

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

MARIA EDUARDA LISBOA PAGNUSSATTI

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO CARIOSA ARTIFICIAL EM ESMALTE E NA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO BIOFILME FORMADO *IN SITU*

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

2018

Maria Eduarda Lisboa Pagnussatti

**EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA
REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO CARIOSA ARTIFICIAL EM ESMALTE E
NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO BIOFILME FORMADO *IN SITU***

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre – RS

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pagnussatti, Maria Eduarda Lisboa
Efeito de um dentifrício fluoretado contendo
arginina na remineralização de lesão cáriosa artificial
em esmalte e na composição bioquímica do biofilme
formado in situ / Maria Eduarda Lisboa Pagnussatti. --
2018.

39 f.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Coorientadora: Marisa Maltz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2018.

1. Antecedentes e Justificativa. 2. Objetivos. 3.
Artigo Científico . 4. Conclusão. 5. Referências. I.
Arthur, Rodrigo Alex, orient. II. Maltz, Marisa,
coorient. III. Título.

Aos meus pais, Maria Cristina de Souza de Lisboa e Paulo Roberto Pagnussatti, por estarem ao meu lado desde meus primeiros passos, me incentivando, apoiando nas minhas escolhas e me dando amor incondicional. Sem eles nada disso seria possível.

Ao meu irmão Lorenzo, que desde sua chegada me ensinou que a vida fica muito mais bonita quando temos alguém para dividir nossas experiências e aprendizados.

AGRADECIMENTOS

À Deus pois sem Ele, essa caminhada não teria acontecido; por todas as noites em que me senti desamparada e sozinha longe das pessoas que eu amo tanto mas lembrei que nunca estou sozinha pois Ele sempre está comigo.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur e Prof^ª Dra. Marisa Maltz por todo conhecido, ajuda, paciência, dedicação e comprometimento que tiveram comigo durante essa caminhada. Obrigada por confiarem em mim e pela difícil tarefa de transmitirem o conhecimento de vocês com tanta paixão, motivo pelo o qual tenho grande admiração por ambos.

A Prof^ª Dra Lina Naomi Hashizume por todo o conhecimento e auxílio fornecido durante este trabalho. Obrigada pelas palavras de incentivo, preocupação e dedicação que teve comigo durante essa jornada.

Aos meus pais, por terem me apoiado na decisão de ficar longe deles por mais um período de tempo, por me incentivarem a nunca desistir de buscar os meus sonhos e ideais e por me amarem de maneira tão incondicional. Obrigada por serem as pessoas maravilhosas e dedicadas que são, meus exemplos de pessoa e profissional que quero ser. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido. Meu eterno agradecimento e amor à vocês dois.

Ao meu irmão Lorenzo, que quando eu voltava pra casa me recebia de um jeito tímido mas amoroso e me fazia lembrar do quanto eu sentai falta da companhia durante os períodos em que não convivíamos diariamente. Obrigada por me apoiar nas minhas decisões e por ser meu amigo. Te amo.

A minha companheira, amiga e confidente de quatro patas Margô, que desde sua chegada supriu minha solidão e encheu meus dias de amor.

Aos meus colegas e amigos Guilherme, Heitor, Renan, Elen e Deise, que junto comigo passaram por esse importante momento em nossas vidas profissionais. Obrigada pela companhia no Labim, pelos cafés depois das aulas, pelo apoio em dias em que as dificuldades pareciam ser insuperáveis. Vocês tornaram essa caminhada mais alegre e leve.

A Andreia, aluna de iniciação científica que me ajudou durante todas as fases de realização desse trabalho, foi muito bom trabalhar nesta pesquisa contigo. Obrigada pelos finais de semana e noites que passávamos no laboratório cortando e polindo dentes e montando aparelhos para usarmos no nosso trabalho.

A todos os Professores da Cariologia UFRGS que compartilharam seu saber com tanta dedicação, excelência e paixão. Por toda ajuda durante esse período seja com palavras de incentivo ou em experimentos. Deixo aqui meu muito obrigada por serem exemplos de Mestres dos quais tive o maior orgulho e sorte de ter conhecido.

Aos demais Professores que tive a oportunidade de conviver e aprender, aos amigos que fiz no Labim e nas dependências da Faculdade de Odontologia da UFRGS graças a essa oportunidade de participar desse programa de pós-graduação.

A todos os voluntários que fizeram parte desta pesquisa. Sem vocês este trabalho não teria acontecido.

A CAPES pela bolsa concedida durante alguns meses de meus estudos.

*Amadurecer é viver o suficiente para aprender que sou
uma versão melhor de mim não pela quantidade de vezes
que acertei, mas pela quantidade de vezes que errei.*

João Doederlein - poeta

PAGNUSSATTI, Maria Eduarda Lisboa. **Efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na remineralização de lesão cariiosa artificial em esmalte e na composição bioquímica do biofilme formado *in situ***. Dissertação em Odontologia, Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina (DFA) na remineralização de lesão artificial de cárie de esmalte e na composição bioquímica do biofilme formado *in situ* e comparar seu efeito com o dentifrício fluoretado convencional (DF). Em um estudo cruzado, duplo-cego (em relação ao uso de DFA ou DF), realizado durante duas fases experimentais de 14 dias cada, dezesseis voluntários adultos foram randomizados em relação ao uso de DFA e DF 3x/dia em período pré-experimental (wash-out) de 2 meses. Os voluntários foram então solicitados a usar um dispositivo intra-bucal palatino contendo 4 blocos de esmalte dentário bovino com lesão artificial de cárie (2 blocos de cada lado do dispositivo, sendo um de cada lado com porcentagem de perda de dureza de superfície conhecida). Eles foram instruídos a remover os dispositivos da cavidade bucal e gotejar 2 gotas de solução de sacarose a 20% e a suspensão dos dentifrícios em tempos pré-determinados 3x/dia. No final da primeira fase *in situ* e considerando um desenho cruzado, os voluntários foram solicitados a escovar seus dentes 3x/dia com um dentifrício diferente (DF ou DFA) de acordo com a randomização feita no início do estudo. Uma segunda fase *in situ* de 14 dias começou e solução de sacarose e suspensões de dentifrício foram gotejadas sobre um novo subconjunto de blocos de esmalte como descrito acima. Ao final de cada fase *in situ*, os biofilmes formados nos blocos de esmalte foram coletados e processados para quantificação de polissacarídeo extracelular insolúvel (PECi) e contagem de microrganismos totais (MT). Blocos de esmalte foram submetidos à análise de dureza para avaliar o efeito dos tratamentos na reversão da lesão cariiosa em termos de porcentagem de recuperação da dureza superficial (%RDS) e analisados qualitativamente por microradiografia transversal (MRT). Os resultados foram analisados por meio da Equação de Estimativa Generalizada (GEE), com nível de significância de 5%. Biomassa (mg), contagem de UFC (unidade formadora de colônias) MT e RDS% para DF ($30,5 \pm 5,9$; $6,4 \pm 0,2$; $24,1 \pm 4,2$) não foram estatisticamente diferentes em comparação com DFA ($36,6 \pm 8,5$; $5,8$

$\pm 0,5$; $26,8 \pm 4,2$) (mediana \pm se $p > 0,05$). A concentração de PECi ($\mu\text{g}/\text{mg}$) na presença de DF ($71,6 \pm 14,2$) foi estatisticamente superior à presença de DFA ($43,7 \pm 12,6$) ($p=0,044$). A análise de MRT sugere um padrão semelhante de remineralização para os grupos DF e DFA. Os dados do presente estudo *in situ* sugerem que não há diferença na remineralização de lesões cáries artificiais de esmalte entre DFA e DF nas condições estudadas. A menor produção de polissacarídeo extracelular com o DFA comparado ao DF sugere uma possível diminuição do potencial cariogênico do biofilme exposto a detifrício contendo arginina.

Palavras-chave: Dentifrício, Fluoreto, Arginina, Cárie dentária, Esmalte dentário, Remineralização.

PAGNUSSATTI, Maria Eduarda Lisboa. **Effect of arginine-containing fluoridated dentifrice on the remineralization of enamel artificial carious-like lesion and on the biochemical composition of biofilm formed *in situ***. Dissertation in Dentistry, Master Degree – Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of arginine-containing fluoridated dentifrice (AFD) on the remineralization of enamel artificial carious-like lesion and on the biochemical composition of biofilm formed *in situ* and compare its effect with regular fluoridated dentifrice (FD). In a crossed-over, double-blind (with respect to the use of AFD or FD) *in situ* study conducted during two experimental phases of 14 days each, sixteen adults volunteers were randomized in relation to the use of both AFD and FD 3x/day in a 2-months pre-experimental phase. Volunteers were then asked to wear an intraoral palatal appliance containing 4 blocks of bovine dental enamel with artificial carious lesion (2 blocks on each side of the device, being one of each side with known percentage of surface hardness change). They were instructed to remove the appliances from the oral cavity and drip 2 drops of 20% sucrose solution and suspension of dentifrices at pre-determined times 3x/day. At the end of the first *in situ* phase and considering a crossed-over design, volunteers were asked to brush their teeth 3x/day with a different dentifrice (FD or DFA) according to the randomization done at the beginning of the study. A second 14-days *in situ* phase began and sucrose solution and dentifrice suspensions were dripped onto a new subset of enamel blocks as described above. At the end of each *in situ* phase, biofilms formed onto enamel blocks were collected and processed for quantification of insoluble extracellular polysaccharide (IEPS) and total microorganisms (TM) counts. Enamel blocks were subjected to hardness analysis to assess the effect of treatments on carious lesion reversal in terms of percentage of surface hardness recovery (%SHR) and qualitatively analyzed by transversal microradiography. The results were analyzed using the Generalized Estimation Equation (GEE) at 5% significance level. Biomass (mg), TM, CFU counts and %SHR for FD (30.5±5.9; 6.4±0.2; 24.1±4.2) were not statistically different compared to AFD (36.6±8.5; 5.8±0.5; 26.8±4.2) (median±se; p>0.05). The IEPS concentration (µg/mg) in the presence of FD (71.6±14.2) was statistically higher than in the presence of AFD (43.7±12.6) (p=0.044). TMR analysis suggest similar pattern of remineralization for both FD and AFD groups. The data of the present *in situ* study suggest that there is no difference on remineralization of enamel artificial carious lesions between AFD and FD, but biochemical composition of biofilms may be changed in the presence of AFD.

Keywords: Dentifrice, Fluoride, Arginine, Dental caries, Dental enamel, Remineralization.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	1
1.1 Cárie Dental – Aspectos Etiológicos e Prevalência	1
1.2 Microbiologia da Cárie Dental	3
1.3 O Papel dos Carboidratos Fermentáveis	5
1.4 O Flúor e a Cárie Dental	7
1.5 Arginina x Cárie Dental	10
2. OBJETIVO	16
3. ARTIGO CIENTÍFICO	17
4. CONCLUSÃO	34
5. REFERÊNCIAS	35

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 CÁRIE DENTAL – ASPECTOS ETIOLÓGICOS E PREVALÊNCIA

Uma das doenças que mais afeta a população mundial tem sido a cárie dental (Kassembaum et al., 2015); estima-se que 95% da população já foi acometida por essa doença multifatorial. No ano de 2010, a cárie dental não tratada em dentes decíduos foi a décima condição mais prevalente, afetando 9% da população global (621 milhões de pessoas em todo o mundo). Entre os anos de 1990-2010 a prevalência global padronizada por idade ficou em torno de 9%. Já a incidência padronizada por idade no ano de 2010 foi de 15.205 casos para cada 100.000 pessoas-ano, apresentando uma diminuição não significativa da incidência de 1990 de 15.437 casos para cada 100.000 pessoas-ano. Já cárie não tratada em dentes permanentes foi a doença mais prevalente no ano de 2010, afetando 35% da população global (2,4 bilhões de pessoas em todo o mundo) (Kassembaum et al., 2015).

Dados provenientes da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal realizada no Brasil (SB-BRASIL) no ano de 2010 (Ministério da Saúde Brasil, 2010), mostrou que 46,6% das crianças brasileiras com 5 anos estão livres de cárie na dentição decídua, e aos 12 anos, 43,5% apresentaram a mesma condição na dentição permanente. Nas idades de 15-19, 35-44 e 65-74 anos, os percentuais foram 23,9%, 0,9% e 0,2%, respectivamente. Os percentuais de CPO-D/ceo-d=0 são sempre inferiores nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste quando comparados com os das regiões Sul e Sudeste. Aos 5 anos de idade, uma criança brasileira possui, em média, o índice de 2,43 dentes com experiência de cárie, com predomínio do componente cariado, que é responsável por mais de 80% do índice. Novamente, a média do índice ceo-d é mais elevada nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, quando comparado com a média das regiões Sul e Sudeste.

Crianças com 12 anos e adolescentes com 15-19 anos apresentaram, em média, respectivamente, os índices 2,07 e 4,25 dentes com experiência de cárie, sendo as menores médias encontradas nas regiões Sul e Sudeste e as maiores nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Nos adultos, o CPO-D médio foi de 16,75 na faixa etária de 35-44 anos e de 27,53 na faixa de 65-74 anos. Menores índices para o grupo de 35-44 anos encontram-se nas regiões Nordeste e Sudeste. Para o grupo de 65-74 anos, os menores índices foram encontrados nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Destaca-se o

fato de que o componente perdido é responsável por cerca de 44,7% do índice no grupo de 35-44 anos e 92% no grupo de 65-74 anos.

A cárie dentária é uma doença que altera equilíbrio entre o conteúdo mineral do dente e o fluido do biofilme. A dissolução contínua do esmalte dental pode levar à formação de uma lesão que se inicia em nível subclínico, mas que pode progredir, tornando-se clinicamente visível, ou mesmo culminar com o desenvolvimento de cavidades nas superfícies dentais (Anderson, 2002; Björndal e Mjör, 2002; Featherstone, 2004). Essa alteração mineral é induzida por ácidos que são frequentemente produzidos pelas bactérias do biofilme dental a partir da metabolização de carboidratos da dieta. Sendo assim, considera-se que a dieta é o principal fator relacionado ao desenvolvimento da cárie dental (Sheiman e James, 2015).

O ácido láctico é o principal produto final predominante do metabolismo dos açúcares fermentáveis pelo biofilme, e também considerado o principal ácido envolvido na formação da cárie dental. À medida que os ácidos se acumulam na fase fluida do biofilme, o pH cai até o ponto em que as condições na interface biofilme-esmalte tornam-se subsaturadas e o ácido desmineraliza parcialmente a camada superficial do dente. Com a volta do pH do biofilme ao pH neutro o biofilme se torna novamente supersaturado em relação aos minerais do dente e ocorre processo de remineralização. Processo de desmineralização são intercalados, portanto, com processos de remineralização com o contato da saliva. A perda de minerais leva ao aumento da porosidade, alargamento dos espaços entre os cristais de esmalte e amolecimento da superfície, o que permite que os ácidos se difundam mais profundamente no dente, enquanto que os processos de remineralização tendem a remineralizar as camadas mais superficiais da lesão resultando em desmineralização do mineral abaixo da superfície (desmineralização subsuperficial) (Pitts et al., 2017).

A formação de produtos de reação, principalmente cálcio e fosfato, a partir da dissolução da superfície e da subsuperfície aumenta o grau de saturação e pode parcialmente proteger a camada superficial de uma maior desmineralização. Uma vez que os açúcares são eliminados da boca pela deglutição e diluição salivar, os ácidos do biofilme podem ser neutralizados pela ação tampão da saliva. O pH do fluido do biofilme retorna para a neutralidade e se torna suficientemente saturado com íons de cálcio e fosfato viabilizando a remineralização dos minerais dos tecidos dentários.

Devido à natureza dinâmica do processo da doença cárie sob o ponto de vista dos eventos de des/remineralização, a perda de mineral pode ser revertida ou interrompida, especialmente na presença de flúor (Pitts et al., 2017).

É importante salientar, que quanto mais frequentes forem os eventos de desmineralização dos tecidos dentários ao longo do dia (maior perda de mineral e sucessivas quedas de pH), mais difícil será manter um grau de saturação na saliva compatível com remineralização, havendo aumento na quantidade de mineral perdido que pode culminar com o surgimento de uma lesão de cárie clinicamente visível (Manji e Fejerskov, 1991; Kidd e Fejerskov, 2004).

Nesse contexto, a cárie dental é uma destruição localizada dos tecidos dentais duros (mineralizados) susceptíveis aos ácidos originados da fermentação de carboidratos fermentáveis da dieta devido ao metabolismo bacteriano. Sendo assim, é considerada uma doença crônica, de progressão lenta, que afeta crianças e adultos e possui um caráter multifatorial, que começa com mudanças microbiológicas dentro do complexo biofilme dental e é afetada pelo fluxo e composição salivar, exposição ao flúor, consumo de açúcares, hábitos e comportamentos (Selwitz et al., 2007).

Entende-se, ainda, que o processo saúde-doença cárie pode sofrer a influência de fatores modificadores. Além dos chamados fatores etiológicos determinantes para o desenvolvimento da lesão de cárie, tais como o hospedeiro (dentes e a saliva - quantidade, qualidade), os microrganismos (bactérias capazes de produzir ácidos e tolerar ambientes ácidos), a dieta (composição e frequência – principalmente carboidratos fermentáveis) na dependência do fator tempo, outros fatores, tais como escolaridade, classe social, nível sócio-econômico, bem como conhecimentos individuais acerca do processo saúde-doença também podem se apresentam nas mais diversas formas nas mais variadas populações alterando a ocorrências da doença.

1.2 MICROBIOLOGIA DA CÁRIE DENTAL

A desmineralização do esmalte, dentina e cemento dentários, possui íntima relação com a atividade metabólica das bactérias do biofilme que recobre as superfícies dentais. Como características fundamentais, os microrganismos cariogênicos devem ser capazes de produzirem ácidos a partir da metabolização de açúcares da dieta, característica denominada de acidogenicidade, e serem capazes de sobreviver nessas

condições de reduzido pH, característica denominada de aciduricidade (Loesche, 1986). Sabe-se que em uma flora bucal normal, os microrganismos cariogênicos representam menos de 1% do total de microrganismos que fazem parte da mesma (Marsh, 2003). Entretanto, na medida em que o pH da cavidade bucal reduz em resposta à produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas, ocorre uma modificação microbiológica com consequente aumento na proporção de espécies acidúricas (Correia et al., 2011). Historicamente, os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus spp.* têm sido considerados como as principais bactérias envolvidas com o início e progressão das lesões de cárie dental, respectivamente (Caulfield et al., 1993; Van Houte, 1994). Ambos são acidogênicos e acidúricos.

Durante muitos anos, existiam duas escolas de pensamento que discutiam o papel das bactérias na etiologia da cárie. A “*Hipótese da Placa Específica*” propunha que independente da diversidade de microrganismos que compreendem o biofilme dental, apenas um número muito reduzido de espécies, dentre elas os *S. mutans*, estaria envolvido com o desenvolvimento da doença. Contrastando com essa teoria, a “*Hipótese da Placa Não-Específica*” considerava, porém, que a doença era o resultado de uma atividade metabólica geral de toda microbiota formadora do biofilme, e não apenas de bactérias acidogênicas específicas. Sendo assim, uma mistura heterogênea de microrganismos poderia ter participação na doença cárie. Mais recentemente uma outra hipótese foi proposta por Marsh (1994; 2003), que reconcilia os elementos fundamentais das duas outras hipóteses já descritas.

A “*Hipótese da Placa Ecológica*” (Marsh 1994; 2003) propõe que os organismos associados à doença cárie também podem estar presentes em sítios saudáveis, mas em níveis muito baixos para serem clinicamente relevantes. A doença é o resultado de uma mudança no equilíbrio da microbiota residente, guiada por uma transformação nas condições ambientais. No caso da cárie dentária, condições repetidas de pH baixo no biofilme dental após a ingestão frequente de açúcar favorecerão o crescimento de espécies acidogênicas e acidúricas ou ácido-tolerantes (Marsh, 1994; 2003).

Nesse sentido, em adição aos *S. mutans*, microrganismos como *Rothia ssp*, *Scardovia ssp*, *Propionibacterium ssp* e outros também têm sido encontrados em biofilmes de indivíduos cárie-ativos sugerindo que desempenham papel no desenvolvimento da lesão de cárie (Thomas et al., 2012; Wolff et al., 2013), levando ao

entendimento de que a cárie dental é resultado de uma disbiose induzida pela dieta. Dessa forma, estudos mais recentes, têm mostrado que apesar de algumas espécies bacterianas possuírem um papel importante na etiologia da cárie dentária (como o *S. mutans*) o processo saúde-doença envolve microbiologicamente um sistema bem mais complexo de microrganismos (Takahashi e Nyvad, 2011).

Os microrganismos presentes no microbioma bucal no processo de saúde e doença são dependentes da disponibilidade de nutrientes. A dieta do hospedeiro é que irá moldar a relação de simbiose da microbiota que reside nas mucosas e superfícies dos dentes. Como exemplo de fácil entendimento é o consumo de carboidratos refinados na dieta humana, que tem sido considerado como um fator determinante para a alteração do microbioma bucal (Costa Longa & Hezerberg, 2014).

Apesar do atual entendimento da cárie dentária como uma doença polimicrobiana, o *S. mutans* ainda é considerado um dos mais importantes microrganismos cariogênicos. Isso deve-se ao fato de que, além produzir ácidos, essas bactérias produzem uma enzima chamada de glicosiltransferase (GTF), que, na presença da sacarose, irá promover importantes modificações estruturais e bioquímicas no biofilme dental afetando fortemente o potencial patogênico desse biofilme (Paes Leme et al., 2004).

1.3 O PAPEL DOS CARBOIDRATOS FERMENTÁVEIS

Um estudo recente feito por Sheiman & James (2015), apontou que a importância dos açúcares como causa da cárie dental ainda é subestimada e não proeminente nas estratégias de prevenção da doença. Os autores colocam como principal justificativa para este fato, que muitos pesquisadores consideram de forma errônea a doença como multifatorial, concentrando-se em fatores amenizadores, principalmente o flúor. Os açúcares fornecem um substrato para as bactérias bucais cariogênicas para que se estabeleçam e gerem ácidos que irão desmineralizar os tecidos dentários. Fatores como o flúor e a higienização bucal não necessitariam de tamanha atenção se fosse abordada a causa única da cárie: o açúcar. Sem açúcares (principalmente a sacarose), a cadeia de causalidade é quebrada, então a doença não irá ocorrer. Assim sendo, esses autores fortemente sugerem que os açúcares iniciam o processo e desencadeiam uma cadeia causal, sendo portanto o único fator crucial que determina o desenvolvimento do processo cariioso.

É importante ressaltar que todos os carboidratos da dieta possuem um certo potencial cariogênico uma vez que eles podem ser fermentados pelas bactérias do biofilme dental. A sacarose, porém, apresenta a particularidade de agir como substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi) a partir da ação de enzimas GTFs produzidas pelos *S. mutans* (Rölla et al., 1989; Bowen e Koo, 2011). Os PECi aumentam a porosidade do biofilme (Dibdin e Shellis, 1988) contribuindo para a manutenção de níveis mais baixos de pH na interface dente/biofilme o que acarreta em maiores perdas de minerais da superfície dental (Zero et al., 2009). Além disso, os PECi atuam viabilizando a adesão de bactérias à superfície dental, contribuindo ainda para a manutenção de um biofilme altamente coesivo e aderente (Bowen & Koo, 2011).

Em acréscimo às alterações estruturais induzidas no biofilme dental, a sacarose altera composição inorgânica dos biofilmes. O biofilme dental formado na presença desse carboidrato apresenta reduzidas concentrações de cálcio, fosfato inorgânico e flúor (Cury et al., 1997; Aires et al., 2006). Esses íons no fluido do biofilme são responsáveis pelo equilíbrio da solubilidade do tecido mineral e suas concentrações determinam se o esmalte ou a dentina desmineralizarão ou não quando o pH cair (Ccahuana-Vásquez et al., 2007). Além disso, o aumento na concentração de cálcio (Ca) no fluido seria um passo autolimitante para a desmineralização dentária logo após a exposição do biofilme aos carboidratos (Correia et al., 2012). Dessa forma, devido a todas essas alterações induzidas pela sacarose, ela é considerada o carboidrato mais cariogênico (Paes Leme et al., 2004).

Um estudo *in situ* feito por Tenuta et al. (2006), tem sugerido que quando há uma elevada concentração e sucessivas exposições aos açúcares fermentáveis, principalmente à sacarose, há um aumento na concentração de PECi na matriz dos biofilmes, baixando os valores do pH em jejum e propiciando uma maior desmineralização do esmalte dental quando comparado a biofilmes formados na ausência da sacarose (Tenuta et al., 2006); alguns estudos clínicos demonstram que o aumento da biomassa total de biofilme exposto à altas frequências de sacarose pode ser encontrado devido aos polissacarídeos extracelulares ocuparem um grande volume da matriz do biofilme (Tenuta et al., 2006).

Sheiman e James (2015), em sua revisão de literatura sobre a relação existente entre cárie dental e a dieta, citam alguns estudos que mostram que a frequência de

consumo de bebidas adoçadas com açúcares refinados está relacionada ao aumento da cárie. Um estudo feito por Armfield et al., (2013) demonstrou que há um relação dose-resposta entre a frequência do consumo de bebidas açucaradas e a cárie dental em crianças australianas. A cárie dental foi significativamente associada com o consumo de bebidas açucaradas, principalmente em crianças que escovavam os dentes com menor frequência, do sexo masculino, com nível sócio-econômico mais baixo e em regiões de áreas rurais ou remotas, sendo o consumo dessas bebidas um importante fator de risco para a cárie dental. Uma revisão sistemática feita por Moynihan e Kelly (2014) também constatou que há correlação entre a cárie dental e a ingestão de açúcares. A doença progride com o passar da idade e os efeitos dos açúcares na dentição ocorrem ao longo da vida; mesmo havendo baixo índice de cárie dental na infância, houve um aumento progressivo durante toda a vida, e apesar da proteção oferecida pelo flúor, a relação causal entre açúcares e cárie dental é indiscutível (Sheiman e James, 2015).

Assim sendo, também é importante reconhecer que, se a presença de açúcares é crítica para a incidência de cáries, a prevalência de cárie em uma comunidade ou país estará vinculada à ingestão e frequente exposição à açúcares (Sheiman e James, 2015).

1.4 FLÚOR E CÁRIE DENTAL

Quase um século depois dos primeiros estudos sobre os efeitos do flúor na cavidade bucal, os benefícios preventivos do flúor em relação á cárie dental são aceitos pela maioria da comunidade científica e pelos profissionais da odontologia mundial (Pitts et al., 2017). Apesar de o flúor não ser capaz de impedir o início da doença cárie, ele se mostra extremamente eficaz no controle da progressão da mesma, sendo dessa forma, um dos principais desafios da atualidade manter os benefícios do flúor sem que haja uma exposição que não seja maléfica e desnecessária a ele (Cury, 2001).

Quando o íon flúor está presente de forma constante na cavidade bucal, a saliva e o fluido proveniente do biofilme tornam-se supersaturados em relação à fluorhidroxiapatita, uma estrutura mineral de fosfato de cálcio e que possui flúor em sua composição. Portanto, toda vez que o pH do meio for menor do que 5,5 para esmalte e 6,5 para dentina, o meio permanecerá subsaturado em relação a hidroxiapatita (principal estrutura mineral encontrada no dente humano), havendo dissolução do dente, que acaba por perder este mineral. Porém, na presença do flúor e em condições de supersaturação para a fluorhidroxiapatita, apesar de haver perda da hidroxiapatita, há deposição de

fluorhidroxiapatita na superfície dental, o que reduz a perda mineral líquida. Dessa forma, entende-se que o flúor atua reduzindo a desmineralização, fenômeno que ocorre até que o pH não seja inferior 4,5 para o esmalte e 5,5 para a dentina, (Cury e Tenuta, 2008). Quando há um aumento do pH acima dos valores já citados, o meio bucal torna-se novamente supersaturado para a hidroxiapatita, permitindo com que haja deposição dessa na superfície dental e recuperação dos minerais perdidos, e altamente supersaturado em relação a fluorhidroxiapatita, que também irá se depositar na superfície dental, fazendo com o que o flúor participe então, da remineralização do dente. (Cury e Tenuta, 2008).

Segundo Featherstone (1999), o mecanismo de ação do flúor se dá através do seu efeito local, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização da estrutura dentária. O flúor atua diretamente sobre os minerais presentes na estrutura dentária, prevenindo a perda mineral (Cummins, 2013).

A fluoretação das águas de abastecimento começou a ser recomendada pela ADA (American Dental Association) no início da década de 1950, quando os primeiros estudos controlados sobre a fluoretação das águas já estavam consolidados; a OMS (Organização Mundial de Saúde), também passou a recomendar a fluoretação das águas como medida de saúde pública (Narvai, 2000). Programas de fluoretação das águas têm sido implementados em aproximadamente 39 países, alcançando mais de 200 milhões de pessoas, além de um adicional de 40 milhões de pessoas que ingerem água natural fluoretada (Peckhan e Awofeso, 2014).

Um estudo feito por Basting et al, (1997) observou a ação do flúor nas águas de abastecimento de três cidades no estado de São Paulo, Piracicaba, Paulínia e Santos e também na cidade de Curitiba, no estado do Paraná, desde a implementação do flúor nas águas no ano de 1971, 1980, 1983 e 1985, respectivamente, até o ano de 1998, na diminuição da prevalência da cárie dental de 50% em crianças de 12 anos, quando comparada com as regiões onde não há fluoretação. Em um outro estudo feito pelo World Health Organization (WHO) (2013), concluiu que houve redução da prevalência de cárie dental à nível global em 15%. O United States Centers from Disease Control and Prevention cita que a fluoretação das águas de abastecimento consta hanking dos top 10 benefícios advindos da inovação da saúde no século 20. Ramirez e Buzalaf (2007) relataram que comunidades que consomem água fluoretada em níveis ideais, sem

interrupções, têm conseguido reduzir os níveis de cárie dental em crianças de 12 anos em 50 a 60% (Dos Anjos e Fernandes, 2015).

No Brasil, desde 1974 a fluoretação das águas de abastecimento público tem sido considerada uma ação de proteção à saúde, em nível coletivo, na Política Nacional de Saúde Bucal (Ministério da Saúde, Brasil, 2010); no território brasileiro, a concentração recomendada para que seja possível obter-se uma proteção elevada à cárie dental e não haja danos ao esmalte dental, como a fluorose, varia de 0,6 a 0,8 ppm, dependendo da região do país (Tomita et al., 1996). Em regiões nas quais não há abastecimento público de água, o dentifrício fluoretado tem se mostrado um importante aliado na prevenção da cárie dental (Narvai, 2000).

Em uma revisão sistemática feita por Walsh et al., (2010) sobre o uso de dentifrícios fluoretados com diferentes concentrações de flúor na prevenção de cárie dental em crianças e adolescentes, os autores reiteram que o uso de dentifrícios fluoretados constitui a principal escolha para prevenção primária da cárie dental. Dentifrícios fluoretados mostram-se mais eficazes na prevenção de cárie dental quando comparados com dentifrícios não fluoretados, em crianças e adolescentes, e um aumento dessa prevenção com os dentifrícios fluoretados, quando há uma alta concentração de flúor nas formulações. Os autores concluem que o dentifrício fluoretado necessita apresentar pelo menos 1100 ppmF para ser efetivo em termos de prevenção e controle de cárie dentária.

Segundo Marinho (2009), além dos dentifrícios fluoretados, os géis, vernizes e bochechos com flúor também são meios utilizados na prevenção e controle da cárie dental. Entende-se que esses produtos, porém, devem ser utilizados apenas por indivíduos que apresentam atividade de cárie.

Após o uso de qualquer produto fluoretado cuja concentração de flúor seja superior a 100 ppm (como no caso de dentifrícios, géis, vernizes e bochechos), há formação de glóbulos de fluoreto de cálcio sobre a superfície dental que atua como um reservatório mineral. No momento em que houver queda no pH na cavidade bucal, esses glóbulos se dissolvem, liberando flúor que inibe a desmineralização e potencializa a remineralização do tecido dentário (Duschner et. al, 1997; Rölla, 1989).

Sendo assim, o flúor aumenta a rapidez com que o processo de remineralização ocorre, visto que adsorve ao cristal parcialmente dissolvido da superfície dentária, atraindo íons cálcio livres no meio em solução, intensificando a remineralização da lesão cariiosa. Para que isso aconteça, o flúor deve ser mantido em concentrações mínimas e constantes na cavidade bucal, principalmente entre biofilme e esmalte, e saliva e esmalte (Featherstone, 1999; Ten Cate, 1997), o que é conseguido pelo uso frequente e diário do dentífrico fluoretado pelo paciente ou pela ingestão de água de abastecimento otimamente fluoretada. Para pacientes cárie-ativos, é necessário aumentar os reservatórios de fluoreto de cálcio na cavidade bucal. Dessa forma, em adição ao uso do dentífrico fluoretado, géis, vernizes e bochechos podem ser utilizados nesses pacientes de acordo com as necessidades individuais a fim de se viabilizar o controle dos processos de des/remineralização e de controle da doença cárie.

1.5 ARGININA X CÁRIE DENTAL

Acredita-se que um biofilme dental composto por bactérias com capacidade de alcalinizar os fluídos do meio possui um grande impacto na ecologia microbiana desse microbioma bucal e seja a chave para a compreensão do processo de inibição e iniciação da cárie dental (Liu et al., 2012).

A geração alcalina pelo biofilme dental pode ocorrer através de dois caminhos: a hidrólise da uréia, feita pela enzima urease; e o metabolismo de arginina, que é realizado via sistema Arginina Deiminase (ADS) (Burne e Marquis, 2000; Chakraborty e Burne, 2017). Algumas bactérias comensais, como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, além de algumas espécies de lactobacilos e actinomices (Burne e Marquis, 2000; Liu et al., 2012) que possuem a capacidade de catabolizar uréia e/ou arginina, por meio de sistemas enzimáticos específicos (Chakraborty e Burne, 2017). A arginina e a uréia são componentes naturais da saliva humana. Estão presentes numa concentração média de 50µmol/L de arginina livre na saliva humana e 3 a 10 mmol/L de uréia (Liu et al., 2012).

Essas bactérias ureolíticas ou arginolíticas procuram elevar o pH do biofilme, tendendo a equilibrá-lo, na tentativa de sobreviverem à um ambiente com pH mais ácido, levando à produção de amônia. Como resultado da degradação da uréia ou da arginina, há liberação de amônia, que por sua vez alcaliniza o meio extracelular atuando

como acceptor de íons hidrogênio promovendo assim, um aumento do pH do biofilme e neutralizando os efeitos deletérios dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano (Huang et al., 2012; Cummins, 2013). Isso acarretaria numa modulação do processo de desmineralização dental, visto que haveria um maior controle do pH na interface dente/biofilme.

Recentemente, alguns estudos têm tido por objetivo desenvolver novos compostos que atuem de maneira a complementar e potencializar o efeito anti-cárie do flúor. Dentifrícios fluoretados com 1.450 ppm de flúor que têm 1,5% de arginina e cálcio insolúvel em sua composição merecem um destaque (Cummins, 2013).

Em um estudo *in vitro*, He et al., (2016), utilizando a L-arginina 1,5% como forma de tratamento tópico em biofilmes com potencial cariogênico e não cariogênico, na presença da sacarose, demonstraram que quando o biofilme é exposto à L-arginina 1,5%, reduz-se o crescimento de *S. mutans*, favorecendo o crescimento de *Streptococcus gordonii* e de *Actinomyces naeslundii* nesses biofilmes. Este estudo demonstrou também, que L-arginina foi capaz de reduzir substancialmente, em três vezes, as quantidades PECi nos biofilmes, o que altera de forma importante a estrutura do biofilme formado. Estudo *in situ* realizado por Sanchez et al., (2018) também demonstrou que biofilmes formados na presença de uso regular de dentifrício fluoretado contendo arginina também apresentaram menores concentrações de PECi quando comparados aos biofilmes formados na presença de dentifrício fluoretado sem arginina.

O estudo de Zheng et al., (2015), avaliou os efeitos combinatórios da arginina com o Fluoreto de Sódio (NaF) na composição microbiológica de biofilmes *in vitro*. Quando avaliados em combinação NaF (125 ppmF) e arginina (2,5%) em culturas planctônicas e de biofilmes *in vitro* com *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis*, ocorre uma sinergia da arginina com o flúor que ocasiona uma supressão de *S. mutans* nas culturas planctônicas e no biofilme. Além disso, a combinação de ambos enriquece o biofilme com *S. sanguinis* que atua reduzindo o potencial de crescimento anaeróbico de *P. gingivalis* dentro do biofilme alcalinizado. Portanto, o estudo demonstrou que há um efeito e abordagem promissores para o controle da cárie dental quando se combina flúor e arginina, considerando possíveis modificações microbiológicas decorrentes do uso dessa associação.

Clinicamente, os resultados obtidos em termos de prevenção de cárie dental após uso de dentifrício contendo arginina são questionáveis.

Um estudo feito por Yin et al., (2013), comparou a eficácia de um dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo 1,5% de arginina, com um dentifrício fluoretado convencional (1450 ppmF) e com uso de dentifrício sem flúor (placebo) na inativação de lesões não cavitadas ativas em indivíduos de 9 a 13 anos de idade. Usando a técnica de QLF (fluorescência quantitativa induzida pela luz), os autores observaram ao final de 6 meses de estudo, redução de cerca de 50% no volume da lesão cariosa do grupo com arginina, cerca de 34% no grupo que usou dentifrício fluoretado convencional e de apenas 13% no grupo que usou dentifrício placebo. Os autores concluíram, que o dentifrício contendo 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1450 ppm de fluoreto, fornece eficácia estatisticamente superior em interromper e reverter lesões de cárie, à um dentifrício convencional contendo apenas 1450 ppm de flúor. É importante ressaltar que alguns pesquisadores desse estudo possuem vínculo com a empresa desenvolvedora do dentifrício com 1,5% arginina.

Em outro estudo, Srisilapanan et al., (2013) avaliaram o efeito de dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo ou não arginina, na paralização e remineralização de lesões cariosas não cavitadas em indivíduos de 7 a 14 anos. Após 6 meses de uso dos dentifrícios 3x/dia, o volume das lesões reduziu 44,6% para o dentifrício contendo arginina e 28,9% para o dentifrício fluoretado sem arginina. Novamente, o dentifrício contendo arginina apresentou melhor efeito na inibição e reversão de lesões de cárie coronária precoce ativa em crianças comparado à um dentifrício, sem arginina, contendo somente flúor.

É importante discutir que o método de Fluorescência Quantitativa Induzida pela Luz (QLF) utilizado para medir mudanças no volume de lesões de cárie baseia-se no princípio de que um dente torna-se verde fluorescente quando é estimulado com luz azul. A luz verde emitida é espalhada dentro de uma lesão inicial, quando a cárie está presente, de tal forma que a superfície do dente sobrejacente aparece escura contra um fundo verde. Ao comparar a perda de fluorescência, devido ao espalhamento na lesão, ao nível de fundo da fluorescência, tanto a área quanto o grau de desmineralização da lesão podem ser quantificados. Além disso, o volume da lesão pode ser estimado multiplicando-se a área da lesão pela perda de fluorescência. Esse método permite

identificar alterações nas lesões ao nível ultra-estrutural, o que necessariamente não representa significado clínico. Além disso, é importante destacar que a magnitude de diferenças encontradas comparando dentifrícios com ou sem arginina (Yin et al., 2013; Srisilapanan et al., 2013) foi muito pequena, sendo portanto clinicamente questionável o benefício da arginina no processo de des- e de remineralização dental.

O estudo de Hu et al., (2013) avaliou o efeito do dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo arginina na paralização de lesões de cárie radicular. Indivíduos de 40 a 70 anos de idade usaram dentifrício fluoretado contendo arginina, dentifrício fluoretado sem arginina ou dentifrício não fluoretado (placebo) por um período de 6 meses. Ao final do período de 6 meses, observou-se paralização (em termos de modificação de textura das lesões) em cerca de 61,7% das lesões no grupo que usou dentifrício com arginina, e 56% e 27% nos grupos que usaram dentifrício fluoretado sem arginina e dentifrício placebo, respectivamente. Os resultados foram estatisticamente diferentes entre os 3 grupos. Num delineamento experimental semelhante ao estudo acima descrito, Souza et al., (2013,) também compararam o efeito do dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo arginina na paralização de lesões radiculares em indivíduos de 30 a 69 anos de idade. Ao final de 6 meses de estudo, observou-se paralização de cerca de 70,5% das lesões no grupo que usou dentifrício fluoretado contendo arginina enquanto que 58% de paralização foi observada no grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina.

Um estudo executado por Kraivaphan et al. (2013), duplo-cego, randomizado, feito na Tailândia com aproximadamente 6000 crianças em idade escolar (6-12 anos), analisou o efeito de um dentifrício fluoretado (1450 ppmF) contendo arginina no incremento de cárie dental, por um período de 2 anos. Três dentifrícios foram avaliados: dentifrício fluoretado contendo 1,5% de arginina e fosfato de cálcio, dentifrício fluoretado contendo 1,5% de arginina e carbonato de cálcio ou dentifrício fluoretado convencional contendo sílica. A orientação quanto à frequência de escovação recebida pelos participantes foi de 2x/dia. O número de dentes e de superfícies cariadas, perdidas e obturadas foi muito semelhantes entre os participantes no início do estudo. Após 2 anos, os grupos que usaram dentifrício contendo arginina apresentaram um incremento no CPOD (de 17 a 21%) e no CPOS (de 16%) menor do que o grupo que usou dentifrício sem arginina. Não houve diferença entre os grupos contendo fosfato de cálcio ou carbonato de cálcio. Os resultados deste estudo clínico demonstraram que os

dentifrícios contendo 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1,450 ppm F fornecem proteção significativamente maior quando comparados à um dentifrício contendo apenas 1,450 ppm F em uma população de baixo à moderado risco de cárie, quando comparados à um dentifrício contendo apenas 1,450 ppm F. Apesar de os grupos que utilizaram o dentifrício contendo 1,5% arginina apresentarem diferença estatística menor em relação àquele encontrado no grupo que usou dentifrício sem arginina, a relevância clínica desses achados é questionada devido ao pequeno efeito clínico observado.

Petersen et al. (2015), também testaram o efeito anticárie do dentifrício fluoretado (1450 ppm F) contendo arginina, em comparação ao dentifrício fluoretado (1100 ppm F) sem arginina, em um grupo de crianças com idade entre 4 a 6 anos. O grupo de crianças que usou o dentifrício contendo arginina também recebeu orientações frequentes de higiene bucal e a escovação dental na escola era realizada de forma supervisionada. Em contraste, o grupo de crianças que usou dentifrício fluoretado sem arginina não recebeu qualquer orientação/supervisão de escovação, e ainda, dentifrício de baixa concentração de flúor. Ao final de 2 anos de estudo, observou-se que o incremento de cárie no grupo que usou dentifrício fluoretado contendo arginina (1,04 para CPOD e 1,59 para CPOS) foi menor quando comparado ao grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina (1,19 para CPOD e 1,91 para CPOS). Contudo, esse estudo possui viés metodológico, principalmente em relação ao inadequado grupo controle. Apesar de melhor efeito em termos de redução no incremento de cárie dental ter sido encontrado mediante uso de dentifrício fluoretado contendo arginina, o delineamento adotado pelos pesquisadores não permite excluir o efeito da orientação de higiene e supervisão de escovação, recebidos pelos pacientes. Além disso, o mal desempenho do dentifrício fluoretado convencional na redução do incremento de cárie pode ter sido devido ao uso de dentifrícios de baixa concentração de flúor (250ppm F) pelas crianças além de carência de orientação quanto à uma correta higiene bucal.

Li et al. (2015a), fizeram um estudo randomizado, duplo cego, com 5.500 crianças, na Província de Sichuan na China, que também teve por objetivo comparar o efeito anti-cárie de dentifrícios fluoretados (1450 ppm F) contendo ou não arginina (1,5%). Após os dois anos de uso dos dentifrícios, o incremento de cárie no grupo que usou dentifrício com arginina foi 20,5% (para CPOD) e 19,6% (para CPOS) menor quando comparado com o grupo que usou dentifrício fluoretado sem arginina. A

relevância clínica dessa redução no desenvolvimento de cárie também tem sido questionada, uma vez que, embora as porcentagens de redução nos índices acima sejam significativas, a diferença entre os grupos foi menor do que 1 dente ou superfície acometidos por cárie.

Algumas revisões sistemáticas feitas por Li et al. (2015b) e Astvaldsdottir et al. (2016), discutem que apesar dos estudos clínicos terem mostrado efeito superior do dentifrício fluoretado contendo arginina, o nível de evidência ainda é considerado baixo. Muitos autores das pesquisas feitas até agora fazem parte do corpo de pesquisadores da empresa que detém a patente do produto. Em razão disso, torna-se indispensável, um maior número de estudos sobre a arginina no controle da doença cárie, com menor dependência de interesses comerciais e que sejam delineados de forma independente. Os autores discutem que os dentifrícios com arginina possuem um custo de cerca de 40% superior em relação ao dentifrício que não possui esse aminoácido na sua composição (Li et al., 2015b; Astvaldsdottir et al., 2016). Além disso, ressalta-se que não é adequado do ponto de vista metodológico e ético realizar estudos nos quais dentifrício não fluoretado (placebo), seja utilizado como controle como verificado nos estudos de Yin et al. (2013) e de Hu et al. (2013).

Apesar do nível de evidência fornecido por estudos *in situ* ser menor quando comparado aos estudos clínicos controlados e randomizados, os estudos *in situ* permitem que fatores relacionados ao desenvolvimento da lesão de cárie sejam estudados de forma mais controlada. Nesse sentido, um estudo *in situ* recentemente realizado por Sanchez et al. (2018), avaliou o papel do dentifrício fluoretado contendo arginina na inibição da desmineralização do esmalte dental. Nesse estudo, voluntários utilizaram dispositivo intrabucal palatino contendo blocos de esmalte dental bovino por 14 dias, sobre os quais solução de sacarose era gotejada com frequência de 4 ou 8x/dia. Mesmo em condições de elevado desafio cariogênico de exposição à sacarose (8x/dia), simulando indivíduos com alto risco de desenvolvimento de cárie dental, o potencial de inibição da desmineralização do esmalte dental foi semelhante entre os dentifrícios fluoretados contendo ou não arginina (Sanchez et al., 2018). Ainda, torna-se necessário esclarecer se este dentifrício contendo arginina apresenta efeito benéfico em termos de ativar a remineralização do esmalte dental.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na remineralização de lesões artificiais de cárie em esmalte e na composição bioquímica do biofilme dental formado *in situ* por um período de 14 dias quando comparado ao dentifrício fluoretado convencional sem arginina.

Objetivos específicos

- Avaliar se a presença de arginina no dentifrício fluoretado interfere no processo de remineralização da lesão artificial de cárie em esmalte, em termos de recuperação da dureza de superfície e do perfil mineral em comparação ao dentifrício fluoretado convencional;
- Avaliar se a presença de arginina no dentifrício fluoretado interfere na composição bioquímica do biofilme dental, em termos de concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, em comparação ao dentifrício fluoretado convencional;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

“Effect of arginine-containing fluoridated dentifrice on the remineralization of enamel artificial carious-like lesion and on the biochemical composition of biofilm formed *in situ*”

Declaration of interests

The authors declare they do not have any conflict of interests

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of arginine-containing fluoridated dentifrice (AFD) on the remineralization of enamel artificial carious-like lesion and on the biochemical composition of biofilm formed *in situ* and compare its effect with regular fluoridated dentifrice (FD). In a crossed-over, double-blind (with respect to the use of AFD or FD) *in situ* study conducted during two experimental phases of 14 days each, sixteen adults volunteers were randomized in relation to the use of both AFD and FD 3x/day in a 2-months pre-experimental phase. Volunteers were then asked to wear an intraoral palatal appliance containing 4 blocks of bovine dental enamel with artificial carious lesion (2 blocks on each side of the device, being one of each side with known percentage of surface hardness change). They were instructed to remove the appliances from the oral cavity and drip 2 drops of 20% sucrose solution and suspension of dentifrices at pre-determined times 3x/day. At the end of the first *in situ* phase and considering a crossed-over design, volunteers were asked to brush their teeth 3x/day with a different dentifrice (FD or AFD) according to the randomization done at the beginning of the study. A second 14-days *in situ* phase began and sucrose solution and dentifrice suspensions were dripped onto a new subset of enamel blocks as described above. At the end of each *in situ* phase, biofilms formed onto enamel blocks were collected and processed for quantification of insoluble extracellular polysaccharide (IEPS) and total microorganisms (TM) counts. Enamel blocks were subjected to hardness analysis to assess the effect of treatments on carious lesion reversal in terms of percentage of surface hardness recovery (%SHR) and qualitatively analyzed by transversal microradiography (TMR). The results were analyzed using the Generalized Estimation Equation (GEE) at 5% significance level. Biomass (mg), TM CFU (colony forming units counts) and %SHR for FD (30.5±5.9; 6.4±0.2; 24.1±4.2) were not statistically different compared to AFD (36.6±8.5; 5.8±0.5; 26.8±4.2) (median±se; $p>0.05$). The IEPS concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in the presence of FD (71.6±14.2) was statistically higher than in the presence of AFD (43.7±12.6) ($p=0.044$). TMR analysis suggest similar pattern of remineralization for both FD and AFD groups. The data of the present *in situ* study suggest that there is no difference on remineralization of enamel artificial carious lesions between AFD and FD, but biochemical composition of biofilms may be changed in the presence of AFD.

Keywords: Dentifrice, Fluoride, Arginine, Dental caries, Dental enamel, Remineralization.

Introduction

Fluoride is the main therapeutic agent able to efficiently reverse carious lesion by activating the phenomenon of remineralization that leads to deposition of calcium/phosphate-rich minerals on tooth surface (Cury & Tenuta, 2010; Marinho, 2009). This effect is enhanced when fluoride is kept at constant levels in the oral cavity (Tenuta & Cury, 2008). One of the most important strategies to maintain saliva and dental biofilm supersaturated with fluoride is by using fluoridated dentifrice (FD) daily. This way, FD has been considered as one of the main reasons for the decline of dental caries worldwide (Marinho, 2009). This anti-caries effect of FD is optimized when fluoride concentration is not lower than 1,000 ppm (Walsh et al., 2010).

Recently, new compounds have been aggregated to FD in an attempt to enhance its anti-caries effect (Fontana, 2016). Among them, 1.5% arginine (associated with insoluble calcium) has been claimed as a promising compound for caries control (Cummins, 2013), considering a buffering effect exerted on dental biofilm by its degradation into ammonia by enzymatic activity of arginolytic oral bacteria (Burne et al., 2000). Ammonia may act as an acceptor of hydrogen ions controlling biofilm acidity. This way, it has been suggested that caries status may be related to the fitness of oral bacteria in producing ammonia through urea and/or arginine (Nascimento et al., 2009; 2013). However, the superiority of the anti-caries effect of arginine-containing fluoridated dentifrices (AFD) is still questionable (Astvaldsdottir et al., 2016; Li et al., 2015a).

Long-term studies have suggested that regular use of AFD may reduce caries increment in comparison with regular FD use, although, it seems that differences between experimental groups are too small to represent any clinical benefit in terms of carious lesion reversal and control (Li et al., 2015b; Kraivaphan et al., 2015). Yet, a recent *in situ* study evaluated the anti-caries effect of AFD and FD on a group of individuals that were exposed extra-orally to different frequencies of exposure to sucrose solution (4 and 8x/day) resembling distinct cariogenic challenges. Although biofilms formed in the presence of AFD presented lower concentration of insoluble extracellular polysaccharides (IEPS), no additional anti-caries effect of AFD was found over FD use, suggesting that under a medium to high cariogenic challenge the possible buffering effect of arginine is overcome making it unable to reduce enamel demineralization (Sanchez et al., 2018). In this scenario, and although no benefit had been found in terms

of reduction of demineralization, it is still unclear whether arginine is able to effectively enhance remineralization of carious lesions.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of AFD on the remineralization of enamel artificial carious-like lesion and on the biochemical composition of biofilm formed *in situ* and compare its effect with regular FD. The null-hypothesis was that the incorporation of arginine to an FD does improve its remineralization efficacy compared to a regular FD. Additionally, it is also hypothesized that biofilms formed in the presence of AFD possess lower IEPS concentration than biofilms formed in the presence of FD.

Material and Methods

Subjects

Sixteen adults volunteers (mean age of 22.8 years, range 20-37) resident in an area supplied with fluoridated water (0.7 ppm F) were recruited at Dental School of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The included volunteers presented good general and dental health, no use of orthodontic appliances, and no antibiotic use for the last 2 months prior to this study. The study protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CAAE 72377317.3.0000.5347). Written informed consent was obtained from all subjects prior to the start of the study in accordance with the Declaration of Helsinki. A sample size calculation was performed based on a previous study (Nobrega et al. 2016) considering a power of 80% and a confidence interval of 95%. A sample size of 13 individuals per group was considered necessary to account for a 25% of difference between the tested dentifrices regarding the percentage of surface hardness change and the sample was increased by 20% to account for any loss during the experimental period.

Experimental Design

This was a crossed-over, double-blind (with respect to the use of AFD or FD) *in situ* study conducted during two experimental phases of 14 days each. Two months before the start of the first experimental *in situ* phase, at the pre-experimental phase, volunteers were randomized in relation to the type of dentifrice [(FD - Colgate Máxima Proteção Anticáries; 1,450 ppm F/MFP; calcium carbonate, aqua, glycerin, sodium lauryl sulfate,

cellulose gum, tetrasodium pyrophosphate, sodium bicarbonate, benzyl alcohol, sodium saccharin, sodium hydroxide; lot No. 8075BR123J; Colgate-Palmolive Industrial LTDA, Brazil) or (FD containing 1.5% arginine - AFD; Colgate Máxima Proteção Anticáries mais Neutraçúcar; 1,450 ppm F/MFP; calcium carbonate, aqua, glycerin, sodium lauryl sulfate, cellulose gum, tetrasodium pyrophosphate, sodium bicarbonate, benzyl alcohol, sodium saccharin, sodium hydroxide, titanium dioxide; lot No. 7349BR123G; Colgate-Palmolive Industrial)] that had to be used during the following 2 months 3x/day. Dentifrices were previously sealed with silver tape and codified by one of the researchers (RAA) in order to assure blinding for volunteers and for the examiner. The volunteers then wore an intraoral palatal appliance containing 4 blocks of bovine dental enamel with artificial carious lesion (2 blocks on each side of the device, being one of each side with known percentage of surface hardness change after the induction of the artificial carious lesion; the second enamel block of each side also presented carious lesions, but they did not qualify for the experimental phases since their percentage of surface hardness change was out of the accepted one; nevertheless, they were included in the appliances providing an additional site for biofilm formation). Volunteers were instructed to remove the appliances from the oral cavity and drip 2 drops of 20% sucrose solution on each set of 2 enamel slabs 3x/day. They were also instructed to drip 2 drops of assigned dentifrice suspension (according to pre-experimental phase) onto enamel blocks during regular toothbrushing times (set as 3x/day). Volunteers were instructed to wear the appliances throughout the day and night, and to remove them only during sucrose/dentifrice suspension exposure, meals, drinking, and oral care. Sucrose exposure and dentifrice suspensions were applied extra-orally at pre-determined times, and the excess of fluid was removed with a cotton swab. The appliances were kept in plastic boxes with humid gauze to maintain a humid atmosphere during 5 min and then they were inserted back into the participant's mouth. At the end of the first *in situ* phase and considering a crossed-over design, volunteers were asked to brush their teeth 3x/day with a different dentifrice (FD or AFD) according to the randomization done at the beginning of the study. A second 14-days *in situ* phase began and sucrose solution and dentifrice suspensions were dripped onto a new subset of enamel blocks as described for the first experimental phase. At the end of each *in situ* phase, biofilm formed onto enamel blocks were collected and processed for quantification of IEPS and total microorganisms counts. Enamel blocks were subjected

to hardness analysis and transversal microradiography to assess the effect of treatments on carious lesion reversal. All analyzes were carried out by a blinded examiner.

Bovine enamel specimens and appliance preparation

Bovine enamel blocks (6mm diameter x 2mm thick) were prepared using a saw-cup drill bit (Model J722, Black Jack® - Brazil) adapted to a bench drill (Model FB13, Schulz®). In order to obtain a block of enamel with 2 mm of height and with greater possible area of flat enamel, first the dentin portion of the block was planned. To do this, the largest area of enamel was fixed with sticky wax against the surface of a pre-made acrylic resin disc (3 cm x 8 mm). The dentin was planned using 320-grit sandpaper (CARBIMET® Paper Discs - BUEHLER®) under constant water-cooling in a polishing machine (AROTEC® APL-4). After dentin planification, the block was detached from the acrylic disk and then fixed back to the center of the disk with the surface of the dentin facing the acrylic. The surface of the dental enamel was then abraded with 600-grit sandpaper (CARBIMET® Paper Discs - BUEHLER®) and polished with 1200-grit sandpaper (CARBIMET® Paper Discs - BUEHLER®) under constant water-cooling. Diamond paste (Diamond Excel® - FGM - BRASIL) was used at the last polishing cycle. Finally, the enamel blocks were washed in deionized water and stored in closed plastic containers with 100% humidity, in a refrigerator at 4°C (Sanchez et al., 2018). All enamel blocks were measured with digital caliper (Digital Digimess® Stainless Steel) and presented a thickness of approximately 2 mm.

Determination of the Initial Surface Microhardness and Selection of Enamel Blocks

In order to determine the surface microhardness of the enamel blocks, five indentations were placed on the center of each block being 1000 µm above the upper edge and 1500 µm to the right of the left edge of the block. A Knoop indenter (Shimadzu, Japan) was applied with a 50-g load for 10 seconds onto the surface of enamel blocks and indentations were separated from each other by a distance of 100 µm. Hardness values were averaged for each block and 151 enamel blocks (with a mean of baseline hardness of $340.82 \pm 42.5 \text{ kg/mm}^2$) were selected for the induction of artificial carious lesions.

Induction of artificial carious lesion in enamel blocks

Prior to induction of caries lesion, an area of approximately 2 mm^2 of the surface of the enamel blocks was coated with acid-resistant nail varnish in order to maintain an area of

non-exposed surface. The blocks were then individually attached to orthodontic wires using sticky wax leaving only the surface of enamel exposed and each wire was individually attached to the lid of 50 mL plastic tubes. Enamel blocks remained in acetate buffer solution 0.05 mol/ L, pH 5.0, containing 1.28 mmol/L calcium, 0.74 mmol/L phosphorus and 0.03 µg F/ml for 24 hours at 37°C (modified from Queiroz et al., 2008 and Nobrega et al., 2016) in a proportion of 2 mL of solution for each mm² of exposed enamel area.

Determination of Surface Microhardness after inducing artificial carious lesions and Selection of Blocks for in situ experimental phases.

The surface hardness of the enamel blocks was again assessed as described above by means of five new indentations distant 100 µm from each other and placed 100 µm to the right of the baseline indentations. Hardness values were averaged for each block and the percentage of surface microhardness change (% SMC) was calculated for each block according to a predetermined formula (Cury et al., 2001): %SMC = ((CI – IS)/IS) X 100, being IS = baseline surface microhardness and CI = microhardness after artificial carious lesion induction. Eighty-four enamel blocks were then selected based on %SMC (89.36 ± 4.85). A second area of approximately 2 mm² of the surface of the enamel blocks was coated with acid-resistant nail varnish in order to protect the demineralized area from the *in situ* experimental phases. These enamel blocks were then randomized to the study volunteers using a table of random numbers.

Preparation of Palatal Intraoral Devices

Colorless acrylic intraoral palatal appliances containing one lateral cavity at each side (14 × 8 × 2 mm) were prepared for each volunteer for each experimental phase. Four enamel blocks with artificial carious lesions were placed inside each cavity, one being at each side with known %SMC. Plastic meshes were fixed over the cavities to protect the enamel blocks' surfaces from mechanical attrition, leaving a 1-mm space for the accumulation of dental biofilm.

Sucrose solution and dentifrice suspension preparation

Sucrose (S) and dentifrice (D) solutions were prepared daily and given to volunteers in opaque dropper bottles coded as "S" (for sucrose solution) and as "X" or "Y" (respective

to the assigned dentifrice used in each experimental phase), respectively. Dentifrice solutions were prepared by diluting dentifrice in distilled water (1:3 w/v) under constant stirring for 10 min at room temperature.

Biofilm analysis

At the end of each *in situ* experimental phase, approximately 12 h after the last exposure to the sucrose solution, the plastic mesh over the blocks was removed, all the biofilm formed at each side of the appliance over the two enamel blocks was collected with a sterile curette, pooled, and immediately transferred to coded, preweighed sterile microtubes, and weighed to determine the biomass (mg) of each tested condition.

Microbiological Analysis of Dental Biofilm

An aliquot of 1mg of wet biofilm was suspended in 1 ml of sterile saline solution (NaCl 0.9%) and sonicated, and the microbial suspension was serially diluted and inoculated in duplicate via the Westergreen technique into brain and heart infusion agar plates (Kasvi, Curitiba, Brazil) supplemented with 5% of sheep blood for agar, for growth of total microorganisms (TM) (Sanchez et al., 2018). Agar plates were incubated under microaerophilic conditions at 37°C for 48 h. The number of colony forming units (CFU) on each agar plate was then determined using a stereomicroscope (Olympus SZ51; Tokyo, Japan) and the results were expressed as CFU (colony forming unit) per milligram of wet biofilm weight

Biochemical Analysis of Dental Biofilm

After dehydration of phosphorus pentoxide (P₂O₅), the biofilm dry weight was determined (± 0.01 mg, Sartorius BP 210D; Sartorius, Gottingen, Germany) and then biofilms were individually resuspended in 0.5 M hydrochloric acid (HCl) in a proportion of 0.1 mL/mg dry biofilm weight and kept under constant agitation for 3 h at room temperature. After centrifugation, sodium hydroxide solution (1.0 M) was added to the precipitate in a proportion of 0.2 mL/mg of dry biofilm weight and kept under constant agitation for 3 h at room temperature. Samples were centrifuged and the supernatant was collected for the determination of IEPS (Dubois et al., 1956). Results were expressed as μg of IEPS/mg of dry biofilm.

Determination of the percentage of enamel surface hardness recovery (%SHR)

At the end of both experimental phases, those enamel blocks that had known %SMC had their surface hardness re-assessed. Five indentations, distant 100 µm from each other were placed 100 µm far from the left of the previous indentations (after inducing carious lesions). Indentations were performed with 50g load, for 10 seconds. As described above, the hardness values of each block was averaged and the percentage of surface hardness recovery (%SHR) for each block was calculated following the formula (Cury et al., 2005): $\%SHR = ((FS - CI) / (IS - CI)) \times 100$, being FS: surface microhardness at the end of *in situ* phase, CI: Surface microhardness after induction of carious lesion and IS: baseline surface microhardness.

Transversal microradiography (TMR)

After the determination of %SHR, all enamel blocks were sectioned through the center with a low-speed diamond saw (Isomer; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), perpendicularly to the surface and transversally to the varnish strip, in order to obtain slices approximately 150 µm thick representing both exposed and unexposed (sound) enamel surfaces. Slices were then hand polished plane-parallel from both cut sides with 600 and 1200 grit sandpapers to a thickness of approximately 100 µm. Specimens were mounted in a custom-made sample-holder with an aluminium calibration step wedge with 14 steps. Microradiographs were taken with an X-ray generator (Softex Co. Ltd., Ebina, Japan) on a high precision glass plate (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan) at a distance of 42 cm using 20 kV and 20 mA for 13 minutes. Plates were developed for 5 min, rinsed with deionized water and fixed for 8 min in a dark room at 20 °C. All plates were then washed in running water for 10 min and air-dried. Microradiographs were examined using a microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, TH, Germany) in conjunction with a camera (Canon, Tokyo, Japan) and a computer running data-acquisition and calculation software programs (Inspektor Research Inc., Amsterdam, NH, Netherlands) (Sanchez et al., 2018).

Statistical Analysis

The mean, median, standard error, confidence intervals and 25th and 75th quartiles for each outcome (% SHR, biofilm weight, total microorganisms count and µgEPS/mg dry biofilm) were calculated in each of the tested conditions and statistically analyzed. The

total microorganisms data were transformed into logarithm (Log CFU/mg) All outcomes were analyzed using the Generalized Estimation Equation (GEE). Statistical Package for Social Science v.18 (SPSS, PASW Statistics for Windows, SPSS inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis and the level of significance was 5%. All analyses were done on volunteer basis. Data of TMR were qualitatively described.

Results

Volunteer recruitment was carried out in January/February 2018 and experimental phases were carried out from March to August 2018. Fourteen out of 16 enrolled volunteers completed this study. One subject dropped out during the first *in situ* phase and one subject dropped out during the wash-out period both because they underwent antibiotic use.

From the Table presented below, it can be observed that no statistical difference was found in the comparison between FD and AFD for biofilm biomass, counts of TM and for %SHR ($p=0.341$, $p=0.293$ and $p=0.163$, respectively). Unlike the other outcomes, concentration of IEPS was statistically lower in the presence of AFD when compared to FD ($p=0.044$).

Table 1. Biomass, counts of total microorganisms (TM), insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) in the biofilm and percentage of surface hardness recovery (% SHR) in enamel blocks according to the type of dentifrice:

Variables	Type of dentifrice								$p \leq 0,05$
	FD				AFD				
	Mean (SE)	Median (quartile 25 ^o /75 ^o)	95% CI	n	Mean (SE)	Median (quartile 25 ^o /75 ^o)	95% CI	n	
Biomass (mg)	30,55 (5,96)	27,61 (12,12/40,38)	(17,68 - 43,43)	14	36,69 (8,51)	29,47 (8,28/70,58)	(18,30 - 55,08)	14	$p=0,341$
TM (log CFU/mg)	6,46 (0,21)	6,85 (6,14/7,03)	(6,01 - 6,91)	13	5,88 (0,51)	6,26 (5,63 - 6,93)	(4,79 - 6,97)	14	$p=0,293$
IEPS (ug/mg)*	71,64 (14,19)	60,59 (28,98/106,97)	(40,99 - 102,28)	14	43,68 (12,62)	23,98 (11,62-64,78)	(16,19 - 71,18)	13	$p=0,044^*$
%SHR	24,09 (4,25)	19,64 (10,33-42,12)	(14,91 - 33,27)	14	26,82 (4,25)	20,56 (13,12/41,96)	(16,98 - 36,67)	14	$p=0,163$

CI: Wald Confidence Interval (95%); $p \leq 0.05$; FD: Conventional Fluoridated Dentifrice; AFD: Arginine-containing Fluoridated Dentifrice. *statistical difference in the comparison between FD and AFD.

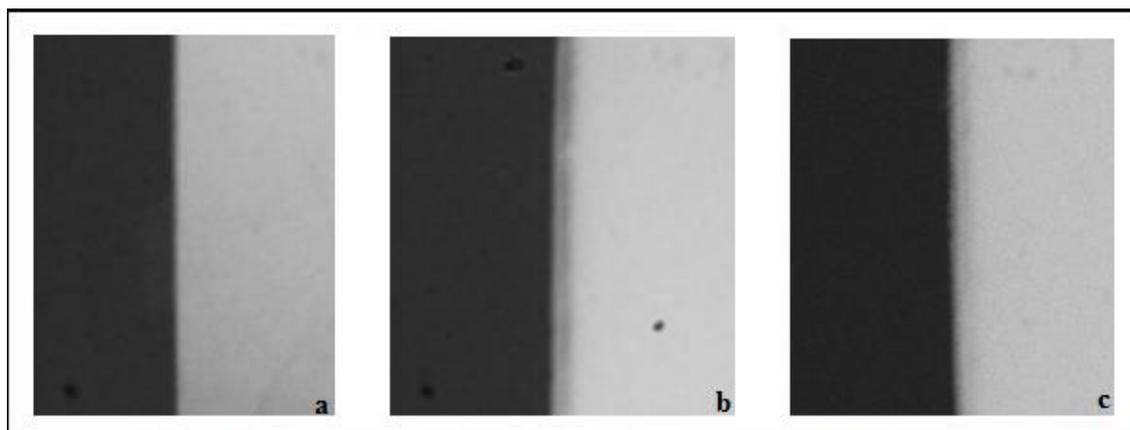


Fig. 1. Mineral profile blocks in the presence of FD, obtained by TMR.
a) sound enamel area; b) artificial demineralized area; c) demineralized-remineralized *in situ* area.

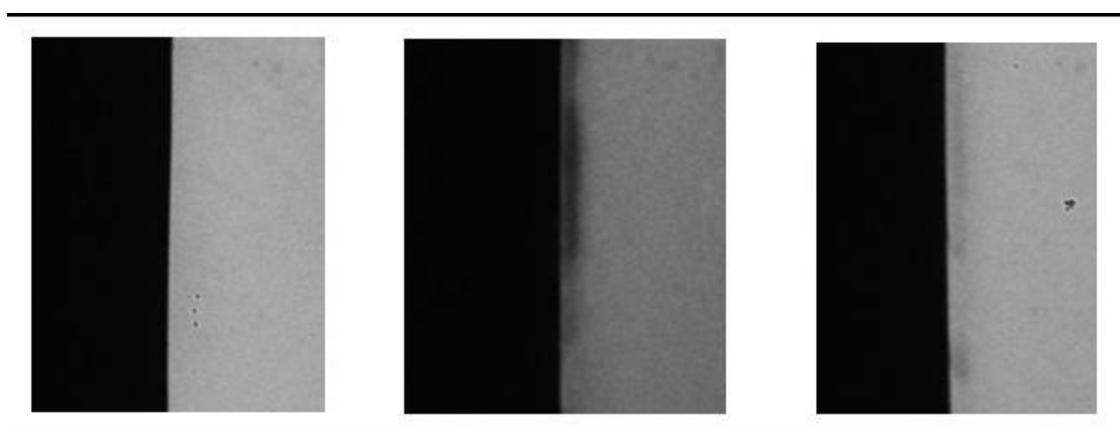


Fig.2. Mineral profile of enamel blocks in the presence of AFD, obtained by TMR.
a) sound enamel area; b) artificial demineralized area; c) demineralized-remineralized *in situ* area.

Most of samples were lost during slicing preparation due to the increased porosity of enamel induced both by the artificial carious lesion (up to 90% of SMC) and by the *in situ* phases. Based on 6 enamel blocks (2 from AFD and 4 from FD) it was observed that integrated mineral loss of demineralized area (after inducing artificial carious lesion) was statistically higher ($1,555 \pm 425.24$) than those observed on the remineralized area ($1,090.83 \pm 408.12$) ($p=0.02$). From a qualitative analysis of the images obtained using the Transversal Microradiography (TMR), it is possible to observe the presence of artificial subsurface carious lesion (Fig. 1b and Fig.2b). Qualitative analysis suggests no difference in the remineralized area when FD is compared to AFD (Fig.1c and Fig.2c)

Discussion

Previous *in situ* study found that both AFD and FD present the same potential for inhibiting enamel demineralization under a moderate to high cariogenic conditions induced by different exposure to sucrose solution (Sanchez et al., 2018). Those authors acknowledged then that the cariogenic challenge imposed to biofilms may have overcome any buffering effect played by arginine. In this present study, no additional effect of AFD was also found even considering that biofilms were subjected to a lower frequency of exposure to sucrose. The extent of remineralization found in the present study was similar between both tested dentifrices (Table 1).

One may argue the lack of differences between AFD and FD might be due to the fact that the *in situ* model used in this study might not be adequate for assessing remineralization taking into account it is based on a palatal appliance that favors demineralization processes. Alternatively, mandibular partial appliances have been suggested as the better choice for the assessment of the remineralization process since they may keep teeth in constant contact with saliva with enhances remineralization (Hara et al., 2003). Moreover, frequent mechanical removal of biofilm out of enamel blocks during the experimental *in situ* phases would also be desirable to favor remineralization. Although we cannot disregard that the chosen model might have posed the enamel carious lesions to a more intense demineralization while also subjected to remineralization provided by the tested dentifrices, it is important to emphasize that it represents a condition of a caries-active subject that presents non-cavitated enamel lesions and that continue to be exposed to cariogenic challenge with an inadequate biofilm mechanical control.

Our data show that in caries active subjects that are kept under a risk for caries development (frequent exposure to sucrose and lack of mechanical biofilm control), both tested dentifrices presents the same remineralization effect. The present *in situ* model though represents the worst scenario in which fluoride/arginine would act to partially reverse mineral loss. The range of %SHR found in the present study for FD is similar to that found by Nobrega et al. (2016) using the same *in situ* model.

Several clinical studies have suggested that AFD present superior effect reversing non-cavitated carious lesions when compared to regular use of FD (Li et al., 2015a; Kraivaphan et al., 2013; Srisilapanan et al., 2013; Yin et al., 2013). This better effect of

AFD over FD in a 6-months period of time has been supported based on changes on carious lesions volume assessed by quantitative-light induced fluorescence methods, which detect small mineral changes at the ultrastructural level (Srisilapanan et al., 2013; Yin et al., 2013). Despite the fact that those differences were statistically significant, they may not present any clinical relevance. Yet, it is important to emphasize that the size effect found for the 2-years long-term studies (Kraivaphan et al., 2013; Li et al., 2015a) was also small since differences in caries increment between groups that used AFD and FD was lower than one tooth or one surface affected by caries over the studied period (being the increment around 0.12 for DMFT and 0.15 for DMFS). The data of the present *in situ* study suggest that there is no difference on remineralization of enamel carious lesions between AFD and FD once no difference was observed under the experimental conditions.

In an attempt to clarify the effect of both FD and AFD on mineral profile of enamel carious lesions, enamel blocks were prepared to TMR analysis. However, most of samples were lost during slicing preparation due to the increased porosity of enamel induced both by the artificial carious lesion (up to 90% of SMC) and by the *in situ* phases which enables us to perform quantitative analysis comparing both treatments. But, based on 6 enamel blocks (2 from AFD and 4 from FD) we found an increased mineral content on the remineralized area compared to the demineralized area supporting that this *in situ* model is appropriate to assess remineralization. Qualitative analysis suggests no differences between both dentifrices (Figure 1).

The present study also confirms previous data showing that biofilm formed in the presence of arginine presents lower IEPS concentration (He et al. 2016; Sanchez et al., 2018). IEPS increase porosity of biofilm matrix and act as scaffolds for microbial growth while promoting microbial adherence to dental surface (Bowen & Koo, 2011; Dibdin & Shellis, 1988). The importance of IEPS for the increase of the cariogenic potential of biofilms is unquestionable and studies have shown that the higher the IEPS biofilm concentration, the more severe is carious lesion development (Sanchez et al., 2018; Rezende et al., 2017; and others). However, although biofilms formed in the presence of AFD presented lower IEPS concentration, it did not decrease the cariogenic potential of the biofilms in a way to enhance the remineralization process. As hypothesized by Sanchez et al. (2018) it may be possible that the present reduction on IEPS concentration had not been important enough to change biofilm cariogenic

potential under the experimental conditions. However, the reduction in IEPS concentration in the presence of AFD compared to FD could explain the small differences found in the clinical studies.

It has also been suggested that frequent use of AFD may induce microbial changes on oral cavity leading to the selection of a healthier microbial community such as arginolytic bacterial species *S. sanguinis* and *S. gordonii* that may neutralize acids produced by acidogenic microorganisms (Nascimento et al., 2014). Besides, after 4 weeks of regular use of AFD the arginine-deiminase system (the enzymatic system responsible for the degrading arginine into ammonia) is expressed at the highest rate (Nascimento et al., 2014). Since the volunteers of this present *in situ* study used AFD for 2 months before the *in situ* phase, it is likely that enzymatic system had been activated by then. However, under the present tested conditions it does not seem that such microbial changes were great enough to modulates the cariogenicity of formed biofilms or to enhance remineralization process.

Conclusion

The data of the present *in situ* study suggest that there is no difference on remineralization of enamel artificial carious lesions between AFD and FD, but biochemical composition of biofilms may be changed in the presence of AFD.

Acknowledgment

The authors would like to thank the volunteers for their valuable participation in this study. Thanks also go to CAPES, which conceived a scholarship to MELP, and to the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS/BIC), from which ARL received a scholarship during her under graduation course in Dentistry.

References

1. 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
2. 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.

3. Burne Robert A & Marquis Robert E. Alkali Production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 103: 1-6.
4. 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.* 2013; 24(A:A): 1-14.
5. Cury JA, Tenuta LMA. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. *Adv. Dent. Res.* (2008); 20:13-16.
6. 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.
7. 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.
8. Fontana M, Guzmán-Armstrong S, Schenkel AB, Allen KL, Featherstone J, Goolsby S, Kanjirath P, Kolker J, Martignon S, Pitts N, Schulte A, Slayton RL, Young D, Wolff M. Development of a Core Curriculum Framework in Cariology for U.S. Dental Schools. *J Dent Educ.* 2016;80(6):705-20.
9. Hara AT, Turssi CP, Teixeira EC, Serra MC, Cury JA. Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(5): 423-7.
10. 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.
11. 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.
12. 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* 2015b;26:7-12.
13. 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* 2015a;49:606-617.
14. Marinho VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* 2010; 10(3):183-91.
15. 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 (2):89-95.

16. Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, Primosch RE, Burne RA. Oral Arginine Metabolism May Decrease the Risk for Dental Caries in Children. *Dent Res.* 2013; 92(7):604-608.
17. Nascimento MM, Browngardt C, Xiaohui X, Klepac-Ceraj V, Paster BJ and Burne RA. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol* 2014;29:45–54.
18. Nóbrega DF, Fernández CE, Del Bel Cury AA, Tenuta MAL, Cury JA. Frequency of Fluoride Dentifrice Use and Caries Lesions Inhibition and Repair. *Caries Res* 2016;50:133–140.
19. Queiroz SC, Hara TA, Paes Leme FA, Cury JA. pH-Cycling Models to Evaluate the Effect of Low Fluoride Dentifrice on Enamel De- and Remineralization. *Braz Dent J* (2008) 19(1): 21-27.
20. Rezende G, Arthur RA, Grando D, Hashizume NL. Cariogenic Potencial of Sucrose Associated with Maltodextrin on Dental Enamel. *Caries Res* 2017;51:129–135.
21. Sanchez YA, De Oliveira LC, Negrini CT, Hashizume NL, Hara TA, Maltz M, Arthur AR. In situ Effect of Arginine-Containing Dentifrice on Plaque Composition and on Enamel Demineralization under Distinct Cariogenic Conditions. *Caries Res.* 2018;52: 588-597.
22. 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.
23. 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* 2013(a);41: 22-28.
24. 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 (Review). *The Cochrane Collaboration* 2010: 1-223.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo *in situ* sugerem que num período de 14 dias de exposição à sacarose 3x/dia o potencial remineralizador do dentifrício fluoretado contendo arginina em relação à lesão cáriosa artificial em esmalte é semelhante ao do dentifrício fluoretado convencional sem arginina. Encontrou-se também que o biofilme formado na presença do dentifrício fluoretado contendo arginina apresenta menor concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

5. 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.

ANDERSON, M. Risk Assessment And Epidemiology Of Dental Caries: Review Of The Literature. **Pediatr Dent.**, v. 24, n.5, p. 377-385, 2002.

ARMPFIELD, M. J.; SPENCER, A. J.; ROBERTS-THOMSON, K. F.; PLASTOW, K. Water Fluoridation And Association With Sugar-Sweetened Beverage Consumption and Dental Caries In Australian Children. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 3, p. 494-500, 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.

BASTING, R. T.; PEREIRA, A. C.; MENEGHIM, M. C. Evaluation of Dental Caries Prevalence in Students from Piracicaba, SP, Brazil, After 25 Years of Fluoridation of the Public Water Supply. **Rev. Odontol.**, v.11, n.4, p. 287-292, 1997.

BJORN DAL, L. e MJÖR, I. A. Dental Caries: Characteristics Of Lesions And Pulpal Reactions. **Pulp-dentin biology in restorative dentistry**, p. 55-75, 2002.

BOWEN, W.; KOO, H.: Biology of *Streptococcus mutans* Derived Glucosyltransferases: Role In Extracellular Matrix Biofilm Formation Of Cariogenic Biofilms. **Caries Res.**, v.45, p. 69-86, 2011.

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.

CAULFIELD, P.W.; CUTTER G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial Aquisicion of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. **J. Dent Res.**, v.72, n.1, p. 37 -44, 1993.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; TABCHOURY, C.P.; TENUTA, L.M.; DEL BEL CURY, A.A.; VALE, G.C.; 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.

CHAKRABORTY, B. e BURNE, R.A. Effects Of Arginine On Growth, Virulence Gene Expression, And Sress Tolerance By *Streptococcus Mutans*. **Am Soc Microbiol**. Manuscript Aceptt., p.1-47, 2017.

CORREIA, M. F.; TENUTA, L.M.A; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Mineral Ions in the Fluid of Biofilms Formed on Enamel and Dentine Shortly after Sugar Challenge. **Caries Res.**, v.46, p. 408-412, 2012.

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.

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, 2008.

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.

DOS ANJOS, S.A.G e FERNANDES, F.G. Fluoretação Das Águas De Abastecimento Público No Estado Do Pernambuco: Um Resgate Histórico. **Odont Clín-Cient.**, v.14, n.1, p. 559-564, 2015.

DUSCHNER, H.; GÖTZ, H.; OGGARD, B. Fluoride-induced Precipitates on Enamel Surface and Subsurface Areas Visualised by Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy. **Eu J Oral Sci.**, v.105, n.5-pt.2, p.466-472, 1997.

FEATHERSTONE, J.D.B. The Science and Practice of Caries Prevention. **JADA.**, v. 103, p.887-899, 2000.

FEATHERSTONE, J.D.B. The Continuum of Dental Caries – Evidence for a Dynamic Disease Process. **J Dent Res.**, v.83, Spec Iss C, p. C39-C42, 2004.

FEATHERSTONE, J.D. Prevention and Reversal of Dental Caries: Role of Low Level Fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol.**,v. 27, p.31-40, 1999.

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.

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.

HU, D.W.; YIN, W.; FENG, Y.; ZHANG, Y.P.; CUMMINS, D.; MATEO, L.R.; ELLWOOD, R.P. A Clinical Investigation of the Efficacy of a Dentifrice Containing 1.5% Arginine and 1.450 ppm Fluoride, as Sodium Monofluorophosphate in a Calcium Base, on Primary Root Caries. **J Clin Dent.**, v.24, Spec Iss A, p. A23-A31, 2013.

HUANG, X.; EXTERKATE, R.A.M.; TEN CATE, J.M. Factors Associated With Alkali Production from Arginine in Dental Biofilms. **J Dent Res.**, v.91, n.12, p.1130-1134, 2012.

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.; AMORNCHAT, C.; TRIRATANA, T.; MATEO, L.R.; ELWOOD, R.; CUMMINS, D.; DEVIZIO, W.; ZHANG, P.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.**, vol. 47, p. 582 – 590, 2013.

LI, X.; ZHONG, Y.; JIANG, X.; HU DEYU; MATEO, L.R.; MORRISON, B.M. Jr; ZHANG, Y.P. Randomized Clinical Trial of the Efficacy of Dentifrices Containing 1.5% Arginine an Insoluble Calcium Compound and 1.450 ppm Fluoride Over TwoYears. **J Clin Dent.**, v.26, n.1, p. 7-12, 2015a.

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, 2015b.

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.

LOESCHE, J.W. Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. **Microbiol Rev.**, v.50, n.4, p. 353-380, 1986.

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. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. **Adv Dent Res.**, v.8, n.4, p. 263-271, 1994.

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, 2009.

MOYNIHAN, P.J. e KELLY, S.A.M. Effect of Caries of Restrict Sugars Intake: Systematic Review to Inform WHO Guidelines. **J Dent Res.**, v.93, n.1, p. 8-18, 2014.

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.

NARVAI, P.C. Cárie Dentária e Flúor: Uma Relação do Século XX. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.5, n.2, p. 381-392, 2000.

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.

PECHKAN, S. e AWOFOESO, N. Water Fluoridation: A Critical Review of the Physiological Effects of Ingested Fluoride as a Public Health Intervention. *The Scientific World Journal*, v. 1, p. 1-10, 2014.

PETERSEN, P.E.; HUNSRISAKHUN, J.; THEARMONTREE, A.; PHITPORNCHAIYAKUL, S.; HINTAO, J.; JÜRGENSEN, N.; ELLWOOD, R.P. School-based Intervention for Improving the Oral Health of Children in Southern Thailand. **Community Dental Health**, v. 32, p.44-50, 2015.

PITTS, B.G.; ZERO, D.T.; MARSH, P.D.; EKSTRAND, K.; WEINTRAUB, J.A.; RAMOS-GOMEZ, F.; TAGAMI, J.; TWETMAN, S.; TSAKOS, G.; ISMAIL, A. Dental Caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, article n. 17030, 2017.

RAMIRES, I. e BUZALAF, R.A.M. A Fluoretação da Água de Abastecimento Público e Seus Benefícios no Controle da Cárie Dentária Cinquenta Anos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n.4, p.1057-1065, 2007.

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

SANCHEZ, Y. A.; DE OLIVEIRA, L.C.; NEGRINI, C.T.; HASHIZUME, N.L.; HARA, T.A.; MALTZ, M.; ARTHUR, A.R. In situ Effect of Arginine-Containing Dentifrice on Plaque Composition and on Enamel Demineralization under Distinct Cariogenic Conditions. **Caries Res.**, v.52, p. 588-597, 2018.

SB BRASIL 2010, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA, GOVERNO FEDERAL, 2010.

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.

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.

SWELWITZ, H.R.; ISMAIL, A.I.; PITTS, B.N. Dental Caries. **Lancet**, v.369, p. 51-59, 2007.

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.

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.

TENUTA, L.M.A; RICOMINI FILHO, A.P.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Effect of Sucrose on the Selection of Mutans Streptococci and Lactobacilli in Dental Biofilm Formed in situ. **Caries Res.**, v.40, p. 546-549, 2006.

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.

THOMAS, R.Z.; ZINJGE, V.; CIÇEK, A.; DE SOET, J.J.; HARMSSEN, 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.

TOMITA, E.N.; BIJELLA, T.V.; LOPES, S.E.; FRANCO, J.L. Prevalência de Cárie Dentária em Crianças da Faixa Etária de 0 a 6 Anos Matriculadas em Creches: Importância de Fatores Socioeconômicos. **Rev. Saúde Pública**, v.30, n.5, p. 413-420, 1996.

VAN HOUTE, J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. **J Dent Res.**, v.73, n.3, p.672-681, 1994.

WALSH, T.; WORTHINGTON, H.V.; GLENNY, A.M., APPELBE, P.; MARINHO, V..C.C.; SHI, X. Fluoride Toothpastes of Different Concentrations for Preventing Dental Caries in Children and Adolescents (Review). **The Cochrane Collaboration**, p. 1-223, 2010.

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).

ZERO, T.D.; FONTANA, M.; MARTÍNEZ-MIER, E.A.; FERREIRA-ZANDONÁ, A.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; BAYNE, S. The Biology, Prevention, Diagnosis and Treatment of Dental Caries: Scientific Advances in the United States. **JADA**, v. 140, p. 25S-34S, 2009.

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.