

FRANCYENNE MAIRA CASTRO GONÇALVES

**Efeito de uma nova formulação contendo
fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo e
trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização e
remineralização do esmalte: estudos *in situ***

Araçatuba – SP
2023

FRANCYENNE MAIRA CASTRO GONÇALVES

**Efeito de uma nova formulação contendo fosfopeptídeo
de caseína - fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato
de sódio sobre a desmineralização e remineralização
do esmalte: estudos *in situ***

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

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

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

Araçatuba – SP
2023

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA/UNESP

Gonçalves, Francienne Maira Castro.

G635e

Efeito de uma nova formulação contendo fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização e remineralização do esmalte: estudos in situ/Francienne Maira Castro Gonçalves. - Araçatuba, 2023

89 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – 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
4. Desmineralização 5. Remineralização dentária 6. Biofilmes 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

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Anderson (in memoriam) e Regivânia**

Quando eu era apenas uma menina prestando vestibular, cheia de sonhos, vontade de realiza-los, uma família maravilhosa que sempre me apoiava em tudo e não media esforços para me ajudar, não imaginava alcançar voos tão altos. Mas vocês sempre me incentivaram, me fizeram acreditar e entender que eu era capaz e que não existia limites no nosso sonhar! Chegar até aqui, só foi possível pois eu tinha vocês dois, as pessoas mais importantes na minha vida. Eu nunca imaginei que teria que dedicar essa conquista a memória do meu pai. A vida nos pregou uma grande peça e tornou tudo mais difícil.

Drim, você sonhou esse sonho comigo e eu daria exatamente tudo para ter você aqui me vendo realiza-lo. Só que a mesma força que você sempre me ensinou, foi a força que eu usei para conseguir finalizar o doutorado e dedicar essa conquista a sua memória. Tudo o que eu sou hoje, devo a você e a mãe. Prometo passar o resto da minha vida honrando sua memória, conquistando os sonhos que sonhamos juntos, iniciando outros e nunca desistindo, afinal, você nunca desistiu!

Mãe, obrigada por ser essa fortaleza, por me ensinar tanto sobre amor e resiliência, sem você nada disso faria o menor sentido, essa conquista é tão sua como minha! Sempre, tudo será por vocês.

Amo vocês com toda a imensidão desse mundo.

Agradecimentos Especiais

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 companheiro Gustavo,

Já são quase 14 anos juntos, você acompanhou toda a minha trajetória de iniciação científica, mestrado e doutorado. Foi você que me amparou e apoiou quando eu não tinha mais forças nenhuma para continuar. É você que me incentiva, anima e apoia todos os dias, e assim seguiremos, Eu, você, Elizabeth e Domenica, comemorando as nossas conquistas, dividindo os nossos fracassos, apoiando nos momentos difíceis e compartilhando os sorrisos nos bons momentos. Amo você.

Às minhas irmãs Chayenne, Lohayenne, Rayenne,

Sem vocês eu nunca teria conseguido. Eu agradeço por sempre serem minha 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! Chay, como irmã mais velha, você sempre me inspirou e assim é até hoje. Você é minha melhor amiga e metade do meu coração. Loh, queria que todos pudessem conhecer o tamanho do seu coração, você é gigante, tenho muito orgulho seu, obrigada por tanto. Ray, nossa caçulinha para sempre, mas que me enche de orgulho pelo tamanho da força que tem, tenho certeza que você será uma ótima dentista. Meninas, eu amo vocês demais.

A minha sobrinha Lorena,

Você foi um presente para nossa família, desde seu nascimento, todos dias são de felicidade. Nossa pequena, amor da vida da dinda, 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. Em especial a Vó Ilta, Vó Marlene, Rejane, Reginaldo, Cleiton, Juliana, Eleni e Umberto.

“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,

Depois de 10 anos juntas, estamos chegando ao fim de uma jornada espetacular. Você me ensinou tanto! Aprendi muito sobre pipetagem, cárie, durezas, análises, artigos, escrita... mas com toda certeza, você me ensinou coisas muito mais valiosas, me ensinou resiliência, concentração, cuidado com o próximo, persistência, me ensinou a ser uma pessoa melhor! Nos tornamos amigas e eu desejo a você as melhores conquistas desse mundo, afinal você não merece menos que isso! Entrei uma menina sem nenhum senso crítico, saio uma mulher, com muito conhecimento e muita vontade de sempre aprender mais, e devo tudo isso a você! Gratidão eterna.

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,

Em especial ao Professor Robson Frederico Cunha, obrigada por transmitir toda sua experiência e conhecimento e a Professora Cristiane Duque, por estar sempre pronta a ajudar.

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

Aos Meus Queridos amigos,

Priscila,

Pri... Iniciamos essa jornada juntas, dividimos o apartamento, a vida, as dificuldades e tristezas, mas também comemoramos juntas as conquistas e felicidades! Vou estar sempre torcendo para que você conquiste todos os seus objetivos na vida e seja sempre muito feliz! Te amo.

Gabriel,

Da graduação para a vida! Gabis, sou muito grata pela amizade linda que criamos ao longo desses anos! Obrigada por todas as noites, sábados e domingos comigo no laboratório, mesmo sem ter experimentos, você ficava lá para não me deixar sozinha, me animava contando suas histórias e me incentivava a continuar! Contem sempre comigo. Torço muito pelo sucesso e conquistas, você merece demais! Amo você.

Fernanda,

Obrigada por todo carinho que você sempre tem comigo, por cuidar tão bem da minha mamis e das meninas, admiro você, seu profissionalismo e talento! Tenho certeza que logo será você defendendo seu mestrado e estarei lá te aplaudindo e comemorando mais essa conquista.

Leonardo,

Obrigada por fazer parte da nossa família, nos socorrer sempre que precisamos, e claro ter me dado junto a com a Loh o melhor presente desse mundo, que foi nossa Loreninha.

As alunas do TEAM DANELON,

Que orgulho em fazer parte desse time! Vocês são sensacionais, desejo muito sucesso para cada uma, obrigada por toda a ajuda. Em especial, a Julia Quinteiro, que dividiu comigo muitas noites e finais de semana no laboratório, você foi essencial para a realização desse estudo.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora,

Luizinho e Mário por estarem sempre dispostos a 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 Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP,

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

Ao Frigorífico FRIBOI,

Pela permissão da coleta dos dentes bovinos.

A Agência de Fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão de recursos.

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo: 2021/10668-5).

Epígrafe

“A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

Resumo Geral

Gonçalves, FMC. **Efeito de uma nova formulação contendo fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização e remineralização do**

esmalte: estudos *in situ* 2023 89f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) em reduzir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte dentário. **Artigo 1 - Desmineralização *in situ***: blocos de esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície inicial (SH_i) e a seguir voluntários (n=10) utilizaram um dispositivo palatino contendo 4 blocos de esmalte, durante 7 dias em 5 fases experimentais: 1) Dentifrício sem F/CPP-ACP-TMP (Placebo); 2) Dentifrício com 1100 ppm F (1100F), 3) Dentifrício 1100F + 3% TMP (1100F-TMP), 4) Dentifrício 1100F + CPP-ACP (1100F-CPP-ACP) e 5) Dentifrício 1100F + 3%TMP + CPP-ACP (1100F-CPP-ACP-TMP). Os desafios cariogênicos foram produzidos pela sacarose a 30%, 6x/dia. No biofilme foi analisado o conteúdo de F, Ca, P e polissacarídeo extracelular insolúvel (EPS). Nos blocos de esmalte, determinou-se a dureza de superfície final (SH_f) para o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. A adição do CPP-ACP-TMP ao dentifrício 1100F, reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em 42% e 39% quando comparado com os tratamentos 1100F ($p < 0,001$) e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$), respectivamente, além de uma redução no corpo da lesão (Δ KHN) em 36% quando comparado aos mesmos tratamentos ($p < 0,001$). O tratamento com 1100F-CPP-ACP-TMP levou à um aumento significativo nas concentrações de F, Ca e P no esmalte e biofilme, e reduziu a concentração de EPS em ~ 52%, quando comparado ao tratamento com 1100F ($p < 0,001$). **Artigo 2 - Remineralização *in situ***: blocos de esmalte bovino foram selecionados pela dureza de superfície pós lesão de cárie artificial (SH₁). Voluntários (n=10) utilizaram um dispositivo palatino contendo 4 blocos de esmalte desmineralizados, durante 3 dias em 5 fases experimentais com os mesmos dentifrícios do *Artigo 1*. Após 3 dias de remineralização, determinou-se a dureza de superfície final (SH₂) para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), Δ KHN, F, Ca e P no esmalte. A superfície do esmalte tornou-se ~ 55% mais remineralizada quando tratada com o dentifrício 1100F-CPP-ACP-TMP em relação ao 1100F ($p < 0,001$). O tratamento com 1100F-CPP-ACP-TMP levou à remineralização da lesão de subsuperfície (Δ KHN) em 84% e 91% quando comparado aos tratamentos 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$). Para as variáveis iônicas no esmalte (F, Ca e P) houve um aumento significativo com o tratamento 1100F-CPP-ACP-TMP. Para os valores de F, este aumento foi de ~ 63% em relação ao 1100F ($p < 0,001$); Para Ca, houve um aumento de ~ 65%, ~ 28% e ~ 15% quando comparado aos tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP ($p < 0,001$). Para os dados de P, a maior concentração foi observada com o tratamento 1100F-ACP-CPP-

TMP sendo superior em ~ 41% e ~ 17 % em relação aos tratamentos com 1100F e 1100F-TMP respectivamente ($p < 0,001$). Conclui-se que a associação de tratamentos com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) a um dentifrício fluoretado (1100 ppm F) promoveu um maior efeito no controle à cárie e variáveis do biofilme, 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. Flúor. Fosfato. Desmineralização. Remineralização dentária.

General Abstract

Gonçalves, FMC. **Effect of a new formulation containing casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on enamel demineralization and remineralization: *in situ* studies** 2023 89f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

ABSTRACT

The general objective of this study was to evaluate *in situ*, a new toothpaste formulation containing fluoride (F), sodium trimetaphosphate (TMP) and amorphous calcium phosphate casein phosphopeptide (CPP-ACP) in reducing demineralization and promoting remineralization of dental enamel. **Manuscript 1 - In situ demineralization:** bovine enamel blocks were selected by initial surface hardness (SH_i) and then volunteers (n=10) used a palatal device containing 4 enamel blocks for 7 days in 5 experimental phases: 1) toothpaste without F/CPP-ACP-TMP (Placebo); 2) toothpaste with 1100 ppm F (1100F), 3) toothpaste 1100F + 3% TMP (1100F-TMP), 4) toothpaste 1100F + CPP-ACP (1100F-CPP-ACP) and 5) toothpaste 1100F + 3%TMP + CPP-ACP (1100F-CPP-ACP-TMP). The cariogenic challenges were produced by 30% sucrose, 6x/day. In the biofilm, the content of F, Ca, P and insoluble extracellular polysaccharide (EPS) was analyzed. In the enamel blocks, the final surface hardness (SH_f) was determined to calculate the percent surface hardness loss (%SH), integrated subsurface hardness loss (Δ KHN), fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) concentration in the enamel. The addition of CPP-ACP-TMP to 1100F toothpaste, reduced enamel demineralization (%SH) by 42% and 39% when compared to 1100F ($p < 0.001$) and 1100F-CPP-ACP ($p < 0.001$) treatments, respectively, in addition to a reduction in lesion body (Δ KHN) by 36% when compared to the same treatments ($p < 0.001$). Treatment with 1100F-CPP-ACP-TMP led to a significant increase in F, Ca and P concentrations in enamel and biofilm, and reduced EPS concentration by $\sim 52\%$ when compared to 1100F treatment ($p < 0.001$). **Manuscript 2 - Remineralization in situ:** bovine enamel blocks were selected by surface hardness post artificial caries lesion (SH₁). Volunteers (n=10) used a palatal device containing 4 demineralized enamel blocks for 3 days in 5 experimental phases with the same toothpastes as in Manuscript 1. After 3 days of remineralization, the final surface hardness (SH₂) was determined to calculate the percentage of surface hardness recovery (%SH_R), Δ KHN, F, Ca and P in the enamel. The enamel surface became $\sim 55\%$ more remineralized when treated with the 1100F-CPP-ACP-TMP toothpaste compared to 1100F ($p < 0.001$). Treatment with 1100F-CPP-ACP-TMP led to remineralization of the subsurface lesion (Δ KHN) by 84% and 91% when compared to 1100F and 1100F-CPP-ACP treatments ($p < 0.001$). For the ionic variables in enamel (F, Ca and P) there was a significant increase with the 1100F-CPP-ACP-TMP treatment. For F values, this increase was $\sim 63\%$ compared to 1100F ($p < 0.001$); for Ca, there was an increase of $\sim 65\%$, $\sim 28\%$ and $\sim 15\%$ when compared to 1100F, 1100F-CPP-ACP and 1100F-TMP treatments ($p < 0.001$). For P data, the highest

concentration was observed with 1100F-ACP-CPP-TMP treatment being higher by ~ 41% and ~ 17 % compared to 1100F and 1100F-TMP treatments respectively ($p < 0.001$). It is concluded that the association of treatments with sodium trimetaphosphate (TMP) and amorphous casein-calcium phosphopeptide (CPP-ACP) to a fluoride toothpaste (1100 ppm F) promoted a greater effect on caries control and biofilm variables, and may be an effective alternative to improve the oral health of individuals, especially those with high risk and activity of dental caries.

Keywords: Dental enamel. Fluoride. Phosphate. Demineralization. Dental remineralization.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP Fosfato de Cálcio Amorfo

ANOVA Análise de Variância

°C Graus Celsius

CPP Caseína Fosfopeptídeo

Ca Cálcio

CaF⁺ Íon fluoreto de Cálcio

CaHPO₄⁰ Fosfato de cálcio hidrogenado neutro

CaF₂ Fluoreto de cálcio

Ca⁺² Íon cálcio

CPP-ACP Caseína Fosfopeptídeo Fosfato de Cálcio Amorfo

CPP-ACPF Caseína Fosfopeptídeo Fosfato de Cálcio Amorfo Fluoretada

DES Desmineralização

EPS Polissacarídeo extracelular insolúvel

F Fluoreto

F⁻ Íon fluoreto

FI Fluoreto iônico

FT Fluoreto total

g Grama

h Hora

HF⁰ Fosfato de hidrogênio neutro

KHN Dureza knoop

lbs Libras

L Litro

M Molar

Min Minutos

mg Miligramas

mg/g Miligramas por grama

mL Mililitro

mm Milímetro

Mol/L Mol por litro

mol L⁻¹ Mol por litro

mV Milivolts

n Número de voluntários

Na⁺ Íon sódio

NaF Fluoreto de sódio

NaOH Hidróxido de sódio

P Fósforo

pH Potencial hidrogeniônico

ppm F Partes por milhão de fluoreto

RE Remineralização

s Segundos

SH_i Dureza de superfície inicial

SH_f Dureza de superfície final

%SH Porcentagem de perda de dureza de superfície

%SH_R Porcentagem de recuperação de dureza de superfície

TISAB Tampão de ajuste de força iônica total

TMP Trimetafosfato de sódio

μg Micrograma

μg/mm³ Micrograma por milímetro cúbico

μL/mg Microlitro por miligrana

μm Micrometro

ΔKHN Perda integrada de dureza de subsuperfície

β Beta

α Alfa

Lista de Figuras

FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SHi); (C) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (D) Dureza de superfície final (SHf) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (E) Análise de F, Ca e P no esmalte; (F) Análise de EPS, F, Ca e P no biofilme. 55

FIGURAS CAPÍTULO 2

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SH); (C) Indução de lesão artificial de cárie e dureza pós-desmineralização (SH₁); (D) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (E) Dureza de superfície final (SH₂) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (F) Análise de F, Ca e P no esmalte. 75

Lista de Tabelas

TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1: Média ($\pm$ dp, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais	56
Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após desafio cariogênico, <i>in situ</i>	57

TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela 1: Média ($\pm$ dp, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais	76
Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após remineralização, <i>in situ</i>	77

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	29
2 ARTIGO 1 -	
2.1 RESUMO	38
2.2 INTRODUÇÃO	39
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.4 RESULTADOS	44
2.5 DISCUSSÃO/RESULTADOS	45
2.6 AGRADECIMENTOS	48
2.7 DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO	48
2.8 REFERÊNCIAS	50
3 ARTIGO 2 -	
3.1 RESUMO	60
3.2 INTRODUÇÃO	61
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	62
3.4 RESULTADOS	66
3.5 DISCUSSÃO/CONCLUSÃO	67
3.6 AGRADECIMENTOS	69
3.7 DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO	70
3.8 REFERÊNCIAS	71
4 CONCLUSÃO GERAL	79
5 ANEXOS	81

Introdução Geral

1 Introdução Geral

A cárie dentária é uma doença dinâmica multifatorial mediada por biofilme, modulada pela dieta, não transmissível, resultando em perda mineral de tecidos dentários duros. É determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais [Machiulskiene et al., 2020], como dieta, níveis de cálcio, fosfato, bicarbonato, flúor na saliva, bem como fatores genéticos [Puleio et al., 2022]. Assim muitos estudos têm avaliado o uso de técnicas e produtos reduzam a desmineralização do esmalte dentário, assim como induzam a remineralização da estrutura dentária afetada, afim de prevenir a progressão das lesões de manchas brancas e o aparecimento de cavitações [Danelon et al., 2017; Emerenciano et al., 2018; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b].

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 [Amaechi et al., 2019] entretanto com efeito limitado. Sendo assim, esforços têm sido realizados no sentido de se obter produtos que possam paralisar as lesões cariosas o mais precocemente possível [Gao et al., 2020; Alhothali et al., 2022].

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 [Tantbirojn et al., 2008]. A CPP apresenta a capacidade de se ligar aos íons cálcio e ao fosfato, reduzindo, 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 cálcio e fosfato no biofilme dental para manter um estado supersaturado, favorecendo, desta maneira, o processo de remineralização [Thierens et al., 2019]. Portanto, o CPP-ACP funciona como um reservatório de cálcio e fosfato, aumentando a concentração desses íons livres, colaborando para a manutenção de um estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário [Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b]. O CPP-ACP foi demonstrado ter atividade anticariogênica em estudos *in vitro* e *in situ* incluindo ensaio clínico randomizado controlado [Reynolds, 2009]. O CPP-ACP 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 (ACP-CPPF) 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 produtos, mostrando reduzir a perda mineral e aumentar o processo de remineralização, pois apresenta capacidade de modificar a superfície da hidroxiapatita, através de sua adsorção [Danelon et al., 2017; Danelon et al., 2020]. 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 (CaF^+ e Ca^{2+}), substituindo o 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, com alto poder de penetração ao esmalte [Cochrane et al., 2008]. Diante do exposto sobre a ação anticárie do TMP, e levando em consideração 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% a um dentifrício com 1100 ppm F possui eficácia superior em reduzir a desmineralização quando comparado ao seu homólogo sem TMP (1100 ppm F), achados esses confirmados por Danelon et al. [2015] utilizando modelo de cárie em esmalte *in situ*, onde os autores constataram uma remineralização superior a dentifrícios convencionais.

Sabendo-se das boas propriedades anticárie do CPP-ACPF e TMP, Gonçalves et al. [2021a e 2021b] avaliaram *in vitro* o efeito da associação de tratamento com dentifrício fluoretado (1100 ppm F) suplementado com 3% de TMP (1100F-TMP) seguido pela aplicação do fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo fluoretado (MI Paste Plus®) sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie e desmineralização do esmalte dentário. Em ambos estudos, a associação de tratamentos 1100F-TMP-MI Paste Plus® mostrou melhores resultados para dureza de superfície, assim como, favoreceu a maior formação de Ca e P no esmalte quando comparado aos dentifrícios contendo apenas 1100F e/ou 1100F-TMP, sugerindo ser uma alternativa para pacientes com alto risco e atividade de cárie. Embora seja bem conhecido que os modelos de ciclagem de pH sejam adequados para avaliar o impacto de novos princípios ativos em dentifrícios fluoretados, bem como a sua associação com outros tratamentos anticárie, os protocolos *in vitro* têm limitações, incluindo por exemplo: (1) não avaliam as condições orais e a interação do F-TMP-CPP-ACP com as superfícies de esmalte e (2) os períodos mais rápidos de des/remineralização quando comparado com condições *in vivo*. Dessa forma, seria interessante avaliar protocolos de tratamentos que potencializem o efeito de dentifrícios fluoretados sobre a remineralização e a redução da desmineralização do esmalte dentário. Assim sendo, o desenvolvimento de estudo *in situ*, fornece um estágio maior na busca de evidência científica sobre a utilização de ambos os agentes em um

mesmo veículo, e sua influência no controle à cárie dentária, trazendo evidências maiores que, poderão encorajar na condução futura de estudos clínicos.

Referências Bibliográficas

- Alhothali MM, Exterkate RAM, Lagerweij MD, van Strijp AJP, Buijs MJ, van Loveren C: The Effect of Various Fluoride Products on Dentine Lesions during pH-Cycling. *Caries Res* 2022;56:64-72.
- Amaechi BT, AbdulAzees PA, Alshareif DO, Shehata MA, Lima PPCS, Abdollahi A, Kalkhorani PS, Evans: Comparative efficacy of a hydroxyapatite and a fluoride toothpaste for prevention and remineralization of dental caries in children. *BDJ Open* 2019;5:18.
- Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sassaki KT, Delbem AC: Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig* 2014;18:1119-1127.
- 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.
- 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.
- Danelon M, Pessan JP, Prado KM, Ramos JP, Emerenciano NG, Moretto MJ, Martinhon CCR, Delbem ACB: Protective Effect of Fluoride Varnish Containing Trimetaphosphate against Dentin Erosion and Erosion/Abrasion: An in vitro Study. *Caries Res* 2020;54:292-296.
- 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.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Dos Passos Silva M, Cannon ML, Danelon M: Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2021a;25:2811-2820.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Pessan JP, Romero GDA, Cannon ML, Danelon M: Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2021b;122:105001.
- Gao SS, Chen KJ, Duangthip D, Wong MCM, Lo ECM, Chu CH: Preventing early childhood caries with silver diamine fluoride: study protocol for a randomised clinical trial. *Trials* 2020;21:140.
- Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, JablonskiMomeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, SchulteAG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B: Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 2020;54:7-14.

Puleio F, Fiorillo L, Gorassini F, Iandolo A, Meto A, D'Amico C, Cervino G, Pinizzotto M, Bruno G, Portelli M, Amato A, Lo Giudice R: Systematic Review on White Spot Lesions Treatments. Eur J Dent 2022;16:41-48.

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C: Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. J Dent Res 2008;87:344-348.

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

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.

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.

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;27:e20180589.

Objetivo Geral

Francyenne Maira Castro Gonçalves

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) em reduzir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte dentário.

Artigo 1

Francyenne Maira Castro Gonçalves

2.0 Avaliação *in situ* de uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto, fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização do esmalte dentário e variáveis do biofilme

Gonçalves FMC^a, Quinteiro JP^a, de Almeida EMFC^b, Delbem ACB^a, Cannon ML^c, Danelon M^{a,b}.

^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

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

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

Título curto: Ação de fosfato e cálcio sobre a desmineralização e biofilme

Autor correspondente:

Marcelle Danelon

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba

Department of Pediatric Dentistry and Public Health

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

Email:marcelledanelon@hotmail.com

Palavras-chave: Desmineralização; Esmalte dentário; Fosfatos.

***Artigo formatado de acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research.**

2.1 Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) sobre o processo de desmineralização dentária e composição do biofilme. **Material e Métodos:** Blocos de esmalte bovinos (n=200) foram selecionados através da dureza de superfície inicial (SH). Posteriormente dez voluntários (n=10) utilizaram dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte bovino, durante 7 dias em 5 fases experimentais, com os respectivos dentifrícios: 1) sem F-CPP-ACP-TMP (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP (1100F-CPP-ACP), 4) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP). Os desafios cariogênicos foram produzidos pelo uso de solução de sacarose a 30%, 6x/dia. Após 7 dias determinou-se 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), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Além disso, concentração de F, Ca, P e polissacarídeo extracelular insolúvel (EPS) no biofilme foram analisadas. Os dados foram submetidos a análise de variância (1-critério) de medidas repetidas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). **Resultados:** A adição do CPP-ACP-TMP ao dentifrício convencional (1100F), reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em 42% e 39% quando comparado com os tratamentos 1100F ($p < 0,001$) e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$), respectivamente, além de uma redução no corpo da lesão (Δ KHN) em 36% quando comparado aos mesmos tratamentos. Ainda, o tratamento com o dentifrício 1100F-CPP-ACP-TMP levou à um aumento significativo na concentração de F, P e Ca no esmalte e biofilme, e reduziu a concentração de EPS em $\sim 52,6$, quando comparado ao tratamento convencional (1100F) ($p < 0,001$). **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a formulação dentifrícia contendo 1100F-CPP-ACP-TMP promoveu um maior efeito protetor contra a desmineralização do esmalte dentário e afetou significativamente a composição do biofilme formado *in situ*, podendo ser uma alternativa para pacientes que apresentam alto risco a cárie dentária.

Palavras-chave: Desmineralização; Esmalte dentário; Fosfatos.

2.2 Introdução

A cárie dentária permanece sendo a principal problemática da Odontologia devido a sua alta prevalência na população mundial, considerada a doença bucal mais comum na infância. Quando presente, possui um impacto muito grande na qualidade de vida das crianças, e consequentemente de suas famílias, representando uma dificuldade para a sociedade e para a saúde pública, pois vem sendo uma das doenças infantis mais prevalentes ao redor de todo o mundo [Colombo et al., 2019; Philip & Walsh et al., 2019; Pitts et al., 2021]. É caracterizada como uma doença crônica e multifatorial ocasionando a desmineralização das estruturas dentárias após quedas constantes no pH do biofilme dental, levando à desmineralização do esmalte [de Oliveira et al., 2022]. Clinicamente, o estágio inicial da doença pode ser observado como uma mancha branca de aspecto opaco e rugoso. Nesse estágio é importante que estratégias sejam implementadas como, aplicação tópica de flúor, maior controle mecânico do biofilme, mudança no consumo de dieta cariogênica, dentre outras medidas [Pitts et al., 2019]. O fluoreto (F) aplicado topicamente é o principal tratamento de forma não-invasiva para reparar lesões de cárie não cavitadas, mas sua capacidade de promover a remineralização é limitada pela disponibilidade de íons cálcio (Ca) e fosfato (P) [Pinto de Souza et al., 2018], dessa forma, a combinação de F com agentes ativos que sejam fontes de íons Ca e P têm sido proposto como uma estratégia eficaz para reduzir a desmineralização e favorecer a remineralização de lesões de cárie em estágios iniciais da doença [Attiguppe et al., 2019; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b]. Diante deste contexto, fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo associado ao fluoreto (F) (ACP-CPPF) e fosfatos cíclicos (como o trimetafosfato de sódio (TMP)) tem sido estudado, contribuindo assim para o controle da doença [Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017; Zamperini & Bedran-Russo, 2018; Attiguppe et al., 2019; Danelon et al., 2020].

O CPP-ACPF é considerado particularmente eficaz uma vez que o CPP apresenta a capacidade de estabilizar íons Ca e P, evitando sua precipitação; enquanto que o ACP apresenta a capacidade de liberar esses íons no biofilme dental para manter um estado supersaturado, favorecendo, desta maneira, o processo de remineralização e atuando ao mesmo tempo como um reservatório destes íons remineralizantes. Estudos demonstram que a associação de F ao CPP-ACP (CPP-ACPF) apresenta maior potencial de remineralização do que o CPP-ACP [Oliveira et al., 2016]. Isto se deve, pois, o CPP-ACP interage com íons F, produzindo um efeito anticariogênico aditivo através da formação de uma fase amorfa estabilizada de fosfato de cálcio fluoretado. Por outro lado, o mecanismo anticariogênico do CPP-ACP e do F são distintos. Enquanto o CPP-ACP 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 do CPP-ACPF, estudos têm demonstrado o potencial anticárie e remineralizador de polifosfatos cíclicos, como o trimetafosfato de sódio (TMP) quando adicionado em diferentes veículos [Danelon et al., 2017; Akabane et al., 2018; Danelon et al., 2020; Oliveira et al., 2022]. Este efeito está associado à sua capacidade de formar complexos com cátions como Ca^{2+} e CaF^+ e aumentar a atividade

iônica de espécies neutras como CaHPO_4^0 e HF^0 . Dessa forma, o TMP não é usado como fonte de íons fosfato, mas como agente ativo que contribui para a formação de uma barreira que altera a permeabilidade de ácidos, íons F, Ca e P [Favretto et al., 2021], e como um material biomimético, pode induzir a precipitação de fosfato de cálcio no esmalte e dentina [Favretto et al., 2021; Gonçalves et al., 2021a]. Sabendo-se das boas propriedades anticariogênicas do CPP-ACPF e TMP, Gonçalves et al. [2021a] avaliaram *in vitro*, através de ciclagens de pH, o efeito da associação de tratamentos com dentifrício fluoretado (1100 ppm F) suplementado com 3% de TMP (1100F-TMP) seguido pela aplicação do fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo fluoretado (MI Paste Plus®), sobre a desmineralização do esmalte dentário, mostrando que a associação levou à melhora considerável nos resultados de dureza de superfície e em profundidade, assim como, favoreceu a maior formação de Ca e P no esmalte quando comparado aos dentifrícios contendo apenas 1100 ppm F e/ou 1100F-TMP, sugerindo ser uma alternativa para populações infantis que concentram uma alta prevalência de cárie dentária.

Até o momento, nenhum estudo avaliou se a adição de CPP-ACP e TMP em uma mesma formulação dentifrícia contendo 1100 ppm F poderia reduzir a desmineralização do esmalte dentário e alterar a composição do biofilme sob desafio cariogênico, simulando uma condição de alto risco a doença. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar, *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) sobre o processo de desmineralização dentária e composição do biofilme. A hipótese nula investigada foi a de que a nova formulação dentifrícia contendo F-CPP-ACP-TMP não promoveria efeitos positivos no esmalte e biofilme quando comparado as formulações contendo apenas 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Delineamento experimental

O estudo foi duplo-cego e cruzado consistindo em cinco fases experimentais com duração de 7 dias cada e *washout* de 7 dias entre uma etapa e outra, para eliminar possíveis efeitos residuais dos tratamentos [Danelon et al., 2015; Garcia et al., 2019]. O estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Plataforma Brasil (Número CAAE: 60803722.2.0000.5420). Dez voluntários com idade entre 18 e 33 anos, boa saúde geral e bucal e com fluxo salivar normal foram selecionados [Garcia et al., 2019]. Blocos de esmalte (4 mm × 4 mm, n = 200) foram obtidos de dentes incisivos bovinos e mantidos em solução de formol a 2%, pH 7,0 durante 30 dias previamente aos procedimentos experimentais [Danelon et al., 2017] (**Figura 1A**). Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida e aqueles que apresentaram média de dureza de superfície inicial (SHi) entre 320-380 HKN foram selecionados para o estudo (**Figura 1B**). Foram confeccionados dispositivos para a arcada superior com quatro espaços (4 mm × 4 mm), nos quais foram fixados quatro blocos de esmalte bovino. Os desafios cariogênicos foram produzidos pelo uso de uma solução de sacarose a 30% [Emerenciano et al., 2018; Garcia et al., 2019]. Os voluntários escovaram os dentes com o dispositivo palatino na cavidade bucal

utilizando os dentifrícios: 1) sem F-CPP-ACP-TMP (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP (1100F-CPP-ACP), 4) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP) (**Figura 1C**). Nos blocos de esmalte, foram realizadas as análises da dureza de superfície final (SHf) para o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), perda integrada de dureza de superfície (Δ KHN) (**Figura 1D**), F, Ca e P no esmalte (**Figura 1E**). Já no biofilme, foi quantificada a concentração de F, Ca, P e Polissacarídeo extracelular insolúvel (EPS) (**Figura 1F**).

2.3.2 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 30 dias. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=200) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Após a aquisição dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura $\pm$ 2 mm). Para isso, os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada ($\pm$ 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, a qual foi polida de acordo com a seguinte sequência de lixas: granulação 600, 800 e 1200 e refrigeração a água constante. 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 ultrassom (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 permaneceram em ambiente umedecido com formol a 2% e pH 7,0.

2.3.3 Formulação, determinação do pH e concentração de F nos dentifrícios experimentais

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP contendo em sua composição Fluoreto de sódio (NaF) (1100 ppm F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (10% CPP-ACP) e Trimetafosfato de sódio (3% TMP). Um dentifrício sem adição de F/CPP-ACP/TMP (Placebo) também foi preparado. Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 e a leitura procedeu-se através do eletrodo de pH (2A09E, Analyser, São Paulo, Brazil), sob agitação constante [Gonçalves et al., 2021a]. 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 nos

quais foram acrescentados água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do F total (FT), 0,25 mL dessa suspensão foi mantida sob agitação durante 1h a 45 °C com 0,25 mL de HCl 2 mol/L. Em seguida foi neutralizada com 0,5 mL de NaOH mol/L 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 ppm F). Para a dosagem de F iônico (FI), o restante da suspensão de dentifrício foi submetido da mesma forma que o FT.

2.3.4 Descrição da fase clínica dos grupos experimentais

Voluntários (n=10) foram selecionados considerando-se o desfecho primário a análise da dureza de superfície e dureza em secção longitudinal, diferença média entre os grupos (30 e 1300, respectivamente), desvio padrão (20 e 900, respectivamente) e um erro- α de 5% e erro- β de 20% (sendo necessários no mínimo 8 voluntários para detectar diferenças significativas), devendo ainda preencher os seguintes critérios de inclusão [Emerenciano et al., 2018; Garcia et al., 2019]: idade entre 18 e 33 anos; concordarem em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; bom estado de saúde geral; ausência clínica de lesões de cárie ativas ou doença periodontal. Os critérios de exclusão inicial foram: uso de medicamentos ou portadores de alterações que influenciassem no fluxo salivar e alérgicos à proteína do leite (CPP). Já os critérios de exclusão durante o experimento: desistência voluntária, alteração do quadro de saúde com consequente alteração do fluxo salivar ou necessidade de uso de antibióticos e capacidade desmineralizadora similar entre Placebo e 1100F.

Uma semana antes do início do experimento e durante o período de *washout* de 7 dias, os voluntários utilizaram dentifrício sem F-CPP-ACP-TMP (Placebo). Cada dispositivo continha quatro blocos de esmalte (dois em cada lado do dispositivo) fixados cuidadosamente no dispositivo intrabucal com cera pegajosa Kota®. Para permitir o acúmulo de placa bacteriana sobre os blocos de esmalte, uma tela de polietileno foi fixada no acrílico com resina acrílica, cobrindo os blocos deixando um espaço de 1 mm entre a tela e a superfície do esmalte. Para promover o desafio cariogênico os voluntários gotejaram a cada 3 horas (6x ao dia) solução de sacarose a 30% sobre cada bloco de esmalte [Emerenciano et al., 2018; Garcia et al., 2019]. Após o gotejamento da sacarose, os dispositivos eram deixados por 5 minutos em repouso antes de retornarem à cavidade bucal, a fim de que a sacarose fosse difundida pelo biofilme. A solução de sacarose a 30% foi usada até 3 dias após o preparo, sendo posteriormente substituída. Os voluntários foram instruídos a realizar a escovação, com o respectivo dentifrício experimental de cada fase, 3 vezes ao dia (1 minuto e 30 segundos), após as principais refeições, com o dispositivo palatino na cavidade oral [Garcia et al., 2019]. Foram realizadas cinco fases experimentais de 7 dias cada com os seguintes dentifrícios: 1) sem F-CPP-ACP-TMP (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP (1100F-CPP-ACP), 4) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP).

Transcorridos 7 dias de desmineralização, na manhã do 8º dia, os voluntários permaneceram em jejum para a entrega dos dispositivos acrílicos. A tela que recobria o bloco do dispositivo palatino foi removida e o biofilme coletado com auxílio de curetas plásticas, tomando-se cuidado para não danificar os blocos de esmalte [Garcia et al., 2019]. Na sequência, os blocos de esmalte foram limpos utilizando gaze e água deionizada para posteriormente serem realizadas análises de dureza de superfície final (SHf) e cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte e biofilme e polissacarídeo extracelular insolúvel (EPS).

2.3.5 Análise da dureza do esmalte

A dureza de superfície foi determinada antes (SHi) e após os experimentos (SHf) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HVM-2000, sob carga de 25g por 10s. Foram realizadas inicialmente cinco impressões a 100 μ m uma da outra, na região central do esmalte e após o experimento, outras cinco a 100 μ m em relação às impressões iniciais, sendo calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH), [%SH = ((SHi – SHf)/SHf) x 100] [Danelon et al., 2015]. Para a análise da dureza em secção longitudinal, os blocos de esmalte foram seccionados longitudinalmente em seu centro e embutidos em resina acrílica com a face cortada exposta e polida gradativamente. Uma sequência de 14 endentações foi realizada em diferentes distâncias (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μ m) da superfície externa do esmalte usando um durômetro Micromet 5114 (Buehler, Lake Bluff, EUA) e o software Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA), com um penetrador de diamante Knoop sob carga de 5g por 10s. A área integrada da dureza (KHN x μ m) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (GraphPad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN; KHN x μ m) [Danelon et al., 2015].

2.3.6 Análise de F, Ca e P no esmalte

O F presente no esmalte foi determinado conforme descrito por Weatherell et al. [1985], e modificado por Alves et al. [2007]. Discos de polimento autoadesivos (diâmetro, 13 mm) e carboneto de silício de gramatura 400 (Buehler) foram fixados no fundo de tubos de cristal de poliestireno (J-10; Injeplast, São Paulo, SP, Brasil). Uma camada de esmalte ($50,9 \pm 0,2$ μ m) foi removida de cada bloco, e na sequência adicionado 0,5 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹; estes foram mantidos sob agitação constante por 1 hora. A análise de F foi realizada em 0,30 mL dessa solução após adição do mesmo volume de TISAB II, modificado com NaOH, utilizando um eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplado a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA). Os resultados foram expressos em μ g/mm³ [Akabane et al., 2018]. A análise de Ca foi realizada utilizando o método colorimétrico Arsenazo III [Vogel et al., 1983]. As leituras de absorbância foram registradas em 650 nm, com o auxílio de um leitor de placas (PowerWave 340, Biotek, Winooski, VT, EUA). O P foi analisado de acordo com Fiske & Subbarow

[1925], e as leituras de absorvância registradas em 660 nm. Os resultados por sua vez foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

2.3.7 *Análise de F, Ca, P e EPS no biofilme dentário*

O biofilme formado no esmalte foi coletado e armazenado em tubos de microcentrífuga. As amostras de biofilme foram secas a vácuo sob P_2O_5 (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) por 12 h em temperatura ambiente. Após extração por 3 h em temperatura ambiente com 0,5 mol/L de ácido clorídrico (250 $\mu\text{L}/\text{mg}$, peso úmido do biofilme) sob agitação constante, o mesmo volume de NaOH (0,5 mol L^{-1}) foi adicionado [Akabane et al., 2018]. As amostras foram então centrifugadas ($11.000 \times g$) por 1 min e o sobrenadante retido para determinação de F, Ca e P. O F foi analisado usando um eletrodo iônico específico (Orion 9409 BN) e um potenciômetro (Orion 720 Aplus). A concentração de Ca e P foi analisada por métodos colorimétricos [Vogel et al., 1983; Fiske & Subbarow, 1925]. O polissacarídeo extracelular insolúvel (EPS) foi extraído pela adição de 1,0 mol L^{-1} de NaOH (10 $\mu\text{L}/\text{mg}$ peso seco) ao biofilme [Ccahuana-Vásquez et al., 2007]. A quantidade de EPS foi determinada usando o método fenol-ácido sulfúrico [Dubois et al., 1956]. Os resultados foram expressos em mol/kg de F, Ca e P; e mg/g de EPS (peso seco).

2.3.8 *Análise estatística*

Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de %SH, ΔKHN , F, Ca e P no esmalte e F, Ca, P e EPS no biofilme, e como fator de variação o tipo de dentifrício. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sigma Plot (versão 12.0) com um nível de significância de 5%. Os valores de %SH, ΔKHN , F, Ca e P no esmalte, F, Ca, P e EPS no biofilme apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogênea (Bartlett) e foram submetidos a ANOVA (1-critério) de medidas repetidas, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

2.4 Resultados

A média ($\pm\text{dp}$) de SHi considerando todos os blocos foi de 370,8 (3,2) KHN. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após alocação ($p = 0,105$). A Tabela 1 apresenta os resultados da determinação de fluoreto na forma iônica (FI), total (FT) e pH nos dentifrícios experimentais, manipulados previamente ao ensaio experimental. Os valores médios apresentaram-se dentro do aceitável pela Anvisa ($\pm 10\%$). Os valores médios de pH de cada dentifrício experimental previamente ao ensaio variaram entre 7,0 a 7,1, com pH neutro.

O tratamento com o dentifrício 1100F-CPP-ACP-TMP, reduziu a desmineralização do esmalte (%SH) em 42% e 39% quando comparado com os tratamentos 1100F ($p < 0,001$) e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$), respectivamente. Já em relação ao grupo 1100F-TMP, a redução foi de 29% ($p < 0,001$). Ainda, o dentifrício suplementado com 3% de TMP foi capaz de reduzir a desmineralização do esmalte (%SH) em 17% quando comparado ao grupo 1100F ($p < 0,001$), enquanto o dentifrício contendo 1100F-CPP-

ACP reduziu em 4% e 15% em comparação com os tratamentos 1100F ($p = 0,05$) e 1100F-TMP ($p < 0,001$) (Tabela 2). Todos os grupos apresentaram uma redução na lesão de subsuperfície, exceto o grupo Placebo que obteve o maior valor ($p < 0,001$). Os grupos 1100F e 1100F-CPP-ACP apresentaram valores similares entre si, diferindo estatisticamente do grupo 1100F associado ao TMP ($p < 0,001$). A menor perda foi observada para o tratamento contendo 1100F-CPP-ACP-TMP, havendo uma redução no corpo da lesão de 36% quando comparado ao 1100F e 1100F-CPP-ACP. Já este mesmo tratamento (1100F-CPP-ACP-TMP) quando comparado com o dentifrício suplementado com 3% de TMP (1100F-TMP), levou a uma redução de 27% na lesão de subsuperfície.

A concentração de F no esmalte foi similar entre os tratamentos 1100F, 1100F-TMP e 1100F-CPP-ACP ($p > 0,001$), sendo a maior concentração observada para o 1100F-CPP-ACP-TMP ($p < 0,001$), levando a um aumento de 36%, 31% e 26% quando comparado aos tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP, respectivamente ($p < 0,001$). Todos os tratamentos levaram a um aumento na concentração de Ca no esmalte ($p < 0,001$), sendo que o 1100F-CPP-ACP-TMP apresentou um aumento superior em 36% e 57% quando comparado ao 1100F-TMP e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$). Valores similares foram observados para os tratamentos com 1100F-TMP e 1100F-CPP-ACP ($p > 0,001$). Para os dados da concentração de P no esmalte, verifica-se que esta foi superior em 62%, 21% e 30% quando comparado ao tratamento convencional (1100F), 1100F-TMP e 1100F-CPP-ACP, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Quanto à composição do biofilme, 1100F-CPP-ACP-TMP promoveu a maior retenção de F, Ca e P ($p < 0,001$), quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2) ($p < 0,001$); já valores similares para F, Ca e P foram observados para 1100F-ACP-CPP e 1100F-TMP ($p > 0,001$). O tratamento com 1100F-CPP-ACP-TMP reduziu significativamente a concentração de EPS quando comparado com 1100F (~52%) ($p < 0,001$). Concentrações semelhantes foram observadas nos grupos 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP ($p = 0,709$), significativamente menores do que no grupo 1100F ($p < 0,001$) (Tabela 2).

2.5 Discussão/Conclusão

Apesar da crescente conscientização mundial sobre os cuidados com a saúde bucal, a prevalência de cárie dentária ainda permanece alta [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 de remineralização [Cochrane et al., 2012; Danelon et al., 2019]. O presente estudo avaliou *in situ*, a capacidade de uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) e em reduzir a desmineralização do esmalte dentário bovino e alterar a composição do biofilme. Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com o dentifrício 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP promoveu uma alteração significativa na desmineralização

do esmalte e biofilme quando comparado aos tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

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 Ca e P, assim a associação de F com fontes ricas destes íons tem sido proposta como um tratamento eficaz para os estágios iniciais da doença e instalação da mesma. No presente estudo foi avaliado uma formulação dentifrícia contendo 1100 ppm F e 10% de CPP-ACP. 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 fosfopeptídeos de caseína (CPP). É sugerido que o cálcio e o fosfato liberados pelo CPP-ACP apresentam capacidade de formar nanocomplexos no biofilme, tornando o esmalte mais resistente a ácidos e 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, como já demonstrado em estudos prévios [Oliveira et al., 2016; Philip & Walsh et al., 2019]. Os resultados do presente estudo mostram que o regime apenas com 1100F-CPP-ACP não reduziu a perda mineral em profundidade (Tabela 2) quando comparado ao regime convencional (1100F). Para este achado, especula-se que os íons F quando associado ao CPP-ACP 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. [2018] e Gonçalves et al. [2021a], dificultando completamente a difusão de HF^0 e CaHPO_4^0 na lesão do esmalte e consequentemente, reduzindo a remineralização. Portanto, embora estudos *in situ* e ensaios clínicos randomizados mostrem que CPP-ACP pode interferir no processo DES-RE, não é significativamente diferente do F [Sharda et al., 2021].

Já o TMP, um polifosfato de natureza cíclica, tem sido estudado extensivamente [Danelon et al., 2015; Danelon et al., 2017; Danelon et al., 2020] em associação com F em produtos de higiene bucal. Quando adicionado a dentifrícios fluoretados contribui para um efeito sinérgico com o F na redução da desmineralização do esmalte [Danelon et al., 2015; Emerenciano et al., 2018], corroborando com achados anteriores [Danelon et al., 2015; Emerenciano et al., 2018; Danelon et al., 2020]. Em comparação a outros agentes anticárie, o TMP adsorve ao esmalte levando a formação de uma camada reticular que diminui a precipitação de fosfato de cálcio nos poros do esmalte. Portanto, a difusão do fosfato é facilitada permitindo que os íons F, Ca e P conduzam a uma menor desmineralização na parte externa e interna da lesão, como evidenciado pelos dados de %SH, ΔKHN , Ca e P no esmalte (Tabela 2). Dessa forma, sugere-se que o TMP induza grande precipitação de fosfato de cálcio no esmalte, atuando como um agente biomimético [Favretto et al., 2018]. Esses achados também foram observados por Gonçalves et al. [2021a] pela análise de Espectroscopia de energia dispersiva de raio X (EDX); entretanto não foi possível indicar se a fase formada é cristalina (semelhante a apatita) ou amorfa. Por outro lado, foi identificado que a associação do CPP-ACP ao TMP levou a maior reatividade dos agentes, sugerindo um efeito sinérgico entre os mesmos (principalmente devido à capacidade desse complexo em reduzir a precipitação de cálcio

e fosfato) contribuindo para a maior formação não só das espécies iônicas, mas também a formação de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0), assim essas precipitação não ocorreria diretamente no esmalte, o que facilitaria a difusão dessas espécies para o interior da lesão, influenciando positivamente na redução da desmineralização do esmalte [Cochrane et al., 2008; 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.

Em relação aos efeitos dos tratamentos sobre as variáveis do biofilme (F, Ca, P e EPS), destaca-se a ação positiva do 1100F-CPP-ACP, 1100F-TMP e 1100F-CPP-ACP-TMP em relação ao dentifrício contendo apenas F (1100F) (Tabela 2). Nanocomplexos de CPP-ACP são facilmente solúveis na saliva e apresentam um gradiente de difusão que lhes permite penetrar no biofilme dentário. Dessa forma, entende-se que o CPP-ACP atue como um veículo de entrega de fosfato de cálcio aumentando significativamente os níveis de íons cálcio e fosfato na saliva e no fluido do biofilme, sem causar precipitação dos mesmos. Em baixas condições de pH (como o do presente estudo) que ocorrem durante um desafio cariogênico, facilitam a liberação de íons F, Ca e P dos complexos, inibindo a desmineralização e favorecendo a remineralização pela precipitação dos íons liberados. Além disso, o CCP-ACP tem a capacidade de se ligar ao biofilme, proporcionando um considerável reservatório de íons Ca. Em troca, isso restringe a perda mineral durante um processo cariogênico e fornece uma possível fonte de cálcio para remineralização [Rose, 2000]. Destaca-se que o padrão de remineralização produzido pela CPP-ACP é considerado superior a remineralização predominantemente apenas superficial mediada pelo F [Shen et al., 2011; Philip & Walsh et al., 2019]. Ainda, a literatura sugere que o CPP-ACP modifique a adesão de microrganismos a longo prazo devido à sua capacidade de se incorporar em receptores presentes na película (por exemplo receptor de íons Ca), inibindo ou modificando a aderência bacteriana [Grychtol et al., 2014]. Altas concentrações extracelulares de íons Ca disponibilizados pelos complexos CPP-ACP podem aumentar a permeabilidade da membrana de *S. mutans* e causar lise parcial [Alawadhi et al., 2020; Sionov et al., 2021]. Além disso, as moléculas de CPP apresentam regiões hidrofílicas e hidrofóbicas que podem mascarar proteínas hidrofóbicas presentes na parede celular bacteriana, e consequentemente impedir a adesão do microrganismo às superfícies dentárias [Philip & Walsh et al., 2019]. É importante salientar, que o aumento desses íons no biofilme deve ser levado em consideração, uma vez que concentrações de Ca variando entre 1×10^{-3} a 1×10^{-4} reduzem a concentração de EPS, como já constatado em outros estudos [Boyd, 1978; Takeshita et al., 2015; Emerenciano et al., 2018] e evidenciado pelos nossos resultados (Tabela 2). Dessa forma, a interferência com a fixação microbiana pode prevenir alterações ecológicas prejudiciais no biofilme, inibindo ou reduzindo a desmineralização do esmalte dentário, como evidenciado no presente estudo.

Destaca-se também que na associação de F-CPP-ACP-TMP, o efeito foi melhor e maior para todas as variáveis do biofilme (Tabela 2). Dessa forma, acredita-se que o TMP tenha atuado no biofilme

indiretamente, uma vez que as altas concentrações de F e Ca no biofilme alteram o metabolismo bacteriano e a atividade biológica, bem como a formação de EPS [Van Loveren, 2001; Marquis et al., 2003]. Como os fosfatos inorgânicos e orgânicos apresenta alta afinidade pela hidroxiapatita, é possível que tais substâncias interferiram com a adsorção de materiais orgânicos e bactérias nas superfícies dentárias [Nordbö e Rölla, 1972], resultando na alteração da formação do EPS. Por outro lado, especula-se que o TMP tenha sido absorvido no biofilme através de ligação com íons Ca [Rose et al., 1996; Takeshita et al., 2015] atuando como propulsor de reservatório de Ca^{2+} e CaF^+ , explicando os melhores resultados obtidos com o dentifrício contendo 1100F-CPP-ACP-TMP, mesmo na presença do biofilme. Isso se deve a capacidade dos fosfatos inorgânicos apresentarem alta afinidade pela hidroxiapatita, deixando a superfície com polaridade mais negativa [Favretto et al., 2018; Neves et al., 2018], e consequentemente interferindo com a adsorção de produtos orgânicos e bactérias [Nordbö & Rölla, 1972; Emerenciano et al., 2018].

O objetivo do desenvolvimento do modelo *in situ* deve ser controlar variações com o menor impacto sobre relevância clínica, além de integrar várias análises, aumentando assim a sensibilidade e a validade da metodologia do estudo. Um fator importante a ser considerado é que estes dados são baseados em um protocolo *in situ* de desmineralização dentária (isto é, com formação de biofilme e presença de saliva). Embora os processos químicos básicos sejam os mesmos para todos os indivíduos, a suscetibilidade à cárie dentária difere significativamente [ten Cate, 2015], portanto o protocolo utilizado no presente estudo apresenta algumas limitações, pois nosso modelo não simulou o controle da progressão da lesão de cárie, diferentes desafios cariogênicos e a composição inorgânica da saliva e do fluido biofilme. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a formulação dentifrícia contendo 1100F-CPP-ACP-TMP promoveu um maior efeito protetor sobre a desmineralização do esmalte dentário e afetou significativamente a composição do biofilme formado *in situ*, quando comparado as formulações 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP. Portanto, esta nova formulação pode ser considerada uma alternativa eficaz para melhorar a saúde bucal de indivíduos, especialmente aqueles que apresentam alto risco a cárie dentária.

2.6 Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código: 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo: 2021/06408-8) pelo suporte financeiro ao primeiro e segundo autores, e a todos os voluntários desta pesquisa.

2.7 Declaração de Divulgação

Declaração de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Plataforma Brasil (Número CAAE: 60803722.2.0000.5420).

Declaração de Interesse

Os autores Alberto Carlos Botazzo Delbem e Marcelle Danelon possuem um pedido de patente para um produto utilizado no estudo, pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI/SP, sob o número C1 0801811-1.

Fontes de Financiamento

Este estudo foi financiado pelas agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código: 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo: 2021/06408-8).

Contribuição dos Autores

Gonçalves FMC, de Almeida EMFC, Quinteiro JP e Danelon M: elaboração da metodologia deste estudo; Gonçalves FMC, de Almeida EMFC, Quinteiro JP, Delbem ACB e Danelon M: elaboração das análises laboratoriais; Gonçalves FMC, de Almeida EMFC, Quinteiro JP, Delbem ACB, Cannon ML e Danelon M: tabulação dos dados, análise dos resultados e discussão; Gonçalves FMC, Delbem ACB e Danelon M: redação do artigo científico.

Declaração de Disponibilidade de Dados

Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo [e/ou] em seus arquivos de material suplementar. Dúvidas adicionais podem ser dirigidas ao autor correspondente.

2.8 Referências

- 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.
- Alawadhi NB, Lippert F, Gregory RL: Effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on nicotine-induced *Streptococcus mutans* biofilm in vitro. *Clin Oral Investig* 2020;24:3513-3518.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bakry AS, Abbassy MA: Increasing the efficiency of CPP-ACP to remineralize enamel white spot lesions. *J Dent* 2018;76:52-57.
- Boyd RF: The effect of some divalent cations on extracellular polysaccharide synthesis in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res* 1978;57:380-383.
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA: Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 2007;41:9-15.
- Cochrane NJ, Reynolds EC: Calcium phosphopeptides—mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res* 2012;24:41-47.
- Colombo S, Gallus S, Beretta M, Lugo A, Scaglioni S, Colombo P, Paglia M, Gatto R, Marzo G, Caruso S, Paglia L: Prevalence and determinants of early childhood caries in Italy. *Eur J Paediatr Dent* 2019;4:267-273.
- 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.
- 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.
- 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.
- Danelon M, Pessan JP, Prado KM, Ramos JP, Emerenciano NG, Moretto MJ, Martinhon CCR, Delbem ACB: Protective Effect of Fluoride Varnish Containing Trimetaphosphate against Dentin Erosion and

Erosion/Abrasion: An in vitro Study. *Caries Res* 2020;54:292-296.

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.

de Oliveira PRA, Barreto LSDC, Tostes MA: Effectiveness of CPP-ACP and fluoride products in tooth remineralization. *Int J Dent Hyg* 2022;20:635-642.

Delbem AC, Alves KM, Sasaki KT, Moraes JC: Effect of iron II on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Caries Res* 2012;46:481-487.

Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28: 350-356.

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.

Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, de Toledo PTA, Pedrini D: Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2018;22:3021-3029.

Favretto CO, Delbem ACB, Toledo PTA, Pedrini D: Hydraulic conductance of dentin after treatment with fluoride toothpaste containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2021;25:2069-2076.

Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.

Garcia LSG, Delbem ACB, Pessan JP, Dos Passos Silva M, Neto FNS, Gorup LF, de Camargo ER, Danelon M: Anticaries effect of toothpaste with nano-sized sodium hexametaphosphate. *Clin Oral Investig* 2019;23:3535-3542.

Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Dos Passos Silva M, Cannon ML, Danelon M: Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2021a;25:2811-2820.

Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Pessan JP, Romero GDA, Cannon ML, Danelon M: Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2021b;122:105001.

Grychtol S, Basche S, Hannig M, Hannig C: Effect of CPP/ACP on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:512682.

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.

- Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M: Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* 2003;26:493-510.
- Neves JG, Danelon M, Pessan JP, Figueiredo LR, Camargo ER, Delbem ACB: Surface free energy of enamel treated with sodium hexametaphosphate, calcium and phosphate. *Arch Oral Biol* 2018;90:108-112.
- 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.
- Oliveira LQC, Delbem ACB, Morais LA, Gonçalves SC, Souza JAS, Pedrini D: In vitro Evaluation of Surface Free Energy of Dentin after Treatment with Sodium Trimetaphosphate Associated or Not with Fluoride, Exposed or Not to Calcium. *Caries Res* 2022;56:81-90.
- 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.
- Philip N, Walsh L: The potential ecological effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate in dental caries prevention. *Aust Dent J* 2019;64:66-71.
- Pinto de Souza SCT, Araújo KC, Barbosa JR, Cancio V, Rocha AA, Tostes MA: Effect of dentifrice containing fTCP, CPP-ACP and fluoride in the prevention of enamel demineralization. *Acta Odontol Scand* 2018;76:188-194.
- Pitts NB, Baez RJ, Diaz-Guillory C, Donly KJ, Alberto Feldens C, McGrath C, Phantumvanit P, Seow WK, Sharkov N, Songpaisan Y, Tinanoff N, Twetman S: Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. *J Dent Child (Chic)* 2019;86:72.
- Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD: Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J* 2021;231:749-753.
- Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C: Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008;87:344-48.
- Rose RK, Shellis RP, Lee AR: The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996;30:458-464.
- Rose RK: Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol* 2000;45:569-575.
- 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.
- Sharda S, Gupta A, Goyal A, Gauba K: Remineralization potential and caries preventive efficacy of CPP-ACP/Xylitol/Ozone/Bioactive glass and topical fluoride combined therapy versus fluoride mono-therapy - a systematic review and meta-analysis. *Acta Odontol Scand* 2021;79:402-417.

- Shen P, Manton DJ, Cochrane NJ, Walker GD, Yuan Y, Reynolds C, Reynolds EC: Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent* 2011;39:518-525.
- Sionov RV, Tsavdaridou D, Aqawi M, Zaks B, Steinberg D, Shalish M: Tooth mousse containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate prevents biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *BMC Oral Health* 2021;21:136.
- Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sassaki 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.
- ten Cate JM: Models and role models. *Caries Res* 2015;49:3-10.
- Van Loveren C: Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res* 2001;35:65-70.
- Vogel GL, Chow LC, Brow WL: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23-31.
- Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H: Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
- Zamperini CA, Bedran-Russo AK: Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in Artificially Induced Root Caries. *Caries Res* 2018;52:331-338.

Lista de Figura

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SHi); (C) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (D) Dureza de superfície final (SHf) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (E) Análise de F, Ca e P no esmalte; (F) Análise de EPS, F, Ca e P no biofilme.

Lista de Tabela

Tabela 1: Média ($\pm$ dp, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais

Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após desafio cariogênico, *in situ*

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SHi); (C) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (D) Dureza de superfície final (SHf) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (E) Análise de F, Ca e P no esmalte; (F) Análise de EPS, F, Ca e P no biofilme.

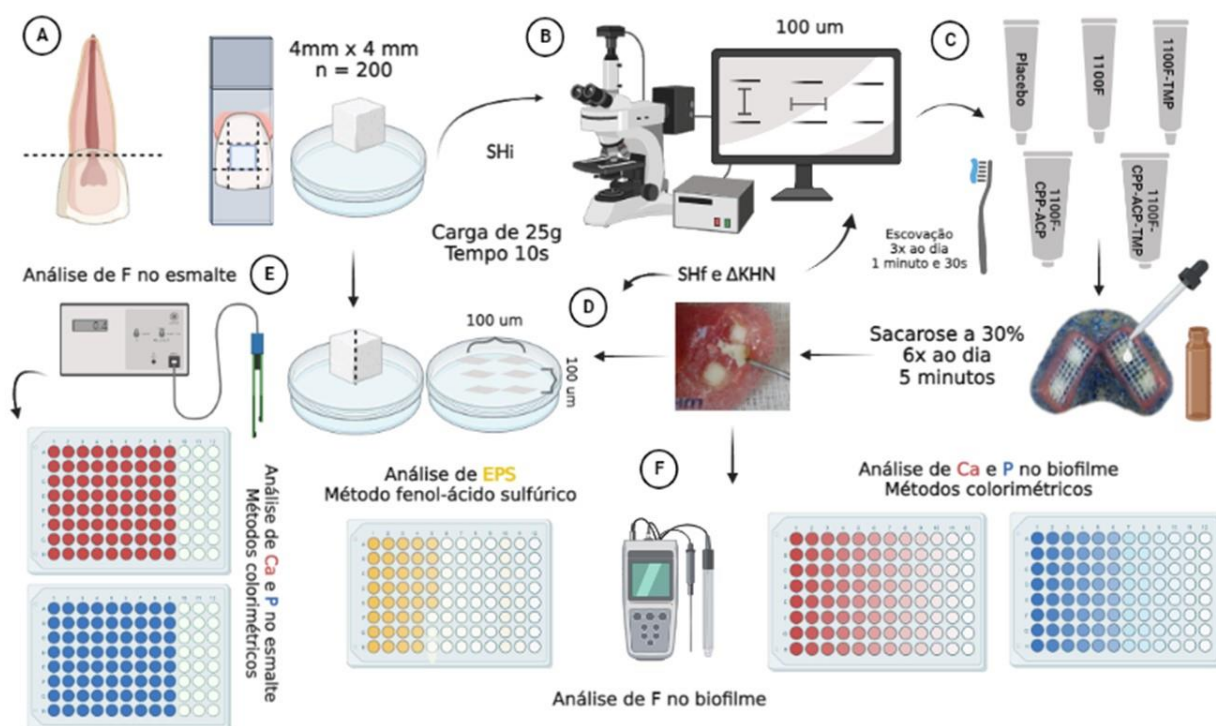


Tabela 1: Média ($\pm dp$, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais

Dentifrícios experimentais	FI (ppm F)	FT (ppm F)	pH
Placebo	17,9 (1,5)	25,6 (1,6)	7,1 (0,1)
1100F	1102,4 (1,2)	1186,0 (4,2)	7,0 (0,2)
1100F-CPP-ACP	1102,0 (3,1)	1158,2 (2,9)	7,1 (0,2)
1100F-TMP	1136,5 (2,3)	1168,3 (5,9)	7,0 (0,3)
1100F-CPP-ACP-TMP	1114,0 (2,2)	1156,6 (2,2)	7,1 (0,4)

**FI: Fluoreto iônico; FT: Fluoreto total; pH: Potencial hidrogeniônico; ppm F: Partes por milhão de fluoreto.

Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após desafio cariogênico, *in situ*

Análises	Dentifrícios experimentais				
	Placebo	1100F	1100F-CPP-ACP	1100F-TMP	1100F-CPP-ACP-TMP
%SH (KHN)	-72,6 ^a (3,9)	-47,2 ^b (2,2)	-45,1 ^c (2,3)	-39,0 ^d (2,8)	-27,5 ^e (3,2)
Δ KHN (KHN $\times$ μ m)	7258,1 ^a (722,5)	5000,4 ^b (688,8)	5044,7 ^b (598,1)	4395,1 ^c (682,6)	3205,4 ^d (398,1)
Esmalte (μg/mm³)					
F	1,6 ^a (0,6)	2,5 ^b (0,6)	2,6 ^b (0,7)	2,7 ^b (0,8)	3,4 ^c (0,6)
Ca	378,3 ^a (88,3)	695,3 ^b (91,5)	790,3 ^c (72,4)	912,1 ^d (62,4)	1244,3 ^e (70,4)
P	396,6 ^a (88,2)	586,8 ^b (75,6)	735,2 ^c (79,3)	788,4 ^c (92,5)	954,1 ^d (72,6)
Biofilme (mol/kg)					
F	2,54E-04 ^a (2,22E-05)	5,18E-04 ^b (3,68E-05)	7,32E-04 ^c (2,60E-04)	6,96E-04 ^c (2,30E-04)	1,37E-03 ^d (5,71E-04)
Ca	2,19E-01 ^a (5,10E-02)	3,23E-01 ^b (8,16E-02)	4,68E-01 ^c (1,01E-01)	4,52E-01 ^c (1,09E-01)	6,17E-01 ^d (1,46E-01)
P	6,07E-02 ^a (2,84E-02)	1,45E-01 ^b (4,09E-02)	2,59E-01 ^c (7,05E-02)	2,57E-01 ^c (1,01E-01)	3,98E-01 ^d (1,45E-01)
Biofilme (mg/g)					
EPS	3,0 ^a (0,9)	2,1 ^b (0,4)	1,5 ^c (0,2)	1,6 ^c (0,1)	1,0 ^d (0,3)

**Letras minúsculas indicam diferenças entre os grupos (Anova 1-critério de medidas repetidas, Teste Student-Newman-Keuls's; $p < 0,001$).

***%SH: porcentagem de perda de dureza de superfície; Δ KHN: perda integrada de dureza de subsuperfície; KHN: dureza Knoop; F: fluoreto; Ca: cálcio; P: fósforo; EPS: polissacarídeos extracelulares.

Artigo 2

Francyenne Maira Castro Gonçalves

3.0 Potencial remineralizador de uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto, fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo e trimetafosfato de sódio: estudo *in situ*

Gonçalves FMC^a, Quinteiro JP^a, de Almeida EMFC^b, Delbem ACB^a, Cannon ML^c, Danelon M^{a,b}.

^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

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

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

Título curto: Efeito remineralizador de fosfatos amorfo e cíclico

Autor correspondente:

Marcelle Danelon

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba

Department of Pediatric Dentistry and Public Health

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

Email:marcelledanelon@hotmail.com

***Artigo formatado de acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research.**

3.1 Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) sobre o processo de remineralização de lesões iniciais de cárie. **Material e Métodos:** Blocos de esmalte bovinos (n=200) foram selecionados através da dureza de superfície inicial (SH). Posteriormente submetidos à indução de lesão de cárie artificial por 16 horas e determinada a dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁). Dez voluntários (n=10) utilizaram dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte bovino com lesão de cárie artificial, durante 3 dias em 5 fases experimentais, com os respectivos dentifrícios: 1) sem F-CPP-ACP-TMP (Placebo), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP (1100F-CPP-ACP), 4) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP). Após 3 dias determinou-se a dureza de superfície final (SH₂) para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH_R), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte. Os dados foram submetidos a análise de variância (1-critério) de medidas repetidas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). **Resultados:** A superfície do esmalte tornou-se ~ 55% mais remineralizada quando tratada com o dentifrício 1100F-CPP-ACP-TMP em relação ao dentifrício de 1100F ($p < 0,001$); quando comparado ao dentifrício 1100F-TMP, a remineralização foi ~ 22% superior ($p < 0,001$). Já o tratamento com 1100F-TMP promoveu um efeito remineralizador maior em ~ 27% e ~ 70% em relação aos dentifrícios de 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$), respectivamente. O tratamento com 1100F-CPP-ACP-TMP levou à remineralização da lesão de subsuperfície (Δ KHN) em 84% e 91% quando comparado aos tratamentos 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$). Em relação ao 1100F-TMP, a lesão remineralizou em ~ 62% ($p < 0,001$). Para as variáveis iônicas no esmalte (F, Ca e P) houve um aumento significativo com o tratamento 1100F-CPP-ACP-TMP. Para os valores de F, este aumento foi de ~ 63% em relação ao 1100F ($p < 0,001$); por outro lado, os grupos 1100F; 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP apresentaram valores similares ($p > 0,001$). Para Ca, houve um aumento de ~ 65%, ~ 28% e ~ 15% quando comparado aos tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP ($p < 0,001$). Para os dados de P, os grupos 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP apresentaram valores similares entre si ($p > 0,001$). A maior concentração de P foi observada com o tratamento 1100F-ACP-CPP-TMP sendo superior em ~ 41% e ~ 17 % em relação aos tratamentos com 1100F e 1100F-TMP respectivamente ($p < 0,001$). **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a formulação dentifrícia contendo 1100F-CPP-ACP-TMP demonstrou um maior efeito remineralizador em lesões iniciais de cárie, podendo ser uma alternativa para pacientes que apresentam lesões em atividade.

Palavras-chave: Remineralização; Esmalte dentário; Fosfatos.

3.2 Introdução

A cárie dentária é uma doença multifatorial, não transmissível, onde fatores como dieta, saliva, exposição ao flúor (F), biofilme, aspectos sociais, comportamentais e econômicos influenciam em sua incidência e progressão [Sheiham & James, 2015; Pitts et al., 2019; Machiulskiene et al., 2020]. Baseado nestas condições, a doença é manifestada devido à intensos e constantes períodos de desmineralização, através da liberação de ácidos, que resultam na dissolução da estrutura dentária e quando não controlada pode levar a perda do elemento dentário [AAPD, 2018/2019; Lemos et al., 2019]. Manchas brancas são evidentes quando a quantidade de minerais subsuperficiais perdidos excede a quantidade de minerais ganhos por um longo período de tempo [Nascimento et al., 2016; Pitts et al., 2021]. 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, bem como para reverter o processo de cárie no estágio mais precoce possível [Braga et al., 2019]. Diante deste contexto, 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) (CPP-ACPF) têm sido estudados, contribuindo assim para o declínio da doença [Danelon et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Danelon et al., 2017; Zamperini & Bedran-Russo, 2018; Attiguppe et al., 2019; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b].

Estudos prévios têm relatado que a adição de trimetafosfato de sódio (TMP) em formulações dentifrícias pode potencializar o efeito protetor do F sobre o processo de remineralização do esmalte dentário [Danelon et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Emerenciano et al., 2018]. Essa ação remineralizadora está diretamente relacionada com a adsorção deste fosfato inorgânico à superfície dentária, pois uma vez adsorvido, o TMP atua como um agente nucleante de cálcio (Ca^{+2}) e fluoreto de cálcio (CaF^+), contribuindo para que estes se liguem em sua estrutura carregada negativamente [Favretto et al., 2018]. Quando em pH ácido, essas ligações são quebradas, libertando-os 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]. 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 maior efeito remineralizador em lesões artificiais de cárie (ΔKHN : redução de ~ 17% e F: aumento de ~ 24%) quando comparado ao dentifrício convencional contendo 1100 ppm F.

Além do TMP, a caseína fosfopeptídeo (CPP) associada ao fosfato de cálcio amorfo (ACP) (CPP-ACP) apresenta um efeito expressivo na remineralização de lesões de mancha branca, podendo ser classificados como um sistema de entrega [Gonçalves et al., 2021b]. Isso se deve a ação da CPP em se ligar à íons cálcio e ao fosfato mantendo-os em uma forma amorfa e ao ACP que promove a liberação desses íons durante a queda do pH bucal e biofilme, favorecendo a remineralização dentária [Tantbirojn et al., 2008; Manoharan et al., 2018]. Dessa forma, o complexo CPP-ACP age como um reservatório de cálcio e fosfato, aumentando a concentração desses íons livres, colaborando para a manutenção de um

estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário [Reynolds et al., 2008; Oliveira et al., 2016; Manoharan et al., 2018]. Quando associado ao F (CPP-ACPF) possui um maior potencial remineralizador devido à formação de uma fase amorfa estabilizada de fosfato de cálcio fluoretado. Assim enquanto o complexo CPP-ACP se dissocia quando há queda no pH, liberando íons que atuam prevenindo a desmineralização e favorecendo a remineralização, o F age formando fluorapatita, tornando o esmalte e dentina mais resistente às quedas de pH [Reynolds et al., 2008; Philip & Walsh et al., 2019].

Sabendo-se das boas propriedades anticárie do CPP-ACPF e TMP, Gonçalves et al. [2021a e 2021b] avaliaram *in vitro* o efeito da associação de tratamentos com dentifrício fluoretado (1100 ppm F) suplementado com 3% de TMP (1100F-TMP) seguido pela aplicação do fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (MI Paste Plus®) sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie e desmineralização do esmalte dentário. Em ambos estudos, a associação de tratamentos 1100F-TMP-MI Paste Plus® mostrou melhores resultados para dureza de superfície e em profundidade (%SH, %SH_R e ΔKHN), assim como, favoreceu a maior formação de Ca e P no esmalte quando comparado aos dentifrícios contendo apenas 1100F e/ou 1100F-TMP, sugerindo ser uma alternativa para pacientes com alto risco e atividade de cárie. Entretanto, nenhum estudo avaliou se a adição de CPP-ACP e TMP em uma mesma formulação dentifrícia contendo 1100 ppm F poderia potencializar a remineralização do esmalte dentário, simulando uma condição de atividade da doença. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar, *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) sobre o processo de remineralização dentária. A hipótese nula investigada foi a de que a nova formulação dentifrícia contendo F-CPP-ACP-TMP não promoveria efeitos positivos no esmalte quando comparado as formulações contendo apenas 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP.

3.3 Material and Métodos

3.3.1 Delineamento experimental

O estudo foi duplo-cego e cruzado consistindo em cinco fases experimentais com duração de 3 dias cada e washout de 7 dias entre uma etapa e outra, para eliminar possíveis efeitos residuais dos tratamentos [Danelon et al., 2015; Garcia et al., 2019]. O estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Plataforma Brasil (Número CAAE: 60800722.4.0000.5420). Dez voluntários com idade entre 18 e 33 anos, com boa saúde geral e bucal e fluxo salivar normal foram selecionados. Blocos de esmalte (4 mm × 4 mm, n = 200) foram obtidos de dentes incisivos bovinos e mantidos em solução de formol a 2%, pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [Danelon et al., 2017] (**Figura 1A**). Estes blocos tiveram sua superfície de esmalte polida (remoção de aproximadamente 120 µm), permitindo sua seleção através da determinação da dureza de superfície inicial (SH) (**Figura 1B**). Os blocos foram desmineralizados por 16 horas (**Figura 1C**) e submetidos ao teste de dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁). Foram confeccionados dispositivos para a arcada superior com quatro espaços (4 mm × 4 mm), nos quais foram fixados quatro blocos de esmalte bovino desmineralizados. Os grupos consistiram em cinco fases experimentais com os

seguintes dentifrícios: 1) Placebo (sem F-CPP-ACP-TMP), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), 4) 1100 ppm F associado a 10% de CPP-ACP (1100F-CPP-ACP) e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP) (**Figura 1D**). Após três dias do período de remineralização os quatro blocos foram removidos do dispositivo, e realizadas as análises da dureza de superfície final (SH_f) para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície ($\%SH_R$), perda integrada de dureza de subsuperfície (ΔKHN) (**Figura 1E**), F, Ca e P no esmalte (**Figura 1F**).

3.3.2 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 30 dias. Blocos de esmalte bovino (4 mm x 4 mm, n=200) foram obtidos a partir da porção mais plana da vestibular das coroas. Após a aquisição dos blocos de esmalte, a dentina foi ajustada para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm). Para isso, os blocos foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricada (± 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, a qual foi polida de acordo com a seguinte sequência: lixa de granulação 600, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 800, 4 lbs, tempo de 30 segundos, refrigeração a água; lixa de granulação 1200, 4 lbs, 30 segundos, refrigeração a água (*Foi removida aproximadamente 120 μ m entre os polimentos com as lixas de diferentes granulações) [Emerenciano et al., 2018]. 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. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com formol a 2% e pH 7,0 [Danelon et al., 2015].

3.3.3 Formulação, determinação do pH e concentração de F nos dentifrícios experimentais

Os dentifrícios foram manipulados no laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP contendo em sua composição Fluoreto de sódio (1100 ppm F), caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo (10% CPP-ACP) e Trimetafosfato de sódio (3% TMP). Um dentifrício sem adição de F/CPP-ACP/TMP (Placebo) também foi preparado. Para determinação do pH cada dentifrício foi suspenso com água deionizada na proporção 1:3 e a leitura procedeu-se através do eletrodo de pH (2A09E, Analyser, São Paulo, Brazil), sob agitação constante [Gonçalves et al., 2021a]. 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 nos quais foram acrescentados água deionizada até volume final de 10 mL. Após homogeneização, para a dosagem do F total (FT), 0,25 mL dessa suspensão foi mantida sob agitação durante 1h a 45 °C com 0,25 mL de HCl 2 mol/L. Em seguida foi neutralizada com 0,5 mL de NaOH mol/L 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 ppm F). Para a dosagem de F iônico (FI), o restante da suspensão de dentifrício foi submetido da mesma forma que o FT.

3.3.4 Indução das lesões de desmineralização artificial nos blocos de esmalte

Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha cosmético, com exceção da superfície externa de esmalte, para a indução das lesões de cárie artificial e colocados individualmente em solução desmineralizadora (1,3 mmol/L Ca, 0,78 mmol/L 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) [Danelon et al., 2019].

3.3.5 Descrição da fase clínica dos grupos experimentais

Voluntários (n=10) foram selecionados considerando-se o desfecho primário a análise da dureza de superfície inicial e dureza em secção longitudinal, diferença média entre os grupos (30 e 1300, respectivamente), desvio padrão (20 e 9000, respectivamente) e um erro- α de 5% e erro- β de 20% (sendo necessários no mínimo 8 voluntários para detectar diferenças significativas), devendo ainda preencher os seguintes critérios de inclusão [Emerenciano et al., 2018; Danelon et al., 2019]: a) Apresentarem idade entre 18 a 33 anos; b) Concordarem em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) Bom estado de saúde geral; d) Ausência clínica de lesões de cárie ativas ou doença periodontal. Os critérios de exclusão inicial foram [Emerenciano et al., 2018; Danelon et al., 2019]: a) Uso de medicamentos ou portadores de alterações que alterem o fluxo salivar; b) Uso de antibióticos e c) Alérgicos à proteína do leite (CPP). Os critérios de exclusão durante o experimento: a) Desistência voluntária; b) Alteração do quadro de saúde com consequente alteração do fluxo salivar ou necessidade de uso de antibióticos e c) Capacidade remineralizadora similar entre Placebo e 1100F. Uma semana antes do início do experimento e durante o período de washout de 7 dias, os voluntários utilizaram dentifrício sem F-CPP-ACP-TMP. Os voluntários foram instruídos a realizar a escovação, com o respectivo dentifrício experimental de cada fase, 3 vezes ao dia (1 minuto e 30 segundos), sendo que o dispositivo palatino deveria estar na cavidade oral e a escovação deveria ser realizada sobre os blocos de esmalte desmineralizados e dentes da arcada superior e inferior [Danelon et al., 2019]. Foram realizadas cinco fases experimentais com os seguintes dentifrícios: 1) Placebo (Sem F- CPP-ACP-TMP), 2) 1100 ppm F (1100F), 3) 1100 ppm F associado a 3% TMP (1100F-TMP), 4) 1100 ppm F associado a 10% de

CPP-ACP (1100F-CPP-ACP) e 5) 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP (1100F-CPP-ACP-TMP). Transcorridos três dias, para promover a remineralização das lesões artificiais de cárie [Danelon et al., 2019], os dispositivos foram removidos e os blocos retirados dos mesmos. Os blocos foram limpos utilizando gaze e água deionizada. Imediatamente foi avaliada a dureza de superfície final (SH₂) para a análise da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SHR), perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) no esmalte.

3.3.6 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), carga de 25 g por 10 s. Cinco impressões, separadas entre si por uma distância de 100 μ m, foram realizadas na região central de cada bloco (SH). Após a indução de lesão de desmineralização, foram realizadas outras cinco impressões (SH₁) distantes a 100 μ m das impressões de SH e outras cinco para análise de SH₂ e a seguir foi determinada a porcentagem de recuperação de dureza de superfície %SH_R, através da seguinte fórmula: [%SH_R = ((SH₂– SH₁/SH –SH₁) $\times$ 100]. 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 μ m da superfície externa do esmalte foi realizada na área central dos blocos. A área integrada da dureza (KHN $\times$ μ m) 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 (Δ KHN) [Danelon et al., 2019; Gonçalves et al., 2021b].

3.3.7 Análise de F, Ca e P no esmalte

O F presente no esmalte foi determinado conforme descrito por Weatherell et al. [1985], e modificado por Alves et al. [2007]. Discos de polimento autoadesivos (diâmetro, 13 mm) e carboneto de silício de gramatura 400 (Buehler) foram fixados no fundo de tubos de cristal de poliestireno (J-10; Injeplast, São Paulo, SP, Brasil). Uma camada de esmalte (50,9 $\pm$ 0,2 μ m) foi removida de cada bloco, e na sequência adicionado 0,5 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹; estes foram mantidos sob agitação constante por 1 hora. A análise de F foi realizada em 0,30 mL dessa solução após adição do mesmo volume de TISAB II, modificado com NaOH, utilizando um eletrodo específico 9409BN (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e microeletrodo de referência (Analyser, São Paulo, Brasil) acoplado a um analisador de íons (Orion 720A+, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) [Akabane et al., 2018]. Os resultados foram expressos em μ g/mm³. A análise de Ca foi realizada utilizando o método colorimétrico Arsenazo III [Vogel et al., 1983]. As leituras de absorbância foram registradas em 650 nm, com o auxílio de um leitor de placas (PowerWave 340, Biotek, Winooski, VT, EUA). O P foi analisado de acordo com Fiske & Subbarow

[1925], e as leituras de absorvência registradas em 660 nm. Os resultados por sua vez foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

3.3.8 Análise estatística

Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores de %SH_R, ΔKHN, F, Ca e P no esmalte e como fator de variação o tipo de dentifrício. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sigma Plot (versão 12.0) com um nível de significância de 5%. Os valores de %SH_R, ΔKHN, F, Ca e P no esmalte apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogênea (Bartlett) e foram submetidos a ANOVA (1-critério) de medidas repetidas, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

3.4 Resultados

A média ($\pm\text{dp}$) de SH após a desmineralização (SH1) foi de 58,2 KHN (3,7), variando entre 55,1 e 72,4 ($p = 0,441$). A Tabela 1 apresenta os resultados da determinação de fluoreto na forma iônica (FI), total (FT) e pH nos dentifrícios experimentais, manipulados previamente ao ensaio experimental. Os valores médios apresentaram-se dentro do esperado. Os valores médios de pH de cada dentifrício experimental previamente ao ensaio variaram entre 7,0 a 7,1, com pH neutro.

O tratamento com o dentifrício 1100F-CPP-ACP-TMP, promoveu a remineralização do esmalte (%SHR) em 55% em relação ao tratamento com 1100F ($p < 0,001$). Quando comparado ao tratamento ao dentifrício contendo 1100F-TMP, levou a uma remineralização de aproximadamente 22% ($p < 0,001$). O tratamento com o dentifrício suplementado com 3% de TMP foi capaz de promover a remineralização do esmalte (%SHR) em $\sim 27\%$ e $\sim 70\%$ quando comparado aos grupos 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram uma redução na lesão de subsuperfície, exceto o grupo Placebo que obteve o maior valor ($p < 0,001$). O grupo 1100F-CPP-ACP-TMP apresentou uma recuperação mineral em $\sim 46\%$ e $\sim 48\%$ quando comparado aos grupos de 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$). Já quando este grupo (1100F-CPP-ACP) foi comparado ao 1100F-TMP sua lesão foi menor em $\sim 38\%$. Além disso quando o esmalte foi tratado com o dentifrício 110F-TMP reduziu o corpo da lesão em $\sim 12\%$ e $\sim 15\%$ quando comparado ao 1100F e 1100F-CPP-ACP ($p < 0,001$) (Tabela 2)

A concentração de F no esmalte foi similar entre os tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP ($p > 0,001$), sendo a maior concentração observada para o 1100F-CPP-ACP-TMP ($p < 0,001$), levando a um aumento de $\sim 62,5\%$ quando comparado ao tratamento 1100F ($p < 0,001$). Todos os tratamentos levaram a um aumento na concentração de Ca no esmalte ($p < 0,001$), sendo que o 1100F-CPP-ACP-TMP apresentou um aumento superior em $\sim 65\%$, $\sim 28\%$ e $\sim 15\%$ quando comparado aos tratamentos com 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP ($p < 0,001$). Para os dados da concentração de P no esmalte, verifica-se que esta foi superior em $\sim 41\%$ e $\sim 17\%$ quando comparado aos tratamentos com os dentifrícios convencional (1100F) e 1100F-TMP, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 2).

3.5 Discussão/Conclusão

Diversos métodos para o controle da doença cárie vem sendo estudados na literatura, nos quais a associação de F a íons Ca e P são destacados, uma vez que a presença desses íons na saliva e biofilme interferem positivamente no processo de remineralização dos tecidos duros dentários [Cochrane et al., 2008; Rechmann et al., 2018; Danelon et al., 2019]. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ*, uma nova formulação dentifrícia contendo fluoreto (F), fosfopeptídeo de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e trimetafosfato de sódio (TMP) sobre o processo de remineralização de lesões iniciais de cárie. Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com o dentifrício 1100 ppm F associado a 10% CPP-ACP e 3% TMP promoveu uma remineralização significativa das lesões iniciais de cárie quando comparado aos tratamentos 1100F, 1100F-CPP-ACP e 1100F-TMP, assim como alterou de forma positiva a concentração de F, Ca e P no esmalte. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

Em relação às estratégias não invasivas para remineralização de lesões cariosas, o F tem um papel relevante, entretanto, sua capacidade de interferir no processo des/re é reduzida pela disponibilidade de íons Ca e P, assim a associação de F com fontes ricas destes íons tem sido proposta como um tratamento eficaz para os estágios iniciais da doença assim como de forma preventiva. No presente estudo foi avaliado uma formulação dentifrícia contendo 1100 ppm F e 10% de CPP-ACP. O CPP-ACP é um composto bioativo de fosfopeptídeos de caseína fosfato de cálcio amorfo o qual provém da caseína do leite, e quando sofre digestão enzimática na cavidade bucal forma o 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 as quais já tem seu mecanismo de ação estabelecidas na literatura com maior ação na profundidade do esmalte, induzindo a remineralização em todo o corpo da lesão [Reynolds et al., 2003].

Sugere-se que o Ca e P liberados pelo CPP-ACP apresentem capacidade de formar nanocomplexos no biofilme adjacente a lesão inicial de cárie, tornando o esmalte mais resistente a qualquer ataque ácido adicional [Manoharan et al., 2018], além disso estudos demonstram que esse composto apresenta grande capacidade de ação na remineralização do corpo da lesão em relação a outros agentes [Reynolds et al., 2008; Wu et al., 2010] e 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; Philip & Walsh et al., 2019]. Entretanto, em nosso estudo, foi observado que a associação de 1100F-CPP-ACP apresentou maior efeito remineralizador em superfície do que em profundidade, quando comparado ao dentifrício convencional (1100F) (Tabela 2). Para este resultado pode ser especulado que tenha ocorrido uma reação entre o ACP e F tornando os dois componentes ineficazes ou até mesmo reduzindo a disponibilidade de F solúvel [Oliveira et al., 2017; Gonçalves et al., 2021b]. Outra hipótese seria que a maior liberação de Ca e P na superfície do esmalte desmineralizado levaria à precipitação desses íons na superfície quando associado ao F, o que provavelmente levaria a obstrução dos poros do esmalte e consequentemente a redução da remineralização da lesão de subsuperfície [Delbem & Pessan, 2019; Gonçalves et al., 2021a. Gonçalves et al., 2021b].

Estudos prévios têm demonstrado o efeito anticárie de sais de fosfatos quando adicionados à diferentes veículos de aplicação tópica [Takeshita et al., 2015; Emerenciano et al., 2018; Danelon et al., 2020]. O TMP tem um importante papel na dinâmica do processo des/re e quando em associação ao F, em uma proporção molar ideal, apresenta capacidade de se adsorver a estrutura dentária, contribuindo para a redução da desmineralização do esmalte, solubilidade da hidroxiapatita e troca mineral [Takeshita et al., 2015; Emerenciano et al., 2018; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b]. Em um estudo *in situ* conduzido por Danelon et al. [2015], os autores avaliaram o efeito de um dentifrício convencional (1100F) associado a 3%TMP sobre a remineralização de lesões iniciais de cárie, sendo possível observar uma remineralização cerca de ~ 24% superior ao dentifrício com 1100F. Em nosso estudo, o tratamento com o mesmo dentifrício levou à maior remineralização superficial do esmalte em ~ 13% e ~ 17% em relação aos tratamentos com 1100F-CPP-ACP e 1100F (Tabela 2) e um aumento significativo de Ca e P para o interior do esmalte, assim como a redução do corpo lesão (Tabela 2). Esses achados podem ser atribuídos ao mecanismo de ação proposto ao TMP, ou seja: quando é adsorvido ao esmalte por meio da interação entre os sítios aniônicos de sua estrutura e grupos hidroxila da hidroxiapatita [Amaral et al., 2018] uma maior quantidade de Ca^{++} e CaF^+ em sua molécula carregada negativamente é retida. É importante notar que, de acordo com os dados da Tabela 2, o TMP facilitou em maior proporção a difusão de íons fosfato e cálcio. Esses achados estão de acordo com estudos prévios onde foi possível observar aumento nas concentrações iônicas no esmalte [Takeshita et al., 2015; Takeshita et al., 2016; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b], justificando o conceito de que embora a adsorção do TMP no esmalte resulte em uma barreira contra a difusão ácida [Takeshita et al., 2015], isso não impede a difusão iônica em esmalte, resultando em um efeito acentuado nas regiões mais profundas da lesão de subsuperfície.

Devido as boas propriedades apresentadas pelos agentes supracitados (CPP-ACP e TMP) a literatura tem buscado associar estes compostos a fim de potencializar a ação do F [Takeshita et al., 2016; Akabane et al., 2018; Danelon et al., 2020; Gonçalves et al., 2021a; Gonçalves et al., 2021b]. Nesse sentido, o estudo *in vitro* de Gonçalves et al. [2021b] avaliou o efeito da combinação de tratamentos com dentifrícios contendo TMP e CPP-ACP na remineralização do esmalte dentário, no qual foi possível observar maior remineralização do esmalte em superfície e profundidade, assim como, maior concentração de íons Ca e P para o interior da lesão, semelhante aos achados de nosso estudo (Tabela 2). Isso evidencia que, quando os agentes ativos estão em uma mesma formulação, podem atuar de forma positiva na remineralização de lesões iniciais de cárie, sem que haja competição por sítios da hidroxiapatita, e isto se deve aos diferentes mecanismos de ação apresentados por estes agentes. Dessa forma, entende-se que o CPP-ACP atue como um veículo de entrega de fosfato de cálcio aumentando significativamente os níveis de íons cálcio e fosfato na saliva, sem causar precipitação dos mesmos. Isso potencializa a remineralização dentária e reduz a perda mineral durante um processo cariogênico, fornecendo uma possível fonte de cálcio para remineralização [Rose, 2000]. Destaca-se ainda que o padrão de remineralização produzido pela CPP-ACP é considerado superior a remineralização

predominantemente apenas superficial mediada pelo F [Shen et al., 2011; Philip & Walsh et al., 2019]. Por outro lado, na presença do F-CPP-ACP a reatividade do TMP é aumentada (principalmente devido à 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 propagação dos mesmos para a lesão de subsuperfície, 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].

É importante enfatizar que, quando um agente remineralizante é usado em uma situação clínica onde há a presença de lesões iniciais de cárie, espera-se que sua ação ocorra no menor tempo possível, evitando assim a progressão da doença. O modelo *in situ* do presente estudo foi conduzido durante 3 dias e sem desafio cariogênico adicional, de modo que apenas a remineralização foi avaliada. Portanto, este modelo de 3 dias foi considerado suficiente para verificar as diferenças entre os tratamentos, demonstrando uma relação de dose-resposta para as diferentes concentrações de F. Em adição, protocolos *in situ* avaliando os efeitos remineralizantes de produtos fluoretados devem permitir que o processo de remineralização possa ocorrer pela saliva, quando associado a um tratamento com dentifrício Placebo, indicando que a remineralização sofre efeito direto de íons cálcio e fosfato presentes do ambiente salivar, como demonstrado em nosso estudo (Tabela 2). Dessa forma, com base nos resultados obtidos conclui-se que houve ação sinérgica entre esses agentes ativos, levando à maior remineralização de lesões iniciais de cárie, podendo ser uma estratégia para pacientes com atividade de cárie.

3.6 Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código: 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo: 2021/10668-5 pelo suporte financeiro ao primeiro e segundo autores, e a todos os voluntários desta pesquisa.

3.7 Declaração de Divulgação

Declaração de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Plataforma Brasil (Número CAAE: 60800722.4.0000.5420).

Declaração de Interesse

Os autores Alberto Carlos Botazzo Delbem e Marcelle Danelon possuem um pedido de patente para um produto utilizado no estudo, pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI/SP, sob o número C1 0801811-1.

Fontes de Financiamento

Este estudo foi financiado pelas agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código: 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo: 2021/10668-5).

Contribuições do Autor

Gonçalves FMC, Quinteiro JP, de Almeida EMFC e Danelon M: elaboração da metodologia deste estudo; Gonçalves FMC, Quinteiro JP, de Almeida EMFC, Delbem ACB e Danelon M: elaboração das análises laboratoriais; Gonçalves FMC, Quinteiro JP, de Almeida EMFC, Delbem ACB, Cannon ML e Danelon M: tabulação dos dados, análise dos resultados e discussão; Gonçalves FMC, Delbem ACB e Danelon M: redação do artigo científico.

Declaração de Disponibilidade de Dados

Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo [e/ou] em seus arquivos de material suplementar. Dúvidas adicionais podem ser dirigidas ao autor correspondente.

3.8 Referências

- 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.
- 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.
- 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.
- American Academy of Pediatric Dentistry: Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategie. *AAPD* 2018/2019;40;60-62.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Danelon M, Pessan JP, Prado KM, Ramos JP, Emerenciano NG, Moretto MJ, Martinhon CCR, Delbem ACB: Protective Effect of Fluoride Varnish Containing Trimetaphosphate against Dentin Erosion and Erosion/Abrasion: An in vitro Study. *Caries Res* 2020;54:292-296.
- 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 Investing* 2015;19:1683-1687.
- Delbem AC, Alves KM, Sasaki KT, Moraes JC: Effect of iron II on hydroxyapatite dissolution and precipitation in vitro. *Caries Res* 2012;46:481-487.
- Delbem ACB, Pessan JP: Alternatives to enhance the anticaries effects of fluoride (1st ed., pp. 75-92, 2019).

- 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.
- Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, de Toledo PTA, Pedrini D: Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2018;22:3021-3029.
- Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
- Garcia LSG, Delbem ACB, Pessan JP, Dos Passos Silva M, Neto FNS, Gorup LF, de Camargo ER, Danelon M: Anticaries effect of toothpaste with nano-sized sodium hexametaphosphate. *Clin Oral Investig* 2019;23:3535-3542.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Dos Passos Silva M, Cannon ML, Danelon M: Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2021a;25:2811-2820.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, Pessan JP, Romero GDA, Cannon ML, Danelon M: Effect of fluoride, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate combination treatment on the remineralization of caries lesions: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2021b;122:105001.
- Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ: The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* 2019;7:10.
- Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, JablonskiMomeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, SchulteAG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B: Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 2020;54:7-14.
- 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.
- Nascimento PL, Fernandes MT, Figueiredo FE, Faria-E-Silva AL: Fluoride-Releasing Materials to Prevent White Spot Lesions around Orthodontic Brackets: A Systematic Review. *Braz Dent J* 2016;27:101-107.
- Oliveira PR, Fonseca AB, Silva EM, et al: Remineralizing potential of CPP-ACP crèmes with and without fluoride in artificial enamel lesions. *Aust Dent J* 2016;61:45-52.
- 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.
- Philip N, Walsh L: The potential ecological effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate in dental caries prevention. *Aust Dent J* 2019;64:66-71.

- Pitts NB, Baez RJ, Diaz-Guillory C, Donly KJ, Alberto Feldens C, McGrath C, Phantumvanit P, Seow WK, Sharkov N, Songpaisan Y, Tinanoff N, Twetman S: Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. *J Dent Child (Chic)* 2019;86:72.
- Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD: Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J* 2021;231:749-753.
- 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.
- 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.
- Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ et al. Fluoride and casein phosphopeptide– amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008;87:344-348.
- Rose RK: Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol* 2000;45:569-575.
- Sheiham A, James WP: Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res* 2015;94:1341-1347.
- Shen P, Manton DJ, Cochrane NJ, Walker GD, Yuan Y, Reynolds C, Reynolds EC: Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent* 2011;39:518-525
- 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.
- 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.
- 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.
- Vogel GL, Chow LC, Brow WL: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23-31.
- Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H: Micro-sampling by abrasion. *Caries Res* 1985;19:97-102.
- 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.
- Zamperini CA, Bedran-Russo AK: Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in Artificially Induced Root Caries. *Caries Res* 2018;52:331-338.

Lista de Figura

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SH); (C) Indução de lesão artificial de cárie e dureza pós-desmineralização (SH1); (D) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (E) Dureza de superfície final (SH₂) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (F) Análise de F, Ca e P no esmalte.

Lista de Tabela

Tabela 1: Média ($\pm$ dp, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais

Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após remineralização, *in situ*

Figura 1: (A) Preparo dos blocos de esmalte; (B) Dureza de superfície inicial (SH); (C) Indução de lesão artificial de cárie e dureza pós-desmineralização (SH₁); (D) Descrição da fase clínica dos grupos experimentais; (E) Dureza de superfície final (SH₂) e perda integrada de dureza de subsuperfície (Δ KHN); (F) Análise de F, Ca e P no esmalte.

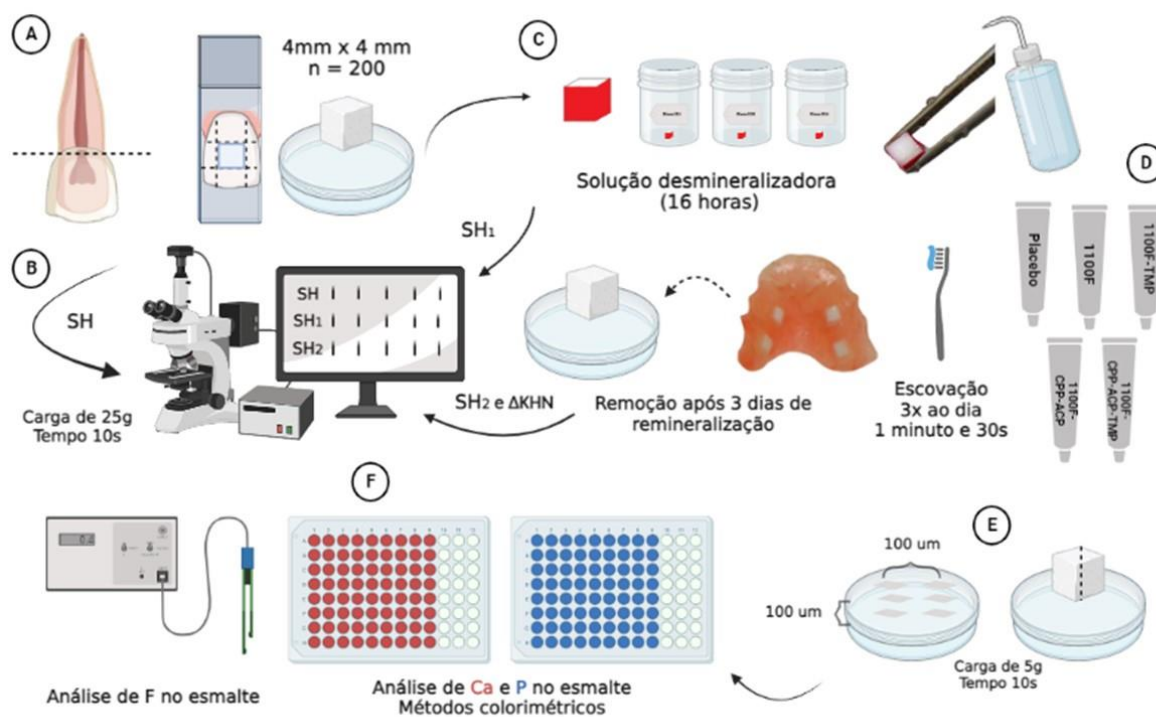


Tabela 1: Média ($\pm$ dp, n=3) da concentração de FI, FT e pH nos Dentifrícios experimentais

Dentifrícios experimentais	FI (ppm F)	FT (ppm F)	pH
Placebo	17,9 (1,5)	25,6 (1,6)	7,1 (0,1)
1100F	1102,4 (1,2)	1186,0 (4,2)	7,0 (0,2)
1100F-CPP-ACP	1102,0 (3,1)	1158,2 (2,9)	7,1 (0,2)
1100F-TMP	1136,5 (2,3)	1168,3 (5,9)	7,0 (0,3)
1100F-CPP-ACP-TMP	1114,0 (2,2)	1156,6 (2,2)	7,1 (0,4)

**FI: Fluoreto iônico; FT: Fluoreto total; pH: Potencial hidrogeniônico; ppm F: Partes por milhão de fluoreto.

Tabela 2. Média ($\pm$ dp, n=10) das variáveis analisadas de acordo com os Dentifrícios experimentais após remineralização, *in situ*

Análises	Dentifrícios experimentais				
	Placebo	1100F	1100F-CPP-ACP	1100F-TMP	1100F-CPP-ACP-TMP
%SH _R (KHN)	15,7 ^a (2,6)	34,9 ^b (2,1)	26,2 ^c (2,6)	44,3 ^d (1,5)	54,2 ^e (1,9)
Δ KHN (KHN $\times$ μ m)	8055,9 ^a (473,9)	5123,9 ^b (626,7)	5324,3 ^b (571,7)	4502,0 ^c (677,1)	2782,0 ^d (552,7)
F (μ g/mm ³)	1,2 ^a (0,2)	2,4 ^b (0,4)	2,6 ^b (0,9)	2,9 ^b (0,5)	3,9 ^c (0,9)
Ca (μ g/mm ³)	368,1 ^a (67,2)	691,0 ^b (62,6)	831,0 ^c (88,3)	990,9 ^d (72,8)	1137,6 ^e (70,4)
P (μ g/mm ³)	359,3 ^a (84,2)	664,7 ^b (79,9)	763,5 ^c (80,2)	803,5 ^c (86,9)	936,6 ^d (72,9)

Letras minúsculas indicam diferenças entre os grupos (Anova 1-critério de medidas repetidas, Teste Student-Newman-Keuls's; $p < 0,001$).

%SH_R: porcentagem de recuperação de dureza de superfície; Δ KHN: perda integrada de dureza de subsuperfície; KHN: dureza Knoop; F: fluoreto; Ca: cálcio; P: fósforo.

Conclusão Geral

Francyenne Maira Castro Gonçalves

4 Conclusão Geral

A associação de tratamentos com trimetafosfato de sódio (TMP) e fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) a um dentifrício fluoretado (1100 ppm F) promoveu um maior efeito no controle à cárie e variáveis do biofilme, podendo ser uma alternativa efetiva para melhorar a saúde bucal dos indivíduos, especialmente aqueles com alto risco e atividade de cárie dentária.

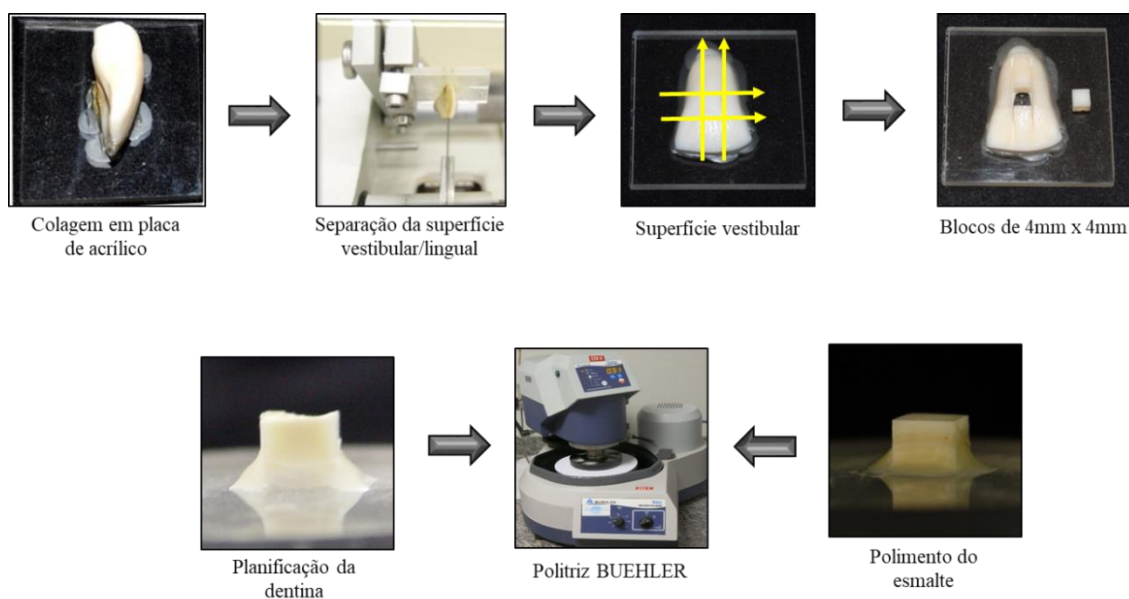
Anexos

Francyenne Maira Castro Gonçalves

5. ANEXOS

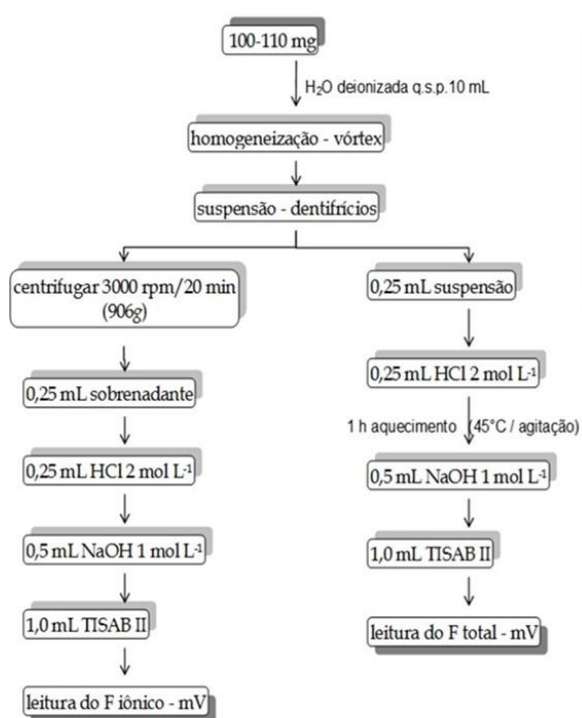
ANEXO A

PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE



ANEXO B

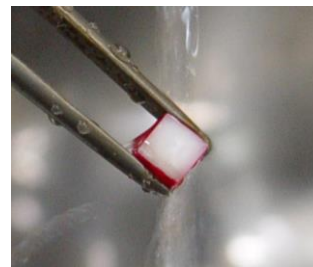
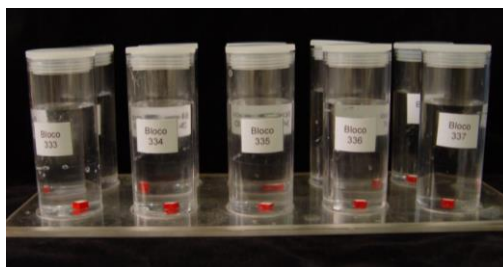
DOSAGEM DE FLUORETO NOS DENTIFRÍCIOS EXPERIMENTAIS



Eletrodo específico para F⁻; Orion 9409-BN
Microeletrodo de referência
Analisador de íons

ANEXO C

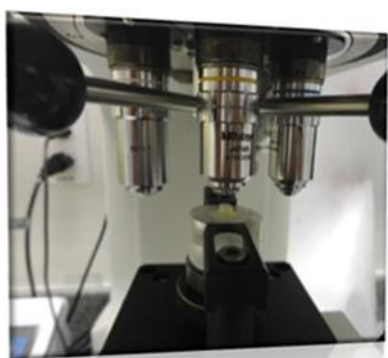
INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL



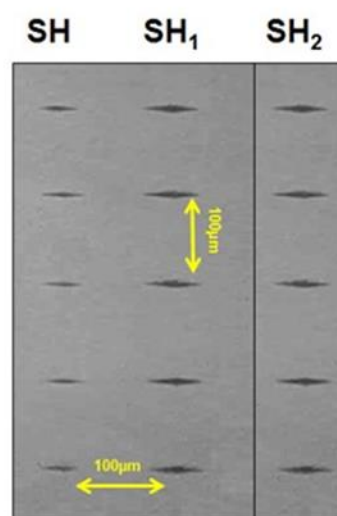
16 horas

ANEXO D

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

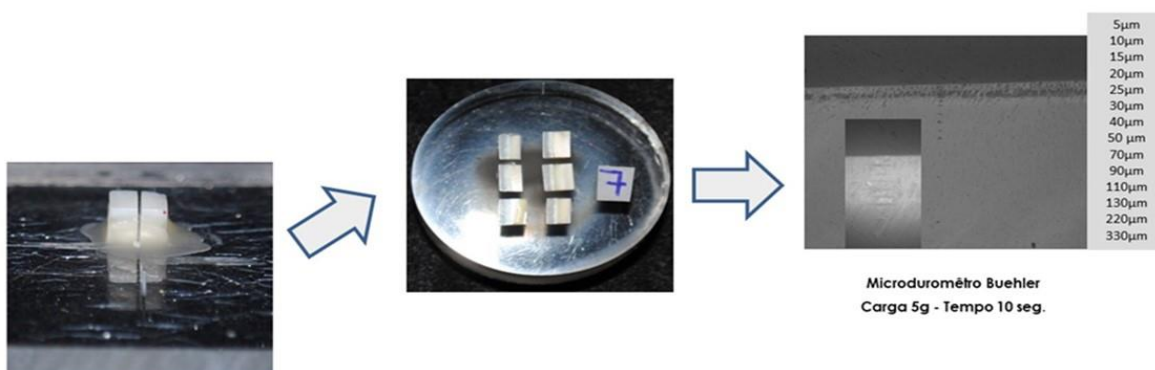


Microdurômetro Buehler
Carga 25 gramas, Tempo 10 segundos

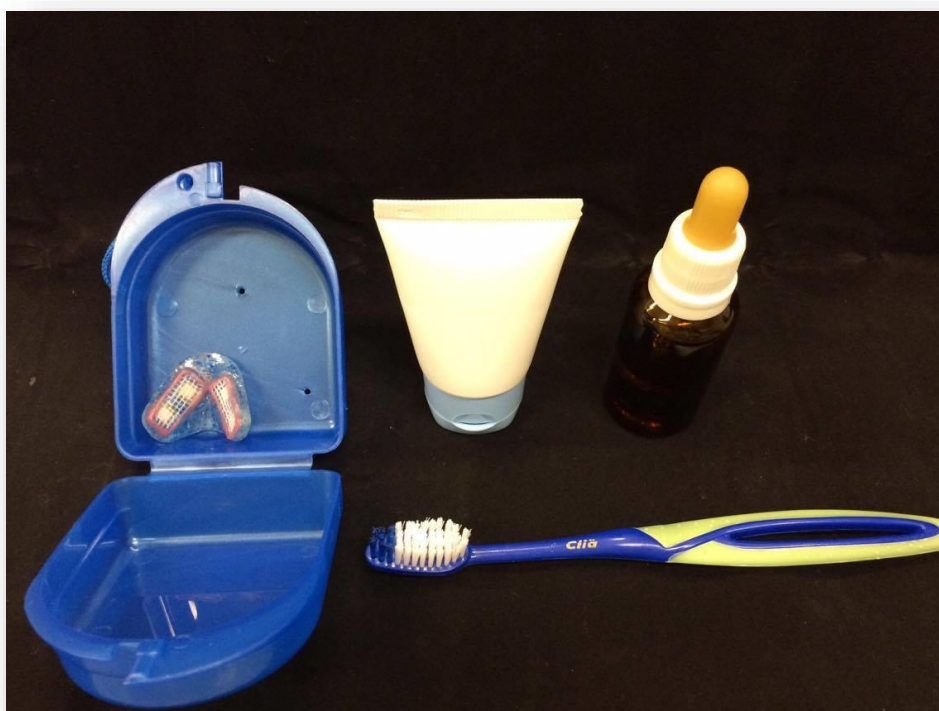


ANEXO E

ANÁLISE DA PERDA INTEGRADA DE DUREZA DE SUBSUPERFÍCIE



ANEXO F
DISPOSITIVO PALATINO (Artigo 1)



Kit fornecido ao voluntário a cada período experimental.

ANEXO G

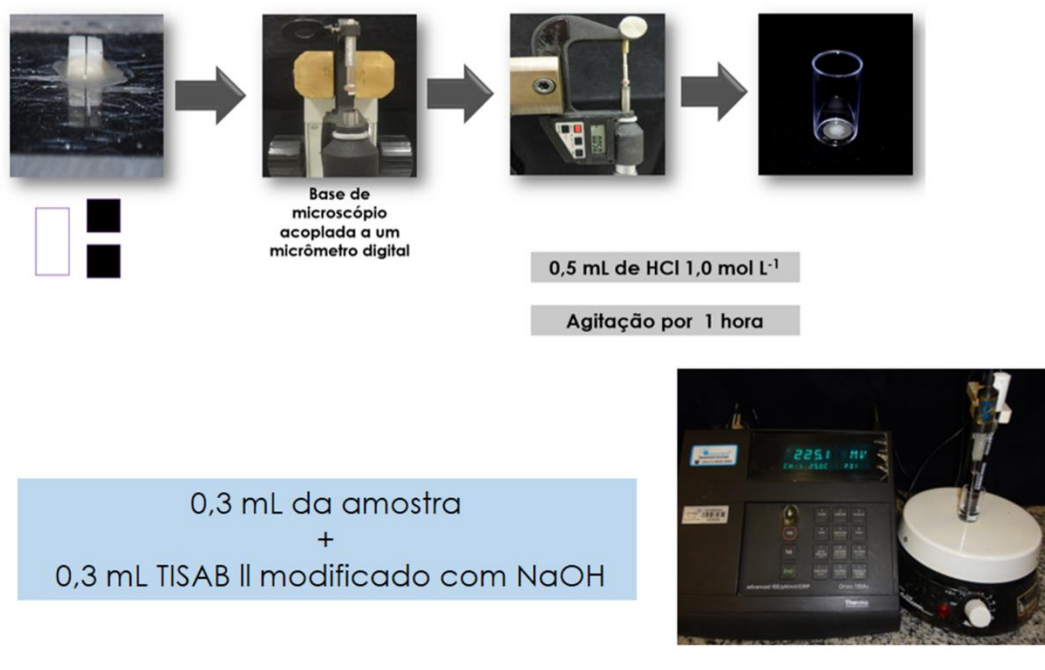
DISPOSITIVO PALATINO (Artigo 2)



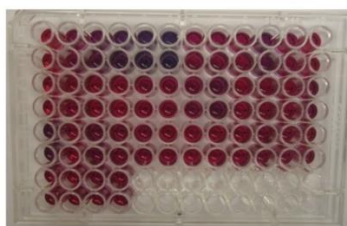
Kit fornecido ao voluntário a cada período experimental.

ANEXO H

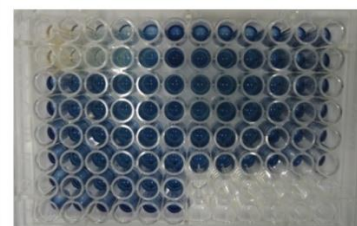
ANÁLISE DE FLUORETO, CÁLCIO E FÓSFORO NO ESMALTE



Espectrofotômetro de microplaca
EONC, Biotek, USA



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



Fósforo - Método colorimétrico
Fiske e Subbarow, 1925.

ANEXO I

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTÁRIO

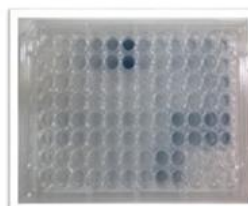
Biofilme Coletado



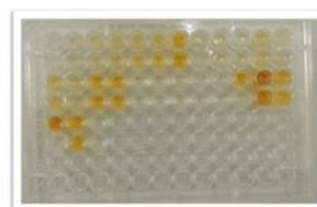
Fluoreto- Eletrodo específico (Orion 9409) - Eletrodo de referência (Orion 900200) - Analisador de íons (Orion 720A+).



Cálcio - Método colorimétrico Arsenazo III, Vogel et al., 1983.



Fósforo - Método colorimétrico Fiske e Subbarow, 1925.



EPS - Método Fenol-Sulfúrico Dubois, 1956.