

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANGEL YAMITH SÁNCHEZ FORERO

**EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
INIBIÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DENTAL E NA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA E MICROBIANA DO BIOFILME FORMADO IN SITU SOB
DIFERENTES DESAFIOS CARIOGÊNICOS.**

Porto Alegre

2016

ANGEL YAMITH SÁNCHEZ FORERO

**EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
INIBIÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DENTAL E NA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA E MICROBIANA DO BIOFILME FORMADO IN SITU SOB
DIFERENTES DESAFIOS CARIOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica - Cariologia e Dentística.

Orientador: Prof. Drº. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2016

ANGEL YAMITH SÁNCHEZ FORERO

**EFFECTO DE UN DENTÍFRICO CON ARGININA EN LA INHIBICIÓN DE LA
DESMINERALIZACIÓN DENTAL, COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y
MICROBIANA DEL BIOFILM FORMADO IN SITO BAJO DIFERENTES RETOS
CARIOGÉNICOS**

Tesis presentada al programa de Pós-Grado en Odontología, Nivel Magister, de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, como pré-requisito final para obtener el título de Magister en Clínica Odontológica - Cariologia y Odontología Restauradora.

Orientador: Prof. Drº. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Sánchez Forero, Angel Yamith

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO
ARGININA NA INIBIÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DENTAL E NA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E MICROBIANA DO BIOFILME
FORMADO IN SITU SOB DIFERENTES DESAFIOS
CARIOGÊNICOS. / Angel Yamith Sánchez Forero. -- 2016.
62 f.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur .

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Dentífrico. 2. Arginina. 3. Fluoreto. 4. Cárie
dentária. 5. Sacarose. I. Arthur , Rodrigo Alex ,
orient. II. Título.

A mis padres José Sánchez Reina y Esther Forero Beltran por la paciencia, dedicación y amor para guiarme desde mis primeros pasos hasta lo que soy hoy, y por ser mi fuente de inspiración, sin ellos nada hubiera sido posible.

A mis hermanas Naty y Raiza por la compañía y apoyo constante fruto del verdadero amor.

AGRADECIMENTOS

A mi orientador Rodrigo Alex Arthur por confiar en mis capacidades y por la difícil tarea de transmitir conocimiento siempre con una dedicación y pasión exagerada digna de los verdaderos maestros.

A mis colegas de maestría Carol, Lais, Roger y Guillermo por la compañía y energía transmitida durante todo el proceso.

A nuestra querida Lu (Luisa Mercado) por la paciencia y ayuda incondicional.

A la profesora Thais Negrini por las “puxadas de orelha” nada hubiera sido igual sin su apoyo.

A la profesora Lina Hashizume nuestra “japonesa” querida por toda la ayuda incondicional.

A todos los voluntarios que hicieron parte de nuestra investigación.

A mi amiga y colega Berna Andrea Torres por la compañía durante los momentos más difíciles, siempre con una excusa para subir el ánimo.

A CAPES por la beca concebida durante mis estudios.

La locura radica en comportarse siempre de la misma manera y esperar resultados diferentes.

Albert Einst

RESUMO

SÁNCHEZ, Angel Yamith. **Efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na inibição da desmineralização dental e na composição bioquímica e microbiana do biofilme formado *in situ* sob diferentes desafios cariogênicos.** 2016. 62 f. Dissertação em Odontologia, Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Estudos clínicos sugerem que o dentifrício fluoretado contendo arginina (DFArg) apresenta melhor efeito anti-cárie do que o dentifrício fluoretado convencional (DF) num período de até 2 anos de acompanhamento clínico. No entanto, não se sabe ainda se a arginina promove qualquer benefício em termos de aumentar o efeito anti-cárie do flúor num grupo de indivíduos exposto a um risco elevado de desenvolvimento de cárie. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do DFArg na inibição da desmineralização do esmalte e nas composições microbianas e bioquímicas do biofilme dental formado sob diferentes frequências de exposição à sacarose. Em um estudo boca dividida e cruzado, quatorze voluntários adultos que utilizavam DF pelo menos 2 meses antes do início deste estudo usaram um aparelho intra-oral palatino contendo 4 blocos de esmalte dental bovino (um par em cada lado do aparelho). Os voluntários foram submetidos a 2 grupos de tratamento: DF ou DFArg. Durante 2 períodos de 14 dias, os voluntários utilizaram um dos dentifrícios avaliados 3x/dia e gotejaram solução de sacarose 20% de sobre os espécimes de esmalte 4x e 8x/dia. Durante esse período, suspensão dos dentifrícios foi gotejada sobre os blocos de esmalte 3x/dia. Foi adotado um período de wash-out de dois meses entre as duas fases experimentais. Determinou-se a percentagem de perda de dureza superficial (%PDS), contagens microbianas no biofilme, biomassa e concentrações de Ca, Pi e polissacarídeos extracelulares insolúveis (IEPS). Maior %PDS foi encontrada quando a sacarose foi utilizada 8x/dia. Não foi encontrada diferença estatística na desmineralização do esmalte submetido ao tratamento DF e DFArg independentemente do desafio cariogênico. Adicionalmente, maior biomassa e maior IEPS foram encontrados em biofilmes expostos à sacarose 8x/dia. Menor concentração de IEPS foi encontrada em biofilmes formados na presença de DFArg. Pequenas alterações foram encontradas nas contagens microbianas e nas concentrações inorgânicas do biofilme. Os resultados deste estudo *in situ* sugerem que o DFArg não apresentou benefício adicional na inibição de cárie em comparação com o DF.

Palavras-chave: Dentífrico, Arginina, Fluoreto, Cárie dentária, Sacarose

ABSTRACT

SÁNCHEZ, Angel Yamith. **Effect of arginine/insoluble calcium containing dentifrice on enamel demineralization and on microbial and biochemical composition of dental biofilm formed *in situ***. 2016. 62 p. Master in Dentistry – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Clinical studies have suggested that fluoridated dentifrices containing arginine (FDArg) present better anti-caries effect than regular fluoridated dentifrice (FD) on the course of up to 2 years of follow-up. However, it is not known whether arginine promotes any increased anti-caries effect in a group of subjects under a high risk of caries development. This study aimed to assess the effect of FDArg on the inhibition of enamel demineralization and on the microbial and biochemical compositions of dental biofilm formed under different frequency of sucrose exposure. In a split-mouth and cross-over design, fourteen adult volunteers who should have used FD for at least 2 months prior to the beginning of this study wore an acrylic palatal appliance containing 4 bovine enamel specimens (one pair at each side of the appliance). They were subjected to 2 treatment groups: FD or FDArg. During 2 periods of 14 days, dentifrices were used 3x/day and 20% sucrose solution was dripped onto the enamel specimens 4x and 8x/day. Dentifrice slurries were dripped onto enamel specimens 3x/day. Two-month wash-out period was adopted between the two experimental phases. Percentage of surface hardness loss (%SHL), microbial counts on biofilms, biomass and Ca, P_i and insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) concentrations were determined. Higher %SHL was found when sucrose was used 8x/day and no difference was found on enamel demineralization between FD and FDArg irrespective to the cariogenic challenge. Additionally, higher biomass and higher IEPS were found on biofilms exposed to sucrose 8x/day. Lower IEPS concentration was found on biofilms in the presence of FDArg. Minor changes were found on microbial counts and on inorganic concentrations. The results of this *in situ* study showed that FDArg did not present additional benefit on caries inhibition compared to regular FD.

Keywords: Dentifrice. Arginine. Fluoride. Dental caries, Sucrose

RESUMEN

SÁNCHEZ, Angel Yamith. **Efecto de un dentífrico con arginina en la inhibición de la desmineralización dental, composición bioquímica y microbiana del biofilm formado in situ bajo diferentes retos cariogénicos.** 2016. 62 f. Tesis de Odontología, Nivel Magister- Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Estudios clínicos han sugerido que los dentífricos fluorados que contienen arginina (FDArg) presentan un mejor efecto anti-caries que los dentífricos fluorados convencionales (FD) en un periodo de hasta 2 años de seguimiento. Sin embargo, no se sabe si la arginina promueve algún aumento del efecto anti-caries en un grupo de sujetos con alto riesgo de desarrollarla. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del FDArg sobre la inhibición de la desmineralización del esmalte y sobre las composiciones microbianas y bioquímicas del biofilm dental formado bajo diferentes frecuencias de exposición a la sacarosa. En un diseño de boca dividida y cruzada, catorce voluntarios adultos que debían haber usado FD por lo menos durante 2 meses antes de comenzar este estudio, usaron un aparato palatino de acrílico que contenía 4 muestras de esmalte bovino (un par a cada lado del aparato). Se sometieron a 2 grupos de tratamiento: FD o FDArg. Durante 2 períodos de 14 días, se utilizaron dentífricos 3x / día y se goteó solución de sacarosa al 20% sobre las muestras de esmalte 4x y 8x / día. Se adoptó un período de limpieza de dos meses entre las dos fases experimentales. Se determinó el porcentaje de pérdida de dureza superficial (% SHL), conteos microbianos en biofilms, biomasa y las concentraciones de Ca, Pi y polisacáridos extracelulares insolubles (IEPS). Se encontró un %SHL mayor cuando se usó sacarosa 8 veces al día y no se encontró diferencia en la desmineralización del esmalte entre FD y FDArg independientemente del desafío cariogénico. Además, una biomasa más alta e IEPS más alto se encontraron en biofilms expuestos a sacarosa 8x / día. Se encontró menor concentración de IEPS en biofilms en presencia de FDArg. Se encontraron menores cambios en los conteos microbianos y en las concentraciones inorgánicas. Los resultados de este estudio in situ mostraron que FDArg no presentó ningún beneficio adicional sobre la inhibición de caries en comparación con la FD regular.

Palabras clave: Dentífrico, Arginina, Fluoruro, Caries dental, Sacarosa

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	1
1.1 Processo Saúde-Doença e o desenvolvimento de cárie dental	1
1.2 Papel do flúor no controle da cárie dental	7
1.3 Capacidade tampão do biofilme dental e o controle da cárie dental	10
1.3.1 Atividade urease e atividade arginolítica na cavidade bucal	10
1.3.2 Papel da arginina no controle da cárie dental	14
2. OBJETIVO	18
3. ARTIGO CIENTÍFICO	19
4. CONCLUSÃO	44
5. REFERÊNCIAS	45

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 PROCESSO SAÚDE-DOENÇA E O DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE DENTAL

A cárie dental é uma doença biofilme-dieta dependente que para desenvolver-se necessita da interação de determinadas condições, como por exemplo, presença de dentes susceptíveis sobre os quais são formados biofilmes microbianos que constantemente expostos a carboidratos da dieta podem promover a dissolução do elemento dental (FEJERSKOV; MANJI, 1990; CORTELLI et al., 2004; KIDD; FEJERSKOV 2004; GARCIA GODOY, 2008;). Os ácidos produzidos pelas bactérias se difundem rapidamente pelo biofilme dental promovendo a dissolução dos minerais do dente (FEATHERSTONE, 2008). A frequência com a qual esse fenômeno ocorre irá determinar se as perdas minerais permanecerão em nível subclínico ou clínico. A cárie dental não-tratada tem sido considerada como uma das condições de saúde bucal mais prevalentes no mundo. Num trabalho de revisão sistemática, seguida de metarregressão, que avaliou 186 estudos epidemiológicos publicados de 1980 até dezembro de 2010 reportando dados de cárie dental não-tratada, Kassebaum et al. (2015) encontraram que essa condição afeta cerca 2,4 bilhões de pessoas no mundo com grande potencial de trazer impactos biológicos, sociais e financeiros para os indivíduos acometidos e de oneração dos sistemas de saúde. Igualmente importante, também foi a constatação de que um pico de prevalência de cárie tem sido encontrada aos 25 e 70 anos de idade, o que sugere a necessidade de estratégias de promoção de saúde para esses grupos (KASSEBAUM et al., 2015). Além disso, houve variações consideráveis na prevalência e incidência entre regiões e países, mostrando que a prevalência de cárie dental vem sendo decrescente em países desenvolvidos e crescente nos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; PETERSEN et al., 2005).

Dessa forma, flutuações do pH na interface entre biofilme e superfície dental decorrentes da atividade metabólica do biofilme dental estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento da lesão de cárie (MANJI et al., 1991; DAWES, 2003). Do ponto de vista ultraestrutural, esmalte e dentina são tecidos altamente mineralizados formados por minerais do tipo hidroxiapatita, ricos em cálcio e fosfato (FEATHERSTONE, 2008). Embora a estrutura mineral do esmalte e da dentina apresentem baixa solubilidade, essa estrutura é solúvel em meio aquoso. Dessa forma, na cavidade bucal a dissolução do mineral tipo hidroxiapatita ocorre até que os íons que formam esse mineral acumulem-se na saliva, havendo um equilíbrio entre a fase mineral do dente e a fase mineral líquida dispersa na saliva. Esse equilíbrio é expresso por uma constante denominada produto de solubilidade (K_{ps}), que representa a concentração de íons dissolvidos numa solução de um sólido pouco solúvel quando a dissolução entra em equilíbrio. Nessa condição de equilíbrio, diz-se que a solução está saturada em relação à solubilidade da hidroxiapatita. Quimicamente, essa condição é atingida quando o K_{ps} da hidroxiapatita do dente iguala-se ao produto da atividade dos íons cálcio, fosfato e hidroxila dispersos na saliva. Nessa condição, os minerais dissolvidos do dente são reprecipitados na superfície dental pela saliva. Entretanto, esse equilíbrio é alterado principalmente por variações no pH da interface dente-biofilme (DAWES, 2003). Valores de pHs menores que 5,5 para esmalte, e de 6,5 para dentina (também chamados de pH crítico) fazem com que a saliva torne-se subsaturada em relação à hidroxiapatita do dente. Com isso, o equilíbrio se desloca no sentido de perda de minerais da superfície do dente, e este se dissolve liberando íons cálcio e fosfato dando início ao desenvolvimento da lesão de cárie (fenômeno denominado desmineralização). Na medida em que o pH é neutralizado pelos sistemas-tampões da saliva e do biofilme dental, o pH aumenta, e conseqüentemente, o grau de saturação da saliva. Em condições de pH neutro, a saliva está supersaturada, e pelo fato do produto de atividade iônica da saliva ser maior que o K_{ps} da hidroxiapatita, ocorre precipitação de íons cálcio e fosfato na superfície dental. Parte dos minerais perdidos durante o período de desmineralização são então reprecipitados na superfície dental (fenômeno

denominado de remineralização). (DAWES, 2003; CURY; TENUTA, 2008). Em decorrência desse processo físico-químico, quanto mais frequentes forem os episódios de quedas no pH durante o dia (abaixo do pH crítico), menos tempo a saliva terá para repor os minerais perdidos, e mais rapidamente a lesão de cárie se desenvolverá. Por isso, considera-se frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis um importante fator relacionado à cárie dental (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; RUGG-GUNN 2013; LLENA et al., 2015; PAGLIA et al., 2016; PERES et al., 2016). Comparativamente em relação ao esmalte, a dentina apresenta menor conteúdo mineral, maior conteúdo orgânico e maior presença de carbonato em sua estrutura mineral, o que permite que a lesão de cárie se desenvolva de forma mais rápida nesse tecido (FEATHERSTONE, 2008).

Essas frequentes quedas de pH decorrentes da ingestão de carboidratos da dieta também induzem modificação na microbiota do biofilme. De acordo com a hipótese da Placa Dental Ecológica (MARSH, 2003), a doença cárie é vista como consequência de um desequilíbrio na microbiota residente do biofilme, devido às condições frequentes de queda de pH no biofilme que leva a um aumento na proporção de bactérias potencialmente cariogênicas. Essas bactérias podem ser encontradas naturalmente no biofilme dental porém, em pH neutro ou mediante esparsas quedas de pH, esses microrganismos são fracamente competitivos e estão presentes apenas numa pequena proporção e não são considerados clinicamente relevantes. Nessa situação, os níveis de desmineralização e remineralização tendem a permanecer em equilíbrio e a lesão de cárie se desenvolve lentamente e pode permanecer em nível subestrutural e subclínico. Porém, se a frequência de ingestão de carboidratos rapidamente fermentáveis aumenta, o biofilme permanece mais tempo sob condições de baixo pH em decorrência da metabolização desses carboidratos pelas bactérias e produção de produtos ácidos. Essa condição causa desequilíbrio microbiológico, reduzindo a prevalência de bactérias ácido-sensíveis, como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, dentre outros, e aumentando a prevalência de microrganismos ácido-tolerantes como *Streptococcus mutans*. Os

S. mutans são bactérias acidogênicas capazes de metabolizarem açúcares e produzirem ácidos de forma eficiente sob baixos pHs (MARSH, 2003; TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

Sendo assim, do ponto de vista microbiológico, tem sido extensivamente demonstrado que os *S. mutans* são considerados um dos principais microrganismos cariogênicos. Estudos clínicos têm demonstrado alta prevalência de *S. mutans* no biofilme dental ou saliva de indivíduos cárie ativos quando comparados à indivíduos livres de cárie (SHKLAIR et al., 1974; WALTER; SHKLAIR, 1982)

Entretanto, os avanços metodológicos produzidos pelo refinamento de técnicas de biologia molecular, que permitem uma identificação mais precisa de microrganismos, têm sugerido que a prevalência de outras espécies bacterianas, além do *S. mutans*, também está elevada em biofilmes cariogênicos. Nesse contexto, ao analisar a composição bacteriana do biofilme de 26 indivíduos cárie-ativos e de 28 indivíduos livres de cárie, Wolff et al. (2013) verificaram uma proporção relativamente alta de *Propionibacterium acidifaciens* no grupo de indivíduo cárie-ativos. Em acréscimo, ao avaliar a diversidade microbiana de biofilmes formados *in situ*, Thomas et al. (2012) verificaram que a diversidade microbiana em sítios cárie-ativos foi maior quando comparado à sítios livres de cárie. Ainda, espécies como *Rothia dentocariosa* e *Scardovia inopinata* não foram detectadas em sítios livres de cárie, mas estiveram presentes em cerca de metade dos sítios cárie ativos. Em acréscimo, trabalhos recentes têm sugerido que os *S. mutans* correspondem à uma pequena fração do microbioma oral, e que as lesões de cárie resultam da atividade metabólica coordenada de um consórcio polimicrobiano (SIMON-SORO; MIRA, 2015). Nesse mesmo sentido, e de uma forma mais ampla, entende-se que a cárie dental é resultado de uma disbiose induzida por fatores externos, que favorece o crescimento de determinadas comunidades microbianas que atuam sinergicamente e sobrepujam a capacidade de proteção do hospedeiro (COSTALONGA; HERZBERG, 2014).

De forma geral, os microrganismos cariogênicos, em especial o *S. mutans*, apresentam algumas características comuns, como por exemplo, a rápida captação e o rápido transporte de açúcares fermentáveis para o meio intracelular, via sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferase de açúcar, o que gera vantagem competitiva em relação às demais bactérias do biofilme dental. Essa rapidez de transporte contribui diretamente para que uma maior quantidade de ácidos seja produzida por esses microrganismos. Além disso, a capacidade para manter o metabolismo do açúcar e permanecem viáveis em condições ambientais extremas, por exemplo, sob pH baixo, é característica comum dessas bactérias cariogênicas, que em sua maioria é desempenhada pela atuação de uma bomba translocadora de prótons que está presente na membrana celular. Essa bomba constantemente envia prótons para o meio extracelular evitando a acidificação intracelular em decorrência do influxo de íons hidrogênio produzidos pela glicólise (TAKAHASHI; YAMADA 1999).

Dessa forma, apesar do acúmulo de biofilme ser condição necessária para o desenvolvimento da cárie dental, é indiscutível que a dieta é o fator-chave e responsável por induzir desequilíbrio ecológico e o desenvolvimento de um biofilme com potencial cariogênico (SHEIHAM; JAMES, 2015). Nesse contexto, dentre todos os carboidratos da dieta, a sacarose tem sido considerada como o mais cariogênico (PAES LEME et al., 2008). Uma das razões se deve ao fato, da sacarose servir como substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis no biofilme dental. Esses polissacarídeos são sintetizados por enzimas glicosiltransferases produzidas pelos *S. mutans* (HAMADA; SLADE, 1980). Existem três tipos de glicosiltransferases produzidas pelos *S. mutans*: gtfB, que sintetiza polissacarídeos extracelulares insolúveis; gtfC, que sintetiza polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis; e gtfD, que sintetiza polissacarídeos extracelulares solúveis (KURAMITSU, 1993). A produção de PEC insolúvel modifica algumas características do biofilme, aumentando seu volume e porosidade, o que permite uma maior difusão de ácidos para a superfície do

dente (DIBDIN; SHELLIS, 1988). Como resultado dessa difusão aumentada as quedas de pH são mais intensas na superfície dental favorecendo a desmineralização (ZERO et al., 1992). Esses PEC insolúveis também promovem uma melhor adesão bacteriana às superfícies dos dentes mantendo a integridade estrutural dos biofilmes (ROLLA et al., 1989). Os PEC solúveis desempenham um papel secundário no desenvolvimento da cárie dental, porém não menos importante, uma vez que eles atuam como reservatório energético que contribuem para a manutenção da acidogenicidade do biofilme (KOO et al., 2013).

Nesse contexto, estudos *in situ* têm demonstrado uma grande concentração de PEC insolúvel no biofilme dental formado na presença de sacarose e sua relação com maior desmineralização dental (CURY et al., 2000; RIBEIRO et al., 2005; PECHARKI et al., 2005; AIRES et al., 2006; VALE et al., 2007). Estudos clínicos têm também sugerido associação entre presença de PEC insolúvel e cárie dental. Mattos-Graner et al. (2000) sugeriram que a capacidade de síntese de PEC insolúvel por *S. mutans* de crianças cárie-ativas é maior do que cepas de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie, o que poderia estar relacionada também à maior colonização de superfícies dentais por *S. mutans* nas crianças cárie-ativas devido ao papel do PEC insolúvel viabilizando adesão microbiana. Em acréscimo, Nobre dos Santos et al. (2002) mostraram correlação entre concentração de PEC insolúvel, consumo de sacarose e experiência de cárie em crianças que apresentavam cárie precoce da infância ou cárie em superfície oclusal.

Além das modificações estruturais induzidas pela sacarose na matriz do biofilme dental, o biofilme formado na presença de sacarose também apresenta menores concentrações de Ca, Pi, e F (CURY et al., 1997; 2000). Clinicamente, tem sido demonstrado menores concentrações de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dental de crianças que apresentam cárie precoce da infância quando comparado ao biofilme de crianças livres de cárie (NOBRE DOS SANTOS, 2002), sugerindo que a redução na concentração inorgânica do biofilme dental reduz sua

saturação em relação à tais íons, o que predispõe a superfície dental à uma perda mais rápida de minerais.

1.2 PAPEL DO FLÚOR NO CONTROLE DA CÁRIE DENTAL

O uso de flúor tem sido o método mais importante e mais efetivo de prevenção e controle de cárie dental (MARINHO, 2009). Mecanicamente, quando o íon flúor está presente de forma constante no meio bucal, cria-se uma condição de supersaturação da saliva e fluido do biofilme em relação à fluorhidroxiapatita, um mineral à base de fosfato de cálcio e que contém flúor em sua composição. Dessa forma, todas as vezes que o pH for menor que 5,5 para esmalte e 6,5 para dentina, o meio permanece subsaturado para a hidroxiapatita, e o dente se dissolve perdendo esses minerais. Entretanto, na presença de flúor e na condição de supersaturação para a fluorhidroxiapatita, ao mesmo tempo em que há perda de hidroxiapatita, há deposição de fluorhidroxiapatita na superfície dental, o que reduz a perda mineral líquida. Por isso, entende-se que o flúor atua reduzindo a desmineralização, e esse fenômeno ocorre até que o pH não seja inferior a 4,5 para esmalte e 5,5 para dentina (TENUTA; CURY, 2008). Quando o pH aumenta (acima dos valores citados acima), o meio bucal torna-se novamente supersaturado para hidroxiapatita (que então se deposita na superfície dental repondo parcialmente os minerais perdidos) e altamente supersaturado em relação à fluorhidroxiapatita, que também se deposita na superfície dental. Dessa forma, o íon flúor ativa o processo de remineralização dental (TENUTA; CURY, 2008). Tem sido discutido que esse processo é facilitado e otimizado quando o flúor está presente de forma constante no meio bucal, acompanhado de um bom controle de acúmulo de biofilme e de ingestão controlada de carboidratos fermentáveis.

Dentre os meios de uso de flúor, os dentifrícios fluoretados são considerados como o mais efetivo para prevenção e controle da cárie dental, uma vez que ao mesmo tempo que o biofilme dental é desorganizado pela escovação, há

fornecimento de flúor para a cavidade bucal para atuação nos processos de des- e de remineralização descritos acima (Cury; Tenuta, 2008). Da mesma forma que ocorre com os demais meios de uso de flúor cujas concentrações de flúor são maiores que 100 ppm, todas as vezes que o dentifrício fluoretado é usado, há formação de glóbulos de fluoreto de cálcio na superfície dental que são recobertos por uma capa de fosfatos presentes na saliva. Quando há queda no pH, essa camada de fosfatos é solubilizada e os cristais de fluoreto de cálcio são dissolvidos, disponibilizando ions flúor para reduzir a desmineralização e ativar a remineralização (AREND; CHRISTOFFERSEN,1990; TEN CATE, 1997). Na ocasião do aumento do pH, os cristais remanescentes são novamente recobertos pela camada de fosfato, protegendo esses cristais de fluoreto de cálcio até um próximo evento de acidificação. Dessa forma, esses cristais de fluoreto atuam como um reservatório temporário e de liberação lenta de flúor para o meio bucal, disponibilizando flúor durante as quedas de pH.

Revisões sistemáticas de literatura seguidas de meta-análise têm sido sugerido que o amplo uso de dentifrícios fluoretados contendo pelo menos 1100 ppm F é considerado como um dos principais responsáveis pela diminuição na severidade e prevalência de cárie dental ao redor do mundo (TWETMAN, 2009; WALSH et al., 2010). Entretanto, é importante considerar que esse efeito cárie-protetor do dentifrício fluoretado é diretamente dependente da frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis. No estudo de Paes Leme et al. (2004), voluntários adultos usaram dispositivo intra-oral palatino contendo blocos de esmalte bovino que foram submetidos à desafio cariogênico de sacarose 4 e 8 vezes ao dia durante 14 dias. Dentifrício fluoretado convencional (1100 ppmF) e dentifrício não-fluoretado foram usados pelos voluntários em momentos diferentes no decorrer do estudo. Os autores demonstraram desmineralização estatisticamente menor quando o dentifrício fluoretado foi usado independente da frequência de exposição à sacarose (4 ou 8 vezes ao dia), porém, a desmineralização foi estatisticamente maior quando o desafio cariogênico foi de 8 vezes ao dia. No estudo de Duggal et al. (2001) voluntários adultos utilizaram dispositivo mandibular contendo blocos de

esmalte dental humano com lesão de cárie artificial durante 5 dias, período em que solução de sacarose foi bochechada 1, 3, 5, 7 e 10 vezes por dia na presença de dentifrício não-fluoretado ou de dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF). Os autores concluíram que quando dentifrício fluoretado foi usado, demineralização foi evidente a partir de exposição à açúcar de 7 vezes por dia, e de 3 vezes por dia quando dentifrício não-fluoretado foi usado. Em adição, o estudo de Ccahuana-Vásquez et al. (2007) também sugeriu que o uso regular de dentifrício fluoretado convencional (1100 ppmF) foi capaz de controlar desmineralização durante um período 14 dias de exposição à sacarose *in situ* até que a frequência de exposição à sacarose não foi maior que 6 vezes ao dia. Porém os autores concluíram também que apesar de maior desmineralização ter sido encontrada acima dessa frequência de exposição à sacarose, modificações bioquímicas já ocorrem no biofilme dental mesmo que exposto à menores frequências de desafio cariogênico, sugerindo que o biofilme já pode apresentar potencial cariogênico mesmo que o desenvolvimento da lesão de cárie ainda não esteja evidente.

Dentifrícios fluoretados, geralmente, apresentam fluoreto de sódio (NaF) ou monofluorofosfato de sódio (MFP) como agentes fluoretados. O trabalho de Volpe (1995) sugere não haver qualquer diferença clínica na eficácia de NaF ou MFP na prevenção de cárie dental. Num estudo clínico duplo-cego, paralelo, com duração de 2 anos, Saporito et al. (2000) verificaram que o incremento de cárie dos indivíduos que utilizaram dentifrício contendo NaF pelo menos 2 vezes ao dia foi semelhante ao grupo de indivíduos que usou dentifrício com MFP pelo menos 2 vezes ao dia. Esses estudos sugerem então que tanto NaF quanto MFP são agentes fluoretados eficazes na prevenção e controle da cárie dental.

Estudos prévios têm demonstrado um aumento na concentração de flúor no biofilme dental ou na saliva de indivíduos que regularmente fazem uso de dentifrício fluoretado. No trabalho de Campus et al. (2003), 23 indivíduos com idade média de 24 anos de idade escovaram os dentes 3x/dia com dentifrício

contendo 1250 ppmF na forma de MFP durante 20 dias. Ao final do período de estudo, observou-se que concentração de flúor na saliva foi de cerca de 4 vezes maior que aquela encontrada no início do estudo.

Whitford et al. (2005) e Pessan et al. (2015) avaliaram concentrações de flúor no biofilme dental de indivíduos que regularmente fizeram uso de dentifrício fluoretado (1000 ppmF) ou de dentifrício sem flúor por 7 dias e que ingeriam água de abastecimento otimamente fluoretada (0,8 ppmF). Observou-se que, 1 hora após a escovação, a concentração de flúor no biofilme dos indivíduos que escovaram com dentifrício fluoretado foi cerca de 2 a 5 vezes maior que nos indivíduos que usaram dentifrício sem flúor. O aumento na concentração de flúor no biofilme dental é fundamental para controlar perda de minerais da superfície dental.

1.3 CAPACIDADE TAMPÃO DO BIOFILME DENTAL E O CONTROLE DA CÁRIE DENTAL

1.3.1 Atividade urease e atividade arginolítica na cavidade bucal

Muitos dos organismos que estão associados com a saúde na cavidade bucal são capazes de utilizar arginina ou uréia para gerar amônia através das enzimas do sistema arginina desiminase ou urease, respectivamente (BRADSHAW et al., 1998). Esta produção alcalina por estas bactérias pode afetar positivamente o equilíbrio entre a remineralização e desmineralização dentária pelo tamponamento que podem exercer no biofilme dental controlando quedas de pH. Além disso, esse controle no pH poderia também contribuir ajudar a prevenir o surgimento de uma microflora cariogênica (DAWES et al., 2001).

Existem basicamente duas rotas principais para a geração alcalina no biofilme dental: a hidrólise da uréia por enzimas urease e o metabolismo da arginina através do sistema de arginina desiminase (ADS) (VAN WUYCKHUYSE et al., 1995; BURNE et al., 2000). A uréia é fornecida continuamente nas secreções

salivares e exsudatos gengivais em concentrações aproximadamente equivalentes a aqueles do plasma sanguíneo, que variam desde cerca de 3 a 10 mmol/L em seres humanos saudáveis. A ureia é rapidamente convertida em amônia e CO₂ por ureases bacterianas que são produzidas por um pequeno subconjunto de bactérias bucais, que inclui o *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* e gênero *Haemophilli* (CHEN YY et al., 2000 ; LIU Y et al.,2006). O amônia atua como acceptor de íons hidrogênio e é convertido em amônio, modulando, dessa forma, as quedas de pH no biofilme.

A arginina, por sua vez, também encontra-se disponível nas secreções salivares numa concentração de até 50 mmol/L (VAN WUYCKHUYSE et al., 1995), porém, ela necessita de um sistema enzimático mais complexo (“sistema arginina desiminase”) (ADS) para ser convertida em amônia e CO₂. Essa conversão é realizada por bactérias comensais da cavidade bucal, como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e certas espécies de lactobacilos, de actinomicetes e espiroquetas (BURNE et al., 2000; LIU Y et al., 2012).

Estudos clínicos têm mostrado importantes correlações entre atividade de urease e do sistema ADS e atividade de cárie dental. Com o objetivo de verificar a relação entre atividade de urease e do sistema ADS e presença de cárie dental, Nascimento et al. (2009) coletaram saliva e biofilme dental de 13 indivíduos livres de cárie, 21 indivíduos cárie-ativos e de 11 indivíduos que apresentassem experiência passada de cárie. Os autores observaram maior atividade ADS e urease em indivíduos livres de cárie, e que a quantidade de amônio produzido pelas amostras de biofilme sempre foram maiores que aquela produzida pelas amostras de saliva. Ainda, esses autores verificaram relação inversa entre atividade urease e nível de *S. mutans* na saliva e biofilme dental de indivíduos livres de cárie.

Seguindo um delineamento parecido ao estudo de Nascimento et al. (2009), Gordan et al. (2010) examinaram 93 indivíduos que foram divididos nos seguintes grupos: livres de cárie, cárie ativos ou com experiência passada de cárie. Biofilme dental e saliva desses voluntários foram coletados e observou-se maior produção de amônia nas amostras de saliva e de biofilme de indivíduos livres de cárie. Em acréscimo, níveis de urease foram cerca de 3 vezes maiores no biofilme de indivíduos livres de cárie.

Com o objetivo de verificar a relação entre metabolismo de arginina e experiência de cárie, Nascimento et al. (2013) avaliaram a atividade do sistema ADS no biofilme dental de 100 crianças coletados de superfícies dentais sem lesão de cárie, com lesão de cárie em dentina, ou de superfícies dentais de crianças que tiveram experiência de cárie. Maior atividade ADS foi encontrada nas amostras de biofilmes de superfícies livres de cárie. Os autores ainda concluíram que a condição de presença ou ausência de cárie dental está diretamente associada à atividade do sistema ADS.

Resultados semelhantes aos de Nascimento et al. (2009) e de Gordan et al. (2010) também foram encontrados por Reyes et al (2014). Nesse estudo, a atividade urease e atividade ADS foi avaliada na saliva e no biofilme dental de 10 indivíduos livres de cárie e de 13 indivíduos cárie-ativos. Os autores verificaram que a atividade urease e atividade ADS foram maiores na saliva e biofilme de indivíduos que apresentavam menores CPOD.

Ainda, Nascimento et al. (2014) avaliaram se a presença de uma fonte exógena de arginina poderia interferir no funcionamento do sistema ADS. Amostras de saliva e de biofilme dental foram coletados de 19 indivíduos livres de cárie e de 19 indivíduos cárie-ativos antes e após 4 semanas de uso de dentifrício experimental sem flúor contendo 1,5% de arginina ou de uso de dentifrício fluoretado convencional, ambos usados 2 vezes ao dia. Indivíduos livres de cárie apresentaram maior atividade ADS no início do estudo, porém o uso do dentifrício

contendo arginina aumentou a atividade ADS dos indivíduos cárie ativos de forma que não houve diferença entre os grupos após as 4 semanas de uso do dentifrício contendo arginina. Além disso, por meio de análise de biologia molecular, esses autores também mostraram mudança microbiológica no biofilme dental dos indivíduos cárie ativos de forma que ao final do estudo a composição microbiológica foi semelhante a de indivíduos livres de cárie.

O efeito da arginina na capacidade de adesão de *S. mutans* ao vidro foram investigados por Sharma et al. (2014). Biofilmes de *S. mutans* foram cultivados sobre superfície de lamínulas de vidro por cerca de 18 horas na presença de diferentes concentrações de arginina e a adesão dos *S. mutans* à superfície foi avaliada por microscopia de força atômica. Os autores observaram que na presença de arginina houve menor adesão. De acordo com os autores, isso poderia ser explicado pelo fato da arginina potencialmente interferir com a síntese da matriz extracelular do biofilme, já que uma matriz extracelular mais densa foi observada nos biofilmes crescidos sem arginina.

Moncada et al. (2015) avaliaram a atividade ureolítica e arginolítica da saliva de crianças e associaram-nas com a experiência de cárie de crianças de 8 anos de idade. Essas crianças foram divididas em 3 grupos: sem lesão de cárie, 1 a 3 lesões de cárie em esmalte (experiência moderada) ou mais de 4 lesões de cárie em dentina (alta experiência de cárie). Os três grupos foram estatisticamente diferentes em relação à atividade urease, que foi maior no grupo de crianças que não possuíam lesões de cárie. Os autores também observaram maiores níveis de atividade urease e uma tendência à uma maior atividade arginolítica em indivíduos que apresentavam menores CPOD/ceod.

Com o objetivo de verificar se existe algum sinergismo entre flúor e arginina que possa estar relacionado à um melhor efeito anti-cárie do flúor, Zheng et al. (2015) cultivaram biofilmes mono-, dual- e multiespécies de *S. mutans*, *S. sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis* na superfície de lamínulas de vidro por até 48 horas na

presença de diferentes concentrações de flúor e de arginina. Os autores observaram que na presença de flúor (125 ppmF) e de arginina (2,5%) ocorre redução na proporção de *S. mutans* no biofilme multiespécies e aumento na proporção de *S. sanguinis*, além de reduzir o crescimento de *P. gingivalis*. Segundo os autores, esse efeito sinérgico de flúor e arginina pode estar relacionado à manutenção de uma microbiota compatível com saúde e que essa poderia ser uma estratégia promissora de controle de cárie dental.

Nesse mesmo contexto, He et al. (2016) verificaram o papel da arginina na formação da matriz extracelular e na ecologia de biofilmes multiespécies formados *in vitro*. Biofilmes formados por *S. mutans*, *S. gordonii* e *Actinomyces naeslundii* foram cultivados na superfície de discos de hidroxiapatita previamente recobertos por película salivar por aproximadamente 5 dias na presença de sacarose. Três vezes ao dia os biofilmes foram tratados com arginina (0,75, 1,5 e 3%) durante 10 minutos. Ao final do período, foi realizada a quantificação de bactérias viáveis em cada condição. Além disso, determinou-se a quantidade de PEC solúvel e insolúvel nos biofilmes, bem como sua conformação estrutural por microscopia confocal. Na concentração de 1,5%, a arginina reduz a colonização do biofilme por *S. mutans* favorecendo a colonização por *S. gordonii*. Além disso, biofilmes formados na presença de arginina apresentaram menores concentrações de PEC insolúvel e redução no volume de matriz extracelular. O perfil acidogênico dos biofilmes formados na presença de arginina também foi menor quando comparado aos biofilmes formados sem arginina.

1.3.2 Papel da arginina no controle da cárie dental

Recentemente, um dentifrício fluoretado contendo 1450 ppmF (na forma de MFP), 1,5% de arginina e suplementado com cálcio (fosfato dicálcio e carbonato de cálcio) foi desenvolvido no intuito de se complementar o efeito anticárie do flúor no processo des/remineralização através do controle do pH do biofilme dental devido metabolização da arginina (CUMMINS, 2013). Nesse contexto, trabalhos

clínicos foram realizados para se avaliar o papel deste novo dentífrico na inibição da desmineralização ou na ativação da remineralização.

Num estudo clínico controlado, randomizado e paralelo, Kraivaphan et al. (2013) avaliaram durante um período de 2 anos o efeito de um dentífrico fluoretado contendo arginina e cálcio no incremento de cárie dental em indivíduos de 6 a 12 anos de idade de baixo à moderado risco de cárie. Esses indivíduos foram divididos em 3 grupos (com cerca de 1600 participantes em cada grupo) de acordo com o tipo de dentífrico: dentífrico fluoretado (1450 ppm F/ MFP) contendo 1,5% de arginina e fosfato dicálcio, dentífrico fluoretado (1450 ppm F/ MFP) contendo 1,5% de arginina e carbonato de cálcio ou dentífrico fluoretado convencional (1450 ppmF na forma de NaF) contendo sílica. Os voluntários foram instruídos a escovarem os dentes 2x/dia. Ao final dos dois anos de estudo, os grupos que usaram dentífrico contendo arginina apresentaram um incremento no CPOD (de 17 a 21%) e no CPOS (de 16%) menor do que o grupo que usou dentífrico sem arginina. Não houve diferença entre os grupos contendo fosfato dicálcico ou carbonato de cálcio.

O efeito do dentífrico fluoretado contendo arginina na paralização e remineralização de lesões não-cavidades em esmalte foi avaliado por Srisilapanan et al. (2013). Indivíduos de 7 a 14 anos de idade que possuíam lesão de cárie em dentes anteriores superiores foram divididos em dois grupos e usaram dentífrico fluoretado (1450 ppmF/ MFP) contendo 1,5% de arginina e cálcio insolúvel (n=166) ou dentífrico fluoretado convencional (1450 ppmF/MFP)(n=165) 3x ao dia. Após 6 meses de uso do dentífrico contendo arginina, observou-se que o volume das lesões de cárie foi menor quando comparado ao grupo de indivíduos que usou dentífrico convencional.

Por meio de um delinamento semelhante, Yin et al. (2013a) também avaliaram o papel do dentífrico fluoretado contendo arginina na paralização e remineralização de lesões não-cavidades em esmalte. Indivíduos de 9 a 13 anos de idade que possuíam lesão de cárie em dentes anteriores superiores foram divididos em três

grupos e usaram dentifrício fluoretado (1450 ppmF/ MFP) contendo 1,5% de arginina e cálcio insolúvel (n=144), dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF/NaF)(n=147) ou dentifrício não fluoretado sem arginina (n=147) 3x ao diaporum período de até 6 meses. Ao final do período foi observada redução de cerca de 50% no volume da lesão cariiosa do grupo com arginina, de cerca de 34% no grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina e de apenas 13% no grupo que usou dentifrício placebo. Ainda, foi encontrado que a redução no volume da lesão após 3 meses de uso do dentifrício fluoretado contendo arginina foi semelhante à redução de volume encontrada quando dentifrício fluoretado convencional sem arginina foi usado durante 6 meses.

Cabe ressaltar que nos trabalhos de Srisilapanan et al. (2013) e de Yin et al. (2013a) a avaliação do volume das lesões de cárie foi realizada pelo método do QLF (quantitative light induced fluorescence). Esse método possibilita identificar diferenças nas lesões de cárie ao nível ultra-estrutural. É importante, por isso, ressaltar que pequenas alterações ultra-estruturais já são detectadas por este método. Porém, essas pequenas alterações podem não apresentar qualquer significado clínico. Sendo assim, não fica muito clara a contribuição do uso desse dentifrício contendo arginina na paralização e remineralização dessas lesões não-cavidades avaliadas nesses trabalhos.

Souza et al. (2013) avaliaram o efeito do dentifrício fluoretado contendo arginina na paralização de lesões de cárie radicular. Indivíduos de 30 a 69 anos que possuíam lesão de cárie radicular não-cavitada com textura de couro foram divididos em dois grupos e usaram dentifrício fluoretado (1450 ppmF/ MFP) contendo 1,5% de arginina e cálcio insolúvel (n=129) ou dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF/MFP)(n=124) 2x ao dia durante 6 meses. Ao final do período, cerca de 70,5% das lesões radiculares tornaram-se endurecidas no grupo que usou dentifrício fluoretado contendo arginina em comparação aos 58,1% do grupo que usou dentifrício fluoretado convencional. Esses grupos foram estatisticamente diferente entre si. Além disso, as lesões do grupo que usou

dentifrício fluoretado contendo arginina apresentaram 73% mais chance de se tornarem endurecidas quando comparadas ao grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina.

Apesar dos resultados dos estudos clínicos serem positivos, recentes revisões sistemáticas de literatura avaliam que essa superioridade do dentifrício contendo arginina deveria ser avaliada com cautela. Li et al. (2015) discutem que a presença de arginina no dentifrício pode apresentar efeito sinérgico ao flúor no controle de lesões de cárie em esmalte ou em dentina radicular. Entretanto, o nível de evidência desse efeito foi classificado como baixo devido ao viés de publicação, uma vez que os estudos clínicos foram financiados pela indústria. Ástvaldsdóttir et al. (2016) também observa que a presença de conflito de interesse nos estudos clínicos publicados não permite concluir que adição de arginina ao dentifrício fluoretado apresenta efeito benéfico. Além disso, esses autores pontuam que em alguns estudos clínicos o grupo controle usou dentifrício sem flúor, o que pode ter favorecido os resultados do grupo experimental. Esses autores ainda sugerem que estudos clínicos futuros sejam menos dependentes de interesses comerciais. De forma similar, Fontana (2016) sugere que dentifrícios fluoretados contendo arginina apresentam potencial para melhorar o efeito do flúor no controle da cárie dental, porém, sugerem que mais estudos sejam conduzidos, de forma independente e sem vinculação com a indústria.

Sendo assim, apesar dos estudos clínicos sugerirem um efeito adicional do dentifrício fluoretado contendo arginina no controle da cárie dental em comparação com dentifrício fluoretado convencional, ainda há dúvida sobre a real contribuição da arginina nesse processo. Ainda, não se sabe qual seria o benefício do uso do dentifrício contendo arginina frente à uma condição altamente cariogênica (frequente exposição à sacarose) em termos de controle da perda de minerais em comparação ao dentifrício fluoretado convencional.

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do dentífrico fluoretado suplementado com arginina e cálcio insolúvel na inibição da desmineralização dental e na composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental formado *in situ* sob diferentes desafios cariogênicos e comparar o seu efeito ao dentífrico fluoretado convencional.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un dentífrico fluorado suplementado con arginina y calcio insoluble en la inhibición de la desmineralización dental, composición microbiana y bioquímica del biofilm dental formado in situ bajo diferentes desafíos cariogénicos comparando su efecto con un dentífrico fluorado convencional.

3. Artigo científico

“Effect of arginine/insoluble calcium containing dentifrice on enamel demineralization and on microbial and biochemical composition of dental biofilm formed *in situ*”

Declaration of interests

The authors declare they do not have any conflict of interest.

Abstract

Clinical studies have suggested that fluoridated dentifrices containing arginine (FDArg) present better anti-caries effect than regular fluoridated dentifrice (FD) on the course of up to 2 years of follow-up. However, it is not known whether arginine promotes any increased anti-caries effect in a group of subjects under a high risk of caries development. This study aimed to assess the effect of FDArg on the inhibition of enamel demineralization and on the microbial and biochemical compositions of dental biofilm formed under different frequency of sucrose exposure. In a split-mouth and cross-over design, fourteen adult volunteers who should have used FD for at least 2 months prior to the beginning of this study wore an acrylic palatal appliance containing 4 bovine enamel specimens (one pair at each side of the appliance). They were subjected to 2 treatment groups: FD or FDArg. During 2 periods of 14 days, dentifrices were used 3x/day and 20% sucrose solution was dripped onto the enamel specimens 4x and 8x/day. Two-month wash-out period was adopted between the two experimental phases. Percentage of surface hardness loss (%SHL), microbial counts on biofilms, biomass and Ca, P_i and insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) concentrations were determined. Higher %SHL was found when sucrose was used 8x/day and no difference was found on enamel demineralization between FD and FDArg irrespective to the cariogenic challenge. Additionally, higher biomass and higher IEPS were found on biofilms exposed to sucrose 8x/day. Lower IEPS concentration was found on biofilms in the presence of FDArg. Minor changes were found on microbial counts and on inorganic concentrations. The results of this *in situ* study showed that FDArg did not present additional benefit on caries inhibition compared to regular FD.

Key-words: dentifrice, arginine, fluoride, dental caries, sucrose

Introduction

Dental caries is a biofilm-dependent and dietary disease related to frequent intake of rapidly fermentable sugars (Sheiham & James, 2015). Fermentation of sugar-rich food leads to a shift on the microbial composition of dental biofilm allowing the overgrowth of acid-tolerant and acidogenic bacteria (such as mutans streptococci and lactobacilli) in respect to acid-sensitive ones (Marsh, 2003). In addition, those frequent episodes of acidification are able to disrupt the mineral equilibrium between tooth and saliva and cause demineralization (Dawes, 2003; Featherstone, 2008).

Sucrose has been considered the most cariogenic dietary carbohydrate (Paes Leme et al., 2006) since it is able to change the tridimensional structure of dental biofilms that becomes more porous and well adhered to dental surface (Rolla et al., 1989; Bowen & Koo, 2011; Koo et al., 2013). These changes are induced by insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) that are synthesized exclusively in the presence of sucrose by enzymatic activity of glucosyltransferases produced by mutans streptococci (Bowen & Koo, 2011). Several studies have shown the relationship between the presence of IEPS on biofilms and their increased cariogenic potential (Cury et al., 2000; Mattos-Graner et al., 2000; Nobre dos Santos et al., 2002; Aires et al., 2006).

In this context, fluoride has been considered the main cariostatic agent since it is able to control tooth mineral loss by decreasing the demineralization under acidic conditions and by increasing the remineralization under neutral conditions resulting in lower mineral loss (Cury & Tenuta, 2008). Recent evidences have claimed that regular use of fluoridated dentifrice containing at least 1,000 ppm of soluble fluoride has been considered as one of the main causes of the reduction on dental caries prevalence and severity worldwide (Walsh et al., 2010; Santos et al., 2013).

In an effort to enhance the anti-caries effect of fluoride on caries management, several compounds have been added to fluoridated dentifrices (Fontana, 2016). Recently, arginine and insoluble calcium have been incorporated into dentifrice

formulation to suppress mineral loss by saturating oral cavity with calcium and by a buffering effect induced by arginine (Cummins, 2013). Arginine can be metabolized into ammonia via arginine-deiminase system by arginolytic bacteria (Wijeyeweera & Kleinberg, 1989), such as *Streptococcus salivarius*, *S. gordonii* and *Actinomyces* ssp (Huang et al., 2015) which could help to maintain a neutral environmental pH on biofilm and reduce the selective pressure over acid-tolerant bacteria by its buffering effect (Huang et al., 2012).

Clinical studies have suggested a better effect of arginine/insoluble calcium containing dentifrice over regular fluoridated dentifrices on the reversal of white spot lesions and on inactivation of dentinal lesions during the course of 6 months to two years of dentifrice use (Kraivaphan et al., 2013; Souza et al., 2013; Srisilapanan et al., 2013; Yin et al., 2013; Li et al., 2015a). However, recent systematic reviews of literature have concluded that there is insufficient evidence supporting improved anti-caries effect of arginine/insoluble calcium containing dentifrice. However, this may be due to inadequate and poorly validated methods used for caries diagnosis, and also to potential conflict of interests, as the considered clinical studies were industry-supported (Astvaldsdotir et al., 2016; Fontana, 2016, Li et al., 2015b). In addition to that, it is not known what would be the benefit of using this dentifrice under a high cariogenic condition (frequent exposure to sucrose) in terms of controlling enamel mineral loss in comparison with a regular fluoridated dentifrice.

Thus, this study sought to evaluate the effect of a fluoridated dentifrice supplemented with insoluble calcium and arginine on the inhibition of enamel demineralization and on the microbial and biochemical composition of dental biofilms formed under different frequency of sucrose exposure and to compare its effect with a regular fluoridated dentifrice use. The null hypothesis is that the incorporation of arginine and insoluble calcium do not pose any advantage over regular fluoridated dentifrice on the inhibition of enamel mineralization and do not induce any microbial and biochemical changes on biofilms formed under different frequency of sucrose exposure.

Materials and Methods

Experimental Design

This was a cross-over split-mouth experimental *in situ* study performed in two legs of 14 days each. Fourteen healthy adult volunteers (mean age 24.5 years; from 22 to 32 years) resident in an area with a fluoridated water supply (0.7 ppm F) were recruited at the Faculty of Dentistry of Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. They should present good general and dental health, no usage of antibiotics during the last 2 months prior this study, unstimulated salivary flow rate of at least 0.25 mL/min and no use of orthodontic appliances. The volunteers should have used fluoridated dentifrice without arginine for at least 2 months prior to the beginning of this study. These volunteers wore an acrylic intraoral palatal appliance containing 4 bovine enamel specimens (one pair at each side of the appliance), with known baseline surface hardness, that were exposed to 20% sucrose solution 4 and 8x/day during 14 days in each experimental phase. Fluoridated dentifrice without arginine (FD; Colgate Máxima Proteção Anticáries; 1,450 ppmF/MFP; Lot #6019BR122A, Exp. 01/19) or fluoridated dentifrice containing insoluble calcium and 1.5% arginine (FDArg; Colgate Máxima Proteção Anticáries mais Neutraçúcar; 1,450 ppmF/MFP; Lot #5342BR122C, Exp. 12/18) were used at each leg. Volunteers were asked to brush their teeth 3x/day with the assigned dentifrice after the main meals and slurries of these dentifrices (1:3 w/v) were dripped onto the enamel specimens during toothbrushing time. After each phase, the microbiological and biochemical composition of the biofilm formed under the different tested conditions was analyzed, as well as mineral change in enamel. All volunteers did all the treatments assigned. The study was blind only with respect to the examiners, who analyzed samples previously coded to ensure blindness, The study protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CAAE 47 91861 5.4.0000.5347). Informed consent was obtained from each participant prior to the beginning of the study.

Bovine enamel specimens and appliance preparation

Enamel blocks (6 mm diameter x 2 mm thick) were obtained from bovine incisors and prepared as described elsewhere (Resende et al. 2016; Cury et al., 1997). After being flattened and polished, specimens with cracks or scratches were discarded. Selected specimens had their baseline surface hardness assessed using a Knoop microhardness with a load of 50 grams for 10 seconds. Five indentations 100 µm apart of each other were placed at the center of the enamel specimen and averaged. One hundred and twelve specimens ($347.15 \pm 23.91 \text{ kg/mm}^2$) were randomized to the treatments (dentifrice at 2 levels and frequency of sucrose exposure at 2 levels) and to the volunteers that the average of specimens baseline hardness was similar among the tested conditions. Randomization was carried out by a computer-generated randomization list of Excel software.

Colorless acrylic intraoral palatal appliances containing 2 lateral cavities at each side (14 mm x 8 mm x 2 mm) were prepared for each volunteer for each experimental leg. Two enamel specimens were placed inside each cavity. Plastic meshes were fixed over the cavities to protect the enamel slab surfaces from mechanical attrition, leaving a 1-mm space for accumulation of dental biofilm. A paper tag containing the information about the frequency of sucrose exposure (4x or 8x) was placed onto the appliances during their preparation to indicate how often sucrose solution should be dripped onto enamel specimens.

Treatments

Volunteers were instructed to wear the appliances during 14-days at each experimental leg. They were also instructed to remove the appliances from the oral cavity and drip two drops of 20% sucrose solution on each set of two enamel slabs at the following time, according to the frequency of sucrose exposure: 4x/day (8:00, 11:00, 15:30 and 21:00 h) or 8x/day (8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 and 21:00 h). The excess of fluid was removed with a cotton swab in an attempt to avoid a crossover effect of the treatments, and after 5 min the appliance was replaced in the mouth (PAES LEME, 2004).

During the first experimental leg, all volunteers brushed their teeth with FD 3x/day. Appliances were removed from the mouth during tooth brushing and two drops of dentifrice slurry were dripped onto the specimens and after 5 min the appliance was replaced in the mouth without being washed. During the second experimental leg, all volunteers brushed their teeth with FDArg and dentifrice slurry was also dripped onto the enamel specimens as described above. Two-months interval was established between both experimental legs. During this interval, volunteers were instructed to brush their teeth 3x/day with FDArg. New sets of enamel specimens and palatal appliances were used on each experimental leg. During a 7-day previously to the first experimental leg, all volunteers were instructed to brush their teeth with the FD provided by the researchers. Volunteers were instructed to wear the appliances all the time and at the night, and to remove them only during meals, drinking and oral care. Since this was a crossover study, no restriction was made on the volunteers' diet. Sucrose solution and dentifrice slurries were prepared every 48 hours.

Biofilm analysis

The dental biofilm formed on the surface of the enamel specimens was collected after 14 days of palatal appliance use approximately 12 h after the last exposure to the sucrose solution and to the dentifrice slurry. The plastic mesh over the blocks was removed and the biofilm was collected with sterile curette and immediately transferred to coded, pre-weighed sterile microtube and weighed to determine the biomass (mg) of each tested condition. An aliquot of 1 mg of biofilm was collected for microbiological analysis and the remaining biofilm was reserved for subsequent biochemical analysis.

For microbiological determination, the aliquot of 1 mg of wet biofilm was suspended in 1 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl) followed by sonication [Aires et al., 2006; Resende et al., 2016]. The suspension was serially diluted in sterile saline solution and inoculated in duplicate by the drop technique into the following culture media: mitis salivarius agar plus 0.2 units bacitracin/mL (MSB) (HI

Media - Ghatkopar West, Mumbai, India) for growth of *mutans* streptococci (MS); mitis salivarius agar (HI Media - Ghatkopar West, Mumbai, India) for growth of total streptococci (TS); Rogosa SL agar (HI Media - Ghatkopar West, Mumbai, India) for growth of lactobacilli (LB) and Brain Heart Infusion (BHI) agar (Kasvi - Atuba, Curitiba, Brazil) plus 5% sheep blood for agar for total microorganisms (TM) growth. Culture media were incubated microaerophilically at 37°C for 48 h for BHI agar and MSB agar and for 72 h for Rogosa SL agar. After this period, the number of colony forming units (CFU) in each culture was counted using a stereomicroscope (Olympus SZ51 - Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). The results were expressed in CFU/mg of dental biofilm (wet weight) and the percentage of MS in relation to TM (%MS/TM), percentage of MS in relation to TS (%SM/TS) and percentage of LB in relation to TM (%LB/TM) were calculated.

Dental biofilm was dehydrated in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide (P_2O_5) and the dry weight was obtained (± 0.01 mg, Sartorius BP 210D, Sartorius, Gottingen, Germany). For biochemical analysis, 0.5 M hydrochloric acid (HCl) was added to the microtube (0.1 mL HCl/mg dry weight dental biofilm). After 3h at room temperature under constant agitation, the same volume of TISAB II pH 5.0 (containing 20 g NaOH/L) was added. The samples were centrifuged for 10 min at 14000 rpm (Eppendorf 5410, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and the supernatant retained for determination of fluoride (F), phosphate (Pi) and calcium (Ca) concentrations. Sodium hydroxide solution (1.0 M) was added to the precipitate (0.2 mL/mg dry weight plaque) and after 3 h at room temperature under constant agitation, the samples were centrifuged [Resende et al., 2016; Pecharki et al., 2005]. The concentration of insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) was determined in the resulting supernatant. F was determined using an ion-selective electrode (Orion 96-09; Boston, MA) connected to an ion analyzer (Procyon, São Paulo, Brazil). Ca, Pi and IEPS were analyzed colorimetrically [Vogel et al., 1983; Fiske & Subarrow, 1925; Dubois et al., 1956].

Post-biofilm formation enamel surface hardness

After each experimental period, the enamel specimens were removed from the appliances and their surface hardness was again measured. One row of 5 adjacent indentations spaced by 100 μm was made at the right side of the 5 baseline measurements. The mean values of baseline (B) and post-biofilm (P) were averaged and the percentage of surface hardness loss (%SHL) was calculated as $\%SHL = ((P-B)/B) \times 100$ (Cury et al., 2000).

Statistical analysis

The mean and standard error and the confidence interval for each outcome (biofilm wet weight, bacterial counts and proportions, concentration of IEPS, Ca, Pi and F) were calculated for each volunteer in each treatment were subjected to statistical analysis tested condition. Data of counts of TM, TS, SM and LC were log transformed. The volunteer was considered as the experimental unit. Data were analyzed by a Generalized Estimating Equations test (GEE) followed by Bonferroni post-hoc test. Statistical Package for Social Sciences (SPSS, PASW Statistics for Windows, Chicago, SPSS Inc, 2009) was used for the statistical analysis and the significant level was set at 5%.

Results

A statistically significant effect of frequency of sucrose exposure was found as an isolated factor for %SHL, F, biomass and TM counts (Tables 1 to 3). Statistically higher mineral loss and higher biomass were found on enamel specimens exposed to sucrose 8x/day, irrespective to the type of dentifrice used (Table 1). Conversely, lower F concentration and lower TM counts were found on biofilms exposed to sucrose 8x/day in comparison with those exposed to sucrose 4x/day.

For IEPS and TS counts, significant effect was found for both sucrose exposure and type of dentifrice as isolated factors (Table 1 and Table 3). Biofilms formed in the presence of sucrose 8x/day presented higher concentration of IEPS than those formed in the presence of sucrose 4x/day. Additionally, biofilms formed in the

presence of FDArg presented lower concentration of IEPS in comparison to those formed in the presence of FD (Table 1). Regarding TS counts, biofilms formed in the presence of sucrose 8x/day showed lower counts than 4x/day. Lower counts of TS were also found in the presence of FDArg (Table 3).

For Pi, MS and LC significant interaction between frequency of sucrose exposure x type of dentifrice was found (Tables 2 and 3). Lower concentrations of Pi were found in the presence of sucrose 8x/day only when FD, but no difference was found between the frequency of sucrose exposure when FDArg was used. Additionally, Pi concentrations in biofilms formed at each sucrose exposure were not different in the comparison between dentifrices (Table 2). For MS counts, although an interaction between the tested factors had been found, no statistical difference was found amongst the tested conditions (Table 3). Regarding LC counts, lower counts were found in the presence of sucrose 8x/day only when FD was used, but no difference was found between the frequency of sucrose exposure when FDArg was used. Under exposure to sucrose 4x/day, lower counts were found when FDArg was used (Table 3).

For Ca concentration on biofilms and %MS/TM, %MS/TS and %LC/TM no statistically significant effect was found for any of the tested conditions (Tables 2 and 4).

Table 1. Carious lesion development (%SHL) and concentration of insoluble extracellular polysaccharide on biofilms (IEPS); means (SE) [95% Wald Confidence Interval] according to frequency of sucrose exposure and type of dentifrice:

Variable	Frequency	Type of dentifrice		Total	Effect size (p)		
		FD	FD ARG		p1	p2	p3
%SHL	4x	-21.7 (4.9) [-31.3;-12.2]	-31.0 (6.3) [-43.3;-18.6]	-26.4 (3.9) A [-34.1; -18.6] n=24	<0.001	0.133	0.818
	8x	-36.6 (4.6) [-45.7;-27.5]	-43.8 (3.0) [-49.8;-37.8]	-40.2 (2.5) B [-45.3;-35.1] n=24			
	Total	-29.2 (4.5) [-38.0;-20.4] n=24	-37.4 (3.3) [-44.0;-30.8] n=24				
IEPS (µg/mg)	4x	315.7 (67.2) [184.0; 447.3]	154.1 (32.3) [90.6; 217.5]	234.8 (39.7) A [157.0; 312.7] n=17	0.004	0.002	0.365
	8x	411.9 (23.7) [365.4; 458.4]	331.9 (37.2) [259.0; 404.9]	371.9 (19.9) B [332.9; 411.0] n=19			
	Total	363.8 (32.5) a [300.1; 427.4] n=18	243.0 (23.7) b [196.6; 289.5] n=18				

Means followed by distinct capital letters are statistically different in terms of frequency of sucrose exposure and means followed by distinct lower case letters are statistically different in terms of type of dentifrice by GEE test ($p < 0.05$) under Normal probability Distribution. p1: Frequency of sucrose exposure; p2: Type of dentifrice; p3: Frequency x Type of dentifrice.

Table 2. Fluoride (F), inorganic phosphorous (Pi) and Calcium (Ca) on biofilms and biomass; means (SE) [95% Wald Confidence Interval] according to frequency of sucrose exposure and type of dentifrice:

Variable	Frequency	Type of dentifrice		Total	Effect size		
		FD	FD ARG		p1	p2	p3
F (ug/g)	4x	167.7 (40.1) [89.2; 246.4]	237.5 (56.1) [127.6; 347.4]	199.6 (39.4) A [122.3; 276.9] n=22	0.001	0.130	0.718
	8x	96.5 (17.4) [62.4; 130.6]	120.3 (18.4) [84.2; 156.3]	107.7 (11.8) B [84.4; 131.0] n=25			
	Total	127.2 (21.0) [85.9; 168.5] n=24	169.0 (25.6) [118.8; 219.1] n=23				
Pi (ug/mg)	4x	2.59 (0.67) aA [1.27; 3.92] n=11	3.00 (0.55) aA [1.90; 4.10] n=12	2.79 (0.43) [1.93; 3.64]	>0.001	0.037	0.016
	8x	0.90 (0.12) aB [0.67; 1.14] n=13	2.02 (0.30) aA [1.41; 2.62] n=11	1.35 (0.15) [1.05; 1.65]			
	Total	1.53 (0.3) [0.98; 2.09]	2.46 (0.35) [1.77; 3.15]				
Ca (uM/mg)	4x	860.5 (438.9) [0.17; 1720.8]	685.8 (175.3) [342.2; 1029.4]	768.2 (257.7) [263.0; 1273.3] n=23	0.160	0.659	0.438
	8x	316.0 (184.8) [46.2; 678.3]	537.6 (247.8) [51.9; 1023.3]	412.2 (159.0) [100.6; 723.8] n=24			
	Total	521.5 (192.5) [144.1; 898.9] n=24	607.2 (178.5) [257.2; 957.2] n=23				
Biomass (mg)	4x	67.7 (15.1) [38.1; 97.1]	61.2 (16.1) [29.7; 92.8]	64.3 (14.2) A [36.4; 92.2] n=24	<0.001	0.676	0.244
	8x	126.3 (22.5) [82.3; 170.3]	154.7 (22.5) [110.6; 198.9]	139.8 (20.1) B [100.3; 179.3] n=24			
	Total	92.4 (17.7) [57.6; 127.1] n=24	97.3 (16.8) [64.3; 130.3] n=24				

Means followed by distinct capital letters are statistically different in terms of frequency of sucrose exposure and means followed by distinct lower case letters are statistically different in terms of type of dentifrice by GEE test ($p < 0.05$) under Gamma Probability Distribution and Log link function. p1: Frequency of sucrose exposure; p2: Type of dentifrice; p3: Frequency x Type of dentifrice.

Table 3. Total microorganisms (TM), Total Streptococci (TS), Mutans Streptococci (MS) and Lactobacilli (LB) counts on biofilms; means (SE) [95% Wald Confidence Interval] according to frequency of sucrose exposure and type of dentifrice:

Variable	Frequency	Type of dentifrice		Total	Effect size		
		FD	FD ARG		p1	p2	p3
TM (Log; CFU/mg)	4x	7.26 (7.03) [6.40; 7.59]	6.61 (6.23) [5.86; 6.87]	6.94 (6.46) A [6.47; 7.16] n=24	0.004	0.11	0.088
	8x	6.44 (5.95) [6.00; 6.65]	6.44 (6.09) [5.53; 6.71]	6.44 (8.90) B [6.07; 6.64] n=24			
	Total	6.85 (6.39) [6.37; 7.07] n=24	6.53 (6.05) [6.06; 6.74] n=24				
TS (Log; CFU/mg)	4x	6.93 (6.86) [6.76; 7.35]	5.87 (5.33) [5.51; 6.06]	6.40 (6.01) A [5.68; 6.66] n=24	0.045	0.002	0.232
	8x	6.32 (5.80) [5.93; 6.18]	5.74 (5.20) [5.38; 5.94]	6.03 (5.35) B [5.80; 6.18] n=24			
	Total	6.62 (6.32) a [4.90; 6.92] n=24	5.81 (5.16) b [5.56; 5.96] n=24				
MS (Log; CFU/mg)	4x	2.42 (2.27) aA [2.03; 2.80] n=12	3.04 (2.83) aA [2.34; 3.38] n=12	2.73 (2.47) [1.59; 3.04]	0.176	0.056	<0.001
	8x	4.02 (4.00) aA [3.96; 4.48] n=12	2.34 (5.13) aA [1.67; 2.68] n=12	3.18 (2.92) [2.14; 3.50]			
	Total	3.22 (2.97) [2.23; 3.54]	2.69 (2.34) [1.74; 2.96]				
LC (Log; CFU/mg)	4x	5.74 (5.29) aA [5.23; 5.97] n=12	5.22 (4.93) bA [3.26; 5.52] n=12	5.48 (5.04) [4.94; 5.72]	0.170	0.559	<0.001
	8x	5.22 (4.79) aB [4.68; 5.46] n=12	6.04 (6.00) Aa [5.93; 6.49] n=12	5.63 (5.37) [4.42; 5.95]			
	Total	5.48 (4.95) [5.11; 5.68]	5.63 (5.48) [5.20; 6.01]				

Means followed by distinct capital letters are statistically different in terms of frequency of sucrose exposure and means followed by distinct lower case letters are statistically different in terms of type of dentifrice by GEE test ($p < 0.05$) under Poisson Probability Distribution and Log link function. p1: Frequency of sucrose exposure; p2: Type of dentifrice; p3: Frequency x Type of dentifrice.

Table 4. Percentage of Mutans Streptococci in relation to Total Microorganisms (%MS/TM), Percentage of Mutans Streptococci in relation to Total Streptococci (%MS/TS) and Percentage of *Lactobacilli* in relation to Total Microorganisms (%LC/TM) on biofilms; means (SE) [95% Wald Confidence Interval] according to frequency of sucrose exposure and type of dentifrice:

Variable	Frequency	Type of dentifrice		Total	Effect size		
		FD	FD ARG		p1	p2	p3
% MS/TM	4x	0.017 (0.154) [0.013; 0.047]	0.155 (0.112) [0.065; 0.375]	0.086 (0.057) [0.025; 0.198] n=24	0.138	0.229	0.213
	8x	0.002 (0.001) [0.0009; 0.005]	0.0002 (0.0001) [0.0001; 0.0005]	0.001 (0.0008) [0.0004; 0.003] n=24			
	Total	0.009 (0.007) [0.005; 0.025] n=24	0.077 (0.056) [0.032; 0.188] n=24				
% MS/TS	4x	0.128 (0.078) [0.025; 0.281]	0.827 (0.609) [0.367; 2.02]	0.477 (0.342) [0.194; 1.149] n=24	0.421	0.171	0.262
	8x	0.159 (0.142) [0.120; 0.439]	0.212 (0.166) [0.114; 0.538]	0.185 (0.126) [0.063; 0.434] n=24			
	Total	0.143 (0.090) [0.032; 0.320] n=24	0.519 (0.312) [0.091; 1.131] n=24				
%LC/TM	4x	7.31 (2.79) [1.83; 12.8]	10.14 (4.34) [1.64; 18.65]	8.73 (2.32) [4.17; 13.29] n=24	0.479	0.743	0.572
	8x	10.63 (2.51) [5.70; 15.55]	10.32 (3.90) [2.67; 17.96]	10.47 (2.73) [5.11; 15.83] n=24			
	Total	8.97 (2.38) [4.29; 13.65] n=24	10.23 (3.39) [3.58; 16.88] n=24				

Means followed by distinct capital letters are statistically different in terms of frequency of sucrose exposure and means followed by distinct lower case letters are statistically different in terms of type of dentifrice by GEE test ($p < 0.05$) under Tweedie Probability Distribution and Identity link function. p1: Frequency of sucrose exposure; p2: Type of dentifrice; p3: Frequency x Type of dentifrice.

Discussion

Oral bacteria alkali production capability is believed to be related to lower caries experience (Nascimento et al., 2009; Reyes et al., 2014). Within the mechanisms involved in alkali production, degradation of arginine by arginolytic bacteria is claimed to potentially reduce tooth mineral loss and caries development due to its capacity of being converted in ammonia which acts as hydrogen acceptor controlling the pH of dental biofilm (Liu et al., 2012). Previous study has shown that arginine is able to shift the biofilm ecology allowing the persistence of health-related microbiota even in caries active subjects that underwent a frequent exposure to an exogenous source of arginine (Nascimento et al., 2014). This amino acid has been added to a dentifrice and several clinical studies have shown lower caries progression in subjects that used fluoridated dentifrice supplemented with arginine in comparison with those that used fluoridated dentifrice without arginine during the course of 3 and 6 months up to 2-year (Srisilapanan et al., 2013; Kraivaphan et al., 2013; Souza et al., 2013; Yin et al., 2013).

Conversely, this *in situ* study suggests though that the presence of insoluble calcium and arginine in a fluoridated dentifrice does not promote any increased effect on the inhibition of enamel demineralization under a condition of medium-high exposure to sucrose. Contrarily to the above cited clinical studies, similar caries development (in terms of %SHL) was found when both FD and FDArg were used (Table 1). In this respect, it is important to consider that the clinical studies evaluated enamel caries progression by means of quantitative-light induced fluorescence (QLF) that showed minute differences in depth and volume of lesions between arginine and non-arginine groups (Srisilapanan et al., 2013; Yin et al., 2013). Recent systematic review and meta-analysis has suggested that fluorescence-based methods for caries lesions diagnosis present adequate sensibility, but low specificity (Gimenez et al., 2013). Additionally, the degree of teeth hydration may interfere with fluorescence scattering, and, consequently, with the acquired data (Angmar-Mansson & ten Bosch, 2001). Moreover, poor correlation has been found for lesion depth and mineral volume outcomes between

QLF and transversal microradiography (TMR) (Ando et al., 2001), that is considered the gold-standard for assessing tooth mineral content. Conversely, the surface hardness assay used in our study presents good correlation with TMR (Lippert & Lynch, 2014) and it has been systematically used to assess enamel demineralization in *in situ* studies (Cury et al., 2000; 2010; Pecharki et al., 2005; Aires et al., 2006 and others). Furthermore, Kraivaphan et al. (2013) has shown a significant effect of arginine-containing dentifrice on the reduction of caries increment in relation to non-containing arginine dentifrice in a 2-year follow-up study, but the difference between arginine and non-arginine groups was from 0.12 to 0.15 units in caries increment. Altogether, it is questionable though whether the changes found by those studies present any clinical relevance.

The absence of difference on caries inhibition between FD and FDArg could be related to the fact that subjects were exposed to medium to high cariogenic challenge represented by exposure to sucrose 4x and 8x/day. We sought to evaluate the potential of FDArg on caries inhibition by simulating a group of individuals with high caries activity and submitted to a high cariogenic diet. Since there is not any clear information about the caries risk of the subjects of the above cited clinical studies, one could hypothesize that the preventive fraction of FDArg may be higher in individuals under low-caries risk, whereas the benefit of arginine under a high cariogenic condition seems to disappear.

It could be argued whether the 2-months period of FDArg use was sufficient to induce a microbial shift on dental biofilm microbiota of subjects that could lead to a lower cariogenic potential. This question cannot be answered based on the presented data, but it is important to consider that ADS system has already been activated even after 4 weeks of arginine use (Nascimento et al., 2014). Whether the microbial shift occurred and whether it might have been suppressed by the cariogenic challenge imposed by sucrose frequency needs to be further addressed. Based on the presented data, it can be seen that FDArg did not exert any effect on SM growth (Table 3). Additionally, despite some changes occurred

on TS and LB counts, we understand that they are too low to be considered as clinically relevant.

Interestingly, our data showed a statistically lower concentration of IEPS on dental biofilms formed in the presence of FDArg irrespective to the frequency of sucrose exposure (Table 1). Our data agree with a recent study of He et al. (2016) who showed under a well-controlled *in vitro* condition that three-species biofilms exposed to 1.5% arginine solution 3x/day presented lower IEPS concentration than control biofilms. Those authors also showed that this lower concentration could be associated to a lower expression of *gtfB* gene in the presence of arginine. Although we have not tested the biofilm gene expression, it is interesting to see that even under a complex- and structurally- different *in situ* biofilm this effect of arginine on IEPS concentration was also found.

Similar to previous *in situ* studies, higher %SHL, higher IEPS and lower F concentrations were found on biofilms formed in the presence of sucrose 8x/day than in the presence of sucrose 4x/day (Tables 1 and 2) (Paes Leme et al., 2004; Ccahuana-Vasquez et al., 2007). IEPS are formed only on biofilms exposed to sucrose that is the sole source that allows the formation of this polysaccharide which is synthesized by glucosyltransferase B, an enzyme produced by *S. mutans* (Bowen & Koo, 2011). Previous data have shown the higher the frequency of exposure to sucrose, the higher the biofilm IEPS concentration (Nobre dos Santos et al., 2002; Paes Leme et al., 2004; Ccahuana- Vasquez et al., 2006). Additionally, it is known that sucrose reduces the biofilm inorganic concentrations (Cury et al., 2000, Vale et al., 2007) in a frequency-dependent manner (Paes Leme et al., 2004; Ccahuana-Vasquez et al., 2006). Frequent pH falls are responsible to decrease the biofilm saturation level of F, Ca and Pi in relation to fluorapatite and hidroxyapatite which also enhances its cariogenic potential. In addition, a reduction in about 45% on biofilm Ca levels was also found in biofilms formed under exposure to sucrose 8x/day (Table 2) which could help explain its higher cariogenic potential.

IEPS are able to induce several changes on biofilm matrix, by increasing its porosity and adherence to tooth surfaces, as well as acting as a skeleton for biofilm growth (Dibdin & Shellis, 1988; Koo et al., 2009; Koo et al., 2013). Several studies have shown a direct association between IEPS on biofilms and its cariogenic potential (Cury et al., 2000; Nobre dos Santos 2002; Aires et al., 2006). We were not able though to show this same association since the lower IEPS concentration in the presence of FDArg did not lead to a lower caries development (Table 1). Additionally, the reduction on IEPS in the presence of FDArg was not followed by a reduction on biomass. Although it is not possible to be conclusive on this matter, we hypothesize that even though a reduction on IEPS concentration had been found in the presence of FDArg, it might have not been important enough to alter the biofilm matrix in a way to modulate its cariogenic potential. This question also needs to be addressed by future studies.

Since we used a split-mouth design, these data confirm the absence of any cross-effect (between the tested frequency of sucrose exposure) as being previously showed by other studies (Paes Leme et al., 2004; Pecharki et al., 2005; Ccahuana Vasquez et al., 2006; Aires et al., 2006; Cury et al., 2010; Resende et al., 2016). It is noteworthy to mention though that this is a short-term well-controlled study in which experimental conditions, such as exposure to sucrose and frequency of tooth brushing, were standardized for all subjects. It is an interesting approach to allow that a treatment effect be observed and studied.

The present study did not find any additional effect of FDArg on the inhibition of enamel demineralization. Cariogenic challenge was induced at 4x and 8x/day during 14 days. It might be possible that the high cariogenic challenge of 8x/day had overcome any biofilm buffering effect of arginine. Yet, it could be possible that arginine presents some effect under longer times of biofilm formation. Neither of those questions can be answered at this time, but they will be addressed on future studies.

Under the experimental conditions of this study it seems that there is not any difference on the anti-cariogenic effect between regular fluoridated dentifrice and fluoridated dentifrice supplemented with insoluble calcium and arginine in a group of subjects exposed to a high cariogenic condition. It might be possible that the effect of arginine on biofilm microbial ecology and on biofilm pH control had been overcome by a high frequency of exposure to sucrose.

References

1. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006;40: 28–32.
2. Ando M, van der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK: Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res* 2001; 35:464-470.
3. Angmar-Mansson B, ten Bosch JJ: Quatitative light-induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. *Dentomaxillofac Radiol* 2001; 30:298-307.
4. Ástvaldsdóttir Á, Naimi-Akbar A, Davidson T, Brolund A, Lintamo L, Attergren Granath A, Tranæus S, Östlund P. Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. *Caries Res.* 2016;50:383-93
5. Bowen W, Koo H: Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix biofilm formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011; 45:69-86.
6. Ccahuana-Vásquez RA¹, 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.
7. Cummins D: The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for

- everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent* 2013; 41:S1–S11.
8. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997;31:356–360.
 9. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000;34:491-497.
 10. Cury J, Tenuta L. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. *Adv. Dent. Res.* 2008; 20;13-16.
 11. Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM: Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci* 2010;118:370-375.
 12. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc.* 2003 Dec; 69:722-724.
 13. Dibdin GH, Shellis RP: Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res* 1988;67:890-895.
 14. Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt Chem* 1956;28:350–356.
 15. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dent J* 2008; 286-291.
 16. Fiske CH, Subarrow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-377.
 17. Fontana M. Enhancing Fluoride: Clinical Human Studies of Alternatives or Boosters for Caries Management. *Caries Res* 2016;50:22–37
 18. Gimenez T, Braga MM, Raggio DP, Deery C, Ricketts DN, Mendes FM: Fluorescence-based methods for detecting caries lesions: systematic

- review, meta-analysis and sources of heterogeneity. Plos One 8(4): e60421. doi:10.1371/journal.pone.0060421
19. He J, Hwangb G, Liub Y, Gaob L, Kilpatrick-Livermanc L, Santarpiac P, Zhoua X, Koo H. L-arginine modifies the exopolysaccharides matrix and thwarts *Streptococcus mutans* outgrowth within mixed-species oral biofilms. J. Bacteriol. 2016;198:2651-2661.
 20. Huang X, Exterkate RAM, ten Cate JM: Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. J Dent Res 2012;12:1130-1134.
 21. Huang X, Schulte RM, Burne RA, Nascimento M: Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. Caries Res 2015;49:165-176.
 22. Koo H, Xiao J, Klein MI: Extracellular polysaccharides matrix: an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. Int J Oral Sci 2009;1:229-234.
 23. Koo H, Falsetta ML, Klein MI: The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res 2013;92:1065–1073.
 24. Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana C, Mateo L, Ellwood R, Cummins D, DeVizio W, Zhang Y. Two-Year Caries Clinical Study of the Efficacy of Novel Dentifrices Containing 1.5% Arginine, an Insoluble Calcium Compound and 1,450 ppm Fluoride. Caries Res 2013;47:582–590
 25. Li X, Zhong Y, Jiang X, Hu D, Mateo RL, Morrison BM, Zhang YP: Randomized clinical trial of the efficacy of dentifrices containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1450 ppm fluoride over two years. J Clin Dent 2015a;26:7-12.
 26. Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H: Anti-caries effect of arginine-containing formulations *in vivo*: A systematic review and meta-analysis. Caries Res 2015b;49:606-617.
 27. Lippert F, Lynch RJ: Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. Arch Oral Biol 2014; 59:704-710.

28. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
29. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.*2000;79:1371–1377.
30. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24:89-95.
31. Nascimento M.M., Browngardt C., X. Xiaohui, V. Klepac-Ceraj, B.J. Paster and R.A. Burne. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol* 2014;29:45–54.
32. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res.* 2002;36:347–352.
33. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004;83:71-75.
34. Paes Leme AF; Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J Dent Res* 2006;85:878-887.
35. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen W. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.*2005; 39:123–129.
36. Resende G, Grando D, Arthur RA, Hashizume L: Cariogenic potential of sucrose associated or not with maltodextrin on dental enamel. *Caries Res* 2016 (submitted).
37. Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira N, Palma P, Gordan V, Oyarzo J, Yevenes I. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:235-240.

38. Rolla G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res* 1989; 97: 115-119.
39. Santos APP, Nadanovsky P, Oliveira BP: A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2013;41:1-12.
40. Souza MLR, Cury JA, Tenuta LMA, Zhang YP, Mateo LR, Cummins D, Ellwood RP: Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1,450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1,450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. *J Dent* 2013; 41:S35–S41.
41. Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res*. 2015;94(10):1341-1347.
42. Srisilapanan P, Korwanich N, Yin W, Chuensuwonkul C, Mateo L.R, Zhang Y.P, Cummins D, Ellwood R.P. Comparison of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence. *J Dent* 2013;41:29–34
43. Vale GC, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res* 2007; 41: 406-412.
44. Vogel GL, Chow LC, Brown WE: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983;17:23-31.
45. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VCC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 1:CD007868.

46. Wijeyeweera RL, Kleinberg I: Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediments and dental plaque *in vitro*. Arch Oral Biol 1989; 34:43-53.
47. Yin W, Hua D, Li X, Fan X, Zhang Y, Pretty I, Mateo L, Cummins D, Ellwood R. The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). J Dent 2013; 41:22-28.

3 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas nesse estudo, biofilme dental formado na presença de dentifrício fluoretado contendo arginina apresentou menor concentração de polissacarídeo extracelular insolúvel quando comparado ao biofilme formado na presença de dentifrício fluoretado convencional, independente do desafio cariogênico (exposição a sacarose 4 ou 8x/dia). Menores contagens de lactobacilos foram encontradas no biofilme dental exposto à sacarose numa frequência de 4x/dia e formado na presença de dentifrício fluoretado contendo arginina. Em acréscimo, não foi encontrada diferença no efeito anti-cárie entre dentifrício fluoretado convencional e dentifrício fluoretado contendo arginina mediante exposição à sacarose 4 ou 8x/dia.

En las condiciones experimentales de este estudio, el biofilm formado en presencia de un dentífrico fluorado que contiene arginina mostraron menor concentración de polisacárido extracelular insoluble en comparación con el biofilm formado en presencia de dentífrico convencional, independientemente del desafío cariogénico (exposición a sacarosa 4 o 8x / día). Recuentos bajos de lactobacilos fueron encontrados en biofilms expuestos a sacarosa a una frecuencia de 4x / día y formado en presencia de un dentífrico suplementado arginina. Además, no se encontraron diferencias en el efecto anti-carries entre el dentífrico convencional y suplementado con arginina bajo exposiciones de sacarosa 4 o 8x / día.

REFERÊNCIAS

- AIRES, C.P.; TABCHOURY, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; KOO, H.,; CURY, J.A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 40, p. 28–32, 2006.
- AMAECHI, BT.; VAN LOVEREN, C. Fluorides and nonfluoride remineralization systems. **Monogr. Oral Sci.**, v.23, p.15–26, 2013.
- ÁSTVALDSDÓTTIR, Á.; NAIMI-AKBAR, A.; DAVIDSON, T.; BROLUND, A.; LINTAMO, L.; ATTERGREN GRANATH, A.; TRANAEUS, S.; ÖSTLUND, P. Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. **Caries Res.**, v.50,n.4, p.383-93, 2016.
- ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. **J. Dent. Res.**, v. 69, p. 601-634, Feb. 1990.
- BURNE, R.A.; MARQUIS, R.E.; Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. **Microbiol. Lett.**, v.193, n.1, p.1–6, 2000.
- BRADSHAW, D.J.; MARSH, P.D.; Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. **Caries Res.**, v.32, n. 6, p. 456–462; 1998.
- CAMPUS, G.; LALLAI, M.R.; CARBONI, R. Fluoride Concentration in Saliva after Use of Oral Hygiene Products. **Caries Res.**, v. 37, p. 66–70, 2003.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; VALE, G.C.; TABCHOURY, C.P.M.; TENUTA, L.M.A.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, v. 41, p. 9-15, 2007.
- CHEN, Y.Y.; WEAVER CA, Burne RA. Dual functions of Streptococcus salivarius urease. **J. Bacteriol.**, v.182, n.16, p.4667–4669, 2000.
- COSTALONGA, M.; HERZBERG, M.C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunol Lett.**, v.162. n.200 p.22-38, Dec, 2014.
- CORTELLI, S. C.; CORTELLI, J. R.; PRADO, J. S.; AQUINO, D. R.; JORGE, A. O. C. Fatores de risco à cárie e CPO-D em crianças com idade escolar. **Cienc. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v. 7, n. 2, p. 75-82, abr./jun. 2004.
- CUMMINS, D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century- the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. **J. Clin. Dent.**, v.24 n. A:A, p.1-14, 2013.

CURY, J.A.; REBELLO, M.A.; DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, vol.31, no. 5, p.356-60, 1997.

CURY, J.A.; REBELO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; TABCHOURY, C.P.M. Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. **Caries Res.**, v. 34, p. 491–497, 2000.

CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. **Adv. Dent. Res.**, v. 20, p. 13-16, jul. 2008.

DAWES, C.; DIBDIN, G.H. Salivary concentrations of urea released from a chewing gum containing urea and how these affect the urea content of gel-stabilized plaques and their pH after exposure to sucrose. **Caries Res.**, v.35, n.5, p.344–353, 2001.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 69, n.11, p. 722-724, 2003.

DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide. **J. Dent. Res.**, v. 67, p. 890–895, 1988.

DUCKWORTH, R.M.; MORGAN, S.N.; BURCHELL, C.K. Fluoride in plaque following use of dentifrices containing sodium monofluorophosphate. **J Dent Res.**, v. 68, p. 130–133, 1989.

DUGGAL, M.S.; TOUMBA, K.J.; AMAECHI, B.T.; KOWASH, M.B.; HIGHAM, S.M. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J. Dent. Res.**, v. 80:1721–1724.

FEJERSKOV, O.; MANJI F. Risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: **University of North Carolina Dental Ecology**. P.215-217, 1990.

FEATHERSTONE JDB. Dental caries: a dynamic disease process. **Australian Dental Journal**, v. 53, p. 286–291, 2008.

FONTANA, M. Enhancing Fluoride: Clinical Human Studies of Alternatives or Boosters for Caries Management. **Caries Res.**, v.50, n.1, p.22–37, 2016.

GARCÍA-GODOY F., HICKS M. J. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **JADA** 2008; v. 139, n. 2, p. 25S-34S, may. 2008.

GORDAN, V.V., GARVAN, C.W., OTTENGA, M.E., SCHULTE, R., HARRIS, P.A., MCEDWARDS, D., MAGNUSSON, I. Could alkali-production be considered an approach for caries control? **Caries Res.** v.44, p.547-554, 2010

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, v. 44, p. 331–384, 1980.

HE, J.; HWANGB, G.; LIUB, Y.; GAOB, L.; KILPATRICK-LIVERMANC, L.; SANTARPIAC, P.; ZHOUA, X.; KOO, H. L-arginine modifies the exopolysaccharides matrix and thwarts *Streptococcus mutans* outgrowth within mixed-species oral biofilms. **J. Bacteriol.**, v.198, n.19, p.2651-2661, 2016.

ISSA, A.I.; TOUMBA, K.J. Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. **Caries Res.**, v. 38, p.15-19, 2004.

KIDD, E; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenics biofilms. **J. Dent. Res.**, vol.83, n. C, p. C35-C38, 2004.

KASSEBAUM, N.J.; BERNABÉ, E.; DAHIYA. M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C.J.L.; MARCENES, W. Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 5, p. 650–658, 2015.

KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J. Dent. Res.**, v. 92, p.1065–1073, 2013.

KRAIVAPHAN, P. et al. Two-year caries clinical study of the efficacy of novel dentifrices containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. **Caries Res.**, vol. 47, p. 582 – 590, 2013.

KURAMITSU, H.K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p.159–176, 1993.

The World Oral Health Report (WHO). Continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Program. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 31, p. 3-23, geneva 2003.

LIU, Y.; HU; T.; JIANG, D. Analysis of urease gene expression by *Actinomyces naeslundii* in biofilm. **J. Dent. Res.**, v.85, n.B, p. 315, 2006.

LIU, Y.; NASCIMENTO, M.M.; SCHULTE, R. Characterization of the arginolytic microflora of human dental biofilms. **J. Dent. Res.**, v.91, n.A, p.1262, 2012.

LI, J.; HUANG, Z., MEI, L., GUIFENG, L., HUANG, L. Anti-caries effect of arginine-containing formulations in vivo: A systematic review and meta-analysis. **Caries Res.** V.49, p.606-617, 2015.

LLENA, C.; LEYDA, A.; FORNER, L.; GARCET, S. Association between the number of early carious lesions and diet in children with a high prevalence of caries. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v.16, n.,1p.7-12, Mar, 2015.

MANJI, F.; FEJERSKOV, O.; NAGELKERKE, N.J.D.; BAELUM, V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.19, p. 324-328, 1991.

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

MARINHO, VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v.10, n. 3, p. 183-91, sept. 2009.

MATTOS-GRANER, R.O.; SMITH, D.J.; KING, W.F.; MAYER, M.P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J. Dent. Res.**, v. 79, p.1371–1377, 2000.

MONCADA, G.; MAUREIRA, J.; NEIRA, M.; REYES, E.; OLIVEIRA JUNIOR, O.B.; FALEIROS, S.; PALMA, P.; CORSINI, G.; UGALDE, C.; GORDAN, V.V.; YEVENES, I. Salivary Urease and ADS Enzymatic Activity as Endogenous Protection against Dental Caries in Children. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, V.39, n.4, 2015.

NASCIMENTO, M.M.; GORDAN, V.V.; GARVAN, C.W.; BROWNGARDT, C.M.; BURNE, R.A. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.24, n.2, p.89-95, 2009.

NASCIMENTO, M. M. et al. The effect of arginine on oral biofilm communities. **Mol. Oral Microbiol.**, vol. 29, p.45-54, 2013.

NOBRE DOS SANTOS, M.; MELO DOS SANTOS, L.; FRANCISCO, S.B.; CURY, J.A. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res.**, v. 36, p. 347–352, 2002.

PAES LEME, A.F.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, A.A.; KOO, H.; CURY, J.A. Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed in vivo, studied by proteomic analysis. **Caries Res**, v. 42, p. 435–443, 2008.

PAES LEME, A.F.; DALCICO, R.; TABCHOURY, C.P.M.; DEL BEL CURY, A.A.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. In situ Effect of Frequent Sucrose Exposure on

Enamel Demineralization and on Plaque Composition after APF Application and F Dentifrice Use. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 71, 2004.

PAGLIA, L.; SCAGLIONI, S.; TORCHIA, V.; DE COSMI, V.; MORETTI, M.; MARZO, G.; GIUCA, MR. Familial and dietary risk factors in early childhood caries. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v.17, n.2, p.93-99; jun, 2016.

PECHARKI, G.D.; CURY, J.A.; PAES LEME, A.F.; TABCHOURY, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; ROSALEN, P.L.; BOWEN, W.H. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. **Caries Res.**, v. 39, p.123–129, 2005.

PERES, M.A.; SHEIHAM, A.; LIU, P.; DEMARCO, F.F.; SILVA, A.E.R.; ASSUNÇÃO, M.C.; MENEZES, A.M, et al. Peres. Sugar Consumption and Changes in Dental Caries from Childhood to Adolescence. **Journal of Dental Research**. P.1–7, 2016.

PESSAN, J.P.; CONCEIÇÃO, J.M.; GRIZZO, L.T.; SZÉKELY, M.; FAZAKAS, Z. Intraoral fluoride levels after use of conventional and high-fluoride dentifrices. **Clinical oral investigations**, v.19, n.4, p. 955-958, 2015.

PETERSEN, P.E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S; NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ**, v. 83, p. 661–669, 2005.

RUGG-GUNN, A. dental caries: strategies to control this preventable disease. **Acta. Med. Acad.**, v.42, n.2, p.117-30, nov, 2013.

REYES, E. et al. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. **J Appl Oral Sci.**, vol. 22, no.3, p.235-240, 2014.

RIBEIRO, C.C.; TABCHOURY, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; TENUTA, L.M.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **Br. J. Nutr.**, v. 94, p.44–50, 2005.

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

SAPORITO, R.A.; BONETA, A.R.; FELDMAN, C.A.; CINOTTI, W.; SINTES, J.L.; STEWART, B.; VOLPE, A.R.; PROSKIN, H.M. Comparative anticaries efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrices. A two-year caries clinical trial on children in New Jersey and Puerto Rico. **Am. J. Dent.**, v. 13, n. 4, p. 221-226, Agus. 2000.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends Microbiol.**, v.23, n.2, p.76-82, feb, 2013.

SOUZA, M. L. R. et al. Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary roots caries. **J. of Dent.**, vol.41, p. 35 – 41, 2013.

SHARMA, S.; LAVENDER, S.; WOO, J.; GUO, L.; SHI, W.; KILPATRICK-LIVERMAN, L.; ET AL. Nanoscale characterization of effect of L-arginine on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion by atomic force microscopy. **Microbiology**, v.160, p.1466–1473, 2014.

SHEIHAM, A.; JAMES, W.P.T. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 10, p. 1341–1347, 2015.

SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J.; CULLEN, P. The Distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of two groups of naval recruits. **Arch. Oral. Biol.**, v. 19, p. 199-202, 1974.

SRISILAPANAN, P.; KORWANICH, N.; YIN, W.; CHUENSUWONKUL, C.; MATEO, L.R.; ZHANG, Y.P.; Cummins D, Ellwood R.P. Comparison of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence. **Journal of dentistry**, v.41, p.29–34, 2013.

TAKAHASHI, N.; YAMADA, T. Acid-induced acidogenicity and acid tolerance of nonmutans streptococci. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, p. 43–48, 1999.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

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

TEN CATE, JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **European Journal of Oral Science**, v. 105 (5 Pt 2), p. 461-5, 1997.

TWETMAN, S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 10, p.162, 2009.

VAN WUYCKHUYSE, B. C.; PERINPANAYAGAM, H. E.; BEVACQUA, D. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 74, no. 2, p. 686–690, 1995.

VALE, G. C. et al. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Res.**, Basel, v. 41, no. 5, p. 406-412, 2007.

VOLPE, A.R.; PETRONE, M.E.; DAVIES, R.; PROSKIN, H.M. Clinical anticaries efficacy of NaF and SMFP dentifrices: overview and resolution of the scientific controversy. **J. Clin. Dent.**, v. 6, p. 1-28, 1996.

WALSH, T.; WORTHINGTON, H.V.; GLENNY, A.; APPELBE, P.; MARINHO, V.C.C.; SHI, X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 11, p. 6-7, 2010.

WALTER, R.G.; SHKLAIR, I.L. Streptococcus mutans in caries-free and caries-active naval recruits. **J. Dent. Res.**, v. 61, n.11, p.1229–1232, Nov 1982.

WHITFORD, G.M.; BUZALAF, M.A.; BIJELLA, M.F.; WALLER, J.L. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. **Caries Res.**, v. 39, n.2, p.100-7, Mar./Apr. 2005.

WOLFF, D.; FRESE, C.; MAIER-KRAUS, T.; KRUEGER, T.; WOLFF, B. Bacterial Biofilm Composition in Caries and Caries-Free Subjects. **Caries Res.**, v. 47, p. 69–77, 2013.

YIN, W.; HUA, D.; LI, X.; FAN, X.; ZHANG, Y.; PRETTY, I.; MATEO, L. Cummins D, Ellwood R. The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). **Journal of dentistry**, v.41, p.22-28, 2013 (a).

ZHENG, X.; CHENG, X.; WANG, L.; QIU, W.; WANG, S.; ZHOU, L.; LI, M.; LI, Y.; CHENG, L.; LI, J.; ZHOU, X.; XU, X. Combinatorial Effects of Arginine and Fluoride on Oral Bacteria. **Journal of Dental Research**, v.94, n.2, p.344–353, 2015.