



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO DA CPP-ACP COM E
SEM FLUORETO EM ESMALTE HUMANO DESMINERALIZADO: ESTUDO IN
VITRO**

Niterói
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO DA CPP-ACP COM E
SEM FLUORETO EM ESMALTE HUMANO DESMINERALIZADO: ESTUDO IN
VITRO**

PATRICIA REGINA ALMEIDA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Monica Almeida Tostes

Niterói

2014

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Monica Almeida Tostes

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Tereza Christina Lopes Coutinho

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr^a. Luiz Flávio Moliterno

Instituição: Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Decisão: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho antes de tudo à força maior e suprema, DEUS, e amigos espirituais. A memória da minha amada avó Clarisse e minha mãe; Monica Tostes por ter sempre boa vontade e animo nos ensinamentos e experiências compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores de Graduação: Apoena de Aguiar Ribeiro e Marcos de Oliveira Barceiro pelo incentivo à pesquisa e iniciação no mestrado, sem a ajuda deles hoje não estaria completando essa nova jornada. Aos professores de odontopediatria da UFRJ por permitiram o uso do laboratório. Ao laboratório LABiom-R por permitir o desenvolvimentos de varias etapas da pesquisa. Á Luiz Carlos Soares por sempre estender as mãos e me levantar nos momentos mais difíceis da minha caminhada.

RESUMO

Oliveira PRA. Comparação do potencial de remineralização da CPP-ACP com e sem fluoreto em esmalte humano desmineralizado. ESTUDO IN VITRO. [Dissertação] Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2014.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos dentifrícios contendo CPP- ACP com e sem flúor na prevenção desmineralização do esmalte em um estudo in vitro. Blocos de esmalte (n = 52), previamente selecionados através de análise de dureza superficial, foram submetidos a tratamento diário com os dentifrício em um modelo de ciclagem de pH. Os blocos de esmalte foram divididos em quatro grupos (n=13): Grupo 1, controle negativo - sem dentifrício (CON); Grupo 2, Tooth Mousse (TM) - RecaldentTM GC Corporation Tóquio, Japão) ; Grupo 3, Tooth Mousse Plus (TMP) - RecaldentTM 900 ppm como NaF, GC Corporation Tóquio, Japão) e Grupo 4, CrestTM Cavity Protection (1.100 ppmF de NaF) - Procter & Gamble), como controle positivo (COP). Na ciclagem, as amostras permaneceram em solução desmineralizadora por 6 horas e 18 horas em saliva artificial, diariamente, durante 10 dias . Os dentifrícios foram aplicados três vezes ao dia por 60s após o período de desmineralização. O dentifrício Crest foi diluído em água destilada em uma proporção de 3:1 (w / w) e os dentifrícios com CPP-ACP utilizados sem diluição (0,03g para cada bloco). As alterações ocorridas no esmalte, antes e depois do tratamento, foram observadas mediante teste de microdureza superficial Knoop (50g/15s) e perfilometria. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal - Wallis e as comparações entre grupos com o teste Mann Whitney (p = 0,05). Os valores de MDS observados pós-tratamento nos grupos TM(47.80±28.50) e TMP(53.68±27.66) foram estatisticamente diferentes dos valores do grupo 4 (90.26±17.12), que foram significativamente maiores do que os encontrados no grupo 1 (39.48± 14.27) (p=00000). O grupo da Mlpaste não mostrou qualquer efeito na inibição da desmineralização e apresentou maior rugosidade. A porcentagem de perda de dureza foi significativamente menor no grupo 4, quando comparada com a do Grupo 1 (p <0,001). As amostras de esmalte tratadas com MI paste Plus e Crest mostraram superfícies mais lisas quando comparadas aos demais grupos.

Palavras-chave: Cárie dentaria Caseína, dureza.

ABSTRACT

Oliveira PRA. Comparison of the remineralizing potential of CPP-ACP dentifrices with and without fluoride in artificial enamel lesions: An in vitro study [dissertation]. Niteró: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2014.

The aim of this study was to evaluate the effect of CPP-ACP dentifrices with and without fluoride on enamel demineralization. Enamel blocks (n=52), previously selected through surface hardness analysis, were submitted to daily treatment with dentifrice and a pH- cycling model. The enamel blocks were divided into four groups (N=13): Group 1, negative control – without dentifrice (NCO); Group 2, Tooth Mousse (TM)- Recaldent™ GC Corporation Tokyo, Japan); Group 3, Tooth Mousse Plus (TMP)-Recaldent™ 900 ppm as NaF, GC Corporation Tokyo, Japan) and Group 4, Crest™ Cavity Protection (1.100 ppmF de NaF) – Procter & Gamble) was used as a positive control (PCO). The specimens were soaked in demineralizing solution for 6 hours and remineralization in artificial saliva for 18 hours alternatively for 10 days. The treatments were applied three times for 60s after the remineralization period. The dentifrice pastes were prepared with deionized water, in a 1:3 proportion (w/w) or undiluted product in the case of the CPP-ACP formula. Demineralized tissue loss was analyzed by microhardness and profilometry. Data were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests comparisons ($\alpha = 0.05$). The SMH values observed for the TM(47.80 ± 28.50) and TMP(53.68 ± 27.66) groups differ from that of PCO group (90.26 ± 17.12), which were significantly higher than that found for the NCO(39.48 ± 14.27) group ($0=00000$). The MI paste group did not show any effect on the inhibition of demineralizing. % SMHL was significantly lower in group 4 when compared to the group 1 ($p < 0.001$). The enamel samples treated with MI paste Plus and Crest showed smoother surfaces than those in the MI paste group

Keywords: dental caries, casein, hardness

1 - INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença crônica caracterizada por desmineralização das estruturas dentárias. O primeiro sinal clínico da cárie é a lesão de mancha branca (LMB), que ocorre devido a um desequilíbrio no biofilme bacteriano com diminuição do pH aumentando a solubilidade do esmalte. O processo de remineralização ocorre na presença do cálcio, fosfato e principalmente, de fluoreto, restabelecendo este equilíbrio^{1,2,3,4,5}.

A prevalência de cárie incipiente em crianças e adolescentes brasileiros não tem sido muito estudada, mas pesquisas realizadas em outros países mostram que a lesão de mancha branca é bem prevalente em pacientes jovens com aparelhos ortodônticos⁶. O uso de aparelho fixo dificulta a remoção do biofilme e aumenta a superfície de aderência bacteriana, além disso, impede a ação de limpeza da saliva, lábios, bochechas e língua, levando a um aumento do risco de cárie^{1,2,6}. Os pacientes com aparelhos ortodônticos apresentam no mínimo uma lesão de mancha branca de forma branda, mas alguns apresentam desmineralizações severas ou moderadas. A prevalência destas lesões é de 38% aos seis meses e de 46% aos 12 meses⁶.

Dentre os métodos de controle e prevenção da lesão de cárie a escovação tem sido reconhecida como eficaz, sendo o fluoreto o ingrediente mais ativo encontrado nos dentífrícios^{4,5}. Estudos têm mostrado que dentífrício contendo CPP-ACP (casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate) também podem ser utilizados no controle e prevenção da lesão de cárie e nos processos erosivos⁷⁻²⁷.

A MI Paste e a MI paste plus (GC Corporation, Tóquio, Japão) são dentífrícios à base de água, sem açúcar contendo Recaldent™ (CPP-ACP) (GC Mousse Dente / Prospec MI Paste) apresentam uma combinação de limpeza, agentes de polimento e selante dos túbulos dentinários. Em meio oral ela se liga as bactérias do biofilme, hidroxiapatita e tecidos moles, liberando o cálcio e fosfato biodisponíveis e estimula a salivação¹². Os produtos foram disponibilizados como meio de tratamento para lesões iniciais de cárie não cavitadas em subsuperfície de esmalte. A MI Paste plus apresenta a mesma composição com adição de 900ppm de fluoreto¹⁶(anexo).

O fabricante apresenta quatro formas de uso do produto, sendo três caseiras e uma em consultório. A recomendação para uso caseiro: escovar os dentes com dentífrico com flúor pela manhã e à noite; aplicar com o dedo uma pequena porção da Mi paste (grão de ervilha), espalhar sobre toda superfície dos dentes, esperar por 3 minutos e cuspir, não enxaguar, assim, o restante do produto irá se dissolver aos poucos na saliva. Com moldeira individual, aplicar o dentífrico na moldeira, levar à boca, esperar por 3 minutos, remover a moldeira, cuspir o excesso e espalhar o restante com os dedos. Finalmente, aplicar diretamente a Mi paste sobre os dentes, mesma quantidade e orientações especificadas acima.

Uso profissional: fazer a profilaxia usando escova Robson com o produto. O produto é contraindicado para pacientes com sensibilidade e alergia à lactose (<http://www.mi-paste.com/apply/php>).

O protocolo para a formação dos complexos CPP-ACP foi descrito por Reynolds⁷. Os fosfopeptídeos de caseína são derivados da caseína do leite, os quais podem se unir e solubilizar mediante uma gama de sais minerais, tais como cálcio, magnésio e ferro. O fosfato de cálcio amorfo (ACP), $(Ca_2 (PO_4) 3 H_2O)$ é um precursor da hidroxiapatita $(Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2)$. Na presença de água ACP pode ser convertido em hidroxiapatita. Na cavidade oral, CPP-ACP podem difundir-se para o interior do biofilme bacteriano elevando o pH, aumentando a concentração de cálcio no biofilme e, conseqüentemente, induzindo a remineralização¹⁴.

Inúmeras pesquisas têm avaliado o efeito preventivo de produtos contendo CPP-ACP^{7,24,26,27,30,31,32}. Morgan *et al*¹⁷, Altenburger *et al*¹⁸ verificaram regressão da lesão de cárie em pacientes que utilizaram goma de mascar e dentífrico contendo CPP-ACP, respectivamente. Segundo Robertson *et al*¹⁶, pacientes com aparelho ortodôntico, que usaram dentífrico com CPP-ACP, apresentaram redução de cárie quando comparado ao placebo. Porém, Rao *et al*³ não encontraram similar prevenção entre dentífrico contendo CPP-ACP e dentífrico com 1190 ppm F, que foi significativamente mais efetivo do que o dentífrico placebo. Brochner *et al*²⁰ encontraram resultados similares comparando 1,100 ppm F e MI Paste. Em um estudo *in situ*, Shen *et al*¹³ verificaram que os dentífricos contendo CPP, MI Paste e MI Paste Plus foram mais eficazes em prevenir desmineralização do que altas concentrações de fluoreto (5000 ppm F).

Em estudos laboratoriais, também ocorrem divergências de resultados. Alguns autores têm mostrado que produtos contendo CPP-ACP aumentam

significativamente a dureza superficial do esmalte após episódios erosivos quando comparados ao controle³⁰. Entretanto, outros estudos não observaram aumento de dureza com dentifrício contendo CPP-ACP quando comparados ao controle²². Estudos comparando os dentifrícios com CPP-ACP, com e sem fluoreto, não mostraram diferença entre eles²¹.

Em suma, uma revisão sistemática sobre o assunto sugere que, a quantidade e a qualidade das evidências de ensaios clínicos são insuficientes para tirar conclusões sobre a eficácia de derivados da caseína na prevenção da cárie¹⁰. Portanto, este trabalho propôs-se a analisar a influência do dentifrício contendo CPP-ACP (MI Paste, GC, Tóquio, Japão) e CPP-ACP + F (MI Paste Plus GC, Tóquio, Japão) em esmalte descalcificado em um estudo *in vitro*, mediante ciclagem de pH, teste de microdureza superficial e perfilometria digital 3D. A ciclagem de pH tem sido utilizada em inúmeras pesquisas para testar o efeito preventivo de dentifrícios contra a cárie e as alterações do esmalte, avaliadas por microdureza^{15,21,22,24,25}. A rugosidade e a topografia do esmalte e de materiais odontológicos submetidos a diferentes tratamentos têm sido avaliadas em alguns estudos utilizando a perfilometria 3D e será aplicada a esta pesquisa^{26,27,28}.

A hipótese nula a ser avaliada é que a dureza do esmalte e a porcentagem de dureza superficial não serão reduzidas após tratamento com MI paste e MI paste plus quando comparadas ao dentifrício padrão (1100 ppm F) e saliva.

2 – METODOLOGIA

2.1 - DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado *in vitro* sob ciclagem de pH e seguiu o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da UFF (ANEXO 1,2 e 3). As alterações nas superfícies de esmalte submetidas aos dentifrícios contendo CPP-ACP, MI Paste plus (MPP) e MI Paste (MP) foram avaliadas mediante testes de dureza e topografia superficial e rugosidade (perfilometria digital 3D). Para o controle positivo

foi utilizado um dentifrício padrão com 1100 ppm F (Crest® Cavity Protection 1.100 ppm F de NaF) e o controle negativo, sem tratamento, apenas a ciclagem de pH. Primeiramente, os blocos foram selecionados mediante microdureza superficial (MDS) e distribuídos (215,78 – 399,74) em 4 grupos (n=13). Os blocos de esmalte foram submetidos à ciclagem de pH por 10 dias para avaliar a capacidade dos dentifrícios em interferir na desmineralização. O tratamento com os dentifrícios foi realizado três vezes ao dia por 60s. Após a ciclagem, a dureza superficial foi avaliada e a porcentagem de mudança de microdureza superficial (%MDS), comparada entre os grupos. A topografia do esmalte também foi avaliada mediante perfilometria digital 3D.

2.2 - SELEÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

Para a obtenção da amostra, trinta terceiros molares foram obtidos para a presente pesquisa seguindo o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense (Parecer número: 580.849, 04/04/2014- ANEXO 4).

Os dentes foram armazenados em timol 0,1% até serem utilizados, analisados em lupa estereoscópica (Olympus SZ61, aumento 20X), após polimento com escova Robson e mistura de pedra pomes fina e água destilada em baixa rotação (Kavo do Brasil S.A.); lavados com água destilada e escolhidos, obedecendo aos seguintes critérios: ausência de trincas ou defeitos macroscópicos ou qualquer outra alteração de esmalte. Primeiramente, as coroas dentárias foram seccionadas com um disco diamantado dupla face total flexível (KG Sorensen referência: 1802.7016) em máquina de baixa rotação (Kavo do Brasil S.A.), através de um corte transversal, eliminando assim, a raiz de cada dente. A seguir a coroa remanescente foi dividida em quatro blocos (2mmx2mmx3mm).

Cada bloco foi então fixado em um disco (polipropileno de 3cm de diâmetro e 1,5cm altura) de forma que a superfície de dentina interna do bloco ficasse exposta e pudesse ser planificada. Os blocos foram fixados com cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP) ao redor do mesmo, com o auxílio de uma

espátula número 7 (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, SP). O disco com o bloco preso foi adaptado a uma Politriz Universal Aropol E (Arotec, Cotia, SP, Brasil), com um sistema de suporte que permitiu que o desgaste fosse paralelo à base do disco. A planificação da dentina interna foi realizada com uma lixa de óxido de alumínio granulação # 320 (Arotec S/A Indústria e Comércio Cotia, SP, Brasil) por 30 segundos com velocidade de 150 rotação por minuto (RPM). Após de planificada a dentina, o bloco foi removido, retirado todo o excesso de cera e refixado, no mesmo disco, com a superfície de esmalte voltada para cima para que pudesse ser então planificada. Novamente o conjunto disco e bloco foram levados para a politriz, planificados e polidos. Foram utilizadas as lixas de óxido de alumínio granulação #600 de carbetto de silício granulação, #1000, #1200 #2400 (Arotec S/A Indústria e Comércio Cotia, SP, Brasil) durante 1 minuto, em 200 RPM. Polidas com pano para polimento com alumina modelo DBM (Arotec S/A Indústria e Comércio Cotia, SP, Brasil) e alumina concentrada, suspensão número 4 com 1 micron, cor azul, com adição de dispersante (Arotec S/A Indústria e Comércio Cotia, SP, Brasil) durante 2 minutos em velocidade de 75 RPM até obter-se uma superfície de aspecto vítreo. A limpeza dos espécimes foi realizada com Lavadora Ultrassônica Cristófil (Cristófil Equipamentos de Biossegurança LTDA Paraná Brasil).

2.3- TESTE DE MICRODUREZA SUPERFICIAL (MDS)

O teste de dureza superficial foi realizado no esmalte hígido (MDS_0), após a cárie artificial (pós-cárie MDS_1) e após o tratamento (pós-tratamento- MDS_2). Cinco indentações com distâncias de $50\mu\text{m}$ entre elas, foram realizadas em cada bloco em cada fase com Microdurometro Buehler (Modelo Micromet 5104 Toquio Japão) com carga de 50g por 15s. As indentações iniciais (MDS_0 -baseline) foram realizadas no centro do bloco e as demais foram realizadas paralelamente a primeira, guardando entre elas uma distância de $100\mu\text{m}$. A amostra foi selecionada a partir da média de dureza inicial (MDS_0 -baseline) em que foram escolhidos os espécimes com média entre 215,78 - 399.74. A seguir a média de dureza Knoop de cada bloco foi obtida a partir das cinco indentações realizadas em cada etapa, após a cárie artificial (pós-

carie MDS₁) e após o tratamento (pós-tratamento-MDS₂). A perda de dureza foi calculada da seguinte forma: % MDS = $[100 (MDS_1 - MDS_2) / MDS_1]$. No anexo 5 estão apresentados os resultados de dureza Knoop nas diferentes fases da pesquisa.

2.4– PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO (CÁRIE ARTIFICIAL)

Cada espécime foi imerso em 10ml de uma solução desmineralizadora por 72 hora (2mM Ca(Ca(NO₃)₂), 2 mM PO₄ (KH₂PO₄) e 75mM de acetato a 4.3 pH)²⁹ e lavados com água destilada ao término. A área exposta foi de 2mm de comprimento (eixo y) por 2mm de largura (eixo x). Como descrito anteriormente 5 indentações foram realizadas e as medias obtidas de cada amostra (MDS₁ esmalte desmineralizado).

2.5 - CICLAGEM DE PH E TRATAMENTO COM OS DENTIFRÍCIOS

Após o processo de desmineralização (cárie artificial) os 52 blocos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=13): Grupo 1- sem dentifrício, apenas as ciclagens; Grupo 2- MI Paste® (Recaldent™ CPP- ACP; GC Corporation); Grupo 3, MI PASTE® Plus (Recaldent™ CPP- ACP com 900ppmF de NaF; GC Corporation) e Grupo 4- Dentifrício Crest® – Cavity Protection (1.100 ppmF de NaF) – Procter & Gamble – Regular Flavor Paste. Os espécimes foram imersos em solução desmineralizadora, utilizando-se recipientes separados (10mL/espécime), à temperatura ambiente, por 2 horas, 3 vezes ao dia (8-10 horas, 12-14 horas, 16-18 horas). Nos demais horários, cada espécime permaneceu em 10 mL de saliva artificial (Cl de sódio 0,67g, Cl de cálcio 0,1168g, carboximetil celulose 8g, Cl magnésio 0,0408, Cl de potássio 0,96g metilparabeno 1g, sorbitol líquido 24g, água destilada 964,938ml, mono fosfato de potássio 0,274g) à temperatura ambiente.

Antes de cada ciclo de desmineralização, os espécimes foram retirados da saliva artificial, removido o excesso de saliva com papel absorvente e aplicado o dentifrício de acordo com os grupos acima. O dentifrício foi aplicado sobre a superfície de esmalte 3 vezes ao dia, por 1 minuto. A MI Paste e a MI Paste plus foram aplicadas com microbrush (0,03g), diretamente sobre o bloco de esmalte²². O dentifrício Crest® Cavity Protection foi aplicado na forma diluída (3:1) com água destilada. A solução foi colocada em uma seringa de insulina e dispensado 0.15 ml e em cada bloco de esmalte^{22,24}. As soluções foram trocadas ao final dos ciclos, diariamente, e, o período de ciclagem, foi de 10 dias consecutivos.

2.6 - ANÁLISE TOPOGRÁFICA

Cinco blocos de cada grupo, com média de durezas mais próximas da média do grupo, foram analisados mediante análise topográfica (Perfilômetro 3-D - Form Talysurf 60, Taylor Hobson, Leicester, UK). As imagens topográficas obtidas em cada grupo (Grupo 1,2,3 e 4) foram comparadas. Em cada espécime, uma área de aproximadamente 500 mm² foi escaneada utilizando 5 pontos espaçados de 7,0 mm nas direções *x* e *y* e de 100 mm com espaçamento de 16 nm na direção. Os seguintes parâmetros foram obtidos: Sa (Média aritmética da rugosidade superficial), Sq (Raiz quadrada altura média da superfície), Sz (Amplitude entre os picos mais altos e vales mais profundos), Sp (Altura máxima dos picos), Ssk (Assimetria da distribuição da altura) e Sku (Morfologia dos picos e vales mais pontiagudos).

2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados foram submetidos à análise estatística pelos testes de Kruskal-Wallis e as comparações entre os grupos foram realizadas

com o Mann-Whitney. Os testes estatísticos foram realizados com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 - ARTIGOS PRODUZIDOS

Comparison of the remineralizing potential of CPP-ACP dentifrices with and without fluoride in artificial enamel lesions: An in vitro study

¹Patricia Regina Almeida de Oliveira, DDS, MSc

²Ana Beatriz Monteiro Fonseca, DDS, MSc, PhD, associate professor

³Monica Almeida Tostes*, DDS, MSc, PhD, associate professor

^{1,2}Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Rua Mário Santos Braga, nº 28, Campus Valonguinho, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

³Department of Statistics, Fluminense Federal University, Rua Mário Santos Braga, s/n7o andar, Campus Valonguinho, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author: Dra. Monica Tostes, Rua Presidente Backer, 337/903, Icaraí, Niterói, RJ – CEP 24240-045 Brazil, e-mail address: matostesuff@yahoo.com.br. Tel- 55(21)26299839

Comparison of the remineralizing potential of CPP-ACP dentifrices with and without fluoride in artificial enamel lesions: An in vitro study

ABSTRACT:

The aim of this study was to evaluate the effect of CPP-ACP dentifrices with and without fluoride on enamel demineralization. Enamel blocks (n=52), previously selected through surface hardness analysis, were submitted to daily treatment with dentifrice and a pH- cycling model. The enamel blocks were divided into four groups (N=13): Group 1, negative control – without dentifrice (NCO); Group 2, Tooth Mousse (TM)- Recaldent™ GC Corporation Tokyo, Japan); Group 3, Tooth Mousse Plus (TMP)-Recaldent™ 900 ppm as NaF, GC Corporation Tokyo, Japan) and Group 4, Crest™ Cavity Protection (1.100 ppmF de NaF) – Procter & Gamble) was used as a positive control (PCO). The specimens were soaked in demineralizing solution for 6 hours and remineralization in artificial saliva for 18 hours alternatively for 10 days. The treatments were applied three times for 60s after the remineralization period. The dentifrice pastes were prepared with deionized water, in a 1:3 proportion (w/w) or undiluted product in the case of the CPP-ACP formula. Demineralized tissue loss was analyzed by microhardness and profilometry. Data were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests comparisons ($\alpha = 0.05$). The SMH values observed for the TM(47.80 ± 28.50) and TMP(53.68 ± 27.66) groups differ from that of PCO group (90.26 ± 17.12), which were significantly higher than that found for the NCO(39.48 ± 14.27) group ($p=0.0000$). The MI paste group did not show any effect on the inhibition of demineralizing. % SMHL was significantly lower in group 4 when compared to the group 1 ($p < 0.001$). The enamel samples treated with MI paste Plus and Crest showed smoother surfaces than those in the MI paste group

.
.

Introduction

White-spot lesions are an early stage of tooth decay formation. The combination of fluoride with a source of bioavailable calcium as an adjunct has been proposed for the treatment of early stage caries^{1,2,3,4,5,6}. Casein Phosphopeptide - Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) is one such agent that has been reported to have anti cariogenic properties. CPP-ACP is thought to prevent demineralization and enhance remineralization by increasing the concentration of calcium and phosphate ions, leading to a state of supersaturation. CPP-ACP is a useful cariostatic agent for the control of dental caries, and it can be used as an adjunct therapy to prevent and reduce caries in high-risk patients, as well as to reduce dental erosion in patients with gastric reflux or other disorders^{7,8,9,10,11,12}.

The first of these calcium phosphate technologies to be used was casein phosphopeptide with CPP-ACP. One product that uses CPP-ACP is called Tooth Mousse or MI Paste (TM) and there is Tooth Mousse Plus or MI Paste Plus (TMP) with 900 ppm F. Tooth Mousse/MI Paste (GC Corporation, Tokyo, Japan). These products are topical remineralizing creams (10% w/v)⁸.

The beneficial effect obtained with CPP-ACP is associated with the ability to localize calcium and phosphate in dental plaque in the proximity of the tooth, thus making it available when needed. In the presence of an acid environment, such as after eating, when the pH of the mouth decreases, the casein phosphopeptide proteins release amorphous calcium and phosphate, creating a supersaturated state of calcium and phosphate around the tooth. The CPP-calcium phosphate complexes are anticariogenic and capable of remineralizing the early stages of enamel lesions^{14,15}.

Several *in vivo* trials have been carried out to evaluate the role of CPP-ACP on the remineralization of enamel^{11,13,16,17,18}. Shen *et al*¹³ found increased salivary calcium and phosphate producing the highest levels of enamel lesion remineralization compared to other products with high concentrations of fluoride. The application of TM or TMP pastes on sound enamel surfaces resulted in the inhibition of enamel demineralization, with a better effect for the latter paste¹¹. But in randomized controlled trials the TMP or TM did not appear to be more effective than regular care (1000-ppm or 1100-ppm fluoridated toothpaste).^{15,19,20} In another study the TM group did not show any effect on the inhibition of lesion progression¹⁵.

In laboratory investigations, the TM and TMP pastes were as effective as a dentifrice containing fluoride^{21,22,23}. According to Rehder Neto *et al.*²¹ the presence of the fluoride ion in CPP-ACP + F could interact with the ACP component of the casein complex, rendering both inorganic components ineffective and not having the expect synergism. In addition, TMP demonstrated low levels of fluoride available when compared to fluoridated toothpaste²⁴.

The present study evaluated the effect of the CPP-ACP with or without fluoride dentifrice on enamel decalcification prevention. Tooth decay is the result of progressive mineral loss from dental tissues. *In vitro* demineralization models enable researchers to examine fundamental processes associated with mineral loss from teeth²⁵.

The effects of acids on dental enamel are of fundamental importance for studies of dental caries and erosive tooth wear. Dissolution of tooth mineral by acids of dietary and gastric origin contributes to the loss of surface tissue in tooth wear. Enamel caries is characterized by subsurface demineralization resulting from the action of acidic metabolites of bacteria in plaque²⁶. Real-time changes in the topography of surface demineralizing enamel during exposure to CCP-ACP dentifrice have been studied by scanning force microscopy²⁷. There have also been reports of the use of atomic force microscopy (AFM) to study the effects of acid on enamel in erosion²². Profilometer 3D has been used to evaluate the roughness and topography of composite resin after the use of mouthwash with alcohol.²⁸

Based on the above considerations, this *in vitro* study evaluated the influence of dentifrices with CPP-ACP and CPP-ACP-F on the demineralization of human enamel using the Knoop microhardness test as the evaluation method. Surface micro hardness is a physical property which assesses the effect of chemical and physical agents on hard tissues. Micro hardness indentation provides a relatively simple, rapid and non-destructive method in demineralization and remineralization studies²². The roughness and topography changes after pH cycling and treatment were performed using a 3-D profilometer.

The null hypothesis to be tested is that in a pH cycling model system, remineralization treatments such as MI paste or MI paste Plus do not result in a greater reduction in microhardness and % loss of hardness surface compared to a

placebo (artificial saliva) and regular dentifrice fluoride when applied to artificial subsurface enamel lesions.

Methods and Materials

Sample preparation

In this study, thirty-five human third molar teeth, which had been extracted for surgical reasons, were used. This study was approved by the Ethical Committee of Medical Science, Federal Fluminense University (protocol number 580.849). The samples were free of caries and fluorotic or hypomineralized lesions and any other visible defects. The teeth were stored in thymol 0.1% during the sample preparation process. Four enamel blocks were obtained from each tooth. After embedding the blocks in acrylic resin, the buccal surfaces of the enamel specimens (2mmx2mmx2mm) were ground with SiC paper (400, 600 and 1200 grits) (Struers S/A, Struer, Denmark) in order to obtain flat surfaces. The specimens were then polished using a 1µm diamond polishing suspension with a polishing cloth (Arotec Ind & Come, Cotia, SP, Brazil). The baseline surface microhardness (SMH₀) of all specimens was measured using a microhardness tester (Micromet 2001, Buehler, IL, USA) with a Knoop diamond indenter under a 25g load for 15s. The average of five indentations made on each specimen was used for the SMH baseline value (SMH₀). After SMH measurements, 52 enamel blocks were selected, with a Knoop hardness number (KHN) ranging from 215,78 to 399.74. The enamel blocks were distributed into 4 groups of 13 blocks each: Group 1 (NCO)- negative control – without treatment; Group 2 (TM)- MI Paste - Recaldent™, GC Corporation Tokyo, Japan); Group 3 (TMP)- MIPASTE PLUS (Recaldent™ 900 ppm as NaF, GC Corporation Tokyo, Japan); and Group 4 (PCO)- control positive (Crest™ Cavity Protection (1.100 ppmF de NaF) – Procter & Gamble) was used as a positive control).

Artificial caries

Each specimen was immersed in 10ml of a demineralizing solution for 72 hours²⁹ (2mM Ca ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), 2 mM PO_4 (KH_2PO_4) and 75mM of acetate at 4.3 pH²⁹ and washed at the end in distilled water for 1 min. This demineralizing solution was used in both pH-cycling model (demineralization) and caries-like lesions on enamel blocks. The exposed area was 2mm long (y axis) by 2mm wide (x axis). As described earlier, 5 indentations were made and the averages obtained from each sample (demineralized enamel - MDS_1).

PH cycling and treatment with dentifrices

The enamel blocks were submitted to four pH cycles per day for 10 days, at 37°C²⁹. After sonication and rinsing with distilled water, the specimens were immersed separately in 10mL of the demineralizing solution (8-10h, 12-14h, 16-18h) and in the remaining hours (18h/day) were transferred to an artificial saliva solution (10mL). At each transfer between the different solutions, the enamel specimens were rinsed in distilled water for 1 min at 37°C. The treatment was applied in a slurry in a proportion of 1:3 of deionized water for 60s for Group 4. A standardized volume (0.15 mL) was applied on each sample. The CPP-ACP (Groups 2 and 3) formulas were used undiluted (0.03g) for the same time¹⁵. Negative control (Group 1) remained unexposed to the pastes. The treatment was carried out before the first, second and third demineralization cycles. After the last demineralization challenge, the enamel specimens were rinsed in distilled water for 1min, and then immersed in 10mL artificial saliva. The solutions were changed every day.

Microhardness analysis

The post-treatment SMH_2 measurements were conducted with the same static load and time applied for the baseline measurements. Five indentations spaced 100 μm from the baseline indentations were made with a Knoop diamond indenter under

a 25 g load for 15s. The percentage change of SMH (%SMH) was calculated [% SMH = 100 (SMH₂ – SMH₁)/SMH₁].

Topographic Analysis

The topographic analysis was performed using a 3-D Profilometer (Form Talysurf 60i, Taylor Hobson, Leicester, UK). For each specimen, an area of 1 mm² (1 x 1 mm) was scanned with a 20nm z-resolution, employing 4,000 steps in the x-axis and a spacing of 2 µm in the y-axis. The roughness of the 3-D reconstructed images was obtained using the 3-D *Sa, Sq, Sp, Sz, SsK and Sku* parameters.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by means of the statistical program SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The scores were subjected to statistical analysis by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The statistical tests were performed with a confidence interval of 95% (p<0.05).

Results

From the initial 52 sections used in this study, one was rejected after pH-cycling, due to extensive loss of the external surface of the lesion and it being too difficult to measure.

The surface microhardness analysis of all groups is shown in Table 1. The specimens demonstrated a significant decrease in microhardness after treatment (p<0.05). Microhardness data (mean values and standard deviations), expressed in KHN, and statistical comparisons are summarized in Table 1. Kruskal-Wallis indicated significant differences among microhardness values obtained as a result of exposing specimens to the different dentifrices (p< 0.05). Mann Whitney tests ascertained that microhardness values observed for the TM (Group 2) differ from

that of the PCO (Group 4), but was not different in the NCO (Group 1) and TMP (Group 3). Specimens treated with TMP (Group 3) differ from the negative NCO (Group 1). Group 1 and Group 2 demonstrated a significant reduction in microhardness values after treatment and pH cycling ($p < 0.05$), substantiating the demineralization of enamel. The microhardness loss percentage in Group 4 was significantly lower when compared to the other groups ($p < 0.000$). (Figure 1).

Representative 3D reconstructed images showing the topography of the enamel at the end of the experimental protocol are shown in Figure. In table 2, roughness and hybrid parameters

Table 1-Surface microhardness results and % SMHL (mean \pm SD) of human enamel specimens according to the different groups.

Groups	SMH ₀ (Baseline) Mean \pm S.D	SMH ₁ (after lesion) Mean \pm SD	SMH ₂ (after treatment) Mean \pm S.D	%SMHL Mean \pm S.D
1 NCO)	335.77 \pm 45.10A	303.14 \pm 33,23A	39.48 \pm 14.27A	87.22 \pm 4.85B
2 (TM)	322.62 \pm 49.04A	294.98 \pm 47,86A	47.80 \pm 28.50AB	84.19 \pm 16 AB
3 (TMP)	321.10 \pm 46.18A	287.64 \pm 40,04A	53.68 \pm 27.66B	79.39 \pm 10.29B
4 (PCO)	317.86 \pm 36.86A	296.56 \pm 40,04A	90.26 \pm 17.12C	68.41 \pm 7,50C

(*) different letters show statistical difference (vertical line) ($\alpha < 0.05$)

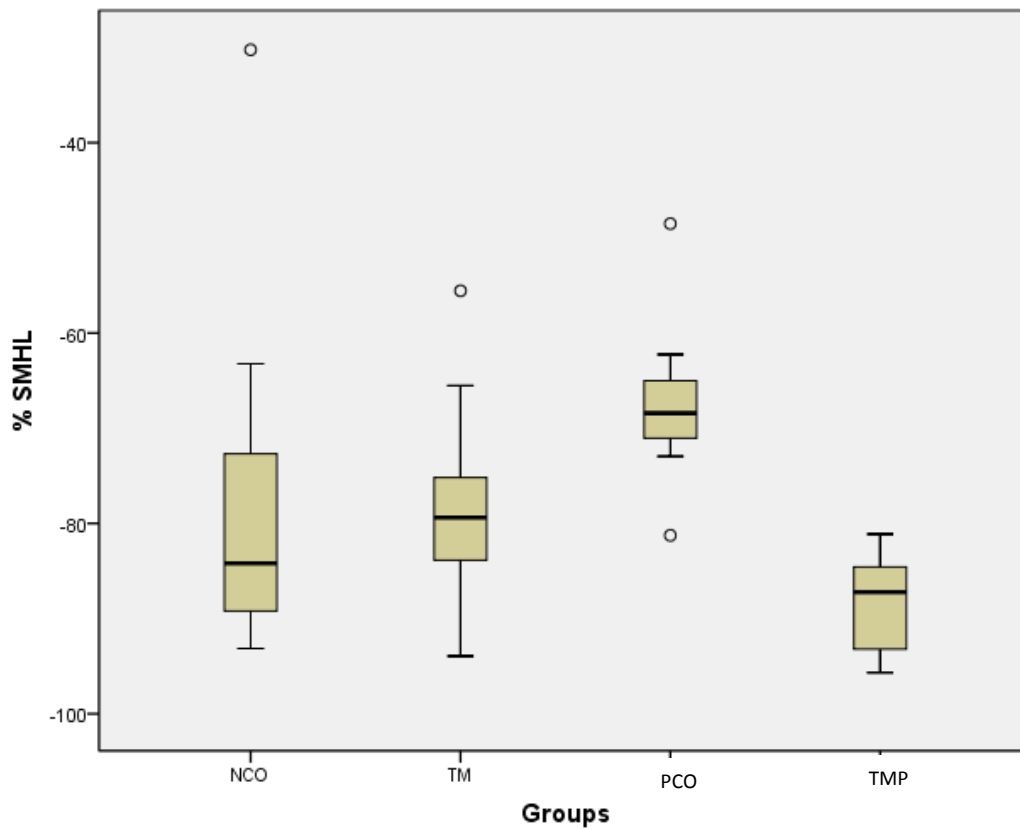


Figure 1- Box plot graphic representative of the SMHL%.

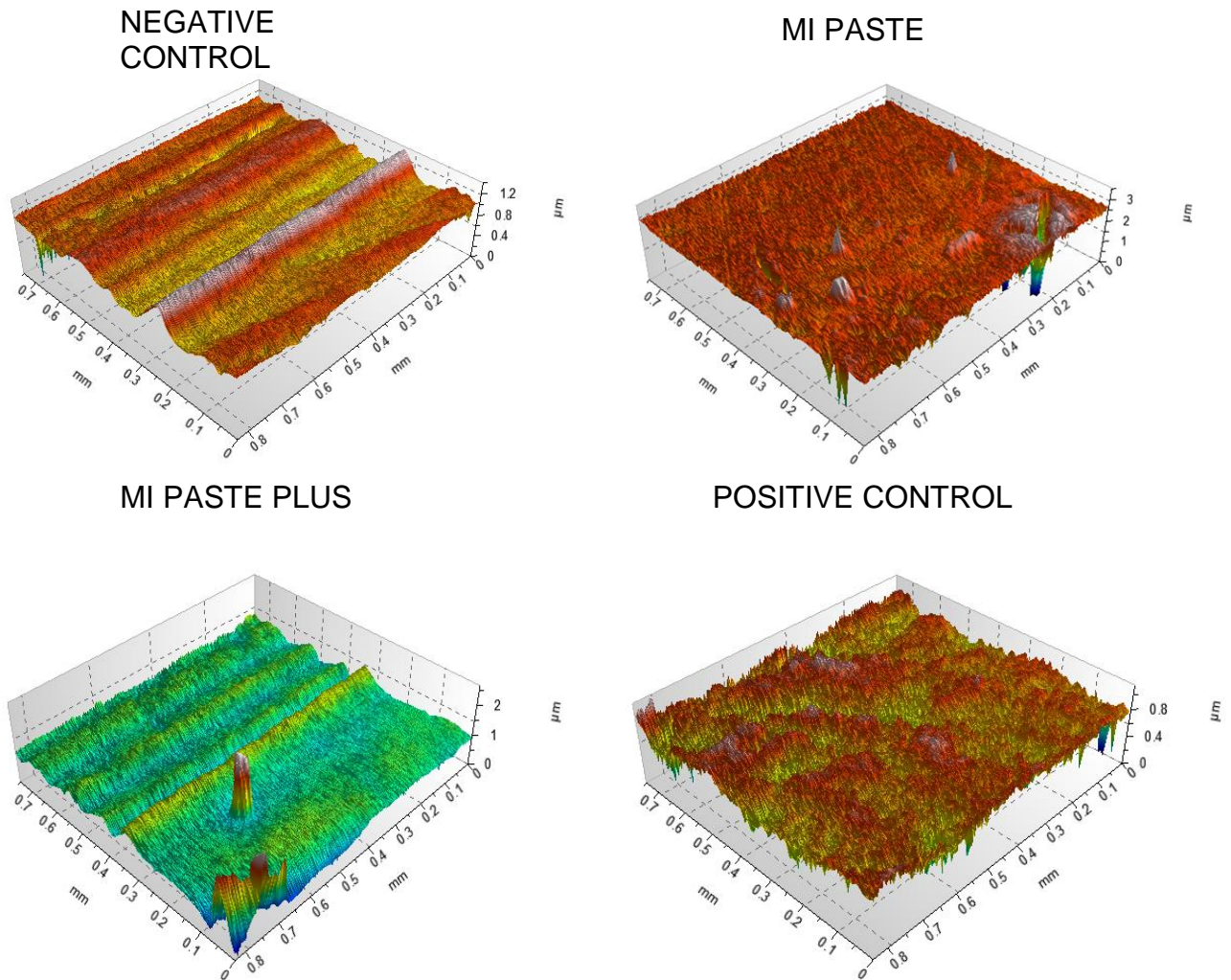


Figure 2- Representative 3-D reconstructed images of each group (α and β angles = 45° / z axis in μm). Images illustrating the morphology of enamel .

TABLE 2- Roughness and hybrid parameters

Parameters	GROUPS			
	NCO Saliva Group 1	TM MI paste Group 2	TMP MIpaste Plus Group 3	PCO Crest Group 4
Arithmetical mean height of the surface (Sa)	1.36	2.01	1.35	1.27
Root mean square height of the surface (Sq)	1.82	2.50	1.94	1.85
Maximum height of the surface (Sz)	14.4	19.3	35.1	17.1
Maximum height of peaks (Sp)	3.55	4.65	8.55	2.56
Skewness of height distribution (SsK)	-0.81	-0.98	-2.01	-2.57
Kurtosis of height distribution (Sku)	5.85	4.32	16.9	13.8

Discussion

The purpose of this study was to evaluate the effect of CCP-ACP dentifrice with and without fluoride on demineralized enamel using surface microhardness in a pH-cycling model, simulating the conditions in the oral cavity. Microhardness analysis have been widely used to assess changes occurring in enamel after treatment with toothpaste^{29,30,31}. Digital profilometry is another accepted method applied in erosion experiments and it was included in this study²⁸.

Microhardness values obtained after using the non-fluoridated MIpaste (TM) and MIpaste Plus (TMP) formulations differ from those observed in the Fluoride Dentifrice (FD- Positive Control). This result was different from that found on previous investigations in which difference has not been found in the SMH values among specimens treated with the same CPP-ACP, CPP-ACP+F and Fluoride Dentifrice^{21,22}. Neither study found differences between dentifrices between dentifrices with 1100 ppm-F, MI paste Plus and MI paste. However, similar to our

results, in those studies the MI paste (without fluoride) did not show any differences in relation to the control (placebo) and MI paste plus. In another study the MI paste group also did not show any effect on the inhibition of lesion progression¹⁵. According to Pulido *et al*¹⁵, it might be necessary to have a longer application time to be able to detect some deposition of calcium and phosphate in a remineralized lesion. However, the application of CPP-ACP dentifrice in lesion erosive with continuous replenishment of saliva-like solution significantly hardened enamel softened by a cola drink³⁰. In addition, CPP-ACP showed higher remineralizing potential when used in combination with a fluoridated toothpaste than when used alone³¹. However, different from the present study, the MI paste was superior to the dentifrice with fluoride (1100 ppm) albeit without statistically significant difference. This result may be explained by the 3 min period used for the MI paste group, while the positive control dentifrice group had 1 min. In addition, the authors do not explain whether the solutions were replaced every day, as was the case in the present study, which could have led to an oversaturation of the solution in relation to calcium and phosphorous, thus contributing to greater remineralization.

Microhardness values obtained after using the non-fluoridated MI paste (TM) and MI paste Plus (TMP) formulations do not differ from each other. These findings showed that there was no difference in the surface microhardness of enamel following treatment with TM and TMP dentifrices during cariogenic challenges (Table 1). However, in the model used no dentifrice was able to totally inhibit enamel demineralization. The fluoride dentifrice groups showed lower losses, with group 4 (Crest 1.100 ppm-F) performing better in demineralization prevention than group 3 (TMP-900 ppm-F). This model also showed a dose-response for dentifrice MI paste Plus (900 ppm-F), but that was not as effective as the Crest (1100 ppm-F) dentifrice. These results may be due to the presence of the fluoride ion in CPP-ACP + F that could interact with the ACP component of the casein complex, rendering both inorganic components ineffective^{10,22} and a lower level of fluoride available when compared to the other NaF systems²⁴.

While some studies focused on evaluating the remineralizing potential of CPP-ACP and CPP-ACP+F pastes after pH cycling for five or six days had been completed^{15,21,22}, in the current investigation, the effect of CPP-ACPs were verified under conditions that allowed those dentifrices to act concomitantly on demineralization and remineralization processes for 10 days. The same timeframe

was used by Kumar *et al*³¹ and Karlinsey *et al*²⁴. One limitation, however, relies on the fact that the demineralizing process is exaggerated under *in vitro* conditions. In addition, the pH-cycling model should show F dose response effect differentiating different concentrations of fluoride but in the model used the dose-response occurred in the different concentrations of products containing fluoride.

Thus, enamel demineralization evaluated by %SMH decreased with CPP-ACP+F (TMP -900 ppm-F) and showed a difference between 1100 ppm-F. Considering these results we conclude that the combination of calcium phosphate and Na F does not seem to add any benefits to the demineralization process. But, according to Kumar *et al*³¹ the CCP-ACP could show a higher remineralizing potential when applied as a topical coating after the use of a fluoride toothpaste.

The representative 3-D reconstructed images showing the topography of the groups at the end of the experimental protocol are shown in Figure 2 and Table 2. It can be noted that, in general, roughness was similar in all groups after ten days. In the present study, the PCO samples (1100 ppmF) and TMP and show smoother surfaces when compared to the NCO (without dentifrice) and TM. In the Zhang *et al*³² study, the SEM images of the enamel surfaces in the CPP-ACP and the NaF groups had different appearances. In the NaF group, numerous particles and amorphous crystals were arranged on the surface, but in the CPP-ACP group, those crystals seemed to be more homogeneous than those in the NaF group, and there was no obvious inter-crystalline space²⁸. According to Turssi *et al*²² application of fluoride dentifrice, CPP-ACP+F and CPP-ACP seemed to lead to the deposition of a mineral phase on the eroded enamel surfaces. In the present study, the value of S_a was similar to PCO and TMP groups, including the NCO group. However, although the S_a value was similar, the image topography shows differences for the groups treated with TMP (parameters in Table 2)

In a clinical study the control surface (after etching + saliva) showed a 3.5% decrease in roughness after 3 weeks, while the test surface (MI paste plus) decreased 18.1%. The degree of roughness of these two surfaces after 6 months decreased by 66.4% and 88.0%, respectively²⁹. In conclusion, the preventive protocol for CCP-ACP may demand extra daily applications, according to Baroni *et al*²⁷. According to Baroni *et al*²⁷, saliva has remineralizing potential, but in the presence of CPP-ACP, this potential is enhanced.

No conclusion may be reached on the basis of the present study, without a protocol for the evaluation of artificial lesions and remineralization with 3D profilometry. Their study needs to be included in future investigations in order to obtain detailed information about the character of the increase in roughness as a result of dentifrice treatment in pH cycling.

In summary, the findings of the present study suggest that the CCP-ACP with fluoride, under laboratorial conditions were able to reduce carious lesions in demineralizing enamel. Despite the limitations of this *in vitro* study, the use of regular fluoride dentifrice and agents based on calcium and phosphate compounds could be useful to control the progression of carious lesions, but progression of lesions in enamel may be reduced by CPP-ACP+F, although these products may not offer advantage over fluoridated toothpaste.

Conclusion

The results obtained from this study showed no remineralizing effect of MI paste on early lesions in enamel, although slightly less demineralization was observed from the use of MI paste when compared with artificial saliva. On the other hand, MI paste Plus demonstrated having protective effect against demineralization; however, regular fluoride dentifrice (1100 ppm/F) should still be considered the most important method against caries progression. The enamel samples treated with MI paste Plus, Crest and saliva showed smoother surfaces than those in the MI paste group.

References

1. Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ, Reynolds EC. Prevention of demineralization around orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:705.e1-9.
2. Uysal T, Amasyali M, Ozcan S, Koyuturk AE, Akyol M, Sagdic D. In vivo effects of amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite on enamel demineralization around orthodontic brackets. *Aust Dent J* 2010; 55:285-91.
3. Rao SK, Bhat GS, Aradhya S, Devi A, Bhat M (2009). Study of the efficacy of toothpaste containing casein phosphopeptide in the prevention of dental caries: a randomized controlled trial in 12- to 15-year-old high caries risk children in Bangalore, India. *Caries Res* 2009;43:430-435.
4. Krithikadatta J, Fredrick C, Abarajithan M, Kandaswamy D. Remineralisation of occlusal white spot lesion with a combination of 10% CPP-ACP and 0.2% sodium fluoride evaluated using Diagnodent: a pilot study. *Oral Health Prev Dent* 2013;11:191-6
5. Johansson I, Lif Holgerson P, Kressin NR, Nunn ME, Tanner AC. Snacking habits and caries in young children. *Caries Res* 2010;44:421-430.
6. Tufekci E, Dixon JS, Gunsolley JC, Lindauer SJ. . Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod*, 2011;81:206-210. 2.
7. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *JDentRes*1997;76:1587-95.
8. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *J Dent Res* 2008; 87:344-348
9. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010; 89:1187-97.
10. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 2008;139:915-24.
11. Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography. *J Dent* 2011;39:405-13
12. Padmini Somasundaram; Vimala, N.; Mandken, L.G. Protective potential of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate containing paste enamel surface. *Conserv J Dent*, 2013. 16(2): 152-156.

13. Shen P, Manton DJ, Cochrane NJ, Walker GD, Yuan Y, Reynolds C, Reynolds EC. Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent* 2011; 39:518-25
14. Tung MS, Eichmiller FC. Dental applications amorphous calcium phosphate. *J Clin Dent* 2003; 10:1-6.
15. Pulido MT, Wefel JS, Hernandez MM, Denehy GE, Guzman-Armstrong S, Chalmers JM, Qian F. The inhibitory effect of MI paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent* 2008;33:550-5.
16. Robertson MA, Kau CH, English JD, Lee RP, Powers J, Nguyen JT. MI Paste Plus to prevent demineralization in orthodontic patients: a prospective randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; 140:660-8.
17. Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CE, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPPACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res* 2008;42:171-184.
18. Altenburger MJ, Gmeiner B, Hellwig E, Wrbas KT, Schirrmeister JF. The evaluation of fluorescence changes after application of casein phosphopeptides (CPP) and amorphous calcium phosphate (ACP) on early carious lesions. *Am J Dent* 2010;23:188-192.
19. Sitthisettapong T, Phantumvanit P, Huebner CT, DeRouen D Effect of CPP-ACP Paste on dental caries in primary teeth: A Randomized trial. *J Dent Res* 2012; 91:847-852.
20. Brochner A, Christensen C, Kristensen B, Tranaeus S, Karlsson L, Sonnesen L, *et al.* Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig* 2011; 15:369-373.
21. Rehder Neto, FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesion. *J Dent* 2009; 37: 786-790.
22. Turssi CP, Maeda FA, Messias DCF, Rehder Neto FC, Serra MC, Galafassi D. Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. *Am J Dent* 2011; 24: 165-8.
23. Carvalho FG, Brasil VLM, Silva Filho TJ, Carlo HL, Santos RL, Lima BASG. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Braz Oral Res* 2013; 27:463-70.6.

24. Karlinsey RL, Mackey AC, Stookey GK, Pfarrer AM. In vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium phosphate technology. *Am J Dent* 2009; 22:180-4.
25. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of teeth. *Adv Dent Res* 1995;9:175-93.
26. Zhang XZ, Anderson P, Dowker SEP, Elliott JC. Optical profilometric study of changes in surface roughness of enamel during in vitro demineralization. *Caries Res* 2000;34:164–174
27. Baroni C, Marchionni S, Bazzocchi MG, Cadenaro M, Nucci C, Manton, DJ. A SEM and Non-Contact Surface White Light Profilometry In Vivo Study of the effect of a crème containing CPP-ACP and fluoride on young etched enamel. *Scanning* 2013; 9999:1–8.
28. Silva EM, Sá Rogrigues CVF, Silva DS, Amaral CM, Guimarães JGA. Effect of toothbrushingmouthrinse-cycling on surfaceRoughness and topography of nanofilled, microfilled, and microhybrid resin composites. *Oper Dent*, 2014; 39-2.
29. Ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16:201-10
30. Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *J Dent* 2007;35:355-357. 9.
31. Kumar VL, Itthagaran A, King NM. The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Aust Dent J* 2008;53:34–40.
32. Zhang Q, Xou J; Yang R, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *IntJ Paediatr Dent* 2011; 21:374–38

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir deste estudo mostraram que a MI paste não foi capaz de prevenir a progressão da desmineralização em esmalte. A MI paste Plus demonstrou efeito protetor; porém, o dentifrício fluoretado padrão (1100 ppm / F) foi mais efetivo em prevenir desmineralização e deve ser considerado como método preventivo na redução da desmineralização do esmalte.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA DOADOR DE DENTES HUMANOS**

Eu, _____, abaixo identificado(a) e firmado(a), portador(a) de RG _____, endereço _____, telefone:(21)_____ declaro ter sido informado(a) claramente sobre todos os benefícios relacionados a doação de dentes. Declaro também que os termos Odontológicos foram explicados e todas as minhas dúvidas esclarecidas pelo Cirurgião-Dentista _____ CRO _____ que extraiu meu(s) dente(s) por razões clínicas conforme descrito em meu prontuário odontológico. Estou ciente, principalmente, de que a doação não trará nenhum dano a minha saúde e que este(s) dente(s) será(ão) utilizado(s) na pesquisa, “COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO DA CPP-ACP COM E SEM FLUORETO EM ESMALTE HUMANO DESMINERALIZADO: ESTUDO IN VITRO”, sob a responsabilidade da professora Mônica Almeida Tostes, membro do Grupo de pesquisa Zeus e pesquisadora da UFF. Estou ciente também que, uma vez doado o(s) dente(s), tenho 30 dias a contar desta data, para retirá-lo(s), caso desista da doação, sem qualquer prejuízo pessoal. Nesta pesquisa, o(s) dente(s) será(ão) cortado(s) em vários pedaços, como devidamente explicado pelo Cirurgião-Dentista que extraiu meu(s) dentes(s) e não poderá(ão) ser devolvido(s) na sua forma íntegra após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e início da pesquisa. Declaro também ter sido informado (a) de que meu(s) dente(s) será(ão) utilizado(s) somente para esta pesquisa e que terei direito de saber todos os dados obtidos e do andamento da pesquisa bem como dos seus resultados e que após o término da mesma, autorizo que os pedaços de meu(s) dente(s) sejam descartados em lixo biológico seguindo as normas de biossegurança para descarte de material odontológico da Faculdade de Odontologia da UFF, segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anvisa. Além disso, estou esclarecido (a) de que a pesquisadora Mônica Almeida Tostes manterá sigilo absoluto sobre os dados relacionados a meu(s) dente(s) que será(ão) identificado(s) e que essa identificação só será de

conhecimento da pesquisadora e que a mesma será responsável pelo(s) dente(s) doado(s) e se compromete a esclarecer minhas dúvidas após a doação através do telefone (21) 2629-9829 ou no endereço: Faculdade de Odontologia da UFF - Rua Mário Santos Braga, 30 – terceiro andar – Valonguinho- Niterói.

Data	Dente doado	Assinatura do doador ou responsável	Assinatura do Cirurgião-Dentista responsável

Niterói, de de 2013

ANEXO 2

REGIMENTO DO BIORREPOSITÓRIO DO GRUPO DE PESQUISA ZEUS

I – ORGANIZAÇÃO DO BIORREPOSITÓRIO

O biorrepositório do grupo de Pesquisa Zeus situar-se-á no prédio anexo da Faculdade de Odontologia da UFF situado na Rua Mário Santos Braga, 30 / terceiro andar – Valonguinho – Niterói sob a responsabilidade da Professora Associada II da Faculdade de Odontologia da UFF Thereza Christina Lopes Coutinho (CV lattes: <http://lattes.cnpq.br/9325691799716501>), mat SIAPE: 2171753, coordenadora do grupo, certificado pela UFF (<http://www.proppi.uff.br/portaagir/unidade/grupo-de-pesquisa-zeus>) e pelo CNPq no diretório dos grupos de pesquisa (<http://dgp.cnpq.br/diretorioc/fontes/detalhegrupo.jsp?grupo=0005402X4EPZ6G>) desde 2008. As instalações do biorrepositório utilizarão o refrigerador e a estufa do Laboratório de Pesquisa da Pós-graduação de Odontologia assim como as pias e autoclave para esterilização. A solução de timol para armazenagem dos dentes será obtida na Farmácia Universitária da UFF e os potes plásticos e as etiquetas de identificação obtidos com recursos próprios do pesquisador.

II – COLETA DOS DENTES HUMANOS

Os dentes doados serão coletados em consultórios particulares e na Faculdade de Odontologia da UFF (Clínica de Cirurgia Bucal) através do TCLE específico de Doador de Dentes Humanos (Anexo) e Termo de Responsabilidade do Odontólogo (Anexo) que fará a coleta dos dentes através de extração dos mesmos por razões clínicas conforme disposto no prontuário do paciente. Os dentes coletados serão identificados em potes individuais etiquetados com o nome do paciente e o respectivo dente sendo mantidos em timol a 0.1% e que serão fornecidos aos dentistas pelo biorrepositório.

II – REGISTRO E ARMAZENAMENTO DOS DENTES HUMANOS E INFORMAÇÕES ASSOCIADAS

Todos os dentes coletados e informações associadas terão garantida a preservação de privacidade, segurança e integridade dos dados. Todos os dados referentes aos pacientes e respectivos dentes obtidos dos Termos de Doação serão registrados em planilha Excel e codificados, sendo de conhecimento apenas do pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa em cadastro específico mantido no laptop pessoal da professora responsável pelo biorrepositório que possui acesso por senha. Os dentes identificados serão mantidos sob refrigeração em solução de timol a 0.1% até o momento da pesquisa e em estufa conforme a metodologia da pesquisa no âmbito do laboratório de Pós-graduação da FOUFF. O tempo de armazenamento dos dentes compreenderá o disposto no cronograma da pesquisa.

III – DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Todos os dentes humanos e informações associadas serão obtidos com autorização dos doadores, por meio de um processo de consentimento, que será pautado pelo princípio da responsabilidade e da confiança entre estes e o cirurgião-dentista que fará o procedimento de extração dentária e que não fará parte da equipe da pesquisa e que determinará a necessidade de remoção do elemento dentário por razões clínicas. O material biológico humano pertencerá ao sujeito da pesquisa, cabendo ao biorrepositório sua guarda e gerenciamento durante o período da pesquisa. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano no biorrepositório será formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa.

O doador terá a liberdade de retirar o seu consentimento para a manutenção ou a utilização de seu dente armazenado e informações associadas no biorrepositório, 30 dias após a doação, sem que isso importe qualquer prejuízo pessoal conforme disposto no TCLE.

IV - DA UTILIZAÇÃO DOS DENTES HUMANOS E DAS INFORMAÇÕES ASSOCIADAS

O Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico (Anexo) será assinado por todos os pesquisadores envolvidos na manipulação e uso do dente humano e informações associadas e constará como anexo do projeto. O acesso do pesquisador responsável às amostras armazenadas no biorrepositório dar-se-á somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP.

V – DO ARMAZENAMENTO E DO DESCARTE DOS DENTES HUMANOS E INFORMAÇÕES ASSOCIADAS

De acordo com os princípios éticos e jurídicos estabelecidos na Resolução 441/11 e em conformidade com os respectivos procedimentos de coleta e dos cronogramas dos projetos de pesquisa aprovados, fica estabelecido que o período de armazenamento dos dentes humanos e das informações vinculadas será durante o período de execução da pesquisa. Ao término da mesma, o pesquisador responsável irá descartar os dentes utilizados na pesquisa, conforme normas vigentes da Faculdade de Odontologia da UFF no que diz respeito à biossegurança, e de acordo com o TCLE, em lixo biológico da Faculdade respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do doador.

VI – DA RESPONSABILIDADE

O biorrepositório do grupo de pesquisa Zeus ficará sob a responsabilidade da professora Thereza Christina Lopes Coutinho, líder do grupo, assim como ao pesquisador do grupo responsável pela pesquisa, aos quais caberá a manutenção da infraestrutura para o adequado funcionamento e armazenamento dos dentes humanos e informações associadas. Os pesquisadores componentes do respectivo

grupo de pesquisa responsáveis por projetos que utilizem os dentes humanos armazenados neste biorrepositório, ou suas informações, deverão se comprometer, assim como toda a sua equipe de pesquisa, com o cumprimento de todas as normas, de acordo com o Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico (Anexo). Os pesquisadores responsáveis por projetos de pesquisa que colem os dentes humanos com fins de armazenamento, utilização das informações ou uso posterior dos mesmos, assumem a plena responsabilidade pela metodologia da pesquisa, que deverá respeitar as normas éticas e de biossegurança e submetidas à aprovação do CEP.

VII – DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

As despesas inerentes à coleta, processamento e armazenamento dos dentes humanos no biorrepositório serão de responsabilidade do pesquisador do grupo de pesquisa Zeus responsável pelo projeto de pesquisa.

Niterói, 15 de março de 2013.

Profª Drª Thereza Christina Lopes Coutinho
Professora Associada II de Odontopediatria
Responsável pelo Biorrepositório do Grupo de Pesquisa Zeus
Faculdade de Odontologia – Universidade Federal Fluminense

ANEXO 3**TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR PARA USO DE DADOS E
MATERIAL BIOLÓGICO**

Eu, Monica Almeida Tostes, professora da FO-UFF, mat SIAPE 2171753 , portadora do CRO-RJ-12550, residente a Rua Presidente Backer, 337 apt 903 Icarai -RJ, tel (21) 2710-6602 cel (21) 97888202, estou ciente da responsabilidade do material humano doado para a pesquisa intitulada “COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO DA CPP-ACP COM E SEM FLUORETO EM ESMALTE HUMANO DESMINERALIZADO: ESTUDO IN VITRO”, e me comprometo a seguir as recomendações de armazenagem (potes individuais e etiquetados contendo os dentes humanos em solução de timol a 0.2% mantidos em refrigeração e estufa durante a pesquisa) no biorrepositório do grupo de pesquisa Zeus, sob responsabilidade da professora Thereza Christina Lopes Coutinho, situado nas instalações da Faculdade de Odontologia da UFF, na manipulação dos dentes seguindo as condições de biossegurança (uso de jaleco, gorro, luvas, óculos de proteção e máscara) dentro do âmbito do laboratório de Pós-graduação da FOUFF, no sigilo dos dados associados do doador e no descarte do material biológico utilizado em lixo biológico da Faculdade de Odontologia da UFF, após o término da pesquisa, seguindo rigorosamente a Portaria 441/11 do Ministério da Saúde.

Niterói ____ de _____ de 2013.

Monica Almeida Tostes

Anexo 4

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE REMINERALIZAÇÃO DA CCP-ACP COM E SEM FLUORETO EM ESMALTE HUMANO DESMINERALIZADO: ESTUDO IN VITRO.

Pesquisador: Monica Almeida Tostes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27656014.8.0000.5243

Instituição Proponente: Faculdade de odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 580.849

Data da Relatoria: 04/04/2014

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação de dentifrícios contendo CPP-ACP e CPP+F na resistência física (teste de microdureza) e na rugosidade do esmalte humano submetido ao desafio cariogênico.

O estudo realizado será do tipo in vitro utilizando-se blocos de esmalte humano retirados de terceiros molares recém extraídos por razões clínicas. Os dentes serão obtidos mediante doação por vinte(20) pacientes que tenham indicação de extração dos terceiros molares e que aceitem doar os dentes após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os espécimes após lisos e polidos, com área planificada de 2mmx2mm, serão expostos à solução desmineralizadora para a realização de cárie artificial. Antes e após a realização da cárie, a análise de microdureza será conduzida em todos os espécimes. De acordo com a média de dureza os espécimes serão distribuídos em 4 grupos: Controle (DC= sem dentifrício); Dentifrício padrão- Crest (DP=1100 ppm); dentifrício Mipaste (DM); Mipaste Plus (DMP). Cada grupo será submetido à ciclagem de pH por vinte dias. Diariamente, o dentifrício, diluído 3:1, será aplicado entre as ciclagens nas superfícies. A seguir as superfícies tratadas serão analisadas por teste de microdureza Knoop (50gr por 15 segundos) e análise de rugosidade por meio de um perfilômetro 3-D (Form Talysurf 60, Taylor Hobson, Leicester, UK). Os valores antes, após a desmineralização e após o tratamento serão comparados. Os testes de microdureza e perfilometria têm sido amplamente utilizados para avaliar as propriedades mecânicas e topografia em pequenas áreas de esmalte submetidas a diferentes tipos de tratamento.

As médias da microdureza serão analisadas por meio da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%, seguidas pelo teste de Tukey para comparações individuais, utilizando-se software estatístico específico (Startgraphis 1.6). Nos casos em que os resultados não apresentarem distribuição normal, os mesmos serão avaliados por meio de teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Como desfecho Primário espera-se que a microdureza após o tratamento com dentifrício contendo fluoreto seja maior.

Objetivo Primário:

Avaliar a resistência mecânica do esmalte desmineralizado e a topografia quando submetido a dentifrício contendo CPP-ACP e CPP-ACPF em um estudo in vitro sob ciclagem de pH.

Objetivo da Pesquisa:

Riscos:

Nenhum risco é esperado, pois trata-se de um estudo que utilizará material biológico de um biorrepositório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

Os resultados obtidos com o presente Projeto irão complementar os dados obtidos em trabalhos sobre cárie publicados na literatura e permitirão contribuir para a seleção de creme dental fluoretado que, seguramente, tenha maior eficácia e previna a cárie dentária, o que, conseqüentemente, reduziria a perda dentária precoce, principalmente, em pacientes jovens com risco para esta patologia e a indicação do mesmo na clínica da disciplina de Odontopediatria da FO/UFF pelos alunos da graduação e pós-graduação para prevenção e controle da erosão, trará benefícios aos pacientes infantis e também, contribuirá para o conhecimento destes alunos sobre os mecanismos envolvidos na ocorrência de erosão dentária e seus métodos preventivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A estrutura do projeto de pesquisa e sua fundamentação teórica estão apresentadas de forma adequada aos objetivos propostos. A pesquisa deverá trazer contribuições acadêmicas e sociais.

Os riscos e os benefícios do estudo estão adequadamente apresentados no escopo do projeto, assim como suas medidas de proteção aos sujeitos da pesquisa.

Os pesquisadores estão cientes de suas responsabilidades, bem como de seu compromisso no resguardo da segurança do material biológico utilizado e das informações obtidas pelo estudo, em atendimento a Portaria 2.201/11.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Compromisso do pesquisador para o uso de dados de material biológico estão apresentados de forma adequada.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

-

Considerações Finais a critério do CEP:

-

NITEROI, 04 de Abril de 2014

Assinado por:

ROSANGELA ARRABAL THOMAZ

(Coordenadora)

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 4º Andar

Bairro: Centro

UF: RJ **Município:** NITEROI

CEP: 24.030-210

Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189

E-mail: etica@vm.uff.br

Anexo 5

Quadro com as médias da dureza dos grupos e suas respectivas fases.

grupos	espécimes	Dureza inicial	Dureza pós cárie	Dureza pós tratamento	% mudança
Grupo 1	81				
	83	330,32	298,98	49,28	83,51
	87	322,58	308,86	29,64	90,40
	93	339,24	331,44	23,36	92,95
	95	344,9	306,98	48,08	84,33
	103	388,1	332,1	39,1	88,22
	109	372,84	299,3	39,86	86,68
	117	293,76	309,26	48,12	84,44
	120	340,34	260,92	49,14	81,16
	129	336,42	356,62	15,4	95,68
	131	226,06	235,02	44,92	80,88
Grupo 2	71	341,8	324,48	11,72	96,38
	84	338,88	302,42	8,76	97,10
	85	321,1	336,04	92,8	72,38
	91	322,62	160,16	74,42	53,53
	92	389,14	272,58	29,86	89,04
	96	360,14	294,98	25,12	91,48
	100	269,36	294,8	47,88	83,75
	105	347,2	252,36	85,32	66,19
	108	268,72	336,12	35,56	89,42
	111	215,78	302,34	22,2	92,65
	114	313,86	245,86	43,62	82,25
	122	245,38	276,02	70,04	74,62
123	324,74	324,06	35,44	89,06	
Grupo 3	85				
	89	356,42	270,92	75,62	
	94	360,18	337,62	87,46	74,09
	97	330,44	295,1	52,48	82,21
	98	399,74	335,4	14,56	95,65
	101	295,96	287,64	59,28	79,39
	110	304,72	253,6	131,14	48,28
	112	244,2	316,1	74,52	76,42
	116	265,78	300,38	53,68	82,12
	124	250,9	284,96	41,98	85,26
	125	311,38	192,34	59,56	69,03
127	346,14	276,02	20,3	92,64	
130	354,48	237,04	38,8	83,63	
Grupo 4	81	379,6	313,28	86,18	72,49
	86	299,34	300,18	74,78	75,08
	88	302,66	234,4	95,82	59,12
	90	326,06	296,56	135,04	54,46
	99	343,06	334,56	92,34	72,39
	104	317,86	253,86	90,26	64,44
	107	301,56	278,48	87,92	68,42
	115	374,24	327	8,7	97,33
	118	359,9	308,72	89,4	71,04
	119	249,78	325,94	109,86	53,43
	126	307,34	262,3	61,28	76,63
128	281,4	285,78	96,86	66,10	

Anexo 6

Tabela com a composição dos dentofrícios

Dentifrício	Composição
Mi paste	Água, glicerol, CPP-ACP, D-sorbitol, CMC propileno glicol, silicone e titânio dióxido de carbono, o xilitol, o ácido fosfórico, o sabor, sódio sacarina, acetato de propilo, p-hidroxibenzoato de butilo
Mi paste plus	Água, glicerol, CPP-ACP, D-sorbitol, CMC ropileno glicol, silicone e titânio dióxido de carbono, o xilitol, o ácido fosfórico, o sabor, sódio sacarina, acetato de propilo, p-hidroxibenzoato de butilo, 900 ppm de fluoreto de sódio
Crest cavit protection	sorbitol, água, sílica hidratada, lauril sulfato de sódio, fosfato de sódio, carboximetilcelulose de sódio, sacarina sódica, dióxido de titânio, FD & C azul n.º 1, 1,5mg de fluoreto de sódio em 1 g.