

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAROLINE LONGARAY DE OLIVEIRA

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA INIBIÇÃO
DA DESMINERALIZAÇÃO DENTAL E NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO
BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU* SOB ALTO DESAFIO CARIOGÊNICO

Porto Alegre
2016

CAROLINE LONGARAY DE OLIVEIRA

EFEITO DE UM DENTIFRÍCIO FLUORETADO CONTENDO ARGININA NA INIBIÇÃO
DA DESMINERALIZAÇÃO DENTAL E NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO
BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU* SOB ALTO DESAFIO CARIOGÊNICO

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

Orientador: Drº. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Caroline Longaray de
Efeito de um dentifrício fluoretado contendo
arginina na inibição da desmineralização dental e na
composição microbiana do biofilme dental formado in
situ sob alto desafio cariogênico / Caroline
Longaray de Oliveira. -- 2016.
34 f.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. Arginina. 2. Cárie dental. 3. Dentifrício
fluoretado. I. Arthur, Rodrigo Alex, orient. II.
Título.

DEDICATÓRIA

Dedico todo o esforço e trabalho empenhados na realização desse projeto a todos aqueles que, de algum modo, colaboraram para a conclusão do mesmo: minha mãe e namorado por terem participado da minha formação e me conduzido por este caminho nem sempre fácil, meus orientadores pela inspiração e dedicação, toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Buciais da FO-UFRGS. Em memória de meu pai e avôs pelos princípios repassados a mim e incentivo na busca pela conclusão da graduação e obtenção do título de cirurgião-dentista. Agradeço à Deus por nos proporcionar saúde para enfrentar os desafios e ter perseverança.

AGRADECIMENTOS

Trabalho e estudo só trazem aprendizado real se realizado em grupo.

A conquista só vale a pena se puder ser partilhada com companheiros.

Desde o início da graduação almejamos pelo dia em que apresentaremos o Trabalho de Conclusão de Curso, colaremos o grau e passaremos a possuir o título de Cirurgião-dentista, ao longo dessa jornada contei com a colaboração e participação de inúmeros seres humanos que, junto a mim, sonharam com a conclusão do curso e a obtenção do título de cirurgião-dentista, bem como, dividiram momentos de infinito trabalho, dedicação, aprendizado, alegrias e tristezas, tornando mais leve enfrentar novos desafios e dificuldades que surgiram ao longo dessa caminhada.

Não poderia deixar de citar aqui a imensa gratidão que sinto em ter feito parte da equipe do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM) da Faculdade de Odontologia da UFRGS, uma vez que este trabalho só pode ser realizado graças a colaboração de todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que se dispuseram a ser voluntários da pesquisa sempre com enorme comprometimento, também sou grata à técnica do laboratório, Luisa Mercado, por todos os momentos de paciência, de esclarecimentos, de auxílio em experimentos e por me permitir uma convivência tão positiva.

Além disso, esse projeto jamais teria sido realizado não fosse a colaboração e o incentivo do meu orientador, Dr^o. Rodrigo Alex Arthur, e co-orientadores, Dr^a. Thais Negri, Dr^a. Lina Naomi Hashizume e Dr^a. Marisa Maltz, bem como, com a participação do cirurgião-dentista e mestrando Angel Yamith. Todos vocês sempre foram motivo de inspiração para que bons resultados fossem alcançados e exemplos de bons profissionais e adequada conduta.

Por fim, meus mais sinceros agradecimentos e gratidão são dedicados a minha família, em especial minha mãe e namorado, que estiveram ao meu lado em todos os momentos dividindo comigo a preocupação e responsabilidade de concluir a graduação, bem como, momentos de incontável alegria e realização, a exemplo a conclusão deste trabalho.

Em memória de meu pai e avôs, figuras que foram exemplo de humanismo, empatia, lisura, altruísmo, caráter e perseverança; e que mesmo não estando presentes fisicamente, não deixam de estar ao meu lado em cada momento e conquista. Obrigado por terem feito parte da minha vida e contribuído para o ser humano que sou. Essa conquista é de todos vocês.

RESUMO

OLIVEIRA, Caroline Longaray de. **Efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina na inibição da desmineralização dental e na composição microbiana do biofilme dental formado *in situ* sob alto desafio cariogênico** 2016. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar dependente. É bem sabido que o uso de dentifrício fluoretado (DF) tem sido considerado como um dos principais fatores responsáveis pelo declínio da cárie dental no mundo. Estudos recentes têm sugerido, porém, que a modulação das quedas de pH do biofilme também é igualmente importante no controle dessa doença, condição atribuída à atividade arginolítica ou ureolítica dos microrganismos do biofilme dental. Nesse contexto, arginina tem sido adicionada ao dentifrício fluoretado para que, além do controle do processo de des/remineralização promovidos pelo fluoreto, também haja controle do pH do biofilme através de sua metabolização por microrganismos arginolíticos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um dentifrício fluoretado contendo arginina (DFA) na inibição da desmineralização dental e na composição microbiana do biofilme formado sob alto desafio cariogênico em comparação ao DF convencional sem arginina por meio de um estudo *in situ*. Numa primeira fase experimental, 14 voluntários adultos que regularmente faziam uso de DF utilizaram dispositivo intra-oral palatino contendo blocos de esmalte dental bovino hígidos e com dureza de superfície previamente determinada. Esses blocos de esmalte foram recobertos por uma tela plástica para permitir acúmulo de biofilme sobre suas superfícies. Solução de sacarose 20% foi gotejada sobre esses blocos dentais 8x/dia durante 14 dias, e suspensão de dentifrício fluoretado convencional foi gotejada sobre os blocos 3x/dia. Após o término da primeira fase experimental, os mesmos voluntários utilizaram DFA por um período de 2 meses. Após esse período, esses voluntários usaram novamente um dispositivo intra-oral palatino contendo blocos de esmalte bovino hígido, sobre os quais foi gotejada solução de sacarose 20% 8x/dia durante 14 dias. Suspensão de DFA foi gotejada sobre os blocos 3x/dia. Ao final das fases experimentais, os biofilmes formados sobre os blocos foram coletados para determinação da biomassa, contagens de microrganismos totais (MT) e de estreptococos totais (ET), porcentagem de estreptococos do grupo mutans (SM) em relação à estreptococos totais (ET) (%SM/ET) e porcentagem de lactobacilos (LB) em relação à microrganismos totais (%LB/MT). Nos blocos de esmalte dental determinou-se a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) em cada uma das condições analisadas. Os dados de contagem de microrganismos foram transformados em Log e expressos em contagem de unidades formadoras de colônia/mL (CFU/mL). Comparações entre os tratamentos foram realizadas por meio de teste t ou de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística na comparação entre os diferentes dentifrícios para cada variável de resposta avaliada neste estudo (média \pm ep): DF (biomassa: $126,3 \pm 22,5$; MT: $6,44 \pm 5,95$; ET: $6,32 \pm 5,80$ %SM/ET: $0,149 \pm 0,152$; %LB/MT: $10,63 \pm 2,51$; %PDS: $-36,6 \pm 4,6$) e DFA (biomassa: $154,7 \pm 22,5$; MT: $6,44 \pm 6,09$; ET: $5,74 \pm 5,20$; %SM/ET: $0,212 \pm 0,166$; %LB/MT: $10,32 \pm 3,90$; %PDS: $-37,4 \pm 3,3$). Os resultados sugerem que DFA não promove benefício em termos de redução de desmineralização nem altera contagem de microrganismos no biofilme dental formado sob alto desafio cariogênico.

Palavras-chave: Arginina. Cárie dental. Dentifrício fluoretado.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Caroline Longaray de. **Effect of fluoridated dentifrice containing arginine on the inhibition of enamel demineralization and on the microbial composition of dental biofilm formed *in situ* under high cariogenic challenge**. 2016. 38 p. Final paper graduation in Dentistry – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Tooth decay is a biofilm-sugar-dependent disease. It is well known that the use of fluoridated dentifrice (FD) has been considered as one of the main factors responsible for its decline worldwide. Recent studies have suggested that the modulation of biofilm pH falls is also equally important in the control of this disease, a condition attributed to arginolytic or ureolytic activity of the biofilm microorganisms. In this context, arginine has been added to the dentifrice that, beyond the control of the process of de / remineralization promoted by fluoride, there is also the biofilm pH control through its metabolism by arginolytic microorganisms. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of a fluoridated dentifrice containing arginine (FDA) in inhibiting dental demineralization and on the microbial composition of the biofilm formed under high cariogenic challenge compared to conventional FD without arginine through an *in situ* study. In a first experimental phase, 14 adult volunteers who regularly made use of FD used palatine intraoral device containing sound bovine dental enamel blocks with known surface hardness. These enamel blocks were covered with a plastic mesh to allow biofilm accumulation on their surfaces. 20% sucrose solution was dropped on enamel blocks 8x / day for 14 days, and FD slurry was dripped onto the blocks 3x/day. After the first experimental phase, the same volunteers used FDA for a period of 2 months. After this period, these volunteers wore an intraoral palatal appliance again containing another set of sound bovine dental enamel blocks with known surface hardness, on which 20% sucrose solution was also dropped 8x/day for 14 days. FDA suspension was also dripped onto the blocks 3x/day. At the end of the experimental phase, dental biofilm was collected for determination of biomass, total microorganism counts (TM) and total streptococci (TS), mutans streptococci percentage (MS) in relation to the total streptococci (TS) (% SM / ET) and percentage of lactobacilli (LB) relative to total microorganisms (% LB / TM). The percentage of surface hardness loss (% SHL) was determined on the enamel blocks. Microorganisms count data were transformed into log and counts were expressed in colony forming units/ml (CFU/ml). Comparisons between treatments were performed by t-test or Mann-Whitney test at 5% significance level. There was no statistical difference in the comparison between the different dentifrice for each response variable assessed in this study (mean \pm SE): FD (biomass: 126.3 ± 22.5 ; TM: 6.44 ± 5.95 ; TS: $6,32 \pm 5.80\%$ SM / TS: 0.149 ± 0.152 ; % LB / TM: 10.63 ± 2.51 ; % SHL: -36.6 ± 4.6) and FDA (biomass: $154.7 \pm 22,5$; TM: 6.44 ± 6.09 ; TS: 5.74 ± 5.20 ; % SM / TS: 0.212 ± 0.166 ; % LB / TM: 10.32 ± 3.90 ; % SHL: $-37,4 \pm 3.3$). The results suggest that DFA does not promote any additional benefit on the inhibition of enamel demineralization not on microbial composition of biofilms formed under high cariogenic challenge.

Keywords: Arginine, Dental caries, fluoridated dentifrice.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTÁRIA	111
3	O EFEITO PROTETIVO ANTI-CÁRIE DO DENTIFRÍCIO FLUORETADO ..	144
4	NOVA TECNOLOGIA: A INCORPORAÇÃO DE ARGININA NO DENTIFRÍCIO FLUORETADO	155
5	OBJETIVO	199
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6	METODOLOGIA	19
6.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
6.2	PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	21
6.3	DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	215
6.4	CONFECÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRABUCAIS	23
6.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	23
6.5.1	Primeira fase experimental	23
6.5.2	Segunda fase experimental	24
6.6	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	25
6.7	ANÁLISES	26
6.7.1	Análise microbiológica do biofilme	26
6.7.2	Determinação da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS)	26
6.8	TABULAÇÃO, ANÁLISE ESTATÍSTICA E APRESENTAÇÃO DOS DADOS	27
7	RESULTADOS	27
8	DISCUSSÃO	29
9	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar dependente. Assim, como já está estabelecido na literatura, o uso do dentifrício fluoretado (DF) é considerado um dos principais responsáveis pelo declínio na prevalência de cárie no mundo, porém, estudos recentes sugerem que a modulação das quedas de pH do biofilme também é igualmente importante no controle dessa doença, condição atribuída à atividade arginínolítica ou ureolítica dos microrganismos do biofilme dental. Nesse contexto, arginina tem sido adicionada ao dentifrício fluoretado para que, além do controle do processo de des/remineralização promovidos pelo fluoreto, também haja controle do pH do biofilme através de sua metabolização por microrganismos arginólíticos. Dessa forma, realizamos esse estudo para avaliar se a incorporação da arginina ao dentifrício fluoretado acarretaria algum benefício no controle e prevenção da doença cárie em comparação com o dentifrício fluoretado convencional, uma vez que, os estudos clínicos publicados em sua maioria apresentam viés de publicação devido à conflito de interesse por serem patrocinados pela indústria que fabrica o produto com essa nova formulação.

2 DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é uma doença cuja prevalência pode estar acima de 50% dentre crianças e adolescentes brasileiros (BORGES et al., 2016; KAMBERI et al., 2016). Os danos que o desenvolvimento desta patologia acarreta na condição de vida da população incluem a diminuição do rendimento na escola e no trabalho, impactos psicológicos e de autoestima e gastos com os tratamentos requeridos, levando a uma diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados (BORGES et al., 2016; KAMBERI et al., 2016).

É sabido que a etiologia da cárie dentária é multifatorial e relacionada a alterações microbiológicas e ambientais do biofilme dental que contribuem para torná-lo potencialmente patogênico (MARSH, 2003). Há diversos fatores relacionados ao desenvolvimento da doença cárie, incluindo não apenas o acúmulo de biofilme sobre a superfície dentária, como a influência do fator tempo nesse processo, a presença de microorganismos cariogênicos no biofilme, características salivares, dieta e fatores socioeconômicos e comportamentais (MANJI, 1991).

Sendo assim, para que a cárie dental se desenvolva ocorre inicialmente a colonização da superfície dentária por microrganismos que compõem o biofilme dental, que se co-agregam por um complexo e dinâmico processo formando uma comunidade (KOLENBRANDER, 2000; PETERSON et al., 2011). Segundo Kolenbrander et al. (2006), a formação do biofilme na superfície dentária é iniciada pelos “colonizadores pioneiros” que são compostos principalmente por membros do grupo *mitis*, como *Streptococcus gordonii*, colonizadores, como o *S. mutans*, *Veilonella ssp.* e o *Fusobacterium ssp.*, e a maturação do biofilme envolve a colonização deste por microrganismos tardios compostos principalmente por anaeróbios e bactérias gram-negativas.

A partir da formação e maturação do biofilme dental se estabelece um processo de seleção microbiológica das espécies presentes conforme a dieta do indivíduo. Dessa forma, o consumo frequente de carboidratos fermentáveis gera um estresse ambiental, devido à metabolização desses compostos por microrganismos acidogênicos, levando ao estabelecimento de um microambiente ácido, que favorece a seleção de bactérias acidúricas e acidogênicas no biofilme dental, resultando em alterações na composição e metabolismo do biofilme (LEMOS; ABRANCHES; BUNE, 2005; TAKAHASHI; NYVAD, 2011) o que o torna potencialmente mais cariogênico.

Dentre os microrganismos acidúricos e acidogênicos que compõem a comunidade microbiana do biofilme dental, duas espécies estão especialmente relacionadas ao

desenvolvimento da cárie dentária: os estreptococos do grupo mutans e os *Lactobacillus*. Segundo Lemos, Abranches e Burne (2005), duas espécies de estreptococos do grupo mutans, *S. mutans* e *S. sobrinus*, são considerados agentes etiológicos primários da cárie dentária em humanos, devido ao fato de numerosos estudos correlacionarem a presença de cárie com a presença desses microrganismos em número elevado, principalmente em lesões cariosas em estágio inicial (HAMADA; SLADE, 1980; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; LOESCHE, 1986). A virulência do *S. mutans* está relacionada à sua habilidade de formar biofilme sobre a superfície dental, à produção de ácidos orgânicos e a capacidade de tolerar estresses ambientais, particularmente o baixo pH (LEMOS; ABRANCHES; BURNE, 2005; LEMOS; BURNE, 2008). No que diz respeito aos *Lactobacillus*, estes são considerados invasores secundários no desenvolvimento da cárie dentária, estando presentes em contagens especialmente elevadas em lesões cavitadas. Além disso, sua contagem é indicativo da presença de uma dieta que contempla carboidratos fermentáveis (LI et al., 2015b; BADET; DEBAUT, 2008).

Um fato importante a ser citado diz respeito à cárie dentária ser considerada uma doença dieta-dependente relacionada à frequente ingestão de açúcares fermentáveis, que serão metabolizados pelos microrganismos presentes no biofilme dental, resultando na produção de ácidos e queda de pH no microambiente do biofilme, estabelecendo, assim, um desequilíbrio físico-químico entre dente/biofilme/saliva, tendo como desfecho a desmineralização dos tecidos dentais e, a longo prazo, a formação da lesão cariosa (SHEIHAM; JAMES, 2015). Dentre os açúcares é sabido que a sacarose é considerado o mais cariogênico, à medida que além de ser metabolizada pelas bactérias orais, ela também exerce o papel de substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC). Sendo assim, o PEC atua aumentando a aderência bacteriana à superfície dentária e a porosidade do biofilme, facilitando a difusão de carboidratos e contribuindo para a integridade de sua estrutura. Desse modo, o biofilme formado na presença de sacarose torna-se potencialmente mais cariogênico por apresentar mudanças na composição da matriz que o deixa mais poroso e espesso, favorecendo a ligação microbiana, pela produção de polissacarídeos extra e intra celulares e por apresentar baixas concentrações de cálcio, fosfato e flúor (LEME et al., 2006).

Isto posto, a frequente ingestão de carboidratos fermentáveis torna-se, dessa forma, uma das principais causas relacionadas às modificações microbiológicas e ambientais do biofilme. Ao longo do tempo, esses episódios frequentes de queda do pH irão produzir um desequilíbrio entre o processo de desmineralização e remineralização, resultando na perda

mineral líquida dos tecidos dentais que caracteriza a lesão cariiosa (KIDD; FEJERSKOV, 2004; MARSH, 2003).

3 O EFEITO PROTETIVO ANTI-CÁRIE DO DENTIFRÍCIO FLUORETADO

Nesse contexto de desenvolvimento e controle de lesões cárias, o uso de fluoretos tem sido considerado como um dos principais fatores responsáveis pelo declínio da cárie dental no mundo, uma vez que, o dentifrício fluoretado tem se mostrado capaz de controlar e paralisar o desenvolvimento de lesões cárias em indivíduos que regularmente fazem uso desse meio (CURY; TENUTA, 2014). Em termos físico-químicos, o flúor disponibilizado ao meio bucal no momento da escovação dental contribui para a manutenção da supersaturação dos fluidos orais em relação à hidroxiapatita, que tende a ser depositada na superfície dental em resposta às constantes variações de pH da cavidade oral. O flúor presente de forma constante no meio bucal ocasiona, dessa forma, uma redução da perda mineral líquida, uma vez que viabiliza a formação de um mineral menos solúvel na superfície dental, ao mesmo tempo em que ativa a reposição de minerais quando o pH da cavidade bucal torna-se maior que 5,5. (DAWES, 2003).

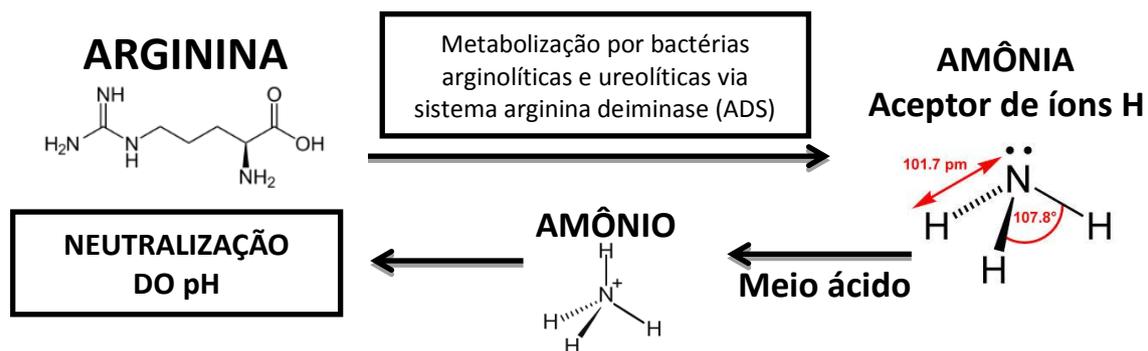
Além disso, é sabido que existe uma relação dose-resposta entre a concentração de flúor no dentifrício e o efeito protetivo anti-cárie do mesmo, uma vez que, concentrações de 550ppm de flúor, ou menos, não demonstram efeito adicional na inibição da desmineralização quando comparado ao dentifrício sem flúor; em contrapartida, para concentrações entre 1.000 ppm a 1.250 ppm de flúor nota-se um efeito protetivo 23% maior para os indivíduos que fazem uso desse dentifrício em comparação ao livre de flúor e, ainda, quando essas concentrações ultrapassam 2.400 ppm de flúor, o efeito anti-cárie passa para 36% (WALSH et al., 2010). Sendo assim, diversas revisões de literatura reforçam que o uso do dentifrício fluoretado, quando apresenta uma concentração de pelo menos 1.000 ppm de flúor acarreta em benefício na inibição da desmineralização dentária em dentes decíduos e permanentes. Além disso, existe um efeito adicional na prevenção da cárie dentária quando o uso do dentifrício é associado a outro meio que contenha flúor, como vernizes ou gel (MARINHO, 2009; SANTOS et al., 2012; WALSH et al., 2010). É interessante esclarecer que o flúor isoladamente não conseguirá controlar perda de minerais da superfície dental se o paciente não for orientado para uma eficiente remoção de biofilme da superfície dental e também se não houver orientação de dieta que possibilite redução na ingestão de açúcares entre as refeições e, conseqüentemente, redução nas quedas de pH na superfície dental.

Atualmente existem diversas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de fatores que possam ser incorporados ao dentifrício com o intuito de potencializar o efeito anti-cárie do flúor.

4 NOVA TECNOLOGIA: A INCORPORAÇÃO DE ARGININA NO DENTIFRÍCIO FLUORETADO

No que diz respeito ao desenvolvimento da lesão de cárie, parece que além do papel do flúor no controle das perdas minerais, o controle do pH do biofilme também é igualmente importante (REYES et al., 2014). Esse controle pode ser desempenhado por microrganismos argininolíticos ou ureolíticos que são capazes de degradar uréia e arginina, via sistema arginina deiminase (ADS), levando à produção de quantidades expressivas de amônia por meio de um conjunto de reações químicas. *Streptococcus salivarius*, *S. sanguinis* e *S. gordonii* são exemplos de microrganismos capazes de sintetizarem amônia a partir de arginina ou uréia (REYES et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014; SANTARPIA et al., 2013). Desse modo, a amônia atua como um aceptor de íons hidrogênio, contribuindo para a neutralização parcial dos ácidos produzidos pelo biofilme após metabolização dos carboidratos fermentáveis da dieta (REYES et al., 2014).

A arginina é encontrada naturalmente no ambiente oral na estrutura de proteínas, que ao sofrerem a ação das proteases salivares liberam essa molécula permitindo sua metabolização por bactérias arginolíticas, o que irá originar duas moléculas de amônia que neutralizarão o pH do meio, conforme o esquema abaixo (SANTARPIA et al., 2013).



Fonte: do autor, 2016.

Diferentemente da ação de compostos fluoretados, a arginina age modulando as condições críticas do microambiente do biofilme, bem como a ecologia dessa comunidade microbiana, à medida que a alcalinização do meio é um fator estressante e crítico para a sobrevivência de bactérias cariogênicas (LEMOS et al., 2005; LEMOS; BURNE, 2008; NASCIMENTO et al., 2014; SANTARPIA et al., 2013). Além disso, estudos têm mostrado que o biofilme de indivíduos livres de cárie apresenta níveis de amônia mais elevados do que

o de indivíduos cárie ativos, bem como o aumento do risco de cárie quando a capacidade da produção de alcaloides pela microbiota está reduzida (REYES et al., 2014).

Além disso, Nascimento et al. (2014) realizaram um estudo que avaliou o efeito da arginina no biofilme dental em termos microbiológicos, partindo da hipótese que um aumento na disponibilidade de arginina no ambiente oral, ocasionaria maior atividade do sistema arginina-deiminase, tornando favorável níveis alcalinos de pH no microambiente do biofilme. Esses autores conduziram um estudo randomizado controlado com duração de 4 semanas, onde 38 voluntários adultos (19 livres de cárie e 19 cárie ativos) foram divididos em 2 grupos de tratamento: uso de dentifrício livre de flúor contendo 1.5% de arginina ou uso de dentifrício fluoretado (1450ppm de flúor) sem arginina 2x/dia. Quantidade de álcalis e ácidos produzidos pelos microrganismos, atividade do sistema arginina-deiminase na saliva e no biofilme dental e identificação de espécies bacterianas presentes na cavidade bucal dos voluntários foram avaliadas ao final das 4 semanas. Observou-se que houve um aumento da atividade do sistema arginina-deiminase e produção de amônia apenas para o biofilme dental, não alterando os níveis salivares destas variáveis, com o uso do dentifrício contendo arginina, além disso, esse efeito foi maior em voluntários cárie ativos. Em acréscimo, foi observada alteração microbiológica no biofilme dental de cárie-ativos que tornou-se semelhante à microbiota do biofilme de indivíduos livres de cárie. Esses resultados sugerem que a arginina poderia promover modificações no biofilme capaz de reduzir seu potencial cariogênico.

Devido a esse importante papel dos microrganismos arginolíticos e ureolíticos no controle das quedas de pH do biofilme dental, a arginina tem sido incorporada ao dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries mais Neutraçúcar[®]) com o objetivo de se associar o efeito benéfico da produção de alcalóides no biofilme com o efeito anti-cárie do flúor. Estudos clínicos têm sugerido que o uso frequente desse dentifrício é capaz de reduzir o incremento de cárie dental tanto para lesões coronárias como radiculares (KRAIVAPHAN et al., 2013; SOUZA et al., 2013; LI et al., 2015a; PETERSON et al., 2011). Sendo assim, uma nova formulação de dentifrício contendo 1450ppm de flúor na forma de MPF, um composto insolúvel de cálcio e 1,5% de arginina, tem sido estudado e avaliado.

Em 2013, Wolff et al., compararam essa nova formulação (grupo teste) com o dentifrício fluoretado convencional com 1450ppm de flúor em forma de MPF (grupo controle), em um estudo clínico com duração de duas semanas que objetivava analisar mudanças no metabolismo do biofilme dental em lesões de esmalte. As variáveis foram analisadas ao final de 7 dias e 14 dias. Observou-se que ocorreu uma modulação no metabolismo do biofilme nos indivíduos do grupo teste, ocasionando um aumento na

produção de amônia e decréscimo na produção de ácido láctico, resultando no aumento do pH do biofilme dental desses voluntários.

Além disso, estudos clínicos de maior duração (3 a 6 meses) também foram realizados a fim de avaliar o efeito destes dois dentifrícios no controle de lesões de cárie coronárias por fluorescência pelo método Quantitative Light-Induced Fluorescence (CUMMINS et al., 2013). Um estudo de maior duração foi realizado por Kraivaphan et. al (2013) que, por sua vez, foi uma pesquisa clínica que comparou o uso do dentifrício fluoretado convencional com 1450 ppm de flúor e o uso do dentifrício fluoretado contendo um composto insolúvel de cálcio e 1.5 %arginina em lesões de cárie coronária. O estudo teve duração de 2 anos e o incremento de cárie foi avaliado por CPO-D e CPO-S, ao final de um período de 1 ano e 2 anos. No término do primeiro ano, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os dois grupos de tratamento. Entretanto, ao final do período experimental, o grupo submetido ao uso de dentifrício contendo arginina apresentou incremento de cárie estatisticamente menor em termos de CPO-D e CPO-S do que o grupo que usou dentifrício fluoretado convencional.

No que diz respeito a lesões de cárie radicular, um estudo realizado por Souza et al. (2013) analisou dois grupos submetidos ao mesmos tratamentos citados anteriormente (dentifrício fluoretado convencional x dentifrício com arginina), por um período de 3 e 6 meses. Ao final do estudo, encontrou-se uma diminuição no número de lesões cariosas com consistência de couro e aumento das lesões com consistência endurecida para o grupo que fez uso do dentifrício contendo arginina, o que representa uma menor progressão das lesões de cárie radicular quando o dentifrício contendo arginina foi utilizado em comparação ao dentifrício convencional.

Entretanto, recentemente uma revisão sistemática e metanálise de estudos clínicos considera como “questionável” o fato de o dentifrício fluoretado contendo arginina apresentar melhor efeito anti-cárie em comparação ao dentifrício fluoretado convencional sem arginina. Os autores discutem que a significância dos resultados é comprometida pela presença de vieses metodológicos e de conflito de interesses nos estudos clínicos avaliados (LI et al., 2015b). O mesmo é relatado em uma revisão de sistemática publicada em 2016 e realizada por Ástvaldsdottir et al., onde o objetivo foi avaliar se as evidências já existentes comprovariam que o uso do dentifrício fluoretado contendo arginina impediria a progressão e o surgimento de novas lesões cariosas, entretanto, não está comprovado o real benefício do uso dessa nova formulação, uma vez que grande parte dos estudos já publicados apresentam vieses por conflito de interesses por terem sido financiados pela indústria

Dessa forma, ainda não existe consenso sobre o real benefício do uso do dentifrício fluoretado contendo arginina na prevenção e controle da cárie dental. É sabido, porém, que parâmetros bioquímicos, estruturais e microbiológicos do biofilme dental podem modular o seu potencial cariogênico (CURY et al., 1997; 2000; BOWEN; KOO 2011). Além disso, estudos prévios sugerem que o potencial anticariogênico do dentifrício fluoretado pode ser comprometido em indivíduos que apresentam uma dieta altamente cariogênica com elevada frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis (DUGGAL et al., 2001; CCAHUANA-VASQUEZ et al., 2007). Não se sabe, porém, se o dentifrício fluoretado contendo arginina possui um melhor efeito anticariogênico comparado ao dentifrício fluoretado convencional em indivíduos que possuem dieta altamente cariogênica e que estão sob alto risco de desenvolvimento de cárie.

5 OBJETIVO

Considerando que, para ser efetivo, o dentifrício fluoretado deve obrigatoriamente ser capaz de controlar cárie dental em indivíduos que fazem uso de uma dieta altamente cariogênica, o presente estudo tem por objetivo avaliar por meio de um estudo *in situ* o papel do dentifrício fluoretado contendo arginina no controle de lesões de cárie desenvolvidas em esmalte dental e a composição microbiana do biofilme dental submetido a alto desafio cariogênico. A hipótese nula é de que a incorporação da arginina ao dentifrício fluoretado não promove nenhum benefício adicional em relação ao dentifrício fluoretado no controle de lesões de cárie nem induz qualquer alteração na composição microbiológica do biofilme dental.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a composição microbiana do biofilme formado *in situ* na presença de dentifrício fluoretado e dentifrício fluoretado com arginina;
- Verificar a dureza de superfície nos blocos de esmalte bovino submetidos aos dois tratamentos (DF e DFA).

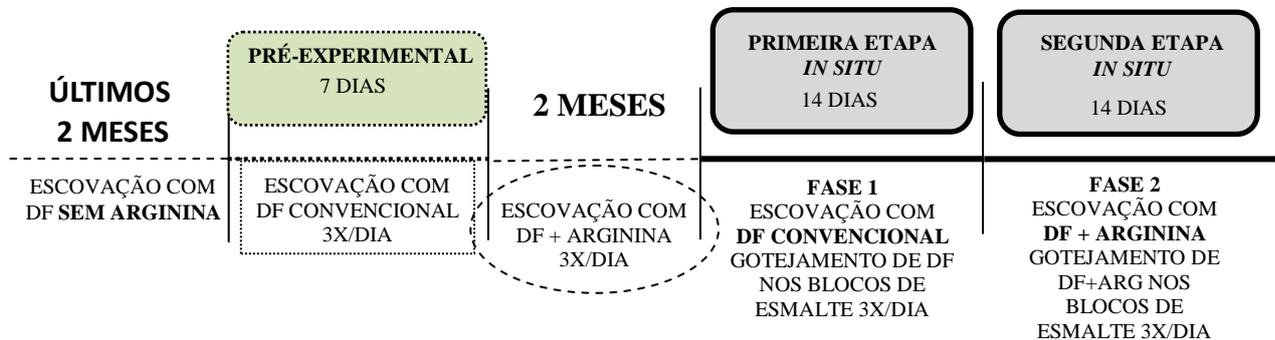
6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este foi um estudo experimental *in situ* com duas fases experimentais. Catorze voluntários adultos, que apresentavam fluxo salivar estimulado normal ($\geq 0,8$ mL/minuto), bom estado de saúde geral, e ausência de doenças sistêmicas, não-fumantes, que não tenham feito uso de medicamentos antibióticos por no mínimo dois meses anteriores ao início do estudo, e que faziam uso regular de dentifrício fluoretado sem arginina por pelo menos 2 meses antes do início do estudo foram selecionados.

Durante um período pré-experimental de 7 dias esses voluntários utilizaram o dentifrício fluoretado fornecido pelos pesquisadores do presente projeto (Colgate Máxima Proteção Anticáries; 1450 ppmF – monoflúor fosfato de sódio – MFP) realizando uma frequência de escovação de 3 vezes ao dia com o objetivo de padronizar a exposição ao flúor. Em seguida, esses voluntários utilizaram dispositivo intra-oral palatino contendo 2 blocos de esmalte dental bovino hígidos e com dureza de superfície previamente determinada, dispostos 1 de cada lado do dispositivo. Sobre esses blocos foi gotejada solução de sacarose 20% numa frequência de 8x/dia durante 14 dias. Em acréscimo, suspensão de dentifrício fluoretado convencional (sem arginina) foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental 3x/dia. Ao final dos 14 dias, o biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado e analisado microbiologicamente (contagem de microrganismos aeróbios totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos). Nos blocos de esmalte dental foi determinada a porcentagem de perda de dureza de superfície. Decorridos os 14 dias da primeira etapa experimental, os voluntários foram instruídos para escovarem os dentes 3x/dia com dentifrício fluoretado contendo arginina (Colgate Máxima Proteção Anticáries mais Neutraçúcar; 1450 ppmF -monofluor fosfato de sódio; 1,5% de arginina), também fornecido pelos pesquisadores do presente projeto de pesquisa, por um período de 2 meses, visando a maior ativação do Sistema Arginina-Deiminase nos microrganismos arginolíticos e ureolíticos que compõem o biofilme dental (NASCIMENTO et al., 2014). Após esse período de uso do dentifrício contendo arginina, esses voluntários utilizaram durante 14 dias outro dispositivo intra-oral palatino contendo outros 2 blocos de esmalte dental bovino (distribuídos da mesma forma descrita acima) sobre os quais solução de sacarose 20% também será gotejada na frequência de 8 x/dia. Em acréscimo, suspensão de dentifrício fluoretado contendo arginina também foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental 3x/dia. Ao final dos 14 dias, o biofilme e os blocos

de esmalte foram coletados e analisados como descrito acima. Durante os 2 períodos experimentais *in situ* os voluntários foram orientados para escovarem seus dentes 3x/dia com o dentifrício fluoretado (com ou sem arginina) correspondente à cada fase experimental. O esquema de cronologia do estudo segue abaixo:



Fonte: do autor, 2016.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE 47 91861 5.4.0000.5347). Antes do início do estudo todos os voluntários assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6.2 PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

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

Os blocos de esmalte foram preparados com dimensões de 6 mm de diâmetro com uso de cortadeira elétrica equipada com discos de corte diamantados (CURY et al., 1997). A parede pulpar de cada bloco foi planejada usando lixas de granulação 500, 1200 e 4000. Em seguida, a superfície externa de cada bloco foi planejada e polida (com o uso de suspensão de diamante de 1 µm), resultando em blocos com espessura de 2 mm. Os blocos então foram limpos e imersos em solução detergente em ultrassom durante 1 minuto. Blocos que apresentaram trincas, rachaduras ou hipocalcificações foram descartados. Após o polimento com suspensão diamantada, os blocos de esmalte foram lavados em água deionizada corrente, durante 3 minutos. A seguir, passaram por ultra-som, durante 2 minutos, imersos em solução

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

6.3 DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Após o polimento, a microdureza superficial dos blocos de esmalte foi medida. As endentações foram feitas no centro da região planificada com o longo eixo do diamante Knoop paralelo à superfície externa do esmalte, sob um peso estático de 50 gramas, que será aplicado por 05 segundos em microdurômetro HMV-2T (Shimadzu, Japan). A partir do centro do bloco de esmalte foi realizada uma endentação de referência, utilizando-se carga estática de 50g durante 05 segundos, a partir disso, foram realizadas cinco endentações em sequência, separadas entre si por uma distância de 100 µm. As leituras da diagonal maior da endentação foram transformadas no número de dureza Knoop (KHN) pela fórmula:

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

KHN: número de dureza Knoop

C= carga aplicada em gramas

L²= comprimento da diagonal em µm

Desse modo, foram incluídos no estudo blocos de esmalte que obtiverem valores de dureza de superfície igual à média geral dos blocos com variação de 10% acima ou abaixo da média, com o objetivo de reduzir a variabilidade nos valores referenciais de microdureza de esmalte.

Os blocos selecionados (n=56) foram numerados e aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais de forma que a média de dureza inicial de superfície fosse semelhante entre todos os grupos experimentais. O software Excel foi utilizado para a randomização.

6.4 CONFECÇÃO DOS DISPOSITIVOS INTRABUCAIS

Foi realizada a confecção de dispositivos intrabucais palatinos removíveis, semelhantes a aparelhos ortodônticos (sem grampos de fixação), sobre o modelo de gesso da arcada superior dos voluntários. Em cada dispositivo intrabucal foram confeccionadas 2 cavidades (4x2x1mm) para alocar os blocos de esmalte, sendo 1 cavidade para cada lado do aparelho (CURY et al., 2003). Cada cavidade acomodou 1 bloco de esmalte, de modo que os blocos de esmalte ficaram com sua superfície voltada para o meio ambiente bucal livre. Após a inserção dos blocos de esmalte nas cavidades, estes foram protegidos por uma tela plástica de forma que houvesse 1,0 mm de distância entre a superfície do bloco e a tela plástica para proteção do biofilme que seria formado (HARA et al., 2003).

6.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.5.1 Primeira fase experimental

Orientações foram repassadas aos voluntários previamente à realização dos procedimentos experimentais. Cada voluntário recebeu um frasco na cor branca, identificado com a letra “S” contendo solução de sacarose à 20%, e outro identificado com a letra “D” contendo a suspensão do dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries 1450 ppmF – monoflúor fosfato de sódio – MFP). A suspensão de dentifrício foi preparada na proporção de 1 parte de dentifrício para 3 partes de água (1:3) simulando a diluição do dentifrício na cavidade bucal (LEME et al., 2004). As soluções foram então fornecidas diariamente para os voluntários em frascos do tipo conta-gotas. A solução de sacarose 20% (presente no frasco branco identificado com a letra “S”) foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental na frequência de 8X/dia (CURY et al., 2001; LEME et al., 2004; PECHARKI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005). A suspensão de dentifrício (presente no frasco branco e identificado com a letra “D”) foi gotejada sobre todos os blocos dentais 3X/dia, às 08:00h, às 12:00h e às 22:00h, mesmo horário no qual os voluntários escovaram seus dentes com o mesmo dentifrício. Os horários de gotejamento de sacarose estão descritos abaixo.

Quadro 1 - Horários estabelecidos para gotejamento da solução de sacarose de acordo com a frequência

Frequência de exposição à sacarose	Horário de gotejamento da solução
8x/dia	08:00h
	09:30h
	11:00h
	13:30h
	15:00h
	16:30h
	18:00h
	21:00h

Fonte: do autor, 2016.

Após o gotejamento da solução de sacarose ou da suspensão de dentifrício, os voluntários deveriam secar o excesso das soluções, se necessário, com uma gaze. O dispositivo seria então guardado numa caixa do tipo porta-aparelho por 5 minutos, e após reinserido na cavidade bucal. Os dispositivos foram utilizados por um período de 14 dias (VALE et al., 2007), durante 24 horas diárias, sendo removidos apenas para gotejamento das soluções, realização da higiene bucal e alimentação.

Não foram fornecidas instruções de higiene bucal nem de dieta. Os voluntários não utilizaram nenhuma fonte adicional de flúor, além de ingestão de água de abastecimento fluoretada (0,8 ppmF) e foram orientados a escovar os dispositivos com escova dental e dentifrício utilizado na fase experimental, sem encostar a escova sobre a tela plástica para evitar que o biofilme formado sobre os blocos fosse desorganizado e removido.

6.5.2 Segunda fase experimental

Logo após o término da primeira fase experimental, os voluntários foram instruídos a escovar os dentes 3x/dia com dentifrício fluoretado contendo arginina (Colgate Neutraçúcar; 1450 ppmF). Este dentifrício foi utilizado durante 2 meses.

Após esses 2 meses de uso, novos dispositivos intra-orais foram confeccionados para cada voluntário. Dois novos blocos de esmalte dental foram colocados em cada dispositivo e recobertos com uma tela plástica, o período experimental foi de 14 dias. Cada voluntário recebeu novamente um frasco na cor branca, identificado com a letra “S” contendo solução de sacarose à 20%, e outro identificado com a letra “D” contendo a suspensão do dentifrício

fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anticáries mais Neutraçúcar; 1450 ppmF -monofluor fosfato de sódio –; 1,5% de arginina). A suspensão de dentifrício foi preparada na proporção de 1 parte de dentifrício para 3 partes de água (1:3) simulando a diluição do dentifrício na cavidade bucal (LEME et al., 2004). As soluções foram fornecidas aos voluntários diariamente em frascos do tipo conta-gotas. A solução de sacarose 20% (presente no frasco branco e identificada com a letra “S”) foi gotejada sobre os blocos de esmalte dental em frequência de 8X/dia. A suspensão de dentifrícios (presente no frasco branco identificado com a letra “D”) foi gotejada sobre todos os blocos dentais 3X/dia, às 08:00h, às 12:00 e às 22:00h (mesmo horário em que os voluntários escovaram seus dentes com o mesmo dentifrício). Os horários de gotejamento da sacarose foram os mesmos da primeira fase experimental conforme apresentado no Quadro 1. Após o gotejamento da solução de sacarose ou da suspensão de dentifrício, os voluntários deveriam secar o excesso das soluções, se necessário, com uma gaze. O dispositivo era guardado numa caixa do tipo porta-aparelho por 5 minutos, e então foi reinserido na cavidade bucal. Os dispositivos foram utilizados durante 14 dias, conforme a primeira fase do experimento (VALE et al., 2007), por 24 horas diárias, sendo removidos apenas para gotejamento das soluções, realização da higiene bucal e alimentação.

Não foram fornecidas instruções de higiene bucal nem de dieta. Os voluntários não utilizaram nenhuma fonte adicional de flúor, além de ingestão de água de abastecimento fluoretada (0,8 ppmF), e foram orientados a escovar os dispositivos com escova dental e dentifrício utilizado na fase experimental, sem encostar a escova sobre a tela plástica para evitar que o biofilme formado sobre os blocos seja desorganizado e removido.

6.6 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

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

6.7 ANÁLISES

6.7.1 Análise microbiológica do biofilme

Após a resuspensão do biofilme em 1 mL de solução salina estéril, uma alíquota foi coletada e seriadamente diluída. A seguir, duas gotas de cada diluição foram semeadas nos seguintes meios de cultura: Ágar mitis salivarius acrescidos de sacarose e bacitracina 0,2 UI/mL (MSB) para crescimento de *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), Ágar mitis salivarius para crescimento de estreptococos totais, Agar Rogosa SL para crescimento de *Lactobacillus* spp, ágar Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de sangue de carneiro, vitamina K e hemina para crescimento de microorganismos totais. Os meios MSB, MS, Rogosa e as placas de BHI foram incubados a 37°C em microaerofilia durante 48 horas. Depois desse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada um dos meios de cultura acima descritos e para cada experimento realizado com auxílio de um estereomicroscópio. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (VALE et al., 2007).

6.7.2 Determinação da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS)

Após o término dos experimentos, foi realizada a medida da microdureza superficial final dos blocos de esmalte. Assim, foram realizadas dez endentações, 5 destas localizadas 100 µm à esquerda e 5, localizadas 100 µm à direita das endentações previamente realizadas com carga de 50g por 05 segundos. A partir do valor médio das 05 endentações, foi calculada uma média de dureza pós-experimento. A porcentagem de perda de dureza superficial foi determinada pela seguinte fórmula (Cury et al., 1997):

$$\% PDS = \frac{(DI - DP) \times 100}{DI}$$

Onde:

PDS = Perda de dureza superficial

DI = Dureza inicial

DP = Dureza pós-experimento

6.8 TABULAÇÃO, ANÁLISE ESTATÍSTICA E APRESENTAÇÃO DOS DADOS

As variáveis: porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), biomassa, contagem de microrganismos totais (MT), estreptococos totais (ET), porcentagem de *S. mutans* (%SM/ET) e porcentagem de lactobacilos totais (%LB/MT) foram comparadas entre os dois tratamentos: dentifrício fluoretado x dentifrício fluoretado com arginina.

Contagem de microrganismos totais (MT) e estreptococos totais (ET) foram transformada em Log.

A normalidade dos dados (%PDS e contagem de microrganismos) foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal (biomassa, MT e %PDS) foram submetidas ao Teste T. Nos casos de não normalidade (%LB/MT, ET, %SM/ET), os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney. O software utilizado foi o Sigma Plot e o nível de significância foi de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos no estudo com os dois tratamentos, comparando-os, para as variáveis: biomassa do biofilme dental (média \pm ep), contagem de microrganismos totais (MT; média \pm ep), estreptococos totais [ET; mediana (percentil 25/ percentil 75)], porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação à ET [%SM/ET; mediana(percentil 25/ percentil 75)], porcentagem de lactobacilos totais em relação à MT [%LB/MT mediana (percentil 25/ percentil 75)] no biofilme dental e porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS; média \pm ep).

Tabela 1. Composição do biofilme dental formado *in situ* e desmineralização dos blocos de esmalte submetidos aos tratamentos com dentifrício fluoretado e dentifrício fluoretado com arginina sob alto desafio cariogênico.

Variáveis	DF	DFA
Biomassa (mg) (n = 12)	126,3 \pm 22,5 A	154,7 \pm 22,5 A
MT (LOG; UFC/mg) (n=12)	6,44 \pm 5,95 A	6,44 \pm 6,09 A
ET (LOG; UFC/mg) (n=12)	6,1 (5,6/6,6) a	5,6 (4,9/5,9) a

%SM/ET (n=12)	0,0 (0,0 – 0,0004) a	0,0 (0,0 – 0,015) a
%LB/MT (n=12)	11,9 (1,1 – 16,4) a	1,5 (0,01 – 12,3) a
%PDS (n=12)	36,6 ± 4,6 A	43,8 ± 3,0 A

Médias seguidas por letra maiúscula A não diferem estatisticamente entre si na comparação entre os dentifrícios (teste t; $p > 0,05$). Medianas seguidas por letra minúscula a iguais não diferem estatisticamente entre si na comparação entre os dentifrícios (teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$). DF: Dentifrício fluoretado; DFA: Dentifrício fluoretado contendo arginina.

Desse modo, em relação a variável Biomassa os resultados sugerem não haver diferença entre o biofilme formado na presença de DF ou de DFA. O mesmo foi observado para as variáveis: contagem de microorganismos totais (MT), estreptococos totais (ET), porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais (%SM/ET), porcentagem de lactobacilos totais em relação aos microorganismos totais (%LB/MT). Em acréscimo, não foi observada diferença estatística na porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) nos blocos de esmalte dental.

8 DISCUSSÃO

Vários estudos demonstram o importante papel do dentifrício fluoretado na paralisação e controle de lesões cárias, bem como na prevenção da doença cárie, benefício obtido através de seu mecanismo de ação que é capaz de reduzir o pH crítico de dissolução dos tecidos dentais e manter condições de supersaturação mineral na cavidade bucal (MARINHO, 2009; SANTOS et al., 2012; WALSH et al., 2010). A partir disso, tem-se estudado fatores que possam potencializar o efeito anti-cárie do flúor, nesse contexto, o benefício da incorporação de arginina ao dentifrício vem sendo analisado, uma vez que, supõe-se que este composto auxilie no controle do pH do microambiente do biofilme. Assim, encontram-se na literatura diversos estudos clínicos que avaliam essa nova formulação de dentifrício e seu efeito na paralisação de lesões cárias. Exemplo disso são os estudos realizados por Srisilapanan et al. (2013) e Yin et al. (2013) que apresentam metodologias semelhantes na medida em que, avaliam e comparam o dentifrício fluoretado convencional com o dentifrício fluoretado suplementado com 1.5% de arginina e um composto insolúvel de cálcio. Essas pesquisas tiveram duração total de 6 meses e mostram redução na fluorescência, profundidade e volume da lesão para os indivíduos que fizeram uso do dentifrício fluoretado contendo arginina em comparação com o convencional.

Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem que a incorporação de arginina ao dentifrício não promove nenhum benefício em termos de redução de desmineralização do esmalte em indivíduos sob alto risco de desenvolvimento de cárie representado por uma dieta altamente cariogênica. É importante ressaltar que o presente estudo difere dos estudos clínicos publicados, uma vez que este estudo foi realizado sob condições experimentais *in situ* controladas (frequência de escovação e exposição à sacarose). Em adição a isso, também simulamos uma condição de alta cariogenicidade, que não estava presente nos estudos clínicos. Sendo assim, essa pode ser a razão da discrepância dos nossos resultados em relação aos resultados reportados na literatura. O modelo de indução de cárie dental usado nesse estudo (modelo *in situ*) apresenta vantagens devido ao fato de possibilitar o desenvolvimento da lesão cária dentro do ambiente bucal e numa condição mais dinâmica por estar sob influência de fatores fisiológicos do próprio indivíduo (como fluxo salivar), permitir o controle de variáveis experimentais (como a frequência de uso de sacarose e de dentifrício) e o fato de possibilitar que métodos mais sensíveis sejam utilizados para medirem os desfechos de interesse (ZERO, 1995). Essas características são difíceis de serem conseguidas em estudos clínicos de base populacional. Nesse sentido, há diversos trabalhos realizados com a

metodologia *in situ* para vários fins, como avaliação da resposta do biofilme dental a diferentes açúcares presentes na dieta, análises de dentifrícios com baixas concentrações de flúor e o efeito da sacarose na formação e metabolismo do biofilme (CURY et al., 2010; RIBEIRO et al., 2005; AIRES et al., 2004), mostrando, assim, que esse modelo tem sido bem utilizado tanto para avaliar potencial cariogenico da dieta quanto para elucidar mecanismo de ação de flúor.

A literatura nos mostra que o aumento na frequência de exposição à sacarose pode reduzir a capacidade do dentifrício fluoretado em controlar as perdas minerais da superfície dental. No trabalho de Leme et al., 2004, observou-se que houve maior desenvolvimento de cárie em blocos de esmalte dental que foram submetidos *in situ* sob alto desafio cariogênico (sacarose 8x/dia) quando comparado àqueles submetidos ao desafio cariogênico numa frequência menor (4x/dia). O estudo *in situ* realizado por Duggal et al. (2001), avaliou o efeito de diferentes frequências de exposição a sacarose (solução sacarose 12%) com o uso do dentifrício fluoretado sobre a inibição da desmineralização do esmalte dental. As frequências de exposição à sacarose foram determinadas em 1, 3, 5, 7 e 10 vezes ao dia, e a escovação com dentifrício fluoretado foi realizada 2 vezes ao dia por um período experimental de 5 dias. Como resultado, observou-se desmineralização evidente com o uso de dentifrício fluoretado (1450 ppm de flúor) quando ocorre uma frequência de exposição à sacarose de 7 e 10 vezes ao dia. Em acréscimo, o trabalho de Ccahuana-Vasquez (2007) também avaliou o efeito do uso do dentifrício fluoretado 3 vezes ao dia para inibição da desmineralização do esmalte dental e sua influência na composição do biofilme dental quando o indivíduo é submetido ao desafio cariogênico, com solução de sacarose 20%, em frequências de 0 (controle), 2, 4, 6, 8 e 10 vezes ao dia. Ao final dos experimentos, observou-se que a desmineralização foi significativamente maior em comparação com o grupo controle para as frequências de sacarose maiores que 6 vezes ao dia, além disso, houve um aumento na biomassa do biofilme, nas contagens de lactobacilos e estreptococos e polissacarídeos extracelulares, em contrapartida, as concentrações de cálcio, fosfato e flúor reduziram no biofilme dental mesmo em uma exposição à sacarose menor que 6 vezes ao dia. Isso nos mostra que o flúor isoladamente não é capaz de impedir ou controlar sozinho a doença cárie. Os pacientes devem sempre ser orientados para uma correta higiene bucal e controle de ingestão de carboidratos fermentáveis.

Apesar dos estudos clínicos mostrarem uma certa superioridade do dentifrício contendo arginina sobre o dentifrício fluoretado convencional no controle de lesões em esmalte (CUMMINS, 2013; YIN et al., 2013; SRISILAPANAN et al., 2013; WOLFF et al.,

2013; SANTARPIA et al., 2013), vale ressaltar que o método utilizado para analisar a extensão e acompanhamento das lesões cariosas foi o método de fluorescência Quantitative Light-Induced Fluorescence (QLF) (CUMMINS et al., 2013; SRISILAPANAN et al. 2013; YIN et al., 2013). Nesse método, diferenças captadas na autofluorescência do esmalte dental são utilizadas como critério para o diagnóstico de cárie dental (KARLSSON;TRANAEUS, 2008). Mediante à ocorrência de desmineralização, há aumento na porosidade subsuperficial contribuindo para que esses poros fiquem preenchidos por água. Isso causa um espalhamento na luz que incide sobre o tecido dental e também altera sua autofluorescência. Pela diferença de fluorescência em relação à uma área hígida, identifica-se a lesão de cárie (KARLSSON; TRANAEUS, 2008). Sendo assim, pequenas alterações ao nível mineral ultraestrutural são identificadas. Nós acreditamos que, apesar do método de fluorescência ser de fácil uso para diagnóstico de lesões em estudos populacionais, as alterações de fluorescência identificadas são tão pequenas que duvida-se que representem algo relevante clinicamente. Recente revisão sistemática e meta-análise tem sugerido que, de forma geral, métodos de detecção de cárie dental baseados em fluorescência apresentam adequada sensibilidade (capacidade de identificar corretamente a doença quando ela está presente), porém, baixa especificidade (capacidade de identificar corretamente a ausência de doença) (GIMENEZ et al., 2013). Dessa forma, pequenas alterações em pixels nas imagens digitais podem ser interpretadas erroneamente como desmineralização. Além disso, a fluorescência captada pelo método QLF é muito susceptível ao grau de hidratação da amostra, o que pode interferir nos resultados obtidos (ANGMAR-MANSSON; TEN BOSCH, 2001). Em acréscimo, baixa correlação entre profundidade de lesão e volume mineral foram encontrados quando QLF e microradiografia transversal (método padrão ouro para avaliação de perda de minerais) são comparados (ANDO et al., 2001). Ao contrário, o método de avaliação de cárie utilizado nesse estudo (dureza de superfície) tem sido amplamente utilizado para quantificação de perdas minerais que ocorrem ao nível da superfície dos blocos dentais (CURY et al., 2000; PECHARCKI et al., 2005; AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VASQUEZ et al., 2007; VALE et al., 2007) sendo capaz de representar o desenvolvimento de lesões iniciais de forma padronizada e com adequada correlação com os parâmetros de profundidade de lesão e de volume mineral fornecidos pela microradiografia (LIPPERT; LYNCH, 2014).

Isto posto, apesar de os estudos clínicos citados demonstrarem diferenças positivas no que diz respeito à prevenção e controle da doença cárie quando o dentifrício fluoretado recebe adição de arginina em comparação com o dentifrício convencional, há dúvida sobre a importância clínica desse benefício, o que é de extrema importância para a indicação de uso

de um produto ao paciente, uma vez que, o dentifrício com essa nova formulação apresenta um valor de mercado mais elevado comparado ao dentifrício convencional. Cabe ressaltar que num período de 2 anos menor incremento de cárie foi encontrado em indivíduos que usaram dentifrício contendo arginina quando comparado ao grupo que usou dentifrício convencional (KRAIVAPHAN et al., 2013). Porém, a diferença encontrada no incremento de cárie em relação ao grupo controle foi de 0,12 para CPO-D e de 0,15 para CPO-S. Além disso, de acordo com revisões sistemáticas, grande parte dos estudos já publicados apresentam baixa qualidade devido à viés ocasionado pelo patrocínio da indústria, gerando conflito de interesse (LI et al., 2015b; ÁSTVALDSDOTTIR et al., 2016).

No presente estudo não foi encontrada diferença na inibição da desmineralização do esmalte dental entre dentifrício contendo ou não arginina. O desafio cariogênico foi realizado 8x/dia durante 14 dias. Pode ser que esse alto desafio tenha se sobreposto a um eventual benefício da arginina em modular o pH do biofilme ou em induzir modificações microbiológicas possibilitando a colonização do biofilme por bactérias arginolíticas. Ainda, pode ser que em períodos maiores de formação de biofilme a presença de arginina desempenhe algum benefício. Essas questões não são possíveis de serem respondidas neste momento, mas certamente fornecem subsídios para que novos estudos sejam realizados.

9 CONCLUSÃO

Frente às condições experimentais avaliadas neste estudo, parece que a incorporação de arginina ao dentifrício fluoretado não apresentou qualquer vantagem em relação ao dentifrício fluoretado sem arginina na inibição da desmineralização dental e nem na composição microbiana do biofilme formado sob um alto desafio cariogênico.

REFERÊNCIAS

- AIRES, C. P. et al. Effect of sucrose Concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel desmineralization. **Caries Res.**, Basel, v. 40, p. 28 – 32, 2006.
- ANDO, M. et al. Comparative study to quantify desmineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser-and light-induced fluorescence techniques. **Caries Res.**, Basel, v. 35, no. 06, p. 464 – 470, 2001.
- ANGMAR-MANSSON, B.; TEN BOSCH, J. J. Quantitative light-induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Erlangen, v. 30, p. 298 – 307, 2001.
- ÁSTVALDSDOTTIR, Á. et al. Arginine and caries prevention: a systematic review. **Caries Res.**, Basel, v. 50, no. 4, p. 383 – 393, 2016.
- BADET, C.; THEBAUD, N. B. Ecologi of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **Open Microbiol. J.**, Hilversum, v. 2, p. 38 – 48, 2008.
- BORGES, T. S. et al. Factors associated with caries: a survey of students from southern Brazil. **Rev. Paul. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 156, p. 01 – 06, 2016.
- BOWEN, W. H, KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, Basel, v. 45, p. 69 - 86, 2011.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A. et al. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel desmineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, Basel, v. 41, p. 9 – 15, 2006.
- CUMMINS, D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. **J. Dent.**, Kidlington, v. 41s, p. s1 – s11, 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.**, Basel, v.31, no. 5, p.356-60, 1997.
- CURY, J. A. et al. Low fluoride toothpaste and deciduous enamel desmineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. **Eur. J. Oral Sci.**, Chichester, v. 118, p. 370 – 375, 2010.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. Evidence-based recommendation on toothpaste use. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 28, no. 1, p. 01-07, 2014.
- DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 69, no.11, p. 722-724, 2003.

DUGGAL, M. S. et al. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 80, p. 1721 – 1724, 2001.

GIMENEZ, T, et al. Fluorescence-based methods for detecting caries lesions: systematic review, meta-analysis and sources of heterogeneity. **Plos One**, San Francisco, v. 8, no. 4, p. 1 – 14, 2013.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol rev**, Washington, v. 44, no. 2, p. 331 – 384, 1980.

KARLSSON, L.; TRANAEUS, S. Supplementary methods for detection and quantification of dental caries. **J. Laser Den.**, Chicago, v. 16, no. 01, p. 6 – 14, 2008.

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

KAMBERI, B. et al. Prevalence of dental caries in Kosovar adult population. **Int. J. Dent.**, Cairo, v. 216, p. 01 – 06, 2016.

KIDD, E; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenics biofilms. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v.83, no.C, p. C35-C38, 2004.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 54, p. 413-437, 2000.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 42, p. 47-79, 2006.

LILJEMARK, W. F.; BLOOMQUIST, C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 7, no. 2, p. 180 – 198, 1996.

LEME, A. F. et al. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel desmineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 83, no. 1, p. 71 – 75, 2004.

LEME, A. F. P. et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 85, no. 10, p. 878 – 887, 2006.

LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Curr. Issues Mol. Biol.**, Wymondham, v. 7, no. 1, p.95–107, Jan. 2005.

LEMOS, J. A.; BUNRE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology.**, Reading, v. 154, p. 3247-3255, 2008.

LI, X. et al. Randomized clinical trial of the efficacy of dentifrices containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride over two years. **J. Clin. Dent.**, Sichuan Province, v. 26, p. 7 – 12, 2015a.

LI, Y. et al. Characterizing diversity of Lactobacilli associated with severe early childhood caries: a study protocol. **Adv. Microbiol.**, Sichuan Province, v. 5, no. 1, p. 9 – 20, 2015b.

LIPPERT, F.; LYNCH, R. J. M. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. **Arch. Oral Biol.**, Indianapolis, v. 59, no.07, p. 704 – 710, 2014.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, Washington, v. 50, no. 4, p. 353 – 380, 1986.

MANJI, F. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Comm. Dent. Oral Epidem.**, Nairobi, v. 19, p. 324 – 328, 1991.

MARINHO, V. C. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. **Eur. Arch. Pediatr. Dent.**, London, v. 10, n. 03, p. 183 – 191, 2009.

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

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

PECHARKI, G. D. et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel desmineralization *in situ*. **Caries Res.**, Basel, v. 39, p. 123 – 129, 2005.

PETERSON, S. N. et al. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. **Int. Dent. J.**, Chichester, v. 61, no. 01, p. 11-22, 2011.

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

RIBEIRO, C. C. C. et al. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **Br. J. Nutri.**, Wallingford, v. 94, p. 44 – 50, 2005.

SANTARPIA, P. et al. *In vivo* effects of a new dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride on plaque metabolism. **J. Clin. Dent.**, Yardley, v. 24, p. A45 – A54, 2013.

SANTOS, A. P. P. et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 10, p. 01 – 12, 2012.

SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. T. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 94, no. 10, p. 1341 – 1347, 2015.

SRISILAPANAN, P. et al. Comparison of efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using quantitative light-induced fluorescence. **J. Dent.**, Kidlington, v. 41, no. 2, p. 29 – 34, 2013.

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

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 90, no.3, p. 294-303, 2011.

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

YIN, w. et al. The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). **J. Dent.**, Kidlington, v. 41s, p. s22 – s28, 2013.

ZERO, D. T. *In situ* caries models. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 9, no. 3, p. 214 – 230, 1995.

WALSH, T. et al. Fluoride toothpaste prevents caries in children and adolescents at fluoride concentrations of 1000 ppm and above. **Evid. Based Dent.**, London, v. 11, p. 06 – 07, 2010.

WOLFF, M. et al. In vivo effects of a new dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride on plaque metabolism. **J. Clin. Dent.**, Yardley, v. 24, no. A, p. A45 – A54, 2013.