixa de granulação 400 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER) em uma politriz BETA – grinder polisher (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob constante refrigeração.

Posteriormente, os slices de esmalte foram manualmente polidos utilizando lixas de granulação 600, 800 e 1200, respectivamente. Imediatamente após, foram colocados em lâminas de vidro, imersos em água deionizada, sendo as bordas vedadas com resina sintética (Entellan, Merck, Darmstadt, Alemanha) e levados para visualização e recuperação de imagens em ampliação de 400X em MLP (AxioPhot, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para a obtenção das lesões de subsuperfície. Ainda, três áreas nas regiões centrais das fatias foram analisadas para verificar a presença e espessura (micrômetro) da camada superficial do esmalte (MLP superficial) e a profundidade de desmineralização (MLP profundidade) [Afonso et al., 2013; Danelon et al., 2014; Medeiros et al., 2018].

3.4.6 Análise da concentração de F, Ca e P presente no esmalte

Uma das metades dos blocos seccionados longitudinalmente foi seccionada novamente a fim de se obter blocos com espessura de 2 mm x 2 mm. Um dos blocos foi fixado com cola adesiva em mandril para peça reta e uma camada de esmalte (~50 µm) foi removida por microabrasão [Weatherell et al., 1985]. Utilizou-se uma base de microscópio modificada com manômetro acoplado (Pantec, São Paulo, Brazil) e disco de lixa auto-adesiva (13 mm de diâmetro) de granulação 400 (silicon-carbide, Buelher) em frascos de poliestireno cristal (J-10, Injeplast, Brasil). Ao pó do esmalte adicionou-se 0,5 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹, e os frascos foram mantidos sob agitação constante durante 1 hora sendo por fim adicionado 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ [Alves et al., 2007; Takeshita et al., 2009]. As concentrações de F, Ca e P foram determinadas e os resultados expressos em µg/mm³.

Para análise de F foi utilizado um eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplados a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Os eletrodos foram previamente calibrados com 5 padrões contendo 1, 2, 4, 8 e 16 µg F/mL, nas mesmas condições das amostras. As leituras foram realizadas, em duplicata, com alíquotas de 500 µL da solução da biópsia acrescidas com o mesmo volume de TISAB II. O cálcio foi determinado pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, como descrito por Vogel et al. [1983]. Para calibração, foram utilizados padrões contendo 40 a 200 µg Ca/mL. Alíquotas de 3 µL (duplicata) foram dispostas em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 – TPP, Switzerland) acopladas em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), utilizando comprimento de onda de 650 nm. O P foi dosado utilizando uma alíquota de 0,1 mL através do método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow [1925]. As leituras em duplicata foram realizadas em placas de 96 poços da mesma forma que na dosagem de Ca,

utilizando-se espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) no comprimento de onda de 660 nm.

3.4.7 Análise da morfologia e composição química do esmalte através do CLSM e MEV/EDS

Blocos de esmalte ($n = 2$) foram analisados por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM, Olympus LEXT OLS 4000- Carl Zeiss, Alemanha) com ampliação de $100 \times$ para obter imagens topográficas tridimensionais da superfície do esmalte. Imagens altamente ampliadas da superfície dos blocos de esmalte foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todos os blocos foram desidratados gradualmente em uma série de etanol ascendente (50, 60, 70, 80 e 100%) e banhados a ouro (Quorum - Q150T E). O modo de operação de elétrons secundários foi realizado para identificar a morfologia dos blocos de esmalte após a ciclagem de pH e tratamentos. O instrumento utilizado para isso foi um MEV-PHILIPS (XL-30 FEG, Philips, Amsterdã, Holanda) equipado com EDS (Energy dispersive spectroscopy). A microsonda EDS anexada ao MEV apresenta análise qualitativa e quantitativa da composição química com uma típica resolução lateral de um micrometro e uma resolução de profundidade típica de alguns décimos de micrometro e foi utilizada para verificar as composições químicas na superfície dos blocos de esmalte [Bakry & Abbassy, 2018]. Ambos equipamentos localizados no Laboratório de Caracterização Estrutural-Departamento de Materiais-UFScar (LCE-UFSCar/DEMa).

3.4.8 Análise Estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigmaplot[®] versão 12.0 (versão 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), com significância ao nível de 5%. Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de %SH, Δ KHN, PLM, F, Ca e P presente no esmalte; e como fator de variação o tipo tratamento. Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogêneo (teste de Cochran) e, portanto, foram analisados por ANOVA 1-critério, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

3.5 Resultados

A concentração média (DP) de fluoreto total (FT) e fluoreto iônico (FI) ($n=3$) foi: Placebo - 10,5 (0,1) e 10,0 (1,2), 1100 ppm F - 1186,0 (33,2) e 1102,4 (28,5), 1100F-

TMP- 1112,6 (13,2) e 1110,3 (17,6) e MI Paste Plus[®] - 918,3 (18,4) e 913,3 (18,4). O valor de pH dos grupos foi de 7,4 (0,1) variando de 7,3 a 7,5.

A média de dureza de superfície inicial (SHi) para todos os blocos foi de 369,0 (2,4), variando de 361,2 (6,2) e 377,2 (5,2) KHN nos grupos experimentais ($p = 0,051$). Não houveram diferenças significativas entre os grupos após a distribuição ($p = 0,737$). Os grupos 1100F, MI Paste Plus[®] e 1100F-MI Paste Plus[®] apresentaram valores semelhantes de %SH ($p > 0,001$). O grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em 20% e 30% quando comparado aos tratamentos 1100F e 1100F-MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$), respectivamente. A fotomicrografia da microscopia de luz polarizada mostrou lesões de subsuperfície em todos os grupos, mas estas estavam presentes em menor extensão no grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (Tabela 1, Figura 1). A menor profundidade da lesão (Δ KHN) foi observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] quando comparado aos demais ($p < 0,001$), sendo inferior em 53% quando comparado ao grupo 1100F (Tabela 1 e Figura 1).

A concentração de F foi similar entre os grupos MI Paste Plus[®], 1100F, 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$), sendo a maior concentração observada para o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$). O tratamento com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu um aumento na concentração de Ca no esmalte em $\square$ 30% e $\square$ 20% quando comparado aos grupos 1100F e MI Paste Plus[®] ($p < 0,001$), respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos 1100F, MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$) (Tabela 2). Valores semelhantes de P no esmalte foram observados nos grupos 1100F, MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] ($p > 0,001$), exceto o grupo 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], que apresentou a maior concentração ($p < 0,001$).

A morfologia da superfície do esmalte de acordo com os tratamentos é mostrada por CLSM e MEV (Figura 2A-2E; Figura 3A-3E). Os blocos tratados com 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] apresentaram uma superfície mais lisa e plana e menos erodida, em relação aos demais tratamentos. Além disso, mesmo na presença de Ca e P as superfícies também se mostraram muito rugosas, porém em menor grau do que no grupo Placebo. Não foi observado aumento significativo na razão Ca/P (EDS) na superfície do esmalte após os diferentes tratamentos (Figura 3A-3E).

3.6 Discussão

Apesar da crescente conscientização mundial sobre os cuidados com a saúde bucal, a prevalência de cárie dentária ainda permanece alta [Chen et al., 2019; Serrano-Piña, et al., 2020]. Além dos métodos tradicionais como visita regular ao dentista, escovação com

dentifrício fluoretado, controle da dieta cariogênica e aplicação tópica de flúor profissional, outros métodos são destacados na literatura a fim de reduzir a incidência da doença [Bahrololoomi et al., 2019], dentre eles, produtos que contenham Ca e P em sua formulação tem merecido destaque, uma vez que participam diretamente nos processos DES e Remineralização [Cochrane et al., 2012; Danelon et al., 2019]. A hipótese nula do estudo foi a de que a associação de tratamentos: 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], não promoveria redução na desmineralização do esmalte quando comparado aos tratamentos com dentifrício 1100 ppm F e MI Paste Plus[®]. Diante dos resultados obtidos a hipótese nula foi negada.

O F tem um papel fundamental no manejo não invasivo de lesões de cárie, mas sua capacidade de interferir na dinâmica da cárie é limitada pela disponibilidade de íons cálcio e fosfato, assim a associação de F com fontes ricas de Ca e P tem sido proposta como um tratamento eficaz para os estágios iniciais da doença de cárie. No presente estudo foi avaliado a MI Paste Plus[®], a qual é constituída por CPP-ACP associado a 900 ppm F. O ACP-CPP é um composto bioativo de fosfopeptídeos de caseína/fosfato de cálcio amorfo obtido a partir da caseína do leite, que ao sofrer digestão enzimática na cavidade bucal forma fosfopeptídeos de caseína (CPP). O CPP estabiliza o cálcio e fosfato mantendo-os em uma forma amorfa (ACP) causando um aumento nas concentrações desses íons no esmalte dentário o que facilita a remineralização, além de favorecer a formação de espécies neutras como HF^0 e CaHPO_4^0 permitindo a difusão dos mesmos em profundidade, reduzindo dessa forma a desmineralização do esmalte [Reynolds et al., 2003].

É sugerido que o cálcio e o fosfato liberados pelo CPP-ACP apresentam capacidade de formar nano-complexos no biofilme adjacente a lesão inicial de cárie, tornando o esmalte mais resistente a ácidos e a qualquer ataque ácido adicional [Manoharan et al., 2018]. Ainda, quando o F é associado ao ACP-CPP (ACP-CPPF) fornece efeitos superiores na remineralização e maior resistência a desmineralização dentária [Oliveira et al., 2016]. Os resultados do presente estudo mostram que o regime apenas com a MI Paste Plus[®] não melhorou a perda mineral (Tabela 1, Figura 2) quando comparado ao regime convencional (1100F), semelhante ao encontrado no estudo de Bakry et al. [2014]. Pode ser especulado que os íons F quando associado ao ACP-CPP possam ter retardado a penetração dos íons Ca e P para as áreas mais profundas das lesões causando precipitação precoce dos mesmos na superfície externa do esmalte, como verificado no estudo Bakry et al. [2014], dificultando assim a difusão de HF^0 e CaHPO_4^0 na lesão do esmalte. Uma outra especulação seria a redução da quantidade de F solúvel disponível [Karlinsky et al., 2009; Oliveira et al., 2017]. É importante esclarecer que o desenho do presente estudo não se concentrou em mostrar o impacto dos produtos na remineralização de lesões pré-formadas de cárie de esmalte, mas na prevenção da

desmineralização. Em nosso estudo, a MI Paste Plus[®] foi aplicada 2x/dia, por três minutos, ou seja, tratamento superior ao recomendado pelo fabricante (1x/dia) entretanto, os resultados não foram satisfatórios. Nossos achados corroboram com pesquisas anteriores que recomendam múltiplas aplicações da MI Paste Plus[®] com período relativamente longo de regime, podendo chegar até 4 semanas para obter remineralização significativa do esmalte desmineralizado [Thepyou et al., 2013]. Dessa forma, embora estudos *in situ* e ensaios clínicos randomizados mostrem, que o ACP-CPP possa interferir no processo DES-RE, não parece ser significativamente diferente do F [Yengopal & Mickenautsch, 2009; Li et al., 2014]. De fato, não existem evidências científicas do benefício da aplicação do CPP-ACP em conformidade com o Revisões sistemáticas [Chen et al., 2013; Li et al., 2014; Indrapriyadharshini et al., 2018].

Para maximizar o efeito benéfico do F, principalmente em crianças com atividade ou em risco a cárie dentária, a combinação de métodos tópicos pode ser sugerida [AAPD, 2017]. Em nosso estudo a associação de tratamentos com dentifrício convencional (1100F) e MI Paste Plus[®] foi utilizada com o intuito de simular uma condição clínica, assim como, avaliar se essa associação poderia potencializar o efeito do uso diário do dentifrício convencional para pacientes com risco a cárie. Através de nossos achados, neste estudo *in vitro*, constata-se que a associação de 1110F-MI Paste Plus[®] não melhorou a redução da desmineralização do esmalte dentário em relação ao 1100F, tanto em superfície como em profundidade, mesmo a pasta comercial apresentar em sua formulação alto nível de cálcio e fosfato solúvel, evidenciando ainda, que essa associação pode reduzir o efeito direto do uso diário de 1100F (Tabela 1 e Figura 1). Nossos resultados estão de acordo com Gopalakrishnan et al. [2017], cujo autores não encontraram nenhum benefício adicional dessa associação. Acredita-se que ao ocorrer precipitação desses íons rapidamente nas zonas superficiais da lesão, haja impedimento de que o processo de remineralização ocorra no corpo da lesão [Oliveira et al., 2014]. Ainda, diversos estudos [Arends & Christoffersen, 1990; Featherstone et al., 1990; Hicks et al., 2004] demonstram a necessidade de um nível baixo e constante de F para reduzir a desmineralização e consequentemente promover a remineralização, ao invés de uma exposição aguda a um alto nível de F. Ainda existem hipóteses de que a deposição de F ocorre principalmente na camada superficial, levando ao bloqueio dos poros da camada superficial. Isso pode explicar por que a alta dose de F fornecida ao esmalte neste estudo foi incapaz de reduzir significativamente a desmineralização nas camadas mais profundas. Dessa forma, mais estudos com diferentes protocolos devem ser realizados para confirmar os achados até o momento, assim como, repensar nos protocolos que são propostos na literatura ao controle da cárie dentária.

Um outro achado importante de nosso estudo é que, embora a MI Paste Plus[®] apresente alta concentração de Ca e P na formulação, a retenção desses íons ao esmalte foi similar aos tratamentos com 1100F e 1100F-MI Paste Plus[®] (Tabela 2). Para esta observação, alguns fatores devem ser considerados: modelos de ciclagem de pH não reproduzem fielmente a situação bucal; a ausência de biofilme e, conseqüentemente, um melhor ambiente para a atuação do CPP-ACPF para criar um estado de supersaturação de íons Ca e P poderia ter impedido que este sistema reduzisse adequadamente a desmineralização do esmalte. Portanto, em estudos futuros o efeito da MI Paste Plus[®] deve ser testado *in situ* para mostrar se a reação com a superfície dentária seria melhor na presença de saliva humana, película adquirida e biofilme. Esses resultados estão de acordo Karlinsey et al. [2009] e Souza et al. [2014], sugerindo que pode ocorrer uma reação química entre ACP e F tornando os dois componentes inorgânicos ineficazes [Karlinsey et al., 2009]. Especula-se também, que tenha ocorrido uma maior liberação de Ca e P na superfície do esmalte desmineralizado no experimento atual, porém houve precipitação desses íons na superfície, retardado a penetração em profundidade e conseqüentemente reduzindo a remineralização [Bakry & Abbassy, 2018].

O TMP, um polifosfato cíclico tem sido muito estudado em associação ao F em produtos de higiene oral. Quando adicionado em dentifrícios fluoretados [Takeshita et al., 2015; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018] tem demonstrando melhorar o efeito do F em reduzir a desmineralização do esmalte [de Castro et al., 2015; Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018]. Em nosso estudo, a associação 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] levou à menor desmineralização do esmalte tanto em superfície quanto em profundidade, sendo superior em ~ 20% (%SH) e ~ 53% (Δ KHN) ao tratamento com 1100F (Tabela 1 e Figura 1). Além da redução da desmineralização observou-se maior fluxo de Ca e P para o interior da lesão como também de fluoreto (Tabela 2), esses achados estão de acordo com o estudo de Takeshita et al. [2011] que também observou maior fluxo desses íons quando o TMP foi associado ao F. Nossos resultados podem ser explicados devido ao mecanismo de ação que tem sido proposto ao TMP. Sabe-se que, quando em contato com a superfície dentária, esse polifosfato possui a capacidade de se aderir por meio da interação entre os sítios aniônicos do TMP e grupos hidroxila da hidroxiapatita, reduzindo a difusão ácida para o interior do esmalte, afetando consideravelmente a mineralização na região mais profunda da lesão de cárie de subsuperfície [Danelon et al., 2014; Akabane et al., 2018; Amaral et al., 2018]. Ainda após essa ligação uma maior quantidade de Ca^{++} e CaF^+ em sua estrutura carregada negativamente é retida. Pode se observar que na presença do ACP-CPPF, essa reatividade é aumentada (principalmente devido a capacidade desse complexo em reduzir a precipitação de cálcio e fosfato) levando a maior formação não só das espécies iônicas mencionadas acima, mas

também a formação de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0), assim a precipitação dessas espécies não ocorre diretamente no esmalte, mantendo os poros na superfície abertos, o que facilita a difusão dessas espécies para o interior da lesão, influenciando positivamente redução da desmineralização do esmalte [Cochrane et al., 2008; Takeshita et al., 2016; de Castro et al., 2015; Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017]. Esses achados também estão de acordo com Reynolds [2008] o qual relatou um aumento na relação Ca/P no esmalte desmineralizado após 10 dias de tratamento com várias soluções contendo CPP-ACP, o que foi atribuído à deposição mineral na forma de hidroxiapatita e a formação das espécies acima mencionadas.

Após o desafio promovido pela ciclagem de pH e tratamento com os dentifrícios experimentais, foi possível observar através da CLSM e MEV/EDS alterações morfológicas e estruturais para todos os grupos de tratamentos (Figura 2A-2E; Figura 3A-3E). Para o 1100F-TMP-MI Paste Plus[®], identificou-se superfícies muito mais suaves, em relação aos demais grupos. Além disso, mesmo na presença de Ca e P (grupos MI Paste Plus[®], 1100F-MI Paste Plus[®] e 1100F-TMP-MI Paste Plus[®]), as superfícies também se mostraram rugosas, porém em menor grau do que no grupo Placebo, sendo verificado aumento da porosidade superficial, depressões e irregularidades significativas. Esses achados corroboram com o estudo de Mendes et al. [2003], onde os autores também relataram a maior porosidade (consequentemente maior exposição, assim como aumento, nos espaços interprismáticos) com a diminuição do conteúdo mineral (Tabela 1, Figura 2A e Figura 3A). O EDS foi utilizado com o intuito de estimar o conteúdo mineral em superfície pós-desmineralização. Não foi possível observar aumento na razão de Ca/P na superfície do esmalte dentário, sugerindo que apenas o F provoca modificações estruturais nos cristais de apatita, restritas à substituição parcial do grupo hidroxila por íons F, sem afetar consideravelmente a rede estrutural de Ca/P assim como seu teor.

Deve-se ressaltar que os dados obtidos até o presente momento, embora não simulem totalmente a complexidade de um ambiente bucal, fornecem evidência inicial para encorajar uma maior exploração dos múltiplos mecanismos que atuam em conjunto para a prevenção da cárie, principalmente aqueles pacientes de alto risco. Alguns exemplos de estudos futuros que devem ser conduzidos destacam-se: 1) avaliação da associação sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie; 2) presença de saliva humana através de estudos *in situ*; 3) diferentes protocolos (tempo de aplicação x quantidade/dia); 4) presença de biofilme e, consequentemente, um ambiente propício ao CPP-ACPF para que contribua a um estado de supersaturação de íons Ca e P, através de estudos *in situ* e *in vivo* e 5) verificar se o efeito dessa associação também pode ser modulado por diferentes tempos de aplicação.

3.7 Conclusão

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a associação de 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] promoveu uma redução significativa na desmineralização do esmalte podendo ser estratégia a ser utilizada em pacientes de risco ou atividade de cárie.

3.8 Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo: 2018/13258-0 e 2018/24761-4) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. *Pediatr Dent* 2017;39:59-61.
2. Afonso RL, Pessan JP, Igreja BB, Cantagallo CF, Danelon M, Delbem ACB. In situ protocol for the determination of dose response effect of low-fluoride dentifrices on enamel remineralization. *J App Oral Sci* 2013;21:525-532.
3. Akabane S, Delbem AC, Pessan J, Garcia L, Emerenciano N, Gonçalves DF, Danelon M. In situ effect of the combination of fluoridated toothpaste and fluoridated gel containing sodium trimetaphosphate on enamel demineralization. *J Dent* 2018;68:59-65.
4. Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-267.
5. Amaral JG, Pessan JP, Souza JAS, Moraes JCS, Delbem ACB. Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106:2553-2564.
6. Arends J, Christoffersen J. Nature and role of looselybound fluoride in dental caries. *J Dent Res* 1990;69:601-605.
7. Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP–ACP and Fluoride: A Synergism to Combat Caries *Int J Clin Pediatr Dent* 2019 12;120-125.
8. Bahrololoomi Z, Zarebidoki F, Mostafalu N. The effect of different re-mineralizing agents and diode laser irradiation on the microhardness of primary molar enamel: An in vitro study. *Laser Ther* 2019;28:187-192.
9. Bandekar S, Patil S, Dudulwar D, Moogi PP, Ghosh S, Kshirsagar S. Remineralization potential of fluoride, amorphous calcium phosphatecasein phosphopeptide, and combination of hydroxylapatite and fluoride on enamel lesions: An *in vitro* comparative evaluation. *Conserv Dent* 2019 22;305-309.
10. Bakry AS, Marghalani HY, Amin OA, Tagami J. The effect of a bioglass paste on enamel exposed to erosive challenge. *J Dent* 2014;42:1458-14563.
11. Bakry AS, Abbassy MA. Increasing the efficiency of CPP-ACP to remineralize enamel white spot lesions. *J Dent* 2018;76:52-57.
12. Chen KJ, Gao SS, Duangthip D, Lo ECM, Chu CH. Prevalence of early childhood caries among 5-year-old children: A systematic review. *J Investig Clin Dent* 2019;10:e12376.

13. Chen H, Liu X, Dai J, Jiang Z, Guo T, Ding Y. Effect of remineralizing agents on white spot lesions after orthodontic treatment: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;143:376-382.
14. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides—mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res* 2012;24:41-47.
15. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig* 2014;18:1119-1127.
16. Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 2015;43:806-813.
17. Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2017;78:82-87.
18. Danelon M, Garcia LG, Pessan JP, Passarinho A, Camargo ER, Delbem ACB. Effect of Fluoride Toothpaste Containing Nano-Sized Sodium Hexametaphosphate on Enamel Remineralization: An in situ Study. *Caries Res* 2019;53:260-267.
19. de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C. In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 2015;19:1683-1687.
20. Delbem ACB, Bergamaschi M, Rodrigues E, Sasaki KT, Vieira AEM, Missel EMC. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *J Appl Oral Sci* 2012;20:94-98.
21. Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, de Camargo ER, Danelon M. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol* 2018;96:223-229.
22. Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res* 1990;69:620-625.
23. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 2008;53:286-291.
24. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
25. Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, et al. Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation—EPMA position paper 2016. *EPMA J* 2016;7:23.

26. Gopalakrishnan VL, Anthonappa RP, King NM, Itthagaran A. Remineralizing potential of a 60-s in vitro application of Tooth Mousse Plus Int. J Paediatr Dent 2017;27:356-363.
27. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). J Clin Pediatr Dent 2004;28:119-124.
28. Karlinsey RL, Mackey AC, Stookey GK, Pfarrer AM. In vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium phosphate technology. Am J Dent 2009;22:180-184.
29. Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, Mei L. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: a systematic review. J Dent 2014;42:769-777.
30. Mann AB, Dickinson ME. Nanomechanics, chemistry and structure at the enamel surface. Monogr Oral Sci 2006;19:105-131.
31. Manoharan V, Kumar RK, Sivanraj AK, Arumugam SB. Comparative Evaluation of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Fluoride Phosphate and Novamin on Artificially Demineralized Human Enamel: An In vitro Study. Contemp Clin Dent 2018;9:S58-S63.
32. Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. Caries Res 2003;37:442-444.
33. Medeiros MID, Carlo HL, Santos RLD, Sousa FB, Castro RD, França RCS, Carvalho FG. TiF4 varnish protects the retention of brackets to enamel after in vitro mild erosive challenge. J Appl Oral Sci 2018;14.
34. Moretto MJ, Magalhães AC, Sasaki KT, Delbem ACB, Martinhon CCR. Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion. Caries Res 2010;44:135-140.
35. Nordbö H, Rölla G. Desorption of salivary proteins from hydroxyapatite by phytic acid and glycerophosphate and the plaque-inhibiting effect of the two compounds in vivo. J Dent Res 1972;51:800-811.
36. Oliveira P, Fonseca A, Silva EM, Coutinho T, Tostes MA. Remineralizing potential of CPP-ACP crèmes with and without fluoride in artificial enamel lesions. Aust Dent J 2016;61:45-52.
37. Oliveira PRA, Coutinho TCL, Portela MB, Paula VCA, Tostes MA. Influence of biofilm formation on the mechanical properties of enamel after treatment with CPP-ACP crème. Braz Oral Res 2017;31:e84.

38. Rechmann P, Bekmezian S, Rechmann BMT, Chaffee BW, Featherstone JDB. MI Varnish and MI Paste Plus in a caries prevention and remineralization study: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig* 2018;22:2229-2239.
39. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003;82:206-211.
40. Serrano-Piña R, Aguilar-Ayala FJ, Scougall-Vilchis RJ, Trujillo-Güiza ML, Mendieta-Zerón H. Prevalence of Obesity in Elementary School Children and its Association with Dental Caries. *Oral Health Prev Dent* 2020;18:35-42.
41. Shetty S, Hegde MN, Bopanna TP. Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2014;17:49-52.
42. Souza CC, Cury JL, Coutinho TC, Da Silva EM, Tostes MA. Effect of different application frequencies of CPP-ACP and fluoride dentifrice on demineralized enamel: a laboratory study. *Am J Dent* 2014;27:215-219.
43. Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. 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* 2009;43:302-307.
44. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem, ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;43:50-56.
45. Takeshita EM, Exterkate RA, Delbem AC, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro. *Caries Res* 2011;45:494-497.
46. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. *Caries Res* 2015;49:394- 400.
47. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res* 2016;50:571-578.
48. Thepyou R, Chanmitkul W, Thanatvarakorn O, Hamba H, Chob-Isara W, Trairatvorakul C, Tagami J. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and glass ionomer show distinct effects in the remineralization of proximal artificial caries lesion in situ. *Dent Mater J* 2013;32:648-653.

49. Thierens LAM, Moerman S, Elst CV, Vercruysse C, Maes P, Temmerman L, Roo NMC, Verbeeck RMH, Pauw GAM. The in vitro remineralizing effect of CPP-ACP and CPP-ACPF after 6 and 12 weeks on initial caries lesion. *J Appl Oral Sci* 2019;20:e20180589.
50. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520.
51. Vogel GL, Chow LC, Brow WL. 1983. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23-31.
52. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Marinho VC, Jeroncio A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;3:CD007868.
53. Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H. Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
54. Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a metaanalysis. *Acta Odontol Scand* 2009;67:321-332.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Média ($\pm dp$) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tabela 2: Média ($\pm dp$) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamento

Lista de figuras

Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 40).

Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 100).

Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo; (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] (× 5000).

Tabela 1: Média ($\pm$ dp) das variáveis analisadas no esmalte de acordo com os tratamentos

Tratamentos	%SH (KHN)	Δ KHN (KHN $\times$ μ m)	PLM Superficial (μ m)	PLM Depth (μ m)
Placebo	82,2 ^a (1,0)	7.451,0 ^a (1.112,4)	1,6 ^a (0,6)	41,4 ^a (6,3)
1100F	49,2 ^b (6,1)	4.663,8 ^b (1.317,2)	3,7 ^b (0,3)	14,2 ^b (2,6)
MI Paste Plus [®]	55,9 ^b (3,3)	5.169,9 ^d (876,7)	3,2 ^b (0,8)	22,3 ^c (5,6)
1100F- MI Paste Plus [®]	51,3 ^b (3,8)	5.512,9 ^d (413,7)	3,3 ^b (0,8)	20,9 ^c (2,7)
1100F-TMP-MI Paste Plus [®]	39,3 ^c (1,6)	2.189,3 ^e (575,0)	7,8 ^c (0,5)	9,8 ^d (1,3)

Letras sobrescritas distintas indicam significância estatística entre os tratamentos em cada análise (ANOVA, 1 critério, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$). Valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média. %SH: porcentagem de perda de dureza de superfície. Δ KHN: perda integrada de dureza de subsuperfície. Superficial PLM: espessura da camada superficial de esmalte. Depth PLM: espessura da profundidade de desmineralização. KHN: Dureza Knoop. μ m: micrometros.

Tabela 2: Média ($\pm$ dp) de F, Ca e P no esmalte de acordo com os tratamentos

Tratamentos	F ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	Ca ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	P ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
Placebo	0,9 ^a (0,4)	114,4 ^a (11,9)	138,7 ^a (12,5)
1100F	2,6 ^b (0,6)	252,8 ^b (37,0)	204,5 ^b (22,1)
MI Paste Plus [®]	2,0 ^b (0,2)	272,7 ^b (39,4)	179,9 ^b (34,0)
1100F- MI Paste Plus [®]	2,3 ^b (0,6)	273,3 ^b (61,0)	181,6 ^b (40,9)
1100F-TMP-MI Paste Plus [®]	3,2 ^e (0,8)	328,5 ^c (42,1)	290,5 ^c (30,6)

Letras sobrescritas distintas indicam significância estatística entre os tratamentos em cada análise (ANOVA, 1 critério, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$). Valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média. F: fluoreto no esmalte. Ca: cálcio no esmalte. P: fósforo no esmalte.

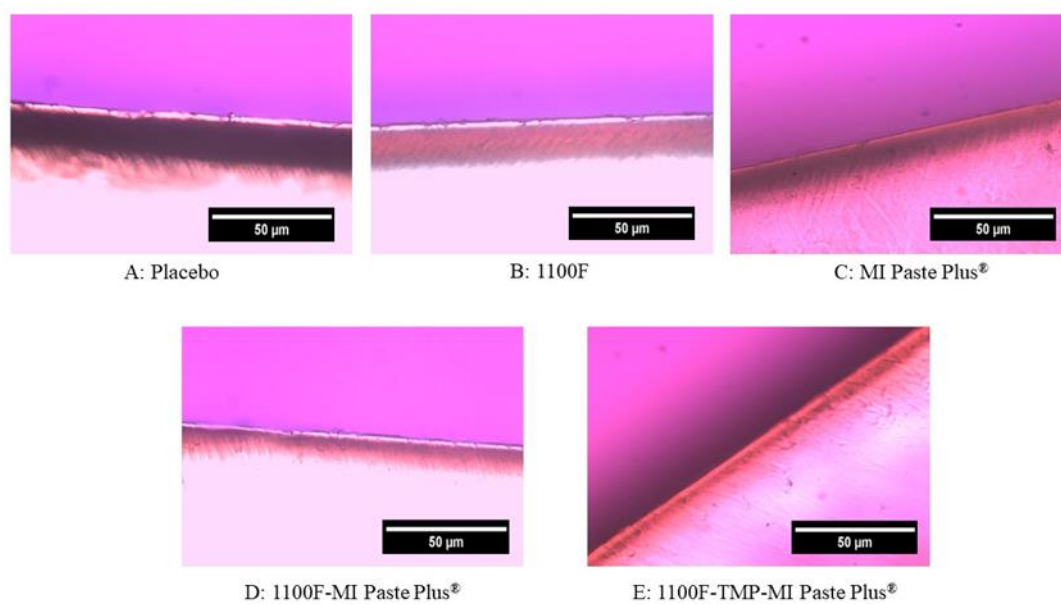


Figura 1: (A) Fotomicrografia com luz polarizada da lesão formada após tratamento com (A) Placebo (sem F-TMP-MI Paste Plus[®]); (B) 1100F; (C) MI Paste Plus[®]; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus[®] ($\times 40$).

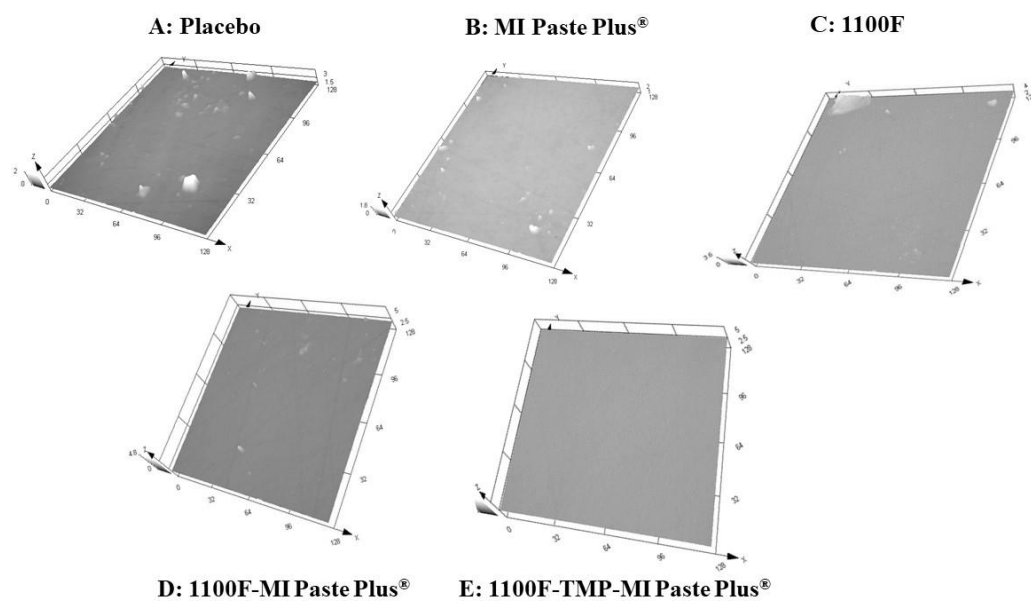


Figura 2: Imagens topográficas tridimensionais obtidas por CLSM após tratamento com: (A) Placebo (sem F-TMP-MI Paste Plus®); (B) 1100F; (C) MI Paste Plus®; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus® ($\times 100$).

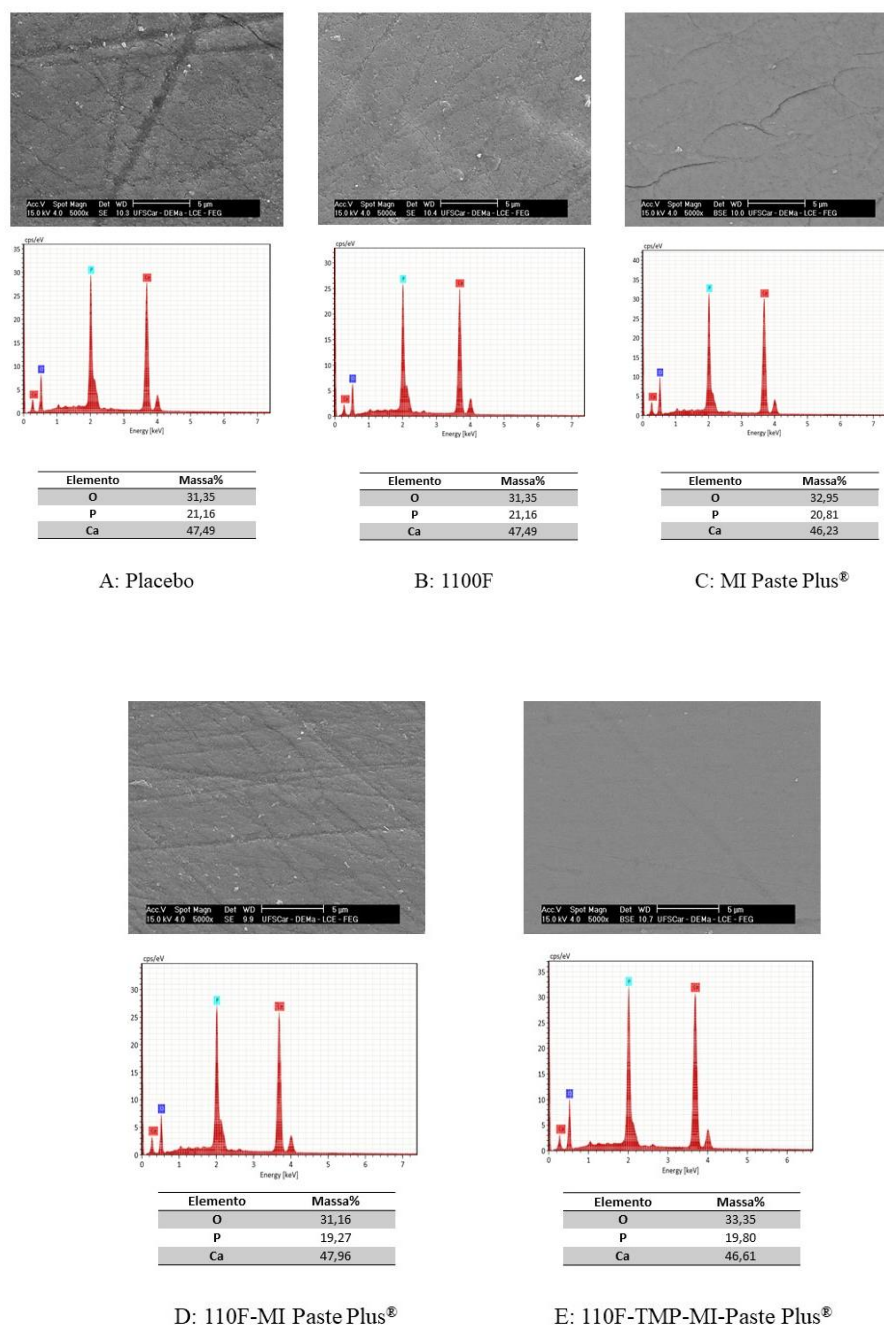


Figura 3: Imagens obtidas através do MEV e análise EDS do esmalte após tratamento com: (A) Placebo (sem F-TMP-MI paste Plus®); (B) 1100F; (C) MI Paste Plus®; (D) 1100F-MI; (E) 1100F-TMP-MI Paste Plus® ($\times 5000$).

Conclusão Geral

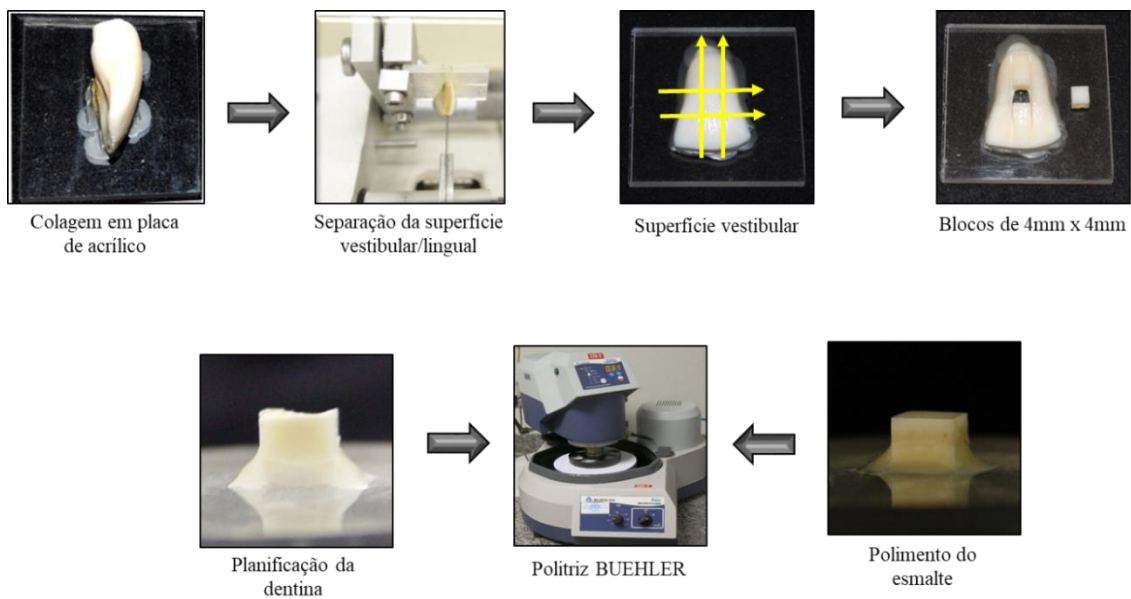
4. CONCLUSÃO GERAL

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a associação de tratamentos com dentifrícios fluoretados e suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (MI Paste Plus[®]) (1100F-TMP-MI Paste Plus[®]) promoveu um efeito adicional significativo no processo de des-remineralização, podendo ser uma alternativa de tratamento eficaz para pacientes em risco e atividade de cárie.

Anexos

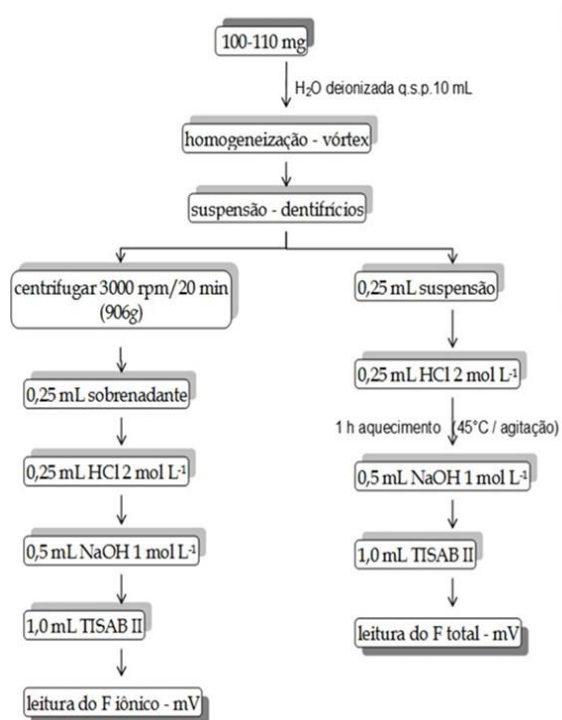
5.1 ANEXO A

PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE



5.2 ANEXO B

DOSAGEM DE FLUORETO NOS DENTÍFRÍCIOS EXPERIMENTAIS

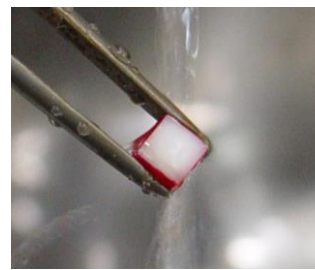
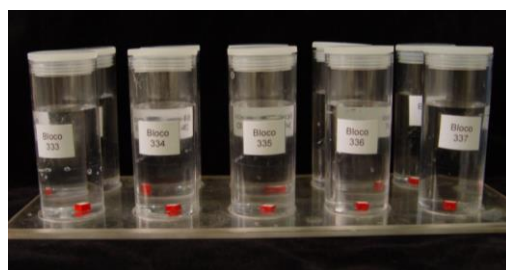


Eletrodo específico para F⁻; Orion 9409-BN

Microeletrodo de referência
Analisador de íons

5.3 ANEXO C

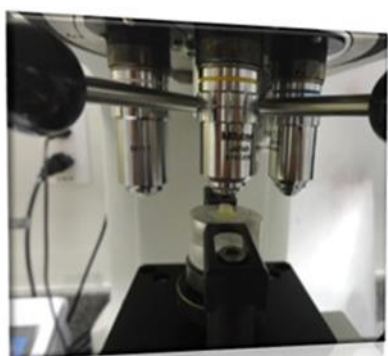
INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL



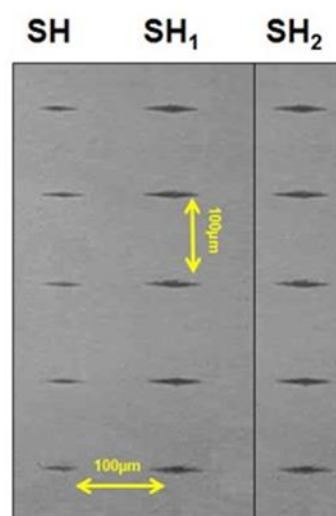
16 horas

5.4 ANEXO D

ANÁLISE DA DUREZA INICIAL, PÓS-DESMINERALIZAÇÃO E PÓS-REMINERALIZAÇÃO

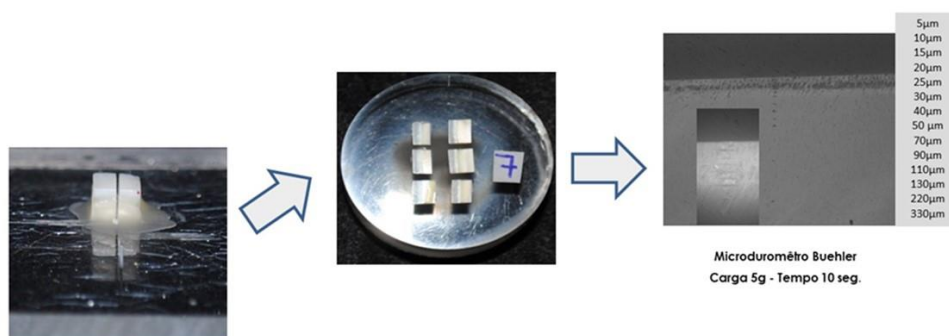


Microdurômetro Buehler
Carga 25 gramas, Tempo 10 segundos



5.5 ANEXO E

ANÁLISE DA PERDA INTEGRADA DE DUREZA DE SUPERFÍCIE



5.6 CICLAGEM DE pH



5.7 ANÁLISE DE FLUORETO, CÁLCIO E FÓSFORO NO ESMALTE



Micrômetro eletrônico digital com saída acoplado a uma base de microscópio e blocos fixados



Desgaste ~50µm Lixa 400
(CARBIMET - BUEHLER)



0,5 ml de HCl 1 mol/L

Agitação por 1 hora

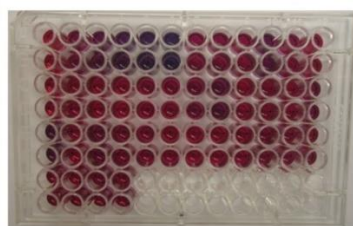


0,25 mL da amostra + 0,25 mL
TISAB II modificado com NaOH.

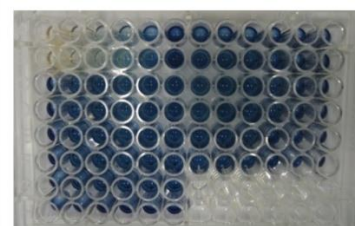
Akabane et al., 2018.



Espectrofotômetro de microplaca
EONC, Biotek, USA



Cálcio - Método
colorimétrico Arsenazo III,
Fiske e Subbarow, 1925.



Fósforo - Método colorimétrico
Fiske e Subbarow, 1925.