



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REMINERALIZAÇÃO PREVENTIVA PRIMÁRIA DO ESMALTE  
ATRAVÉS DO SISTEMA CPP-ACP**

Trabalho submetido por  
**Joana Maria de Sotomayor Calvário**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Carla Ascenso**

**Junho de 2014**



Aos meus pais

Ao Diogo

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Doutora Carla Susana Silva Dias Reis Ascenso, pela sua extrema disponibilidade, pelo seu apoio e orientação ao longo de todo o trabalho.

Ao Diogo, pela presença incansável, amor e dedicação demonstrados durante este trabalho e sempre.

Aos meus pais, Carlos e Ana, que tudo fizeram para me auxiliar neste percurso.

Aos meus irmãos, Pedro e Miguel, pela amizade e coragem que sempre me transmitiram.

À Sara e à Diana, por todo o apoio e amizade ao longo de todo este percurso universitário.

## RESUMO

A cárie é ainda uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo e é imperativo que se desenvolvam métodos de prevenção e limitação da doença. A medicina dentária preventiva tem procurado a remineralização, tratamento não invasivo de lesões iniciais de cárie, em detrimento da realização de restaurações. Produtos com elevadas concentrações de cálcio e de fosfato, como o sistema CPP-ACP, promovem a remineralização e inibem a desmineralização do esmalte. O complexo CPP-ACP resulta da ligação de um fosfopéptido de caseína (com o motivo ácido Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu), com fosfato de cálcio amorfo. O sistema CPP-ACP aumenta as concentrações de fosfato de cálcio no meio, promovendo a remineralização dos cristais de hidroxiapatite desmineralizados presentes no corpo da lesão. Desta forma, o CPP-ACP tem um papel profilático contra a cárie, previne a erosão dentária e tem capacidade de remineralizar *white spot lesions*. O complexo já foi incorporado em diversos veículos de entrega como dentífricos, colutórios, pastilhas elásticas, comprimidos orodispersíveis, leite, bebidas ácidas, entre outros.

Concluiu-se que o complexo CPP-ACP é um agente de remineralização eficaz, promove a remineralização e inibe a desmineralização. A utilização do sistema CPP-ACP mostrou-se segura e vantajosa quando comparada com outros agentes de remineralização disponíveis no mercado.

**Palavras-chave:** Cárie, CPP-ACP, Desmineralização, Remineralização

## **ABSTRACT**

Tooth decay is still within the most prevalent diseases in the world and it is necessary to develop methods of prevention and limitation of this disease. Preventive dentistry has sought remineralization, as a non-invasive treatment of incipient carious lesions, instead of performing restorations. Products with high concentrations of calcium and phosphate, such as CPP-ACP, promote remineralization and inhibit demineralization of dental enamel. The CPP-ACP complex results from the binding of a casein phosphopeptide (with the acidic motif Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu) with amorphous calcium phosphate. The CPP-ACP system increases calcium phosphate concentration in the oral cavity, promoting remineralization of demineralized hydroxyapatite crystals present in the body of the carious lesion. Therefore, CPP-ACP has a prophylactic role against dental caries, dental erosion, and has the ability to remineralize white spot lesions. The complex has been incorporated into various delivery vehicles such as dentifrices, mouthwashes, chewing gums, orodispersible tablets, milk, acidic beverages, and others.

This review has revealed that the CPP-ACP complex is an effective remineralizing agent, promotes remineralization and inhibits demineralization. The use of CPP-ACP system was shown to be safe and advantageous compared with other remineralizing agents available on the market.

**Keywords:** Caries, CPP-ACP, Demineralization, Remineralization.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE GERAL.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. DESENVOLVIMENTO .....	13
2.1. DESMINERALIZAÇÃO .....	13
2.1.1. ESMALTE.....	13
2.1.2. CÁRIE DENTÁRIA .....	16
2.1.3. PLACA BACTERIANA.....	21
2.1.4. EROSÃO DENTÁRIA.....	23
2.2. REMINERALIZAÇÃO .....	25
2.2.1. SALIVA.....	25
2.2.2. A SALIVA E A REMINERALIZAÇÃO.....	27
2.2.3. SISTEMA CPP-ACP .....	28
2.2.4. ESTRUTURA DOS CPP.....	30
2.2.5. OBTENÇÃO DE CPP .....	33
2.2.6. OBTENÇÃO DE CPP-ACP .....	34
2.2.7. MECANISMO DE AÇÃO.....	35
2.2.8. CPP-ACP COM FLÚOR .....	39
2.3. CPP-ACP: ONDE ESTAMOS E PARA ONDE VAMOS .....	44
3. CONCLUSÃO .....	69
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes do dente e suas estruturas adjacentes .....	13
Figura 2 – Prismas de esmalte .....	15
Figura 3 – A cárie dentária como doença multifatorial .....	18
Figura 4 – <i>White spot lesion</i> .....	19
Figura 5 – Nível de perda mineral .....	20
Figura 6 – Linhas de solubilidade do esmalte, HA e FA.....	21
Figura 7 – Organização estrutural da placa bacteriana.....	22
Figura 8 – Erosão dos prismas de esmalte.....	24
Figura 9 – Remineralização de lesão inicial de esmalte.....	28
Figura 10 – CPP-ACP na matriz da placa bacteriana e na superfície de células bacterianas .....	36
Figura 11 – Inibição da adesão bacteriana através do CPP-ACP .....	37
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varrimento após tratamento do esmalte.....	41
Figura 13 – Aplicação removível com amostras de esmalte dentário para estudos <i>in situ</i> .....	44
Figura 14 – Microscopia eletrônica de varrimento de uma amostra após erosão com bebida sem adição de CPP-ACP.....	49
Figura 15 – Microscopia eletrônica de varrimento de uma amostra após erosão com bebida com adição de 0,125% CPP-ACP.....	49
Figura 16 – Imagem de microscopia eletrônica de varrimento do esmalte.....	56
Figura 17 – Fotografias intraorais de um participante do estudo antes e depois do tratamento com Tooth Mousse .....	60
Figura 18 - Microscopia de varrimento confocal a laser: imagem 3D das amostras originais .....	62
Figura 19 - Microscopia de varrimento confocal a laser: imagem 3D das amostras erodidas.....	62
Figura 20 - Microscopia de varrimento confocal a laser: imagem 3D das amostras remineralizadas.....	62
Figura 21 - Análise da energia dispersiva de raios-X dos três grupos de amostras .....	63
Figura 22 – Dureza e módulo de elasticidade dos três grupos de amostras .....	64
Figura 23 – Volume de desgaste por nanorriscos nos três grupos de amostras.....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Funções dos principais componentes da saliva .....	25
Tabela 2 – Relações entre pH, F, dissolução de HA e FA, formação de FA e efeito no esmalte .....	27
Tabela 3 – Número de grupos fosfato em diferentes caseínas .....	31
Tabela 4 – Sequência dos fosfopéptidos sintéticos utilizados no estudo .....	33
Tabela 5 – Determinação dos conteúdos minerais presentes na saliva após utilização de cada produto .....	42
Tabela 6 – Percentagem de remineralização obtida pelos produtos dentífricos.....	43
Tabela 7 – Produtos comerciais com CPP-ACP.....	46
Tabela 8 – Percentagem de remineralização das lesões de esmalte sob a superfície .....	47
Tabela 9 – Valores de pH e de profundidade de erosão obtidos com as diferentes percentagens de CPP-ACP. ....	48
Tabela 10 – Resultados do conteúdo mineral de cada grupo de tratamento.....	50
Tabela 11 – Valores médios de rugosidade e profundidade das lesões.....	52
Tabela 12 – Análise dos iões presentes nas diferentes pastilhas .....	53
Tabela 13 – Análise dos iões presentes na saliva após mastigação das diferentes pastilhas. ....	53
Tabela 14 – Percentagem de remineralização obtida pela mastigação das diferentes pastilhas. ....	54
Tabela 15 – Percentagem de remineralização obtida com cada um dos leites testados. .	55
Tabela 16 – Profundidade de lesão e pH dos diferentes refrigerantes com e sem CPP-ACP.....	57
Tabela 17 – Concentrações de cálcio e de fosfato na saliva antes e depois da mastigação das pastilhas com CPP-ACP .....	58
Tabela 18 – Testes realizados e variação da microdureza nos diferentes grupos.....	59
Tabela 19 – Resultados dos testes de conteúdo mineral.....	66
Tabela 20 – Resultados dos testes de dureza.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP – fosfato de cálcio amorfo [*Amorphous Calcium Phosphate*,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ]

ACFP –fluorofosfato de cálcio amorfo [*Amorphous Calcium Fluoride Phosphate*]

CN – caseína

CPP – fosfopéptido de caseína [*Casein Phosphopeptide*]

F – flúor

FA – fluorapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ]

g – grama

Glu – glutamato

HA - hidroxiapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]

IgA – Imunoglobulina A

Ile – isoleucina

JAD – junção amelodentinária

$\text{k}\text{Å}$  - quiloangstrom

kDa – quilodalton

M – molar

mg - miligrama

mM – milimolar

mN - milinewton

nm – nanómetros

pI – ponto isoelétrico

ppm – partes por milhão

Ser – serina

Ser(P) – serina fosforilada

$\mu\text{M}$  – micromolar

$\text{BaCl}_2$  – cloreto de bário

$\text{CaCl}_2$  – cloreto de cálcio

$\text{CaCO}_3$  – carbonato de cálcio

$\text{CaF}_2$  – fluoreto de cálcio

HCl – ácido clorídrico

NaF – fluoreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

## **1. INTRODUÇÃO**

A cárie dentária e a doença periodontal são provavelmente as doenças crónicas mais prevalentes em todo o mundo (Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007; Nongonierma & FitzGerald, 2012). A cárie é uma constante desde os tempos primórdios, no entanto, sofreu um aumento significativo com a mudança dos hábitos alimentares, principalmente aquando da inclusão de açúcares na dieta. A medicina dentária preventiva tem procurado a remineralização em detrimento da realização de restaurações, que obrigam ao desgaste acrescido da estrutura dentária. Aproximadamente no fim dos anos 70 e início dos anos 80, notou-se um declínio na prevalência da cárie dentária cuja causa não está ainda bem definida, porém pensa-se estar relacionada com a fluoretação da água de consumo público e a de produtos de higiene oral após a descoberta dos benefícios do flúor na prevenção da doença (Roberson, Heymann & Swift, 2006; Reynolds, 2008a). Não obstante, a diminuição da prevalência da doença verifica-se em maior escala nas classes socioeconómicas média e alta e em menor escala na classe baixa. Desta forma, classes mais baixas e com menor acesso ao tratamento da doença apresentam maior prevalência da mesma (Selwitz et al., 2007).

Embora a necessidade da limitação e erradicação da doença seja notável, ainda não foi implementado um plano de saúde pública que seja 100% eficaz já que o flúor não é capaz de erradicar a doença (Rose, 2000). Assim, torna-se imperativa a procura de novos produtos, mais eficazes que o flúor por si só, que auxiliem neste sentido. Além disto, o flúor tem efeitos tóxicos quando utilizado em concentrações elevadas e pode provocar fluorose, tornando-se portanto crucial a descoberta de produtos alternativos menos tóxicos. No passado, o uso clínico dos iões de cálcio e de fosfato não foi bem sucedido devido à sua baixa solubilidade, que os torna instáveis e de rápida precipitação, promovendo a formação de tártaro dentário (Reynolds, 2008a; Cochrane, Cai, Huq, Burrow & Reynolds, 2010). Surgiu a necessidade de procurar novas terapias que aumentassem a solubilidade dos iões de cálcio e fosfato e a sua estabilidade. A capacidade anticariogénica (diminuição da desmineralização e aumento da remineralização) do leite e dos lacticínios é já conhecida desde os anos 50 e deve-se à presença de cálcio, fosfato e caseína no leite (Gurunathan, Somasundaram & Kumar, 2012) Neste seguimento, foi descoberto em 1998 o sistema CPP-ACP (fosfopéptidos de caseína com fosfato de cálcio amorfo) proveniente da junção de produtos da caseína do leite com fosfato de cálcio amorfo, cujos iões apresentam maior solubilidade e estabilidade (Reynolds, 1998a;

Gurunathan et al., 2012). O sistema CPP-ACP tem ação de remineralização depositando íons de cálcio e de fosfato na rede cristalina do esmalte (Reynolds, 2008a). Este método é claramente não invasivo e permite a gestão de lesões de cárie não cavitadas sem que se recorra à restauração do dente. Para compreender o mecanismo de remineralização e as vantagens do sistema CPP-ACP é necessário conhecer a estrutura do esmalte bem como a sua interação com a saliva e com a placa bacteriana presentes no ambiente da cavidade oral.

O presente trabalho de revisão bibliográfica é realizado no âmbito da remineralização do esmalte através do sistema CPP-ACP tendo como objetivo a compreensão dos mecanismos de remineralização e desmineralização, vantagens e desvantagens dos produtos com adição de CPP-ACP e apresentação de estudos realizados neste sentido.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. DESMINERALIZAÇÃO

Os dentes são constituídos por várias estruturas (figura 1). A coroa anatómica do dente tem na sua porção mais externa uma camada de esmalte, estrutura cristalina, mineralizada e de dureza elevada. Internamente ao esmalte encontra-se a dentina, também mineralizada. A porção radicular da dentina encontra-se recoberta por cimento. A dentina envolve a polpa dentária, formada pela polpa coronal e pela polpa radicular. A polpa contém vasos sanguíneos e nervos que garantem a nutrição e conferem sensibilidade ao dente. A rigidez e a forma do esmalte contribuem para a proteção da dentina e da polpa que se encontram sob a sua estrutura. Assim, para manter os órgãos dentários saudáveis, é necessário primariamente manter o esmalte saudável, impedindo a sua desmineralização.

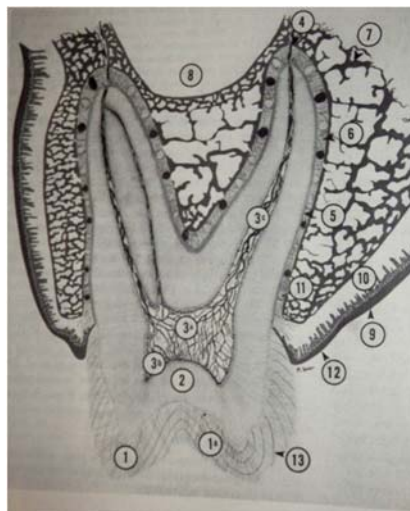


Figura 1 – Componentes do dente e suas estruturas adjacentes. (1) esmalte; (2) dentina; (3a) câmara pulpar; (3b) corno pulpar; (3c) polpa radicular; (4) forâmen apical; (5) cimento; (6) fibras do ligamento periodontal; (7) osso alveolar; (8) seio maxilar; (9) mucosa; (10) submucosa; (11) vasos sanguíneos; (12) gengiva; (13) linhas de Retzius. (Roberson et al., 2006)

#### 2.1.1 ESMALTE

O esmalte recobre a porção coronária dos dentes sendo portanto a estrutura dentária mais exposta às variações do ambiente. A sua espessura varia no próprio dente, sendo maior na face oclusal ou incisal e diminuindo em direção à região cervical do dente (figura 1). A espessura do esmalte varia ainda de dente para dente, apresentando-se mais

espessa nos molares e menos espessa nos incisivos inferiores. Os bordos incisais de incisivos têm aproximadamente 2 mm de espessura de esmalte, as cúspides de pré-molares cerca de 2,3 a 2,5 mm e as cúspides de molares cerca de 2,5 a 3 mm (Roberson et al., 2006). Adicionalmente, o esmalte apresenta cores maioritariamente acinzentadas e possui uma translucidez característica.

A origem do esmalte é ectodérmica. A ectoderme, uma parte do germe embrionário, origina, entre outros, células denominadas ameloblastos. Estas células têm extensões do esmalte para a junção amelodentinária (JAD) às quais se chama processos de Tomes. Os processos de Tomes formam-se no ameloblasto maduro e são responsáveis pela secreção da matriz proteica de esmalte e sua mineralização e orientação dos prismas de esmalte. Após a mineralização do esmalte e formação dos prismas, o ameloblastos degenera. Desta forma, o esmalte não apresenta capacidade regeneradora por si só.

Quimicamente, o esmalte é constituído por matéria inorgânica (95-98% do peso), matéria orgânica (1-2% do peso) e água (~4% do peso) (Roberson et al., 2006; Featherstone & Lussi, 2006; Hilton, Ferracane & Broome, 2013). A matéria inorgânica é principalmente constituída por cálcio (34-39% do peso do esmalte) e por fósforo (16-18% do peso do esmalte) (Attin, 2006), presentes na forma de cristais de hidroxiapatite [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] que ocupa 86-92% do volume total do esmalte (Roberson et al., 2006; Hilton et al., 2013). A restante matéria inorgânica é constituída por diferentes minerais em quantidades residuais. A matéria ou matriz orgânica, formada por proteínas e lípidos, juntamente com a água representam cerca de 6% do volume do esmalte (Roberson et al., 2006). A matriz orgânica apresenta uma rede de microporos localizada entre os cristais de HA, a qual contém água suficiente para permitir a entrada de ácidos e outros componentes para o interior do dente, assim como a saída de produtos da desmineralização para o exterior (Featherstone & Lussi, 2006; Hilton et al., 2013). O sistema de microporos forma uma ligação dinâmica entre o meio oral, o esmalte, a dentina e a polpa, fazendo do esmalte um tecido semipermeável (Baratieri et al., 2003; Hilton et al., 2013). Desta forma, os fenómenos de desmineralização e remineralização, bem como os processos de ação tópica de produtos remineralizantes não ocorrem unicamente ao nível da superfície de esmalte mas sim em profundidade através do sistema de microporos. Com a idade, esta permeabilidade diminui, assim como o volume dos poros, a solubilidade aos ácidos e o conteúdo de água (Hilton et al., 2013).

Embora o mineral presente nos dentes seja a HA, de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , alguns dos seus iões estão sujeitos a constante substituição originando

formas mais solúveis na presença de ácido do que a forma original. Esta HA resultante tem menos cálcio e é carbonatada, apresentando uma fórmula química geral  $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_{2-u}\text{F}_u$ , onde  $x$ ,  $y$ ,  $z$  e  $u$  representam os números variáveis de iões constituintes. O  $\text{Ca}^{2+}$  é principalmente substituído por  $\text{Na}^+$  (sódio), mas também por  $\text{Mg}^{2+}$  (magnésio) ou  $\text{K}^+$  (potássio). Os iões  $\text{OH}^-$  podem ser substituídos por iões  $\text{F}^-$  (fluoreto), formando apatite fluoretada ou fluorapatite (FA). A FA corresponde a cerca de 10 % de substituição de HA por FA (Baratieri et al., 1993). A substituição mais frequente é de iões  $\text{PO}_4^{3-}$  (fosfato) por iões  $\text{CO}_3^{2-}$  (carbonato), embora não na proporção 1:1 devido à diferença na carga iónica. Estas substituições destabilizam a HA e conferem-lhe uma já referida maior solubilidade em meio ácido devido às alterações na estrutura (Baratieri et al., 2003; Featherstone & Lussi, 2006).

Estruturalmente, o esmalte é constituído maioritariamente por prismas cilíndricos, correspondentes a agrupamentos de HA. Na sua estrutura está também presente o esmalte interprismático, onde os cristais de HA estão organizados em diferentes direções. Estes dois componentes, prismas de esmalte e esmalte interprismático, formam um padrão simétrico e altamente organizado (figura 2), padrão este cuja concentração de prismas aumenta em direção à JAD. Em redor dos prismas encontra-se uma fina camada de matriz orgânica designada por bainha de esmalte. A função da matriz é servir de suporte aos cristais de HA (Fawcett, 1995). O número de prismas de esmalte varia entre dentes, sendo que um incisivo inferior tem aproximadamente 5 milhões e um molar superior tem cerca de 12 milhões. Os prismas de esmalte estão organizados de uma forma extremamente densa e entrelaçada, alinhando-se paralelamente entre si e perpendicularmente à superfície do esmalte e à JAD, exceto na região cervical onde os prismas se encontram alinhados para fora e apicalmente. Os prismas de esmalte medem 4 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, perto da JAD e perto da superfície dentária, respetivamente (Roberson et al., 2006).

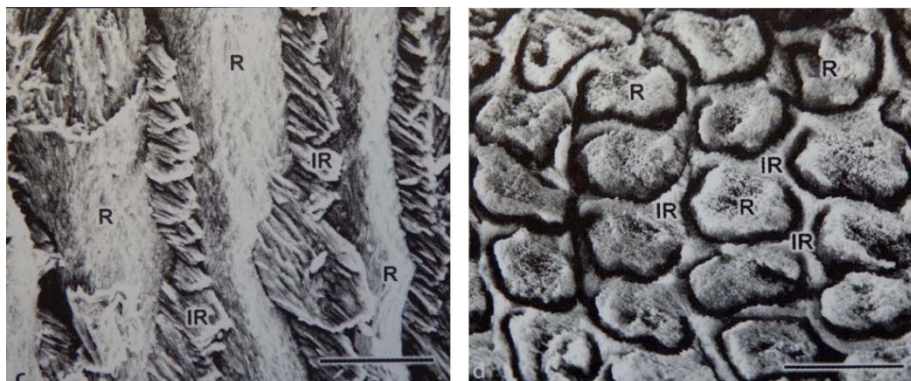


Figura 2 – Prismas de esmalte. (R) prisma; (IR) esmalte interprismático. (Hilton et al., 2013).

Quando seccionados transversalmente, os prismas de esmalte apresentam uma cabeça ou corpo de ~5 µm de diâmetro orientada para incisal ou oclusal, e uma cauda com ~5 µm de comprimento orientada para cervical, formando uma série repetitiva de primas interligados. Os prismas de esmalte são constituídos por milhões de cristais de apatite, de tamanhos variáveis, cujo longo eixo se encontra disposto paralelamente ao longo eixo do prisma de esmalte, na porção do corpo do prisma. Na região da cauda do prisma, os cristais de apatite aumentam a inclinação gradualmente até 65° em relação ao eixo do prisma. O processo de dissolução por ácido ou processo cariioso ocorre mais na região do corpo do prisma do que na região da cauda ou na periferia do corpo. A camada mais externa do esmalte, com cerca de 30 µm de espessura, não está estruturada, é aprismática, é mais mineralizada do que o restante esmalte, ocorre principalmente na região cervical e forma-se no final da amelogênese (Roberson et al., 2006; Poggio, Lombardini, Dagna, Chiesa & Bianchi, 2009). A JAD, por contrário, é uma zona de cerca de 30 µm de espessura cuja mineralização é menor (Roberson et al., 2006).

Como já mencionado, o esmalte é solúvel quando exposto a um meio ácido. A sua solubilidade não é uniforme, sendo maior junto da JAD e menor junto à superfície do dente, devido aos diferentes graus de mineralização da sua estrutura. Quando são utilizados agentes de remineralização, tais como o flúor ou o sistema CPP-ACP, diminui-se a solubilidade, aumenta-se a resistência do esmalte à desmineralização e promove-se a remineralização.

### **2.1.2. CÁRIE DENTÁRIA**

A cárie dentária é uma doença infecciosa de origem microbiana, de caráter multifatorial, que consiste na destruição localizada dos tecidos dentários e pode afetar o esmalte, a dentina e o cimento. Uma tal destruição dos tecidos dentários calcificados define-se por desmineralização. A desmineralização resulta da ação de ácidos produzidos por bactérias presentes na cavidade oral aquando da fermentação dos hidratos de carbono da dieta. A acumulação de ácidos provoca uma descida do pH do meio oral e uma desmineralização do esmalte (inicialmente), que por sua vez origina uma cavitação no dente ou dentes afetados. A desmineralização é um processo que pode ser revertido, quer contrariando as condições que a favoreceram, quer agravando essas mesmas condições de modo a dificultar a sua indução. O processo inverso da desmineralização corresponde à remineralização.

A lesão cariosa apenas ocorre se existir uma concentração bacteriana capaz de produzir a quantidade de ácido suficiente para desmineralizar a estrutura dentária. A placa bacteriana consiste numa massa gelatinosa que se forma na superfície do dente e que metaboliza os hidratos de carbono da dieta para obter energia, libertando ácidos para o meio oral. São estes ácidos que, exacerbando a descida do pH, provocam perda de minerais da estrutura dentária, provocando desmineralização da HA e cavitação. Quando o substrato deixa de estar disponível, o metabolismo bacteriano diminui e o pH da placa bacteriana aumenta. Quando o pH se eleva acima dos 5,5 com o auxílio da saliva, inicia-se a regeneração da estrutura perdida ou remineralização. O carácter multifatorial das lesões cariosas justifica a deteção da presença de bactérias cariogénicas sem que haja manifestação clínica de cárie.

A doença cárie diz-se multifatorial por necessitar que se reúnam vários fatores para que haja evidência clínica da mesma (presença de lesões cariosas): suscetibilidade do hospedeiro (indivíduo), presença de substrato e ação bacteriana. A suscetibilidade é a apetência que cada indivíduo tem para desenvolver lesões de cárie, tal como o pH da saliva, o fluxo salivar, os iões presentes na saliva, os hábitos de higiene oral, a placa bacteriana, ou a própria anatomia dentária. Esta suscetibilidade pode ser diminuída com a introdução de programas de remineralização, os quais são baseados no uso de agentes (como o flúor ou o sistema CPP-ACP) que diminuem o pH crítico de desmineralização do esmalte e obrigam a uma maior produção de ácido por parte dos microrganismos para superar a supersaturação de minerais (Featherston & Lussi, 2006). A carga bacteriana pode ser reduzida através de um controlo da mesma e de uma higiene oral cuidada. A escovagem dos dentes provoca uma disrupção na placa bacteriana, desorganizando as colónias nela presentes. O substrato está relacionado com os resíduos alimentares e com o tipo de dieta ingerida pelo indivíduo. Este parâmetro pode ser controlado diminuindo a quantidade e frequência de ingestão de alimentos açucarados. A elevada frequência de ingestão de açúcar não permite retomar aos níveis de pH favoráveis à remineralização.

Ainda não foi identificado um único microrganismo que fosse o responsável direto pelo processo da doença cariosa. As bactérias presentes na flora oral vivem em comunidade entre várias espécies e não unicamente em colónias solitárias. Porém, os *Streptococcus mutans* são uma estirpe frequentemente associada às lesões cariosas, pelo que a deteção de níveis elevados de *S. mutans* indica a necessidade de ações preventivas tais como o ajuste da dieta, a aplicação de selantes, a melhoria da higiene oral, entre

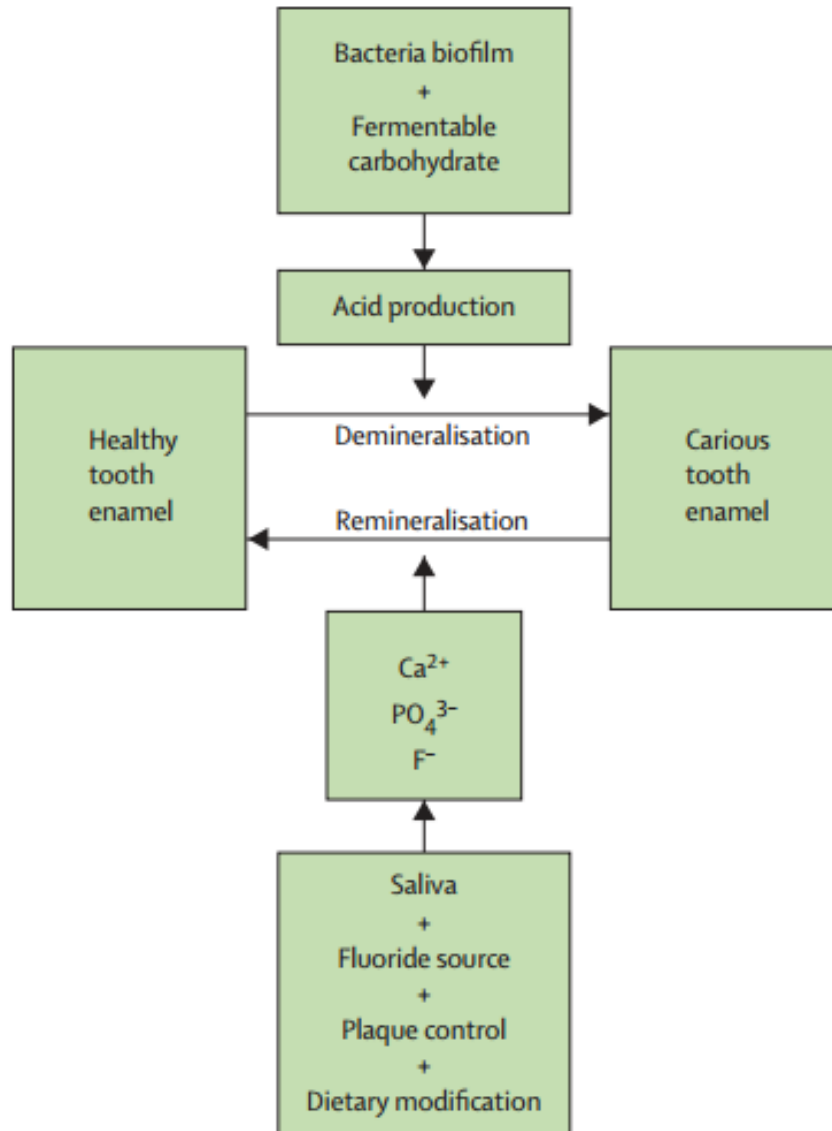


Figura 3 – A cárie dentária como doença multifatorial. A produção de ácidos por bactérias da placa bacteriana contribuem para a desmineralização. A saliva, o flúor, a higiene oral e uma dieta adequada contribuem para a remineralização. (Selwitz et al., 2007).

outros. Os *Lactobacillus* são, por outro lado, as bactérias mais frequentemente associadas à progressão da cavitação em si e são indicadores da presença de lesões de cáries ativas (Kuribayashi et al., 2012).

A figura 4 mostra uma lesão cariada inicial na qual a superfície do esmalte se encontra aparentemente intacta. Abaixo desta zona, encontra-se o corpo da lesão, região desmineralizada. As lesões cariosas iniciais como as ilustradas na figura 4 denominam-se *white spot lesions* e caracterizam-se pela sua coloração esbranquiçada e opacidade.

Tais lesões perdem a sua translucidez devido à porosidade sob a superfície, causada pela desmineralização. Pode demorar cerca de 4 a 5 anos para que ocorra desmineralização suficiente para formar cavitação (Hilton et al., 2013). As lesões cáries iniciais podem ser remineralizadas através de melhorias na higiene oral e utilização de agentes de remineralização, regenerando o esmalte afetado.

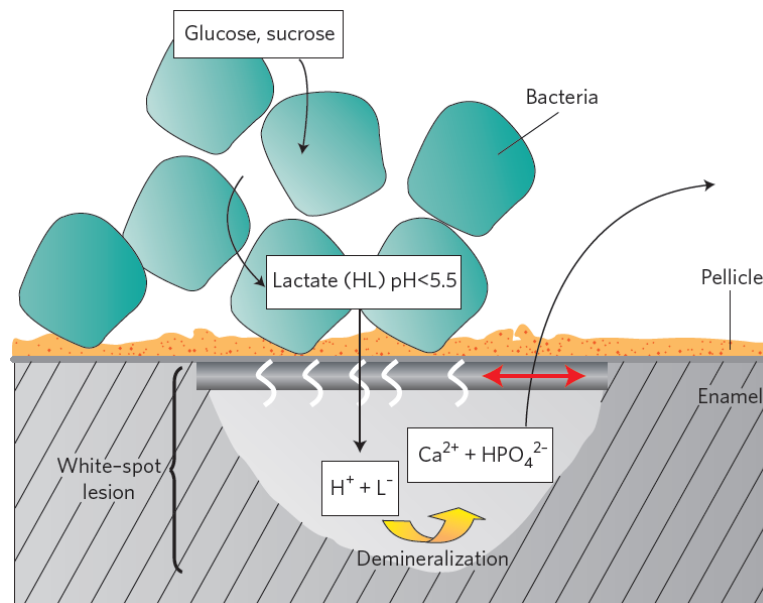


Figura 4 – *White spot lesion*. O metabolismo bacteriano resulta na produção de ácido (lactato). O ácido libertado dissocia-se formando  $H^+$  que provoca a desmineralização sob a superfície do esmalte (corpo da lesão), dissolvendo cálcio e fosfato. Devido à precipitação que se segue, forma-se uma superfície de esmalte aparentemente intacta (seta vermelha). As curvas brancas na superfície de esmalte indicam a permeabilidade da mesma aos íões. (Hannig & Hannig, 2010)

Quando as lesões sob a superfície atingem um ponto crítico de desmineralização, a superfície do esmalte cede e ocorre a cavitação. Este processo ocorre devido a um desequilíbrio entre a desmineralização e a remineralização, onde a desmineralização é dominante. A cavitação do esmalte não pode ser revertida e normalmente acelera a progressão da lesão cáries devido à acumulação de resíduos alimentares no local. Nesta situação, a remineralização não é viável. Na figura 5 encontra-se representado um esquema que visa elucidar acerca das lesões remineralizáveis e não remineralizáveis. As lesões passíveis de remineralização, lesões que podem ser alvo dos produtos de CPP-ACP e/ou de  $F^-$ , são as lesões subclínicas e as lesões no esmalte sem cavidade (ditas como reversíveis). As restantes (irreversíveis) obrigam a tratamentos restauradores.

Featherstone & Lussi (2006) estudaram a interação entre ácido e o conteúdo mineral do esmalte e verificaram que à medida que o pH aumenta, as concentrações de fosfato de cálcio necessárias para manter um estado de supersaturação diminuem. A figura 6 mostra os resultados obtidos neste estudo, representados na forma de gráfico da variação das concentrações em solução de íons cálcio e de íons fosfato com o pH do meio do



Figura 5 – Nível de perda mineral. Lesões de esmalte sem cavitação são reversíveis e não necessitam de restauração. Lesões cavitadas no esmalte e na dentina são irreversíveis e apenas tratadas com recurso a materiais restauradores. (Baratieri et al., 2003)

esmalte (curva a cheio), a HA (curva a ponto-tracejado) e FA (curva a tracejado). Acima de cada curva tem-se a supersaturação dos íons de cálcio e de fosfato (zona onde estes íons não se encontram solúveis) e abaixo a subsaturação, pelo que o esmalte apresenta sempre menor resistência à dissolução que a HA e esta que a FA, qualquer que seja o pH do meio. Na figura estão ainda representados os quatro passos (identificados com os números 1-4) que ocorrem quando se dá um ataque ácido: Inicialmente o pH à superfície dentária desce de 7,3 para 4,5 (passo 1), provocando a dissolução de cálcio e fosfato e aumentando a concentração destes íons em solução (passo 2); devido à sua capacidade tampão, a saliva na superfície dentária afetada aumenta o pH local para ~7 (passo 3). A um pH neutro, já é possível dar-se a remineralização do esmalte afetado, diminuindo assim os níveis de fosfato e cálcio disponíveis em solução. Caso estejamos na presença de flúor, esta remineralização origina FA (passo 4). O ciclo repete-se continuamente.

Uma conclusão relevante a retirar deste estudo é a importância da concentração de cálcio e fosfato em solução. Se estas concentrações estiverem elevadas, mesmo em pH

ácido, é possível permanecer acima das linhas de solubilidade. Assim, a adição de cálcio e fosfato aos produtos de higiene oral ou mesmo a produtos alimentares pode auxiliar na remineralização do esmalte dentário.

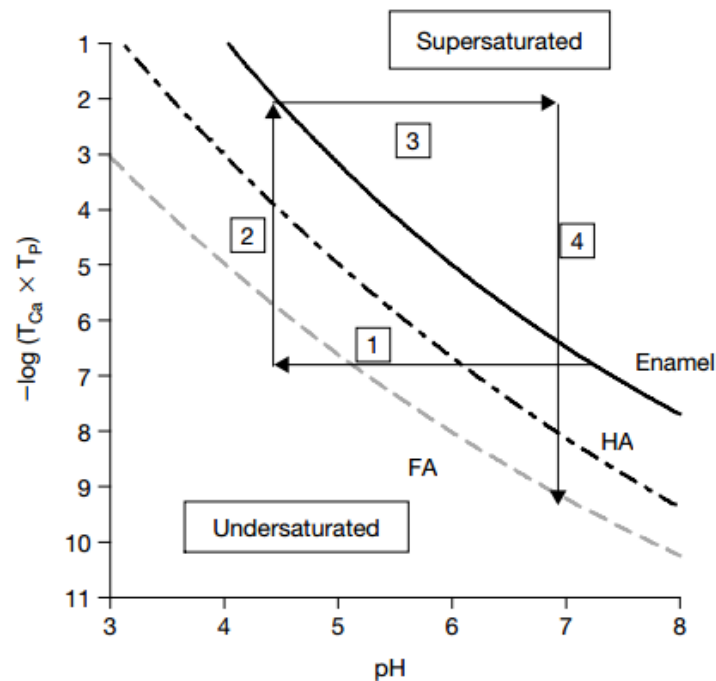


Figura 6 – Linhas de solubilidade do esmalte (curva a cheio), HA (curva a ponto-tracejado) e FA (curva a tracejado). As setas indicam o sentido da evolução nos passos 1-4 de um ataque ácido. (Featherstone & Lussi, 2006)

### 2.1.3. PLACA BACTERIANA

A placa bacteriana é um biofilme que se forma na superfície dentária e é considerada um fator crucial no desenvolvimento da doença cárie. A placa bacteriana é uma acumulação organizada de microrganismos, entre os quais se destacam os *Streptococcus mutans*, localizada e aderida à superfície dentária. Para além de microrganismos, na placa bacteriana estão também presentes uma matriz de polímeros extracelulares, iões, nutrientes sequestrados do meio oral envolvente e ainda metabolitos resultantes da atividade dos microrganismos presentes.

A maioria dos organismos presentes na placa bacteriana não é encontrada em qualquer outro local do corpo humano. Assim, a sobrevivência destes depende da sua capacidade de aderência aos tecidos da cavidade oral, especificamente à superfície dentária. Os microrganismos não aderidos à superfície dentária são facilmente eliminados

pela deglutição frequente da saliva ou mesmo pelo fluxo salivar. Os microrganismos com maior capacidade de adesão à superfície dentária são os *Streptococcus* pelo facto de produzirem uma matriz que os une mutuamente e por apresentarem recetores específicos de adesão à estrutura dentária. A adesão destes microrganismos à superfície dentária e o seu crescimento e desenvolvimento permitem a adesão de outras bactérias, tais como bactérias filamentosas e espirais. A adesão dos microrganismos entre si origina pequenas colónias interdependentes no biofilme. Num biofilme encontram-se microrganismos

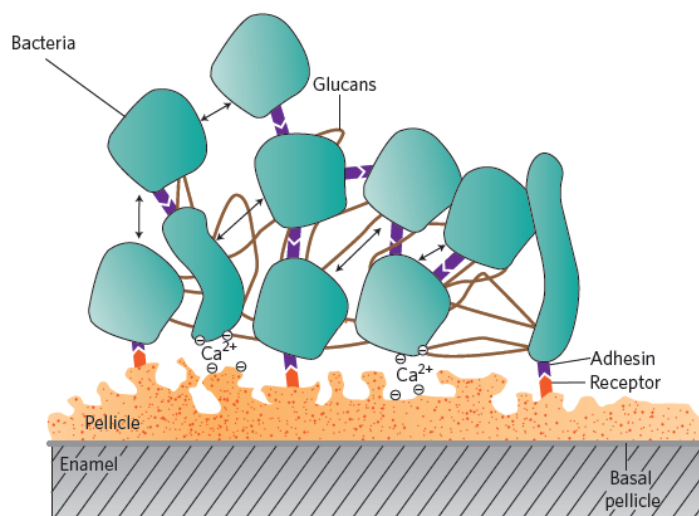


Figura 7 – Organização estrutural da placa bacteriana. As bactérias aderem à pellicula adquirida e entre si através de pontes de cálcio e recetores específicos (roxo e vermelho). As bactérias estão envoltas numa matriz extracelular (linhas unindo-as) e “comunicam” entre si (setas). (Hannig & Hannig, 2010)

aeróbios, na região mais superficial da placa bacteriana, e microrganismos anaeróbios, nas camadas mais perto da estrutura dentária. Não obstante a sua densidade, o biofilme possui canais de água que permitem a passagem de pequenas moléculas em profundidade.

A placa bacteriana pode coexistir em dinamismo saudável com as estruturas dentárias desde que sejam mantidas as condições de equilíbrio entre ambas. No entanto, a transição de um estado de saúde oral para um estado de doença relaciona-se com alterações na composição e metabolismo das espécies bacterianas presentes na placa.

A modificação de um só fator na placa bacteriana, como a consumo de açúcar, pode provocar um desequilíbrio em todo o dinamismo da mesma. Se o consumo de açúcar for frequente, os produtos do metabolismo dos microrganismos da placa bacteriana

provocam uma descida de pH para valores abaixo de 5,5 e dá-se uma mudança ecológica no biofilme, dominando os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus*, cujo potencial cariogénico é elevado, propiciando a desmineralização da estrutura de esmalte. Por outro lado, se o consumo de açúcar for moderado, o pH à superfície dentária mantém-se acima de 5,5, o que favorece uma comunidade microbiana rica em *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*, de potencial cariogénico inferior. Neste caso, propicia-se um ambiente de remineralização do esmalte (Baratieri et al., 2003).

#### **2.1.4. EROÇÃO DENTÁRIA**

A erosão dentária é a perda localizada de estrutura dentária provocada pela ação química de ácidos não relacionados com o metabolismo bacteriano. Estes ácidos podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Um ácido de origem intrínseca pode ser, por exemplo, o suco gástrico, que por refluxo gastroesofágico chega à cavidade oral em pacientes sofrendo de bulimia, anorexia, gastrite crónica, entre outros. Os ácidos de origem extrínseca são os ácidos presentes na dieta, medicação, ambientais ou inerentes ao estilo de vida do indivíduo. Na dieta, os ácidos estão presentes em bebidas energéticas, sumos cítricos, vinho, vinagre, refrigerantes gaseificados e água gaseificada. A profissão pode ser também um fator relevante, nomeadamente quando há exposição diária a compostos ácidos orgânicos e/ou inorgânicos no ambiente de trabalho. É o caso dos funcionários de fábricas envolvidas em processos de limpeza ou em fermentações bacterianas à escala industrial. Outro exemplo é o dos nadadores profissionais, que apresentam maior propensão para a erosão dentária por estarem em constante contacto com água tratada com produtos descontaminantes à base de cloro, os quais diminuem o pH do meio.

O grau de erosão está relacionado com vários fatores como o meio, a frequência e a duração da mesma, assim como o método de contacto entre o dente e o ácido. O grau de erosão pode estar também relacionado com fatores da cavidade oral do indivíduo, como o fluxo salivar, o pH, a composição e a capacidade tampão da saliva, ou mesmo a anatomia dentária (Poggio et al., 2009). A erosão dentária pode afetar apenas o esmalte dentário, como atingir proporções que afetam a dentina subjacente. A prevenção da erosão deve ser fomentada através da diminuição da ingestão de alimentos ácidos, controlo de doenças que provocam refluxo gastroesofágico e escovagem dos dentes uma hora após o ataque ácido.

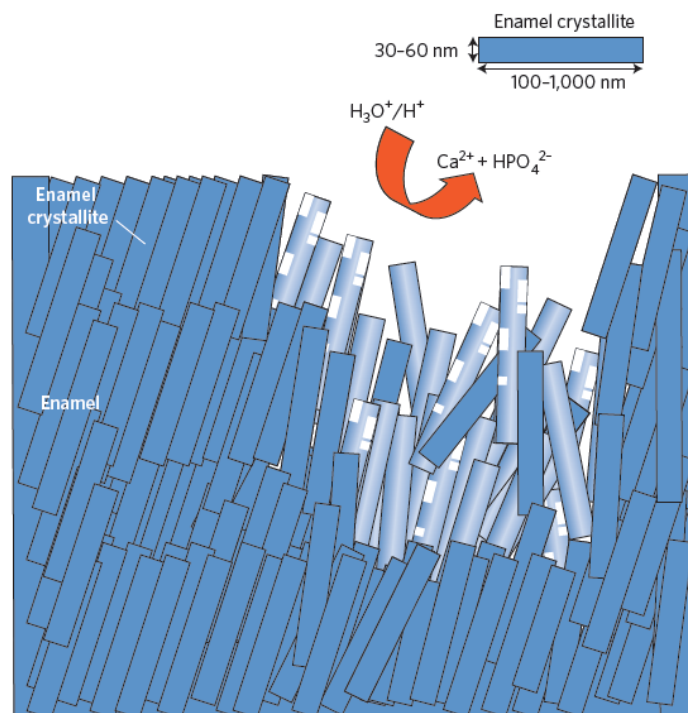


Figura 8 – Erosão dos prismas de esmalte. Na presença de concentrações elevadas de  $H^+$ , baixo pH, ocorre dissolução dos cristais de esmalte (azul claro) resultando na liberação de cálcio e fosfato. (Hannig & Hannig, 2010)

## 2.2. REMINERALIZAÇÃO

### 2.2.1. SALIVA

A saliva é um fluido secretado pelas glândulas salivares, diretamente na cavidade oral, e é composto principalmente por água, mas também por matéria orgânica e inorgânica. A matéria orgânica consiste em proteínas (principalmente glicoproteínas e enzimas digestivos), aminoácidos, ureia, imunoglobulinas, entre outros. Uma das proteínas presentes na saliva é a estaterina, responsável por manter altas as concentrações de íons de cálcio e de fosfato no meio ambiente oral e por impedir a sua precipitação descontrolada (Llena, Forner & Baca, 2009; Cochrane et al., 2010) (como se verá mais à frente neste trabalho, o sistema CPP-ACP funciona muito à semelhança desta proteína). A matéria inorgânica da saliva é composta por aniões (ião cloreto, o bicarbonato, o monofosfato, o bifosfato, o sulfato, o flúor, entre outros) e catiões (sódio, o cálcio, o potássio, a amónia, o magnésio, entre outros). Os íons cálcio, bicarbonato, monofosfato e bifosfato são importantes na capacidade tampão da saliva.

Tabela 1 – Funções dos principais componentes da saliva. (Adaptado de Levine, 2011)

Componente da saliva	Função
Mucinas	Lubrificante da mucosa oral e dos alimentos; Inibição da colonização bacteriana
Água	Facilita a clearance; Inibição da colonização bacteriana
$\alpha$ -amilase, lípase lingual	Digestão de amido (principalmente) e de lípidos (residual)
Bicarbonato de sódio, anidrase carbónica, estaterina	Estabilização da superfície do dente
Lisozima, lactoferrina, peroxidases, histatinas,	Ação imunológica inata, não específica e antibacteriana
Aglutinina e mucina salivares	Ação imunológica inata que favorece a <i>clearance</i> bacteriana
Imunoglobulina secretória (IgA)	Ação imunológica adquirida, específica, que favorece a <i>clearance</i> bacteriana

A saliva desempenha diversas funções, não só digestivas, mas também lubrificantes e protetoras do trato gastrointestinal superior (tabela 1). Destas últimas, e no contexto do presente trabalho, destacam-se a capacidade de tamponização do meio oral, a limpeza mecânica das superfícies orais, e a ação antimicrobiana. A ação antimicrobiana da saliva é devida por um lado à presença de enzimas (por exemplo o lisozima), que interferem

com o metabolismo bacteriano e impedem o crescimento celular, por outro à presença de imunoglobulinas como a IgA, que apresentam capacidade de adesão a microrganismos, facilitando a sua remoção mecânica ou *clearance*.

O fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva são dois importantes parâmetros para avaliar o risco de cárie de um indivíduo. O fluxo salivar obtém-se medindo a quantidade de saliva produzida num determinado período de tempo e é variável ao longo do dia, sendo menor durante o sono e maior nas refeições. A capacidade tampão está relacionada com a concentração do ião bicarbonato e com a capacidade de neutralizar os ácidos produzidos, ou seja, manter o pH a níveis mais perto do neutro (pH 7,0). Durante as refeições aumenta o fluxo salivar, aumentando, conseqüentemente, o conteúdo em carbonato para neutralizar os ácidos produzidos imediatamente após ingestão de açúcar (Baratieri et al., 1993).

Devido à presença de iões de fosfato e de cálcio na saliva, iões constituintes do esmalte dentário, esta tem capacidade de proteção natural da estrutura dentária. A elevada concentração destes iões permite uma troca constante dos mesmos entre o esmalte e a saliva, troca esta que se inicia imediatamente após a erupção do dente na cavidade oral. Este processo denomina-se maturação do esmalte. O esmalte maduro apresenta maior resistência à desmineralização, menor permeabilidade e maior dureza na sua superfície. Assim, após um ataque ácido ao esmalte, os iões presentes na saliva atuam na remineralização dos locais afetados. No entanto, a capacidade de remineralização da saliva é dependente do pH, sendo que a alteração do pH devido à dieta e produção de ácidos pelos microrganismos determina o limite desta capacidade de regeneração. Define-se como pH crítico o valor de pH abaixo do qual a saliva não tem capacidade de reverter a perda mineral do esmalte. Acima do pH crítico, os minerais presentes em solução na saliva e à superfície do dente estão em supersaturação quando comparados com a HA. Também é importante referir que a presença de flúor influencia o pH crítico. A tabela seguinte (tabela 2) mostra as relações entre o pH do meio, a presença de flúor, dissolução de HA e FA, formação de FA, dissolução de FA e conseqüências para o esmalte. De acordo com a tabela 2, o pH crítico diminui na presença de flúor, isto é, na presença de flúor e consoante o pH do meio, a remineralização encontra-se aumentada ou a desmineralização diminuída. Tomando como exemplo um pH entre 4,5 e 5,5, na presença de F<sup>-</sup> ocorre dissolução de HA e FA, mas também formação de FA que permite a reposição de minerais perdidos como fosfato, cálcio e flúor, prevenindo parcialmente a

desmineralização. Por outro lado, num ambiente com o mesmo pH mas na ausência de F<sup>-</sup>, não ocorre formação de FA e portanto a desmineralização é superior.

Tabela 2 – Relações entre pH, F, dissolução de HA e FA, formação de FA e efeito no esmalte. As setas ↑ e ↓ significam “aumentada” e “reduzida”, respetivamente. (Adaptado de Baratieri et al., 2003)

pH	Presença de Flúor	Dissolução de minerais mais solúveis	Dissolução de HA e FA	Formação de FA	Dissolução de FA	Consequência no esmalte
7,0		Não	Não	Não	Não	Remineralização
	Sim	Não	Não	Sim	Não	Remineralização ↑
5,5 – 6,5	Não	Sim	Não	Não	Não	Remineralização
	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Remineralização ↑
4,5 – 5,5	Não	Sim	Sim	Não	Não	Desmineralização
	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Desmineralização ↓
<4,5	Indiferente	Sim	Sim	Não	Sim	Cárie aguda

Embora necessária, a saliva não é suficiente para a proteção do esmalte por não apresentar a capacidade de iniciar o processo de aumento dos níveis de iões de cálcio, fosfato e flúor (Shetty, Hegde & Bopanna, 2014). As perdas minerais vão ocorrendo lentamente até que existe colapso da estrutura dentária, devido ao desequilíbrio entre a perda e a reposição dos minerais, facilitada pela acumulação de placa bacteriana, maus hábitos de higiene oral, não utilização de produtos fluoretados, existência de restaurações desbordantes e/ou elevado consumo de açúcares, entre outros fatores.

### 2.2.2. A SALIVA E A REMINERALIZAÇÃO

A saliva e o meio oral estão, geralmente, supersaturados com iões de fosfato e de cálcio cuja tendência para precipitar é elevada. Adicionalmente, a saliva contém na sua composição um péptido com o nome estaterina que estabiliza as formas solúveis dos iões fosfato e cálcio, prevenindo a sua precipitação. Tal precipitação daria origem a uma massa mineral depositada em redor das estruturas dentárias e à rápida formação de tártaro. A estaterina permite que a deposição de iões na superfície dentária seja controlada e que, portanto, a remineralização seja contínua. Garantindo-se um valor de pH acima de 5,5 e na presença de iões fosfato, cálcio e flúor, a desmineralização sofrida pelo esmalte é revertida pela remineralização da estrutura afetada (Roberson et al., 2006).

As lesões de esmalte não cavitadas apresentam uma rede cristalina intacta, tal como os seus prismas. O cálcio e o fosfato da saliva podem atravessar a superfície de esmalte e precipitar nas regiões desmineralizadas dos cristais de HA. A supersaturação da saliva permite que este processo seja uma constante, promovendo a remineralização das lesões. As lesões remineralizadas apresentam uma coloração mais escura, manchas negras ou castanhas, embora sejam clinicamente intactas, sem cavitação.

A presença de flúor durante a remineralização resulta na incorporação deste ião na HA formando-se FA, que apresenta maior resistência a ataques ácidos subsequentes. Adicionalmente, a presença de flúor promove a precipitação de fosfato e de cálcio (Cochrane et al., 2010).

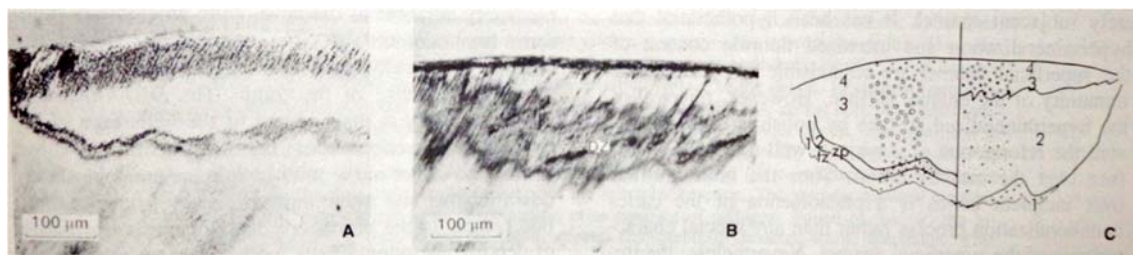


Figura 9 – Remineralização de lesão inicial de esmalte. Esmalte antes (A) e depois (B) da remineralização. (C) esquema do esmalte antes (painel esquerdo) e depois de remineralização (painel direito). (1) zona translúcida; (2) zona escura, remineralizada à direita; (3) corpo da lesão; (4) esmalte superficial. (Roberson et al., 2006)

Na figura 9 pode observar-se uma lesão inicial sob a superfície de esmalte antes (A) e depois (B) de remineralização. A imagem C corresponde a uma representação esquemática das anteriores. Na imagem A, a zona mais clara sob a superfície de esmalte corresponde à zona desmineralizada. Na imagem B, a zona anteriormente desmineralizada apresenta-se de cor escura devido à remineralização. Na imagem C podem observar-se círculos de tamanhos variados que representam o tamanho dos poros nos diferentes locais da lesão (Roberson et al., 2006).

### 2.2.3. SISTEMA CPP-ACP

Os fosfopéptidos de caseína (CPP) são péptidos bioativos derivados da caseína que possuem fósforo ligado por ligações monoéster a resíduos de serina (Nagamani, Hiremath & Murthy, 2012). Dizem-se péptidos bioativos por serem inativos na sequência proteica

onde se encontram e por sofrerem ativação por hidrólise enzimática ou química (Kitts, 2006). Estes biopéptidos ligam catiões bivalentes, nomeadamente cálcio, mas também magnésio, ferro, ou mesmo zinco, bário, crómio, níquel, cobalto e selénio (FitzGerald, 1998; Zong, Peng, Zhang, Lin & Feng, 2012), e ao se ligarem aumentam a solubilidade desses iões, interferindo com diversas funções biológicas na cavidade oral, tais como o equilíbrio desmineralização/remineralização do esmalte e a capacidade tampão da saliva (Llena et al., 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Farooq, Moheet, Imran & Farooq, 2013). Tal capacidade tem sido explorada no desenvolvimento de agentes profiláticos para a cárie dentária, erosão dentária e mesmo para regressão de *white spot lesions*. Os CPP não são tóxicos, podendo ser utilizados como suplementos alimentares, preparações farmacêuticas, conservantes alimentares e produtos nutracêuticos derivados do leite (Clare & Swaisgood, 2000 citados por Nagamani et al., 2012).

O sistema CPP-ACP (patenteado com o nome Recaldent™) foi introduzido em 1998 como agente de remineralização do esmalte (Reynolds, 1998b). Este composto remineraliza a estrutura dentária favorecendo a difusão de iões minerais até aos locais desmineralizados do esmalte (Reynolds, 1998a). O sistema CPP-ACP é um agente cariostático útil no controlo da doença cárie, reduz a erosão dentária em pacientes com refluxo gastroesofágico, reduz a desmineralização, regenera *white spot lesions* e reduz a hipersensibilidade (Reynolds, 2008b). Uma vantagem desta terapia é o facto dos produtos não serem tóxicos, serem ingeríveis (ao contrário dos produtos fluoretados), serem insípidos e apresentarem baixa antigenicidade (Azarpazhooh & Limeback, 2008; Cochrane et al., 2010). A citotoxicidade dos CPP-ACP foi testada por Bussadori et al. (2010), tendo-se estimado uma viabilidade de 70% em células expostas durante 7 dias ao CPP-ACP (estes resultados foram considerados aceitáveis pelo facto do produto ter uma aplicação essencialmente tópica) (Nongonierma & FitzGerald, 2012). Embora alguns autores afirmem que o complexo pode ser utilizado por pacientes com intolerância à lactose (Azarpazhooh & Limeback, 2008), existe ainda alguma controvérsia neste âmbito (Farooq et al., 2013). Em 1999 a *Food and Drug Administration* (FDA) aceitou a Recaldent como “*generally recognized as safe*” (Azarpazhooh & Limeback, 2008; Cochrane et al., 2010).

#### **2.2.4. ESTRUTURA DOS CPP**

Os CPP são estruturas peptídicas ricas em aglomerados com a sequência primária padrão (motivo ácido) Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, apresentando numerosos resíduos de serina fosforilados e por vezes também treonina (Reynolds, 1998a, 1998b; Huq, Cross & Reynolds, 2000; Gravaghi et al., 2007; Poggio et al., 2009; Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Zong et al., 2012). Os resíduos de serina fosforilados são os locais preferenciais das ligações dos íons de cálcio (Kitts, 2006; Zong et al., 2009). No entanto, uma vez que os CPP têm capacidade de se ligar a mais íons do que os atribuíveis aos motivos ácidos (Cross, Huq, Palamara, Perich & Reynolds, 2005), outros locais da sequência poderão também ligar e estabilizar o cálcio (Cochrane et al., 2010).

Os fosfopéptidos são provenientes da caseína (descoberta nos anos 80), uma proteína presente no leite cuja grande capacidade é a de estabilizar fosfato de cálcio, normalmente bastante insolúvel (Reynolds, 1998a; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Gurunathan et al., 2012), formando fosfato de cálcio amorfo (ACP, descoberto nos anos 90) em nanocomplexos numa solução metastável (Cai, Shen, Morgan & Reynolds, 2003; Cross et al., 2005; Poggio et al., 2009; Cochrane et al., 2010; Gurunathan et al., 2012; Zheng, Zheng, Zhang, Qian & Zhou, 2013). A caseína constitui 80% das proteínas presentes no leite bovino (Silva & Malcata, 2005; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Cochrane et al., 2010). Foi demonstrado que a caseína não hidrolisada é anticariogénica e antiplaca, no entanto apenas quando em doses elevadas, doses cerca de dez vezes superiores às necessárias de CPP para o mesmo efeito (Reynolds, 1998a; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Nongonierma & FitzGerald, 2012) e daí a atratividade dos CPP relativamente à sua proteína original.

As micelas de caseína são estruturas grosseiramente esféricas, apresentando uma cavidade central com cerca de 100 nm de raio e contendo centenas de pequenos agregados (nanocomplexos) de fosfato de cálcio (Cross et al., 2005; Gravaghi et al., 2007). Esta proteína tem sido associada ao cálcio, sendo que um terço do cálcio presente no leite bovino se encontra livre ou ligado a fosfatos, enquanto os restantes dois terços se encontram na forma de fosfato de cálcio amorfo parcialmente ligado à caseína (Kitts, 2006). Cerca de dois terços do cálcio presente no leite bovino e metade do fosfato inorgânico encontram-se ligados às diferentes caseínas formando micelas coloidais com uma razão molar cálcio:fosfato:caseína de 30:21:1 (Cross et al., 2005; Gravaghi et al., 2007).

As caseínas são fosforiladas durante a biossíntese do leite na glândula mamária (FitzGerald, 1998) e o número de resíduos de serina ou treonina fosforilados é influenciado pelo polimorfismo genético das proteínas, o que faz com que existam diferentes caseínas consoante o grau de fosforilação das mesmas (Nongonierma & FitzGerald, 2012). Existem quatro frações primárias de caseínas no leite bovino,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ , correspondendo cada uma a aproximadamente 38%, 10%, 36% e 12% da caseína não fosforilada, respetivamente (Kitts, 2006). Segundo Kitts (2006) e Nongonierma & FitzGerald (2012), de acordo com a fração de caseína, assim varia o número de grupos fosfato presentes no péptido (tabela 3). O grau de fosforilação afeta diretamente a capacidade de quelação de minerais do CPP (Kitts, 2006), variando esta no sentido  $\kappa < \beta < \alpha_{s1} < \alpha_{s2}$ .

Tabela 3 – Número de grupos fosfato em diferentes caseínas. (Nongonierma & FitzGerald, 2012)

Caseína	Número de grupos fosfato
$\alpha_{s1}$ -CN	8 a 9
$\alpha_{s2}$ -CN	10 a 13
$\beta$ -CN	5
$\kappa$ -CN	1 a 2

Os CPP correspondem apenas a 10% da sequência total da caseína (Cochrane et al., 2010) e derivam desta por hidrólise enzimática, principalmente pela tripsina (McDonagh & FitzGerald, 1998; Nagamani et al., 2012). Os péptidos obtidos por digestão sucessiva com tripsina e pepsina têm uma maior capacidade de se ligar ao cálcio, sendo 248 mg de iões de cálcio por g de péptido, enquanto os péptidos em conformação tríptica têm uma capacidade de quelação de 168 mg por g de péptido (Kitts, 2006). Os CPP sequestram fosfato de cálcio numa solução de pH entre 7 e 10,5 (neutro a alcalino) impedindo assim que este se precipite sob a forma de ACP insolúvel (Kitts, 2006; Llena et al., 2009; Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012). Nesta gama de pH, o ACP liga-se através do cálcio aos resíduos de serina fosforilados ficando estável (Rose, 2000; Cochrane et al. 2010). O CPP tem capacidade de estabilizar cem vezes mais fosfato de cálcio do que normalmente é possível em solução aquosa, neutra ou alcalina, antes de se atingir a concentração a partir da qual se inicia a precipitação espontânea (Jayarajan, Janardhanam, Jayakumar & Deepika, 2011).

Uma solução de CPP a 1% e pH 7, tem a capacidade de estabilizar 60 mM de cálcio e 36 mM de fosfato (Reynolds, 1998a; Cochrane et al., 2010). O péptido  $\alpha_{s1}(59-79)$  liga-se, no máximo e por molécula, a 24 iões de cálcio e 16 de fosfato (Reynolds, 1998a). Sob condições de pH neutro ou alcalino, os CPP têm a capacidade de se ligarem a iões de fosfato e de cálcio equivalentes ao seu peso (Reynolds, 1998a; Cross et al., 2005).

Em solução, os iões livres e os iões ligados aos CPP existem em equilíbrio, equilíbrio este que depende dos fatores do meio, tais como pH, concentração de iões e presença de superfícies de ligação competitivas para os CPP. As ligações dos iões de cálcio e de fosfato aos CPP são relativamente fracas, o que permite a sua dissociação, conduzindo a um equilíbrio dinâmico entre os iões livres e os iões associados, oferecendo um reservatório de iões biodisponíveis (Cochrane et al., 2010).

A um pH neutro, o motivo ácido encontra-se altamente carregado negativamente, o que além de permitir que se liguem os catiões bivalentes acima referidos, também aumenta a resistência do CPP a nova hidrólise (Silva & Malcata, 2005). Os péptidos bioativos apresentam esta resistência a hidrólise enzimática devido aos grupos fosfato ligados por ligações covalentes e aos resíduos de prolina (Kitts, 2006).

Num estudo dos efeitos da estrutura molecular dos fosfopéptidos nas propriedades de ligação ao cálcio, Zong et al. (2012) mostraram que, tanto a quantidade de serina fosforilada, como o seu arranjo no fosfopéptido, são fatores importantes na prevenção da precipitação de fosfato de cálcio. Este estudo, realizado utilizando seis fosfopéptidos sintetizados contendo maioritariamente resíduos de serina, com diferentes graus de fosforilação, e de glutamato, revelou que quanto mais resíduos de serina fosforilada estiverem presentes e quanto mais intercalados se apresentarem na sequência, maior a capacidade de ligação ao cálcio e maior a capacidade de inibição de precipitação do fosfato de cálcio. Adicionalmente, o fosfopéptido sintético contendo o motivo ácido presente nos CPP, Ser(P)<sub>3</sub>-Glu<sub>2</sub>, foi o que demonstrou menor libertação de fósforo orgânico e o segundo menor libertador de cálcio por mol de fosfopéptido. O mesmo estudo revelou ainda que um fosfopéptido contendo duas serinas fosforiladas solubiliza menos cálcio por mol de fósforo orgânico e liberta mais cálcio por mol de fósforo orgânico quando comparado com um fosfopéptido com três serinas fosforiladas, sugerindo que os fosfopéptidos contendo três serinas fosforiladas formam complexos mais estáveis com o cálcio do que os que contêm apenas duas serinas fosforiladas (Zong et al., 2012).

Tabela 4 – Sequência dos fosfopéptidos sintéticos utilizados no estudo. (Zong et al., 2012)

Sequência	Número de serinas fosforiladas
Ser-Ser-Ser-Glu-Glu	Nenhuma
Ser-Ser-Ser(P)-Glu-Glu	Uma
Ser-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu	Duas consecutivas
Ser(P)-Ser-Ser(P)-Glu-Glu	Duas intercaladas
Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu	Três consecutivas
Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser-Ser(P)-Glu-Glu	Três intercaladas

Os complexos CPP-ACP são compostos por seis fosfopéptidos no máximo e a sua fórmula depende do péptido envolvido. Exemplificando, a caseína  $\alpha_{s1}(59-79)$  liga-se a sete ACP enquanto a caseína  $\beta(1-25)$  liga-se a oito, os quais formam complexos de seis fosfopéptidos. Este último complexo apresenta um raio médio de  $1,526 \pm 0,44$  nm a pH 6 e  $1,923 \pm 0,082$  nm a pH 9 (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

### 2.2.5. OBTENÇÃO DE CPP

Como já foi referido, os CPP estão presentes na sequência primária da caseína e necessitam ser libertados para se tornarem ativos. Existem diferentes abordagens para libertar os CPP: (1) hidrólise enzimática *in vitro*, seguida de proteólise por enzimas de mamíferos, micróbios e plantas, ou recorrendo a processos físicos (ultrassons, microondas) ou tratamentos químicos; (2) hidrólise por bactérias proteolíticas durante a manufatura de lacticínios fermentados (hidrólise esta que pode ocorrer *in vivo* aquando da ação da flora microbiana intestinal de humanos); e (3) digestão *in vivo* por ação de hidrolases pancreáticas e gástricas durante o trânsito gastrointestinal. Vários estudos demonstraram a formação de CPP em humanos, porcos e ratos após ingestão de leite e produtos lácteos (Nongonierma & FitzGerald, 2012). A primeira abordagem é a mais usual para a obtenção de preparações disponíveis no mercado e a enzima mais comumente utilizada é a tripsina, cujos CPP obtidos apresentam uma capacidade de ligação ao cálcio de 0,60 mg de íões de cálcio por mg de CPP, bem como uma capacidade de solubilizar o cálcio de 14,7 mg de íões de cálcio por mg de CPP (McDonagh & FitzGerald, 1998). Sendo uma abordagem de extrema importância para a criação de produtos comerciais contendo CPP, será seguidamente descrita em mais pormenor.

O primeiro passo do processo de obtenção dos CPP através de procedimentos químicos e físicos consiste na hidrólise do caseinato de sódio pela enzima tripsina, após

o qual é adicionado ácido clorídrico ajustando o pH a 4,7 (pI da caseína) de forma a precipitar a caseína não hidrolisada. Após centrifugação, os CPP em solução são separados da caseína precipitada, que é removida. À fração solúvel é adicionado um sal de cálcio ( $BaCl_2$  ou  $CaCl_2$ ) e etanol para que se formem complexos insolúveis de cálcio com os fosfopéptidos fosforilados (a combinação de etanol e cálcio induz a precipitação seletiva de CPP com o motivo ácido). O sedimento obtido por centrifugação é então ressuspenso com ácido clorídrico a pH 3,5. Com o intuito de aumentar o grau de pureza da solução de CPP, seguem-se ciclos de precipitação com mistura acetona:NaOH, centrifugação e ressusensão do precipitado com ácido. Por fim, o sobrenadante contendo CPP é submetido a uma diálise e uma secagem por atomização (*spray drying*), obtendo-se assim um pó de CPP estável (McDonagh & FitzGerald, 1998; Nongonierma & FitzGerald, 2012). No fim do processo é necessário basificar o pH para que o CPP possa ligar-se ao ACP.

McDonagh & FitzGerald (1998) analisaram a produção de CPP utilizando diferentes preparações de proteases comercializadas, nomeadamente alcalases, pancreatina, proteases fúngicas, quimotripsina, tripsina, entre outras, e concluíram que tanto as preparações enzimáticas de mamíferos, como as fúngicas ou as bacterianas podem ser utilizadas, com sucesso, na produção de CPP a partir de caseinato de sódio. De facto, em qualquer dos ensaios a ligação ao cálcio variou apenas entre 0,4 e 0,61 mg de cálcio por mg de CPP, e a capacidade de solubilização do cálcio variou entre 7,4 e 24,0 mg de cálcio por mg de CPP. O mesmo estudo permitiu ainda verificar que as características dos CPP obtidos se relacionam diretamente com o conteúdo enzimático presente nas preparações de proteases, permitindo a produção de CPP com capacidades de ligação e de solubilização de cálcio diferentes entre si. De acordo com os autores, tais diferenças são devidas a variações nos flancos das regiões fosforiladas das sequências de aminoácidos.

#### **2.2.6. OBTENÇÃO DE CPP-ACP**

O processo de manufatura de complexos CPP-ACP foi inicialmente descrito por Reynolds (2008b). Este processo inicia-se com uma solução de hidrolisado de caseína (CPP) como descrito anteriormente (ver obtenção de CPP), ao qual se adiciona lentamente  $CaCl_2$  como fonte de cálcio, NaOH para ajustar o pH entre 5 e 7 e  $Na_2HPO_4$  como fonte de fosfato na formação de complexos CPP-ACP. Por serem solúveis em água, os

complexos de CPP-ACP são passíveis de serem separados por filtração dos restantes compostos presentes em solução (impurezas, tais como outros péptidos provenientes da caseína e sais), usando uma membrana com um tamanho de poro tal ( $\sim 0,1 \mu\text{m}$ ) que retenha os complexos de CPP-ACP, permitindo a passagem das impurezas. Este complexo, de dimensões na gama dos nanómetros (nanocomplexo) forma-se a um pH entre 5 e 9, sendo que a quantidade de ACP ligado aumenta com o pH até que o equivalente peso de fosfato de cálcio esteja ligado ao CPP (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

### 2.2.7. MECANISMO DE AÇÃO

A capacidade anticariogénica do CPP-ACP prende-se com a apetência do CPP para localizar o ACP na superfície dentária (Nongonierma & FitzGerald, 2012; Farooq et al., 2013; Shetty et al., 2014), assim como na superfície da lesão (Cochrane et al., 2010). O ACP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , é o precursor da HA,  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , e quando na presença de água, o primeiro é convertido no segundo. Esta capacidade é dependente da dose (Azarpazhooh & Limeback, 2008), sendo considerada máxima a uma concentração de CPP de 10 mg/ml (Kanekanian et al., 2008 citado por Nongonierma & FitzGerald, 2012).

O mecanismo de ação do CPP-ACP baseia-se nos seguintes princípios: (1) supersaturação de iões de fosfato e iões de cálcio na saliva de forma a modular a sua biodisponibilidade; (2) capacidade de tamponizar a placa bacteriana e a saliva através da manutenção dos níveis iónicos altos, impedindo descidas de pH; (3) promoção da remineralização da HA; (4) prevenção e redução da desmineralização da HA; (5) atuação nos microrganismos da placa bacteriana; (6) manutenção da concentração iónica sob a superfície da lesão cariosa com intuito de remineralização da mesma (Rose, 2000; Llena et al., 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Goswami, Saha & Chaitra, 2012; Farooq et al., 2013; Shetty et al., 2014).

A grande maioria dos microrganismos patogénicos presentes na placa bacteriana supra gengival e na superfície dentária possuem ação cariogénica. Os estudos de Rose (2000) comprovaram a eficácia do composto CPP-ACP contra a formação de placa bacteriana. O CPP-ACP eleva em cerca de cinco vezes os níveis de cálcio e fosfato na placa bacteriana (Gurunathan et al., 2012). O composto é incorporado na película aderida e na placa bacteriana (Reynolds, 1998a; Caruana, Mulaify, Moazzez & Bartlett, 2009) atuando como um reservatório de cálcio e fosfato (Yengopal & Mickenautsch, 2009).

Apesar do aumento significativo de íons de cálcio e de fosfato (e de flúor, quando este é fornecido juntamente com o fosfato de cálcio) na placa bacteriana, não há formação de tártaro, constatando-se que o CPP-ACP estabiliza os íons à superfície dentária impedindo que estes passem à sua fase cristalina, mantendo-os disponíveis (Cochrane et al., 2010). A atuação do CPP-ACP na placa bacteriana é devida principalmente à sua capacidade tampão, contrariando a descida de pH provocada pela produção de ácidos pelo metabolismo bacteriano (Nongonierma & FitzGerald, 2012). De facto, um estudo *in vivo* realizado por Caruana et al. (2009) mostrou que o uso de pasta dentífrica contendo CPP-ACP antes do consumo de hidratos de carbono tem capacidade de impedir a descida dos níveis de pH da placa bacteriana, pelo menos a curto prazo. Marchisio, Esposito & Genovesi (2010) realizaram um estudo *in vivo* onde concluíram que 48% dos pacientes apresentaram um aumento do pH da placa bacteriana e 76% dos pacientes apresentaram um aumento do pH da saliva após utilização de um produto com CPP-ACP. O CPP-ACP liga-se às bactérias da placa bacteriana, inibe a sua adesão ao esmalte e a atividade das suas enzimas diminuindo a patogenicidade da placa, cujo metabolismo será afetado (Rose, 2000; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Llana et al., 2009; Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012). O composto liga-se à parede celular das bactérias assim como à substância intercelular, ficando a placa bacteriana colonizada por bactérias menos cariogénicas, diminuindo a capacidade de produção de ácidos do seu metabolismo e conduzindo a uma menor desmineralização da HA (Llana et al., 2009). O CPP-ACP atua nos *Streptococcus mutans* e nos *Streptococcus sobrinus* dificultando a sua adesão à superfície dentária e o seu crescimento, podendo mesmo diminuir a contagem de *S. mutans* (Rose, 2000; Llana et al., 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Farooq et al., 2013; Shetty et al., 2014).

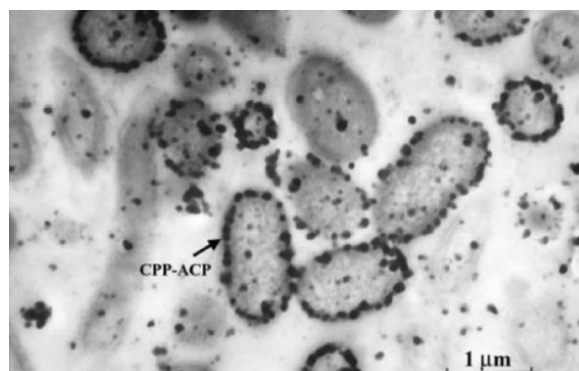


Figura 10 – CPP-ACP na matriz da placa bacteriana e na superfície de células bacterianas. (Farooq et al., 2013)

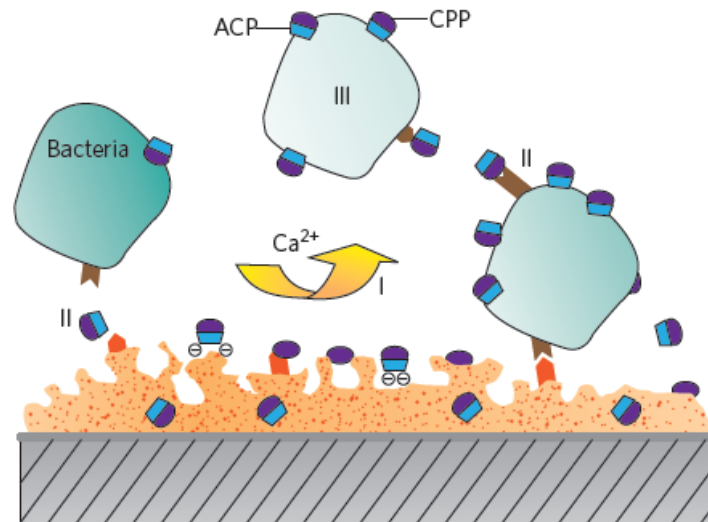


Figura 11 – Inibição da adesão bacteriana através do CPP-ACP. O CPP-ACP (roxo e azul) liga-se à película adquirida competindo com os locais de ligação do cálcio à placa (I). O CPP-ACP liga-se à superfície das bactérias (castanho) interferindo com a ligação das mesmas à superfície dentária (II). O CPP-ACP liga-se também a macromoléculas da película adquirida (vermelho) impedindo a adesão das bactérias. A viabilidade das bactérias fica diminuída (III). (Hannig & Hannig, 2010)

Rose (2000) sugeriu que na presença de CPP-ACP a taxa de difusão de cálcio na placa bacteriana estaria reduzida, tanto a pH neutro como ácido, permitindo uma diminuição na perda de cálcio aquando de um desafio cariogénico. De facto, o CPP-ACP limita a perda de cálcio da placa bacteriana, diminui ou previne a desmineralização e permite uma rápida remineralização devido às altas concentrações de cálcio que providencia (Rose, 2000; Caruana et al., 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2012). A ligação do complexo CPP-ACP às bactérias foi inicialmente descrita como sendo mediada pelo cálcio, onde aproximadamente três iões de cálcio de uma molécula de CPP-ACP estariam envolvidos na coordenação à célula bacteriana (Rose, 2000). No entanto, outros estudos sugerem que a maior parte das ligações do CPP-ACP à parede celular bacteriana seja através de ligações hidrofóbicas e/ou mediadas por hidrogénio (Reynolds et al., 2003 citados por Cochrane et al., 2010).

Os CPP-ACP funcionam como um reservatório de iões, especialmente iões de fosfato e de cálcio, que se encontram em supersaturação na saliva e no biofilme quando comparados com o esmalte, o que promove a remineralização em detrimento da desmineralização (Rose, 2000; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Llena et al., 2009;

Yengopal & Mickenautsch, 2009; Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Farooq et al., 2013).

Devido ao seu tamanho, os complexos CPP-ACP conseguem difundir-se pela placa bacteriana, película aderida e esmalte e penetrar nas porosidades da superfície da lesão cariiosa de esmalte, invadindo o interior da lesão (Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012), ao contrário do flúor que apenas remineraliza a superfície da lesão e não atua em profundidade (Jayarajan et al., 2011; Nongonierma & FitzGerald, 2012). A remineralização em profundidade melhora a estética da lesão, a sua força e promove a formação de esmalte mais resistente a futuros ataques ácidos (Cochrane & Reynolds, 2012). Devido à grande afinidade do CPP à apatite, estabelece-se a ligação dos complexos CPP-ACP e ocorre a libertação de iões. O fosfato de cálcio desloca-se do exterior para o interior do corpo da lesão a favor do gradiente de concentração, formado pela supersaturação de fosfato de cálcio provocada pelo CPP-ACP à superfície do esmalte (Vashisht, Kumar, Indira, Srinivasan & Ramachandran, 2010). Desta forma, o fosfato de cálcio é depositado nos espaços vazios dos cristais de HA, isto é, nos locais desmineralizados, ficando o CPP no interior da superfície remineralizada (Cochrane et al., 2010). A deposição dos iões de fosfato e cálcio na HA dá-se segundo o mesmo padrão que ocorre durante a amelogénese (Huq et al., 2000). A formação da HA no interior da lesão origina a formação de fosfato e ácido que por sua vez se difundem até à superfície da lesão através do gradiente de concentração. Este ácido promove a dissociação do ACP do CPP. Assim, aquando da remineralização do esmalte, forma-se ácido que promove a libertação de mais ACP mantendo o gradiente de concentração destes iões para o interior da lesão (Reynolds, 1998a; Hegde, Shetty & Pardal, 2007; Gurunathan et al., 2012).

Uma vez que o ACP se dissocia do CPP em condições de pH neutro e especialmente ácido, a produção de ácidos pelo metabolismo bacteriano facilita a libertação de iões capazes de impedir a desmineralização dos cristais de HA do esmalte, ou mesmo remineralizar imediatamente os locais desmineralizados (Reynolds, 2008a). A semivida do CPP na placa bacteriana é de 124,8 minutos (Cochrane et al., 2010). Três horas após o consumo de pastilhas elásticas com CPP-ACP, os níveis de CPP presentes na placa bacteriana são 4,6 vezes mais altos do que numa placa bacteriana de controlo (Reynolds et al., 2003 citado por Nongonierma & FitzGerald, 2012).

Para cumprirem o objetivo de estabilizar o fosfato de cálcio, os CPP têm de estar intactos. No entanto, as fosfatases e peptidases presentes na saliva e placa bacteriana degradam as moléculas de CPP remanescentes, caso contrário estas seriam capazes de

permanecer nas superfícies dentárias aguardando por novos íões para estabilizar e agiriam como reservatório destes. As fosfatases defosforilam os resíduos de serina necessários às ligações aos íões de cálcio e de fosfato, enquanto as peptidases degradam os fosfopéptidos por hidrólise ou digestão enzimática. Os fosfopéptidos são também degradados por bactérias sedimentares presentes na saliva. Por outro lado, a própria degradação enzimática dos CPP provoca um aumento de pH, o que contribui para o objetivo da utilização destes compostos: remineralização do esmalte e limitação da desmineralização do mesmo (Cochrane et al., 2010).

Os cristais de HA remineralizados por CPP-ACP mostraram maior resistência aos ácidos quando comparados com esmalte de dentes não tratados com este composto (Yengopal & Mickenautsch, 2009; Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012). No entanto, os locais não remineralizados, isto é, fora da zona da lesão cariosa antiga, apresentam resistência à desmineralização semelhante ao esmalte de dentes não tratados com CPP-ACP. Isto acontece devido à menor solubilidade dos cristais mineralizados através do CPP-ACP (Cochrane et al., 2010).

#### **2.2.8. CPP-ACP COM FLÚOR**

O composto CPP-ACP pode ser combinado com a ação do flúor formando CPP-ACFP. Para a obtenção de compostos CPP-ACFP é necessário adicionar NaF (após a preparação de CPP-ACP) como fonte de flúor e a filtração é substituída por diálise a pH 9 com membrana de 1 kDa (Reynolds, 2008b). O complexo CPP-ACFP tem um raio médio de  $2,12 \pm 0,26$  nm (Cochrane et al., 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012).

Uma molécula de CPP tem capacidade de se ligar a 5 íões de flúor (Llena et al., 2009). A combinação de íões  $F^-$  com outros agentes remineralizantes pode ajudar a combater a doença cárie, diminuindo a quantidade de flúor necessário para se atingir eficácia e prevenir a fluorose dentária (Rose, 2000; Nongonierma e FitzGerald, 2012).

Vários estudos têm vindo a ser realizados com o intuito de comparar o potencial de remineralização entre complexos CPP-ACP e CPP-ACFP. A co-utilização de flúor, mesmo que em concentrações baixas, revela-se mais eficaz do que CPP-ACP sem flúor (Llena et al., 2009; Jayarajan et al., 2011; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Goswami et al., 2012; Shetty et al., 2014). O uso de CPP-ACP conjuntamente com flúor tem sido considerado como o método mais eficaz na prevenção e na regressão das lesões cariosas (Nongonierma & FitzGerald, 2012; Shetty et al., 2014) assim como o método que produz

maior remineralização (Llena et al., 2009; Jayarajan et al., 2011). Estudos demonstraram que em formulações com ambos os compostos, CPP-ACP e flúor, a biodisponibilidade do flúor se encontrava diminuída. O mesmo não ocorre se a concentração de flúor for mais baixa, 900 ppm. Desta forma o fosfato de cálcio não interage com o flúor nem surge a precipitação de  $\text{CaF}_2$  (Gupta & Prakash, 2011 citados por Nongonierma & FitzGerald, 2012).

Cross, Huq, Stanton, Sum & Reynolds (2004) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar a estrutura da  $\alpha_1\text{CN}(59-79)$  quando ligada a ACFP. Segundo os autores, a estrutura do CPP-ACFP resultante deste estudo apresenta uma conformação semelhante à do CPP-ACP. Adicionalmente, concluíram que em pH 6 e em pH 9 os complexos formados apresentavam a seguinte estrutura: 1 molécula de CPP, 15 íons de cálcio, 9 íons de fosfato e 3 íons de flúor, o que equivale a um rácio de 5:3:1.

Kumar, Itthagaran & King (2008) realizaram um estudo utilizando Tooth Mousse (10% CPP-ACP) de forma tópica após tratamento com pasta fluoretada. O tratamento referido apresentou maior capacidade de diminuição da profundidade de lesão quando comparado com o uso de Tooth Mousse em pasta ou em aplicação tópica, pasta fluoretada e pasta não fluoretada.

Num estudo realizado por Reynolds et al. (2008), os autores constataram que utilizando um colutório de 2,0 % de CPP-ACP com 450 ppm de F é obtida uma concentração de  $33,0 \pm 17,6$  nmol F/mg de placa bacteriana seca enquanto um colutório apenas com flúor na mesma quantidade provoca uma concentração de  $14,4 \pm 6,7$  nmol F/mg de placa bacteriana seca, corroborando a hipótese de os compostos estabilizarem os íons, aumentando a sua biodisponibilidade. Ainda no decurso do mesmo estudo, Reynolds et al. (2008) avaliaram a capacidade de remineralização de um dentífrico com 2% de CPP-ACP e 1100 ppm de F e de um dentífrico apenas com 1100 ppm de F. O dentífrico com CPP-ACFP apresentou 2,6 vezes mais remineralização sob a superfície da lesão quando comparado com o segundo (citados por Cochrane et al., 2010).

Jayarajan et al. (2011) efetuaram um estudo comparativo para avaliar a eficácia de produtos tópicos contendo CPP-ACP e CPP-ACFP na remineralização de lesões de cárie criadas artificialmente. O estudo recorreu ao uso de três grupos de tratamento: (1) saliva artificial ou grupo de controlo; (2) 10% CPP-ACP (Tooth Mousse); (3) CPP-ACFP (Tooth Mousse-Plus: 10% CPP-ACP e 0,2% NaF ou 900 ppm). Após protocolo de desmineralização, os dentes foram tratados segundo o grupo no qual se inseriam, durante 4 minutos. As amostras foram avaliadas utilizando Diagnodent (laser fluorescente) e

microscopia eletrônica de varrimento (figura 12). No grupo de controlo verificou-se que a saliva por si só é incapaz de elevar os níveis de fosfato de cálcio significativamente, apesar de deter algum poder de remineralização. No grupo tratado com CPP-ACFP (grupo que demonstrou maior remineralização), os depósitos calcificados foram mais evidentes e localizavam-se nos defeitos porosos das lesões criadas pela desmineralização. Este grupo apresentou níveis de remineralização superiores aos do grupo do CPP-ACP. Mediante uma análise estatística surgiram os seguintes níveis de remineralização:  $4,1 \pm 1,8$  para o CPP-ACP;  $4,8 \pm 1,2$  para o CPP-ACFP; e  $1,7 \pm 0,7$  para a saliva artificial. Conclui-se que existe uma relação sinérgica entre o CPP-ACP e o flúor. Os autores

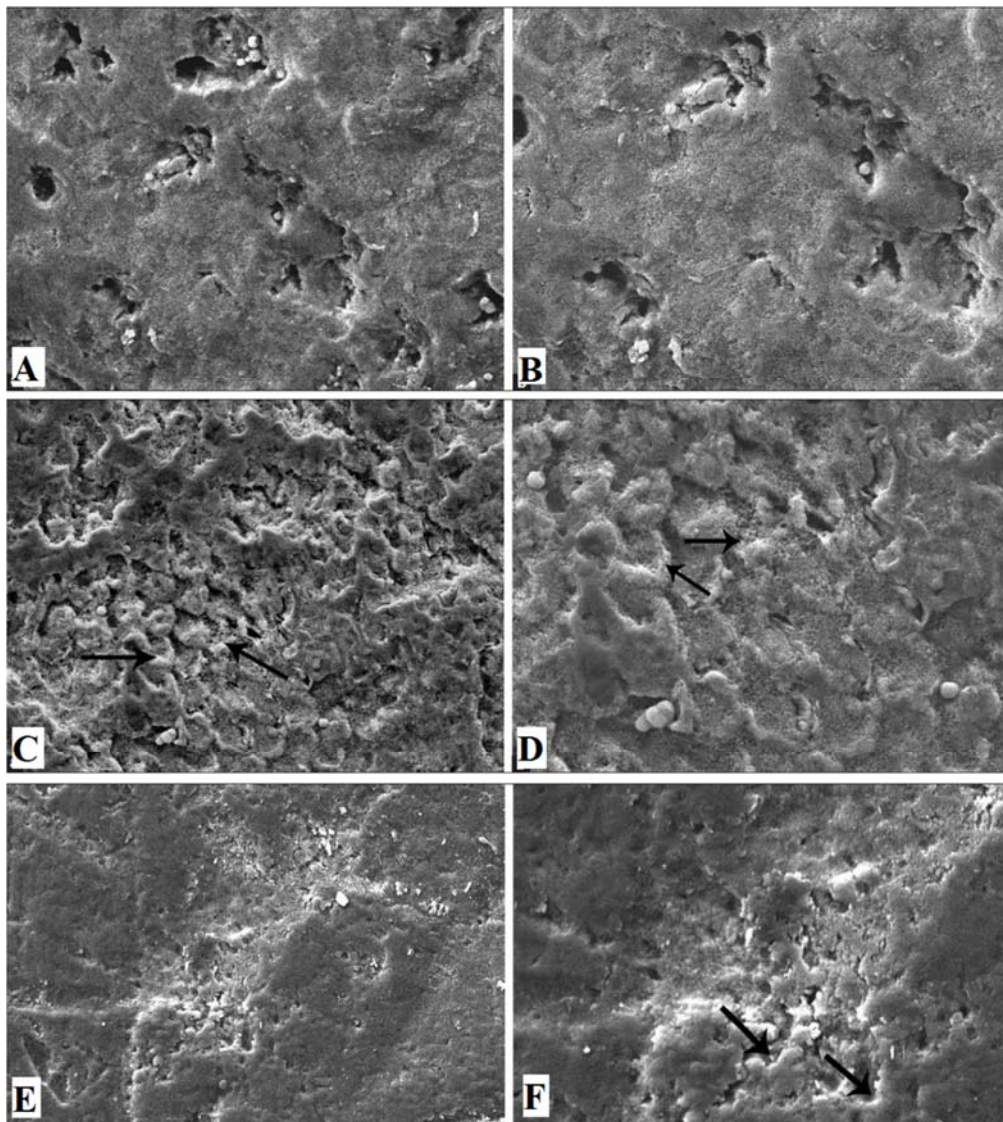


Figura 12 – Microscopia eletrônica de varrimento após tratamento do esmalte. (A, B) Grupo de controlo; (C, D) grupo de CPP-ACP; (E, F) grupo de CPP-ACFP. Imagens obtidas no fim do estudo com uma ampliação de 1000x (imagens A, C, E) e de 2000x (imagens B, D, F) (Jayarajan et al., 2011)

sublinham o facto de o estudo ter avaliado os efeitos dos produtos durante uma semana, sendo que provavelmente se os produtos forem aplicados numa rotina diária, os valores de remineralização poderão ser maiores.

Shen et al. (2011) realizaram um estudo comparativo utilizando seis pastas dentífricas: (1) placebo; (2) 1000 ppm F; (3) 5000 ppm F; (4) Tooth Mousse (10% CPP-ACP); (5) Tooth Mousse-Plus (10% CPP-ACP e 900 ppm F); (6) Clinpro (fosfato tricálcico e 950 ppm F sob a forma de NaF). Com 1 g de produto e 4 ml de água realizaram-se misturas de cada produto. Estas misturas foram utilizadas durante 1 minuto 4 vezes por dia durante 10 dias. O estudo teve vários objetivos tais como determinar a verdadeira quantidade de fosfato, cálcio e flúor nos produtos, avaliar a percentagem de remineralização provocada pelos diversos compostos e compará-la com produtos placebo. Nas tabelas 5 e 6 podem observar-se alguns dos resultados do estudo.

Tabela 5 – Determinação dos conteúdos minerais presentes na saliva após utilização de cada produto. (Adaptado de Shen et al., 2011)

Produto	Ca ( $\mu\text{mol/ml}$ )	P ( $\mu\text{mol/ml}$ )	F (ppm)
Placebo	3,1 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 0,5	-
1000 ppm F	2,4 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,7	106,5 $\pm$ 23,0
5000 ppm F	5,6 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 3,9	584,6 $\pm$ 92,5
Tooth Mousse	48,6 $\pm$ 4,6	34,0 $\pm$ 4,0	-
Tooth Mousse-Plus	51,6 $\pm$ 15,7	35,4 $\pm$ 10,3	108,8 $\pm$ 38,1
Clinpro	1,4 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 1,4	91,1 $\pm$ 9,9

Quanto ao conteúdo em cálcio e fosfato na saliva, as pastas de CPP-ACP são as que se evidenciam devido à grande quantidade destes minerais na saliva após utilização das pastas, sendo a Tooth Mousse-Plus a que apresenta os valores mais altos. Relativamente ao conteúdo em flúor, a pasta com 5000 ppm F é a que apresenta o valor mais alto deste conteúdo na saliva após utilização da pasta.

Comparando um produto com CPP-ACP e flúor com um produto fluoretado a 1000 ppm, ocorre 3,7 vezes mais remineralização com a utilização do primeiro. A capacidade de remineralização dos compostos contendo CPP-ACP (Tooth Mousse e Tooth Mousse-Plus) é maior do que a dos restantes produtos. O facto de estes compostos estabilizarem

Tabela 6 – Percentagem de remineralização obtida pelos produtos dentífricos. (Adaptado de Shen et al., 2011)

<b>Produto</b>	<b>% de Remineralização</b>
<b>Placebo</b>	3,7 ± 2,1
<b>1000 ppm F</b>	7,9 ± 2,1
<b>5000 ppm F</b>	16,3 ± 1,3
<b>Tooth Mousse</b>	24,2 ± 2,3
<b>Tooth Mousse-Plus</b>	29,4 ± 1,8
<b>Clinpro</b>	9,5 ± 1,1

os íons de cálcio e de fosfato permite que os mesmos consigam penetrar sob a lesão mineralizando-a desde o seu interior, ao contrário de produtos contendo apenas os íons, cuja concentração iônica sem ligação ao CPP atinge os níveis de precipitação à superfície do esmalte, sem penetrar na lesão. Os autores concluíram igualmente que um produto contendo os mesmos íons mas na ausência de CPP (Clinpro) não são capazes de estabilizá-los e portanto não permitem uma libertação contínua dos mesmos, impedindo a correta mineralização do esmalte. Ainda, o Tooth Mousse-Plus foi o produto que revelou maior percentagem de remineralização devido ao efeito sinérgico do CPP-ACP com o flúor.

O produto Tooth Mousse-Plus é uma pasta dentífrica que combina os benefícios do sistema CPP-ACP com os do flúor. O flúor e o ACP quando juntos podem precipitar sob a forma de  $\text{CaF}_2$ , diminuindo os efeitos de ambos os componentes. No entanto, um veículo como o CPP vem reduzir esta ocorrência embora apenas na presença de concentrações de flúor relativamente baixas, como 900 ppm, concentração que se encontra presente na pasta acima referida (Azarpazhooh & Limeback, 2008).

### 2.3. CPP-ACP: ONDE ESTAMOS E PARA ONDE VAMOS

Os estudos *ex vivo* são realizados em dentes previamente extraídos e todos os protocolos decorrem fora do meio oral, em laboratório (facto pelo qual por vezes os autores designam os estudos por *in vitro*). Existem várias formas de simular os processos de desmineralização e remineralização das estruturas dentárias, consistindo o método mais descrito na literatura na criação de ciclos de pH que simulam as alterações decorrentes do consumo de hidratos de carbono em intervalos de tempo regulares. O protocolo de desmineralização pode provocar lesões sob a superfície de 80 a 110  $\mu\text{m}$  de profundidade (Azarpazhooh & Limeback, 2008).

Os estudos *in situ* consistem no uso de aplicações removíveis contendo placas de esmalte previamente submetidas a um protocolo de desmineralização (ver figura 13). As aplicações são utilizadas por indivíduos humanos por um tempo determinado para o estudo em causa, durante o qual é aplicada uma terapêutica anticariogénica. Após o término do tempo definido, as aplicações são removidas e estudadas laboratorialmente sob o ponto de vista do conteúdo mineral, profundidade das lesões, estado da superfície do esmalte, entre outros.

Em relação especificamente ao sistema CPP-ACP, os estudos *in vivo* consistem na utilização de produtos contendo o complexo (com ou sem adição de flúor), em indivíduos vivos, avaliando-se os dentes antes e depois da terapêutica. São avaliadas regressões de *white spot lesions*, remineralização do esmalte, limitação do desenvolvimento de novas lesões cariosas, entre outros. Até à data, existem ainda poucos estudos *in vivo* documentados relativos ao complexo CPP-ACP.

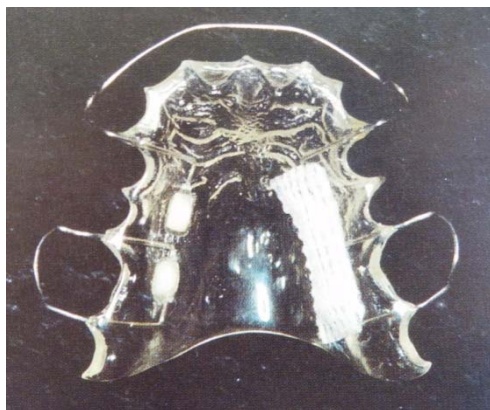





Figura 13 – Aplicação removível com amostras de esmalte dentário para estudos *in situ*. (Baratieri et al., 2003)

Normalmente os estudos *ex vivo* utilizam dentes humanos, embora dentes bovinos ou mesmo de ratos sejam passíveis de serem utilizados. Os dentes bovinos têm composição e características físicas semelhantes aos dentes humanos e podem ser recolhidos em áreas geográficas específicas de modo a limitar as diferenças ambientais ou nutricionais. Além disso, são de fácil obtenção e são maiores do que os dentes humanos, o que permite mais cortes do mesmo dente e possibilita a diminuição da variabilidade interdentária. Por último, os dentes bovinos são normalmente livres de cárie e não são previamente expostos a compostos fluoretados. Em conjunto, estas características sugerem que os dentes bovinos são viáveis para a realização destes estudos.

O sistema CPP-ACP já foi incorporado e estudado em diversos veículos de entrega. Este sistema de remineralização do esmalte pode ser incluído em variadíssimos produtos tais como dentífricos, cremes tópicos, colutórios, pastilhas elásticas, comprimidos orodispersíveis, leite, iogurte, doces, bebidas energéticas, refrigerantes e cimentos de ionómero de vidro para selantes (Yengopal & Mickenautsch, 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2012). Existem diversos dentífricos contendo CPP-ACP, inclusive com flúor, e estão disponíveis em vários sabores. Estão disponíveis no mercado colutórios com 2% CPP-ACP bem como com 2% CPP-ACP e 450 ppm de flúor. As pastilhas elásticas são tidas como ótimos veículos de entrega de iões, por um lado por permitirem a utilização de concentrações elevadas de iões minerais (concentrações que chegam aos níveis presentes num litro de uma solução de remineralização ou saliva), por outro porque o tempo de utilização é geralmente superior ao dos outros veículos (compare-se, por exemplo o tempo de mastigação de uma pastinha com o de um bochecho, cujo período é geralmente um minuto). Além disso, a ação de mastigar uma pastilha elástica já produz, por si só, uma limpeza mecânica das superfícies dentárias e estimula a produção de saliva. Um fator não menos relevante é o da maioria da população gostar de mastigar pastilhas, não sendo portanto limitativo do sucesso da terapia a adesão por parte do utilizador (Santhosh, Jethmalani, Shashibhushan, & Subba Reddy, 2012). Por seu lado, os comprimidos orodispersíveis são igualmente um veículo de entrega de CPP-ACP a ponderar, uma vez que estimulam a produção de saliva através dos seus sabores e dissolvem-se totalmente quando consumidas, são eficazes e seguras (Cai et al., 2003). Ainda, a adição de CPP-ACP nos produtos laticínios já está igualmente disponível no mercado em certos países. Bebidas energéticas e outras bebidas ácidas com adição de CPP-ACP também já foram testadas.

Tabela 7 – Produtos comerciais com CPP-ACP. (Recaldent™, 2014)

Produto comercial	Imagem
Dentífricos	
Pastilhas elásticas	
Leite	

Estudos *in vivo* confirmaram que o uso diário de CPP-ACP aumenta o cálcio e o fosfato na placa bacteriana e origina uma redução de  $51 \pm 19\%$  na perda mineral de esmalte após exposição frequente a sacarose durante três semanas, quando comparados com grupos de controlo (Reynolds, 1998a). Por outro lado, o CPP-ACP é eficaz mesmo em concentrações baixas como 0,1% (Rose, 2000).

Cai et al. (2003) realizaram um estudo *in situ* com o objetivo de avaliar a remineralização de uma lesão de esmalte sob a superfície, através do consumo de comprimidos orodispersíveis contendo CPP-ACP. Para tal, mediram o fluxo salivar estimulado e não estimulado num conjunto de indivíduos aos quais foi colocado uma aplicação removível em acrílico contendo quatro amostras de esmalte desmineralizado. No estudo documentado por estes autores participaram 10 indivíduos adultos saudáveis, não medicados e sem manifestações de doença de cáries ativa, doença periodontal ou qualquer outra patologia oral. Amostras de esmalte com 4x4 mm, preparadas a partir de terceiros molares extraídos e submetidas a um processo de desmineralização para se obterem lesões iniciais sob a superfície, foram colocadas nas aplicações removíveis de acrílico (quatro amostras por aplicação). Em paralelo, prepararam-se amostras para

controle, as quais foram armazenadas num ambiente húmido. Realizaram-se quatro tratamentos aleatórios com comprimidos contendo diferentes doses de CPP-ACP, tratamentos esses que consistiram no consumo de um comprimido 4 vezes por dia durante 14 dias. O tempo médio de dissolução dos comprimidos foi de 8 minutos, sem mastigação. As aplicações removíveis foram utilizadas durante o mesmo período de tempo para todos os grupos mesmo no grupo sem consumo de comprimidos. Quando removidas da cavidade oral, as aplicações foram lavadas com uma escova e pasta sem adição de flúor, sem escovagem das zonas com as amostras de esmalte. Todas as amostras foram analisadas por microrradiografia e densitometria. A tabela 8 mostra os resultados obtidos neste estudo, onde é possível verificar que tanto os comprimidos com 18,8 mg de CPP-ACP (78%), como os com 56,4 mg de CPP-ACP (176%) originaram uma percentagem de remineralização superior aos comprimidos sem adição de CPP-ACP. Estes resultados sugerem que a adição de CPP-ACP em comprimidos orodispersíveis induz remineralização e que a remineralização depende da dose.

Tabela 8 – Percentagem de remineralização das lesões de esmalte sob a superfície. (Cai et al., 2003)

<b>Tratamento: dose de CPP-ACP por comprimido (mg)</b>	<b>% de remineralização</b>	<b>Aumento da % de remineralização em relação ao grupo de comprimidos sem CPP-ACP</b>
Sem tratamento	1,97 ± 0,33	-
0	7,03 ± 0,65	-
18,8	12,50 ± 1,48	5,47 (78%)
56,4	19,39 ± 1,69	12,36 (176%)

Ramalingam, Messer & Reynolds (2005) estudaram o efeito da adição de diferentes concentrações de CPP-ACP a uma bebida energética (com alto poder erosivo) com o intuito de: (1) determinar a concentração mínima eficaz para prevenir a erosão dentária provocada pela bebida; (2) avaliar a diferença no sabor da bebida; (3) avaliar a remineralização da superfície de esmalte. Foram utilizados 15 dentes e para cada um foram realizadas duas amostras. As amostras foram imersas em diferentes soluções de bebida energética sem e com diferentes percentagens de CPP-ACP. A tabela 9 mostra os

Tabela 9 – Valores de pH e de profundidade de erosão obtidos com as diferentes percentagens de CPP-ACP. (Adaptado de Ramalingam et al., 2005)

% CPP-ACP	pH	Profundidade de erosão (kÁ)
0	2,709 ± 0,012	38,70 ± 5,60
0,063	3,068 ± 0,002	17,98 ± 3,05
0,09	3,273 ± 0,008	4,31 ± 0,64
0,125	3,403 ± 0,002	3,35 ± 1,65
0,25	3,903 ± 0,002	1,94 ± 0,65

resultados de pH e da profundidade de erosão obtidos para as diferentes quantidades de CPP-ACP presentes na bebida energética. Como se pode verificar, o pH aumentou progressivamente com o aumento de percentagem de CPP-ACP adicionado, embora não tenha sido significativo. A profundidade de erosão diminuiu significativamente com a adição de CPP-ACP e mostrou-se dependente da dose. Relativamente ao sabor, foi considerado indistinguível. Quanto à análise da superfície do esmalte, foram observadas imagens de microscopia eletrónica de varrimento. Nas figuras 14 e 15 são apresentadas algumas das imagens obtidas. As amostras imersas em bebida energética sem adição de CPP-ACP apresentaram uma marcada erosão comparando a área de teste com a área de controlo. Nas amostras imersas em bebida com 0,125% de CPP-ACP, a diferença entre área de teste e área de controlo apresentou-se mais ténue e apresentou uma ténue irregularidade na superfície de esmalte. Nas amostras imersas em bebida com 0,25% CPP-ACP, as irregularidades da superfície mostraram-se mais dispersas, escassas e com aparência granular, segundo os autores provavelmente resultado do processo de remineralização pelo CPP-ACP. O presente estudo veio confirmar o poder erosivo das bebidas energéticas e permitiu concluir que a adição de CPP-ACP não altera as características da bebida relativamente ao sabor e à cor, aumenta ligeiramente o pH e esse aumento é dose-dependente, diminui a profundidade de erosão provocada pela mesma. Os autores realçam ainda a importância das condições do estudo permitirem considerar os fatores protetores intraorais, como o padrão de consumo da bebida (com ou sem palhinha, por exemplo), o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva, a formação de película aderida, entre outros, fatores estes impossíveis de serem considerados nos estudos *in vitro*.

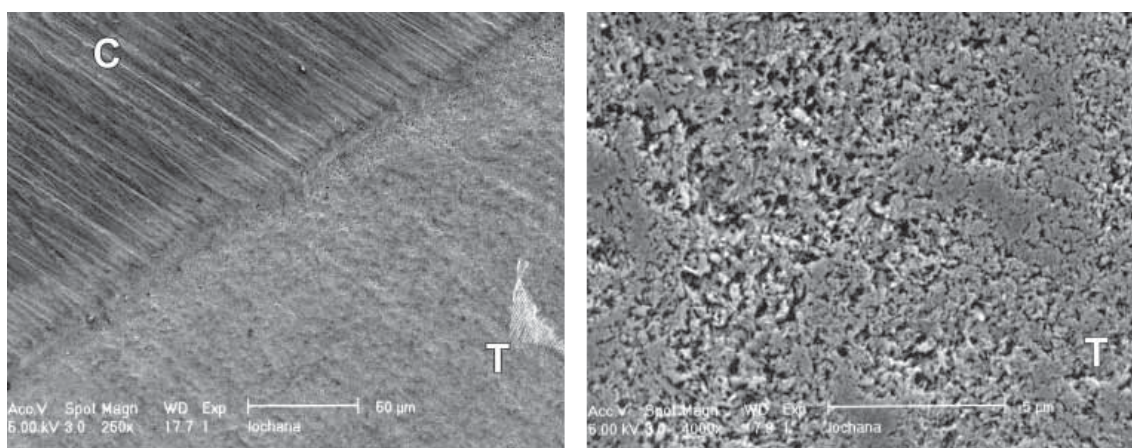


Figura 14 – Microscopia eletrônica de varrimento de uma amostra após erosão com bebida sem adição de CPP-ACP. (esquerda) 250x; (direita) 4000x. (C) controlo; (T) teste. (Ramalingam et al., 2005)

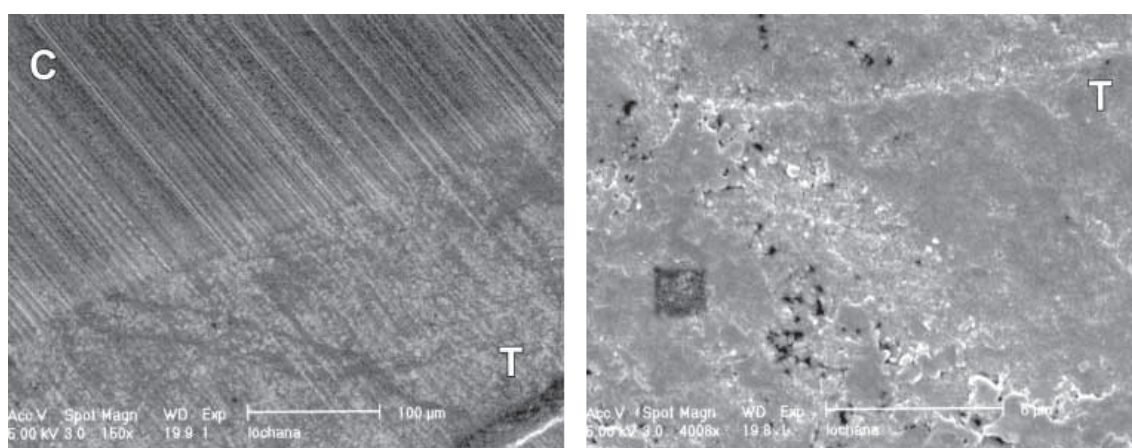


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varrimento de uma amostra após erosão com bebida com adição de 0,125% CPP-ACP. (esquerda) 150x; (direita) 4000x. (C) controlo; (T) teste. (Ramalingam et al., 2005)

Um estudo realizado por Hegde et al. (2007) avaliou quantitativamente a capacidade de remineralização sob a superfície de lesões esmalte através da utilização da pasta Tooth Mousse (CPP-ACP 10%). Neste estudo foram utilizados 30 molares recentemente extraídos a partir dos quais se prepararam 60 amostras. O conteúdo mineral (cálcio e fosfato) destas amostras foi primeiramente avaliado por microscopia eletrônica de varrimento com análise de energia dispersiva de raios-X, antes de as sujeitar a um tratamento com solução desmineralizante durante dois dias para induzir lesões de esmalte artificiais e novamente avaliar o conteúdo mineral das amostras pelos mesmos métodos. As amostras foram então submetidas a diferentes ensaios, cada um envolvendo o

tratamento com Tooth Mousse durante 3 minutos, duas vezes por dia e durante um número de dias variável para cada ensaio. No final foi feita nova análise do conteúdo mineral. Os resultados do conteúdo mineral foram apresentados na forma de rácio Ca/P e encontram-se apresentados na tabela 10. Os autores concluíram que a pasta de 10% CPP-ACP tem significativa capacidade de remineralização sob a superfície de lesões de esmalte. Os resultados máximos foram obtidos no tratamento de dez dias, o que permitiu concluir que a eficácia do CPP-ACP é dependente da duração do tratamento. Após o período de dez dias, o rácio Ca/P ainda não tinha atingido os valores obtidos no esmalte são (sem tratamento), facto que os autores justificaram com a insuficiente duração do tratamento e sugeriram um uso diário a longo prazo para aumentar a eficácia, embora sem qualquer suporte experimental *in vivo* a longo prazo. Sobre este estudo, Azarpazhooh & Limeback (2008), numa revisão sistemática da literatura, postularam não existir evidência experimental suficiente sobre o sistema CPP-ACP, quer em quantidade, quer em qualidade, para afirmar a sua eficácia na prevenção de cáries *in vivo* a longo prazo.

Tabela 10 – Resultados do conteúdo mineral de cada grupo de tratamento (Adaptado de Hegde et al., 2007).

<b>Tratamento: Tempo de desmineralização (dias)</b>	<b>Conteúdo mineral (Razão Ca/P)</b>
Sem tratamento	1,77 ± 0,06
1	1,57 ± 0,04
2	1,49 ± 0,04
5	1,64 ± 0,05
10	1,71 ± 0,03

Morgan et al. (2008) realizaram um estudo comparativo, *in vivo* e a longo prazo, entre pastilhas elásticas sem adição de açúcar na ausência e na presença de CPP-ACP (54 mg por pastilha). O estudo foi realizado com 2720 crianças e consistiu na mastigação diária de pastilhas durante 2 anos, três vezes por dia e durante 10 minutos, tendo sido sempre assegurada uma higiene oral cuidada. Os autores observaram não só uma menor progressão de cáries interproximais (18% menos), como um maior número de lesões que regrediram com as pastilhas de CPP-ACP em comparação com as do grupo de controlo.

Yengopal & Mickenautsch (2009) realizaram uma metanálise cuja questão central consistiu em avaliar os benefícios do CPP-ACP relativamente à prevenção de cárie

quando comparados com outro tipo de intervenções ou placebos. Os autores reuniram vários artigos relativos ao assunto com o intuito de responder à questão. Em todos os estudos analisados, as lesões expostas ao composto CPP-ACP apresentaram maior remineralização quando comparadas com lesões não expostas. Segundo os autores, a exposição ao CPP-ACP a longo prazo apresenta resultados ainda melhores na prevenção de lesões de cáries, *in vivo*. Os autores concluíram, portanto, que atualmente já existe evidência científica suficiente para afirmar que o uso regular de produtos contendo CPP-ACP previne lesões de cárie e remineralizam o esmalte, tanto a curto como a longo prazo.

Um outro estudo com Tooth Mousse com CPP-ACP foi realizado por Mathias, Kavitha & Mahalaxmi (2009) com o objetivo de avaliar a aspereza de uma superfície de esmalte tratada com microabrasão, em comparação com uma superfície de esmalte tratada com microabrasão seguida de aplicação de Tooth Mousse. A microabrasão é um processo que torna a superfície mais polida e, portanto, com menos aptidão para aderir à película e à placa bacteriana. Para este estudo foram utilizados 30 dentes recentemente extraídos, divididos em três grupos: (1) dentes submetidos a micro abrasão com HCl 11% e pó fino de pedra-pomes com uma taça de borracha rotatória (com micro-motor); (2) dentes submetidos ao mesmo procedimento de micro abrasão seguido de aplicação da pasta Tooth Mousse; (3) dentes utilizados como grupo de controlo. A aspereza ou rugosidade das superfícies foi medida. As médias de aspereza resultantes do estudo foram:  $0,68 \pm 0,055$  para o grupo tratado com micro abrasão apenas;  $0,52 \pm 0,057$  para o grupo tratado com CPP-ACP;  $0,85 \pm 0,050$  para o grupo controlo. Conclui-se que o sistema CPP-ACP diminui a rugosidade da superfície de esmalte diminuindo assim a capacidade de adesão da placa bacteriana à superfície dentária.

Poggio et al. (2009) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a eficácia da pasta Tooth Mousse na prevenção da erosão dentária produzida por um refrigerante. A avaliação foi feita através de microscopia de força atômica (AFM). Os autores utilizaram 30 incisivos extraídos, colocados em saliva artificial a pH 7. As coroas dos dentes foram cortadas de modo a que metade da coroa servisse de grupo controlo e a outra metade seria o grupo de tratamento. De entre o grupo de tratamento, formaram-se três grupos: (1) grupo onde só se realizou erosão com o refrigerante, (2) grupo que sofreu erosão seguida de aplicação de pasta com CPP-ACP e (3) grupo no qual apenas se aplicou a pasta. O refrigerante utilizado para o processo de desmineralização foi a Coca-cola. No início do estudo foram realizados testes a esta bebida revelando um pH de 2,44, uma concentração de cálcio de 20,83 mg/ml e uma concentração de fosfato de 175,7 mg/ml. O processo de

desmineralização, nos grupos 1 e 2, foi realizado imergindo as amostras em 6 ml de refrigerante durante 2 minutos seguido de lavagem com água. O procedimento foi realizado quatro vezes para cada amostra. Nos grupos de tratamento 2 e 3 foi aplicada a pasta cobrindo toda a superfície de esmalte durante 3 minutos sem escovar. Após os 3 minutos, a pasta foi removida com água destilada. A pasta foi aplicada às 0, 8, 24 e 36 horas sempre removendo a mesma entre tratamentos. Após os procedimentos, todas as amostras foram imersas em saliva artificial novamente. As amostras foram analisadas através de AFM e os valores encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Valores médios de rugosidade e profundidade das lesões. (Poggio et al., 2009)

Grupos	Tratamento	Média dos valores de rugosidade	Profundidade da lesão (em $\mu\text{m}$ )
1	Com tratamento	0,29 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,15
	Sem tratamento	0,05 $\pm$ 0,01	-
2	Com tratamento	0,14 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,09
	Sem tratamento	0,06 $\pm$ 0,02	-
3	Com tratamento	0,06 $\pm$ 0,05	0
	Sem tratamento	0,07 $\pm$ 0,02	-

Os valores médios de rugosidade das amostras não tratadas não apresentaram diferenças significativas, o que sugere que os grupos podem ser comparados entre si. A diferença entre os resultados de rugosidade dos grupos 1 e 2 demonstra o poder de remineralização da pasta com CPP-ACP. Verifica-se também uma diminuição da profundidade de lesão com a aplicação da pasta (0,50 para 0,20  $\mu\text{m}$ ). Os autores concluíram que a pasta com CPP-ACP é eficaz na prevenção de erosão dentária provocada pela Coca-cola e que o tratamento das superfícies de esmalte consiste no preenchimento das cavidades interprismáticas cobrindo os prismas de esmalte e prevenindo assim o ataque ácido posterior.

Cai et al. (2009) realizaram um estudo utilizando pastilhas elásticas com CPP-ACP (Trident Xtra Care), com carbonato de cálcio (Orbit Professional) e duas outras sem adição de cálcio (Orbit e Extra). O estudo foi realizado em 10 adultos saudáveis, sem doença de cáries ativa, sem doença periodontal ou outras patologias orais. Os indivíduos não se encontravam em qualquer tratamento ou medicação. Neste estudo realizaram-se diversas análises tais como: análise aos iões presentes nas diferentes pastilhas, análise aos

iões presentes na saliva após mastigação das pastilhas durante 2 minutos e análise da percentagem de remineralização de lesões iniciais de esmalte sob a superfície. A análise dos iões presentes nas pastilhas (tabela 12) revelou que as pastilhas com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) apresentavam a maior concentração de iões de cálcio ( $320\mu\text{mol/dose}$ ) embora não biodisponíveis (apenas  $69,7 \pm 1,5 \mu\text{mol/dose}$  estavam disponíveis em solução). A pastilha que apresentou maior concentração de cálcio disponível em solução foi a pastilha com CPP-ACP ( $88,7 \pm 2,6 \mu\text{mol/dose}$ ), sendo que uma dose destas pastilhas equivale a 1,96 g enquanto uma dose das pastilhas com carbonato de cálcio equivale a 3,13 g de pastilha. A análise dos iões presentes na saliva após mastigação destas pastilhas (tabela 13) demonstrou uma concentração de cálcio de  $3,62 \pm 1,73$  com as pastilhas com CPP-ACP e  $3,95 \pm 1,08$  com as pastilhas com  $\text{CaCO}_3$ , diferença pouco significativa. Quanto ao ião de fosfato, as concentrações obtidas foram de  $4,83 \pm 2,19$  com as pastilhas com CPP-ACP e  $2,82 \pm 0,75$  com as pastilhas com  $\text{CaCO}_3$ . Os valores do fluxo salivar foram semelhantes para todas as pastilhas. A percentagem de remineralização para a pastilha com CPP-ACP foi de  $20,67 \pm 1,05 \%$ , bastante significativa, e para a pastilha com carbonato de cálcio foi de  $12,43 \pm 0,64 \%$ , cerca de metade da remineralização pela pastilha anterior. As duas pastilhas sem adição de cálcio apresentaram uma percentagem de remineralização de cerca de 9 %.

Tabela 12 – Análise dos iões presentes nas diferentes pastilhas ( $\mu\text{mol/dose}$ ) (Adaptado de Cai et al., 2009)

ião	Trident Xtra Care	Orbit Professional	Orbit	Extra
<b>Cálcio</b>	$88,7 \pm 2,6$	$69,7 \pm 1,5$ (320)	$8,8 \pm 0,3$ (211)	$24,0 \pm 1,2$ (266)
<b>Fosfato</b>	$37,5 \pm 0,9$	$0,38 \pm 0,01$	---	---

Tabela 13 – Análise dos iões presentes na saliva após mastigação das diferentes pastilhas ( $\mu\text{mol/ml}$ ) (Cai et al., 2009)

ião	Saliva não estimulada	Trident Xtra Care	Orbit Professional	Orbit	Extra
<b>Cálcio</b>	$1,83 \pm 0,47$	$3,62 \pm 1,73$	$3,95 \pm 1,08$	$1,69 \pm 0,26$	$1,99 \pm 0,39$
<b>Fosfato</b>	$5,11 \pm 1,68$	$4,83 \pm 2,19$	$2,82 \pm 0,75$	$3,49 \pm 1,29$	$3,46 \pm 1,49$

Tabela 14 – Percentagem de remineralização obtida pela mastigação das diferentes pastilhas. (Adaptado de Cai et al., 2009)

Pastilhas	% Remineralização
Trident Xtra Care	20,67 ± 1,05
Orbit Professional	12,43 ± 0,64
Orbit	9,27 ± 0,59
Extra	9,32 ± 0,35

Apesar da libertação de iões através da pastilha com  $\text{CaCO}_3$ , estes iões não se encontravam disponíveis e portanto não promoveram a remineralização do esmalte. É de notar que devido à diferença de peso por dose das várias pastilhas, a análise dos iões não demonstra a efetiva concentração das pastilhas. Apresentando os resultados em  $\mu\text{mol}$  de ião por grama de pastilha, a pastilha com CPP-ACP liberta 45,3  $\mu\text{mol}$  de cálcio por grama de pastilha enquanto a pastilha com  $\text{CaCO}_3$  liberta 22,3  $\mu\text{mol}$  de cálcio por grama de pastilha *in vitro*. É de referir que os iões presentes na saliva também podem ter uma outra interpretação. A diferença de concentração de iões de cálcio nas duas pastilhas com adição de cálcio não parece significativa. No entanto, é de recordar que o sistema CPP-ACP possui capacidade de se localizar nas superfícies dentárias, o que diminui a sua concentração na saliva recolhida. Assim, os valores obtidos na saliva são subestimados. Quanto à remineralização obtida, os valores representam a eficácia do sistema CPP-ACP na limitação da progressão de lesões iniciais de cárie e na remineralização das mesmas. Desta forma, os autores concluem que, além de as pastilhas de CPP-ACP serem um bom veículo de entrega dos iões referidos, têm uma ótima capacidade de remineralização de lesões sob a superfície de esmalte quando comparadas com outras pastilhas, com e sem cálcio, disponíveis no mercado.

Walker et al. (2009) estudaram o efeito da adição de CPP-ACP na capacidade de remineralização do leite bovino. O estudo *in situ* consistiu na adição de 0,2 e 0,3% CPP-ACP no leite. O grupo de controlo foi realizado com leite sem adição de CPP-ACP. As amostras de esmalte foram imersas em solução de desmineralização de forma a criar lesões iniciais de esmalte sob a superfície. Os participantes do estudo usaram aplicações removíveis com duas amostras de esmalte. Cada participante consumiu cada um dos três leites em três períodos diferentes com intervalo de uma semana entre si. As aplicações removíveis foram utilizadas uma vez por dia durante o consumo do leite. Os participantes consumiram 100 ml de leite uma vez por dia, durante 30 segundos, no total de 15 dias.

Após o consumo, os participantes permaneceram com a aplicação removível durante 40 minutos após os quais foram instruídos para realizar a higiene da aplicação removível.

Tabela 15 – Percentagem de remineralização obtida com cada um dos leites testados. (Adaptado de Walker et al., 2009)

<b>% CPP-ACP no leite</b>	<b>% Remineralização</b>
<b>0</b>	3,02 ± 0,10
<b>0,2</b>	5,46 ± 0,15
<b>0,3</b>	7,99 ± 0,12

O consumo dos três leites testados demonstrou resultados de remineralização positivos. No entanto, os resultados obtidos com o consumo dos leites com adição de CPP-ACP foram mais favoráveis quando comparados com os resultados obtidos com o leite sem adição do composto. A capacidade de remineralização é dependente da dose já que 0,2% CPP-ACP provocou um aumento na percentagem de remineralização em 81% e uma concentração de 0,3% CPP-ACP provocou um aumento na percentagem de remineralização de 164% quando comparados com leite sem CPP-ACP. Os autores concluíram que a adição de CPP-ACP no leite, mesmo em baixas percentagens, é vantajosa no que concerne à remineralização de lesões cariosas sob a superfície do esmalte (no corpo da lesão).

Um estudo *in vitro* realizado por Lata, Varghese & Varughese (2010) utilizou amostras de esmalte humano com o intuito de avaliar o potencial de remineralização do sistema CPP-ACP e da combinação do mesmo com flúor. Foram criados quatro grupos de tratamento: (1) verniz de flúor; (2) creme com CPP-ACP; (3) verniz de flúor seguido de creme com CPP-ACP; (4) grupo de controlo sem tratamento. Os quatro testes foram aplicados em amostras de esmalte após protocolo de desmineralização. A remineralização à superfície foi medida através de microdureza de superfície e a remineralização sob a superfície foi medida através de microdureza transversal. Os autores concluíram que o verniz de flúor é eficaz na remineralização de lesões iniciais de cárie. Embora o CPP-ACP e a sua combinação com flúor sejam também eficazes na remineralização, os autores concluem que a capacidade de remineralização destes sistemas não atinge os valores de remineralização obtidos com verniz de flúor.

Vashisht et al. (2010) realizaram um estudo *ex vivo* cujo objetivo foi avaliar o efeito da utilização de Tooth Mousse na remineralização de lesões iniciais de esmalte provocadas pela aplicação de ácido ortofosfórico durante 20 minutos. O estudo foi realizado em pacientes cujo tratamento ortodôntico incluía a extração dos pré-molares. Através da aplicação de ácido ortofosfórico a 37% durante 20 minutos, foram criadas lesões iniciais no esmalte de dois pré-molares em cada paciente (um superior para estudo e um inferior para controlo). Duas bandas metálicas ortodônticas foram cimentadas com IRM (*intermediate restorative material* – óxido de zinco com eugenol) em cada um dos pré-molares em questão sendo que no superior foi aberta uma janela. A pasta foi aplicada na janela do pré-molar superior diariamente, durante 3 minutos três vezes ao dia, durante 14 dias após as refeições. Ao fim dos 14 dias os pré-molares foram extraídos e examinados em cortes através de microscopia eletrónica de varrimento. Os autores concluíram que uma pasta de CPP-ACP a 10% tem capacidade de remineralizar lesões iniciais de esmalte e mesmo alterar a morfologia da superfície de esmalte.

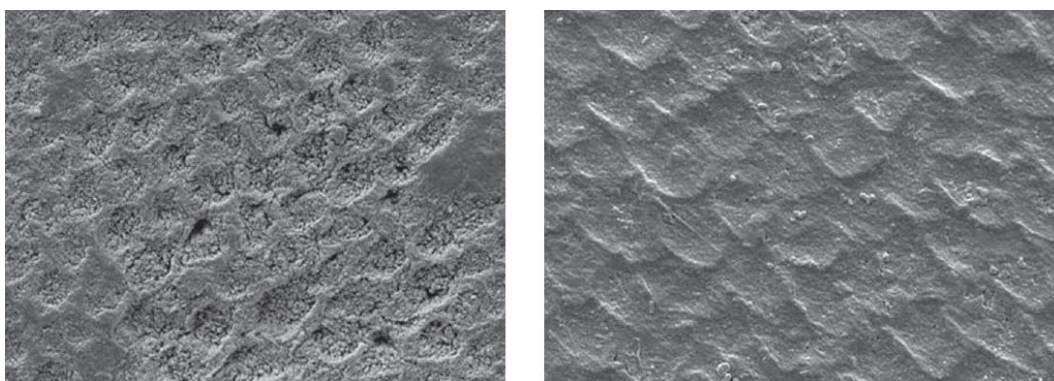


Figura 16 – Imagem de microscopia eletrónica de varrimento do esmalte. (esquerda) esmalte desmineralizado; (direita) esmalte após aplicação da pasta com CPP-ACP. (Vashisht et al., 2010)

À semelhança do estudo realizado por Ramalingam et al. (2005), Manton et al. (2010) realizaram um estudo com quatro refrigerantes ácidos disponíveis no mercado. Os refrigerantes geralmente contêm ácido carbónico ou ácidos orgânicos (como ácido cítrico). Os aniões de citrato fazem quelação dos catiões de cálcio diminuindo os valores dos iões de cálcio disponíveis para remineralização, limitando a remineralização e potenciando a desmineralização (Featherston & Lussi, 2006; Manton et al., 2010). O estudo consistiu em adicionar 0,2% CPP-ACP a cada refrigerante e avaliar a profundidade da erosão provocada, o pH das soluções, entre outros. O controlo negativo do estudo foi

realizado com água destilada. Os resultados de algumas das análises realizadas são apresentados na tabela 16. Como pode ser observado na tabela 16, todos os refrigerantes testados sem CPP-ACP provocaram lesões erosivas nas amostras de esmalte (8,21 a 13,18). A adição de CPP-ACP aos refrigerantes diminuiu em larga escala a profundidade de erosão provocada pelas bebidas (0,48 a 1,07). A erosão provocada pelos refrigerantes com CPP-ACP não foi estatisticamente diferente dos valores obtidos para a água destilada (controlo negativo). Relativamente ao pH, as diferenças entre as bebidas com e sem CPP-ACP não foram significativas. Os autores concluíram que a adição de CPP-ACP a bebidas ácidas elimina o poder erosivo das mesmas.

Tabela 16 – Profundidade de lesão e pH dos diferentes refrigerantes com e sem CPP-ACP. (Adaptado de Manton et al., 2010).

Refrigerante	CPP-ACP (%)	Profundidade da erosão ( $\mu\text{m}$ )	pH (37°C)
Refrigerante 1	0	9,45 $\pm$ 4,63	2,27
	0,2	0,7 $\pm$ 0,43	2,83
Refrigerante 2	0	8,21 $\pm$ 1,25	2,42
	0,2	0,48 $\pm$ 0,31	2,91
Refrigerante 3	0	11,45 $\pm$ 1,22	2,37
	0,2	1,07 $\pm$ 0,11	2,91
Refrigerante 4	0	13,18 $\pm$ 1,88	2,24
	0,2	0,76 $\pm$ 0,39	2,90
Água destilada		0,51	---

Santhosh et al. (2012) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar os níveis de fosfato e de cálcio na saliva não estimulada com os níveis dos mesmos iões na saliva de indivíduos após mastigação de pastilhas elásticas com adição de CPP-ACP. Participaram no estudo 24 crianças com boa higiene oral e sem lesões de cárie ativas, com idade média de 10 anos. Primeiramente foram recolhidos 1,5 ml de saliva não estimulada de cada indivíduo. Seguidamente, cada participante mastigou durante 20 minutos uma pastilha elástica com adição de CPP-ACP. Recolheu-se novamente 1,5 ml de saliva. Ambas as amostras foram analisadas para serem aferidas as concentrações de cálcio e de fosfato. Os dados foram analisados estatisticamente. As concentrações de cálcio e de fosfato antes e depois da mastigação das pastilhas estão apresentadas na tabela 17. Os níveis de cálcio aumentaram em cerca de 70 % enquanto os níveis de fosfato diminuíram

cerca de 28 %. A supersaturação da saliva em íons cálcio é um ponto importante a reter e potencia altamente a capacidade de remineralização do esmalte. No que concerne ao fosfato, segundo Chow et al. (1994) citados por Santhosh et al. (2012), os níveis de fosfato decrescem quando ocorre estimulação da saliva, isto é, o fluxo salivar e a concentração de fosfato são inversamente proporcionais. Assim, o decréscimo observado aquando do estudo pode decorrer da estimulação salivar pela pastilha e não pelo CPP-ACP. A diminuição da concentração de fosfato na saliva estimulada é cerca de 29 % enquanto no estudo observou-se uma diminuição de 28 % podendo concluir-se que a alteração não é significativa. Os autores concluíram que as pastilhas contendo CPP-ACP, quando mastigadas por 20 minutos, possuem capacidade de aumentar a concentração de cálcio mantendo-o disponível para remineralização. Os resultados obtidos estão em conformação com as conclusões de Cai et al. (2009) cujo estudo demonstrou a capacidade de remineralização das pastilhas com CPP-ACP. Os autores sugerem um futuro estudo utilizando as mesmas pastilhas por diferentes períodos de tempo na tentativa de obtenção de uma recomendação relativamente ao tempo de mastigação da pastilha.

Tabela 17 – Concentrações de cálcio e de fosfato na saliva antes e depois da mastigação das pastilhas com CPP-ACP. (Adaptado de Santhosh et al., 2012)

	Antes	Depois
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	7,075 ± 3,964	12,075 ± 4,477
<b>Fosfato (mg/dl)</b>	17,475 ± 3,549	12,525 ± 3,040

Wegehaupt, Taubock, Stilhard, Schmidlin & Attin (2012) realizaram um estudo *in situ* e *in vitro* que pretendeu comparar a capacidade de remineralização do sistema CPP-ACP com a de um colutório com flúor. Foram utilizados dentes extraídos cujas amostras foram colocadas em aplicações removíveis. Cada participante efetuou cinco testes (tabela 18). A microdureza das amostras foi medida no início do estudo. As amostras foram imersas em Sprite *light* durante 2 minutos com o intuito de provocar erosão do esmalte. A microdureza foi medida novamente. As aplicações removíveis foram colocadas na cavidade oral dos participantes durante 5 minutos. Após os 5 minutos as aplicações: (1) foram removidas da boca do participante e tratadas com colutório fluoretado; (2) foram removidas da boca do participante e tratadas com dentífrico com CPP-ACP; (3) permaneceram na boca e o participante bochechou com colutório fluoretado; (4)

permaneceram na boca e o participante aplicou dentífrico com CPP-ACP nas amostras; (5) permaneceram na boca do participante sem qualquer tratamento. Os tratamentos tiveram duração de aplicação de 3 minutos cada. Em todos os grupos os participantes usaram as aplicações removíveis durante as 4 horas seguintes ao tratamento. A microdureza foi medida novamente no fim do estudo. Os resultados da variação da microdureza nos diferentes grupos são apresentados na tabela 18.

Tabela 18 – Testes realizados e variação da microdureza nos diferentes grupos. (Adaptado de Wegehaupt et al., 2012)

Grupos	Teste	Varição da microdureza
1	Colutório fluoretado (250 ppm), extraoral	+ 18,6
2	Dentífrico com CPP-ACP (10%), extraoral	+ 27,1
3	Colutório fluoretado (250 ppm), intraoral	+ 25,1
4	Dentífrico com CPP-ACP (10%), intraoral	+ 22,6
5	Controlo	+ 18,5

As medições da microdureza no início do estudo e após erosão não mostraram diferenças significativas entre si. Os valores de remineralização do grupo tratado com CPP-ACP extraoral foram mais baixos do que os obtidos com CPP-ACP intraoral. Os autores sugerem que este facto poderá relacionar-se com a diluição do produto pela saliva quando aplicado na cavidade oral. Tal diluição não ocorre quando o produto é aplicado *in vitro*. Os autores concluíram que independentemente do grupo, a microdureza inicial não foi atingida. Adicionalmente, os autores concluíram não existir vantagem na utilização de dentífrico com CPP-ACP ou de colutório com flúor na remineralização intraoral de esmalte previamente erodido, quando comparados com amostras não tratadas. É de salientar que o presente estudo testou a eficácia dos produtos após uma única utilização.

Um estudo realizado por Vashisht, Indira, Ramachandran, Kumar & Srinivasan (2013) avaliou a eficácia de Tooth Mousse na remineralização de *white spot lesions* e na inibição de *Streptococcus mutans*. Para este estudo foram necessários 60 voluntários que apresentassem pelo menos uma *white spot lesion*. Os pacientes foram divididos em dois grupos: um grupo de controlo e um grupo de tratamento com a referida pasta. Ao longo dos três meses de estudo, o grupo de controlo utilizou uma pasta fluoretada com 1450 ppm de flúor duas vezes por dia enquanto o grupo de estudo utilizou uma pasta fluoretada

seguida de Tooth Mousse, igualmente duas vezes por dia. Ambos os grupos foram instruídos relativamente à saúde oral no início do estudo. Relativamente às *white spot lesions* foram utilizados dois métodos, o Diagnodent e o método visual. As *white spot lesions* foram avaliadas segundo estes dois métodos no início e no fim do estudo. Num outro aspeto do estudo, a saliva não estimulada foi recolhida em todos os participantes durante 5 minutos. Foi analisado o fluxo salivar, o pH salivar e foi realizada uma análise microbiológica de forma a contar as unidades formadoras de colónias de *Streptococcus mutans*. A saliva foi recolhida igualmente no início e no fim do estudo. As medições finais através do Diagnodent mostraram uma redução ligeira no grupo de tratamento com Tooth Mousse, não sendo significativa. No entanto, o grupo de controlo mostrou um aumento significativo nos valores obtidos pelo Diagnodent. Comparando os dois grupos pode aferir-se que a utilização de uma pasta com CPP-ACP tem capacidade de reversão de *white spot lesions* através dos iões minerais presentes na pasta cuja difusão para o interior da lesão permite a reparação da HA destruída. Os autores referem a necessidade de estudos a longo prazo para verificar a manutenção das melhorias obtidas. Relativamente à contagem de *Streptococcus mutans*, ambos os grupos apresentaram uma diminuição significativa dos valores obtidos. Desta forma, não pode aferir-se que a diminuição nas contagens esteja relacionada apenas com a pasta com CPP-ACP mas também com o ensino da higiene oral aquando do início do estudo. Relativamente ao método visual, foram tiradas fotografias no início e no fim do tratamento mostrando as alterações visíveis (figura 17). Segundo os autores do estudo, o sistema CPP-ACP é um



Figura 17 – Fotografias intraorais de um participante do estudo antes (a) e depois (b) do tratamento com Tooth Mousse. (Vashisht et al., 2013)

método preventivo viável para combater a desmineralização do esmalte e prevenir lesões cáries.

Zheng et al. (2013) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito do composto CPP-ACP em esmalte erodido por ácido cítrico (como já referido, frequentemente presente em refrigerantes). Para este estudo, foram extraídos terceiros molares, sem lesões cáries, por motivos ortodônticos e conservados em água de modo a impedir desidratação dos mesmos. Foram utilizados dez dentes. Cada dente foi dividido em quatro partes e apenas foram utilizadas as coroas. As amostras foram divididas em três grupos. O primeiro grupo serviu de grupo controle tendo sido denominado grupo das amostras originais. O segundo grupo, grupo das amostras erodidas, foi colocado numa solução de 1mM de ácido cítrico a 37°C e pH 3,2 durante 10 minutos. O terceiro grupo, grupo das amostras remineralizadas, foi obtido colocando as amostras do segundo grupo numa solução de CPP-ACP a 2%, 37°C e pH 7 durante 12 horas. Foi utilizada uma solução de CPP-ACP e não a pasta Tooth Mousse de modo a excluir interferências de outros constituintes da pasta. Para cada um dos grupos referidos foram realizados vários testes: (1) microscopia de varrimento confocal a laser, (2) microscopia eletrônica de varrimento, (3) energia dispersiva de raios-x, (4) nanoindentação e (5) nanorisco. Os primeiros dois testes avaliam a morfologia microscópica do esmalte; o terceiro teste avalia a composição química da superfície de esmalte; o quarto avalia a dureza do esmalte; o quinto avalia a resistência do esmalte ao desgaste. Através dos resultados da microscopia de varrimento confocal a laser, pôde observar-se que as amostras iniciais apresentavam-se lisas e compactas (figura 18); as amostras erodidas por ácido cítrico apresentavam uma aparência em favo de mel devido à desmineralização (figura 19); após remineralização com a solução de CPP-ACP, as amostras apresentavam alguns depósitos, a estrutura em favo de mel encontrava-se menos distinta e a rugosidade diminuída (figura 20).

É possível verificar que a estrutura em favo de mel criada pela erosão acídica foi parcialmente preenchida pelo fosfato de cálcio amorfo depositado nestes locais. Pode aferir-se que o CPP-ACP tem capacidade de reparação da morfologia do esmalte danificado embora não totalmente, devido à não regressão total do aspeto em favo de mel.

A análise da composição química do esmalte, análise da energia dispersiva de raios-X, comprova que os componentes principais do esmalte são o cálcio, o fosfato, o carbono e o oxigénio. As amostras de esmalte erodido apresentavam picos de cálcio e de fosfato mais baixos quando comparados com os das amostras do grupo de controlo, o que

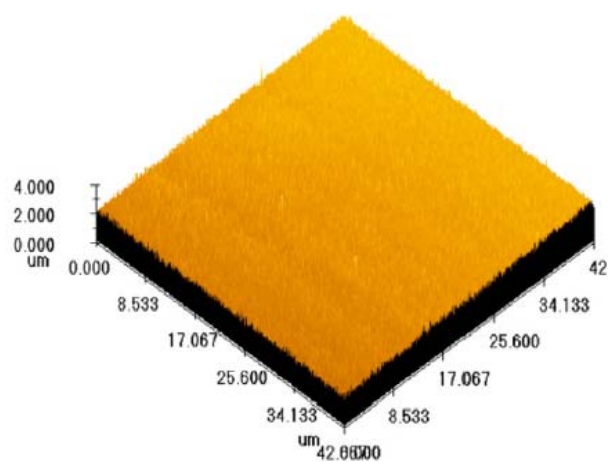


Figura 18 - Microscopia de varrimento confocal a laser – imagem 3D das amostras originais. (Zheng et al., 2013)

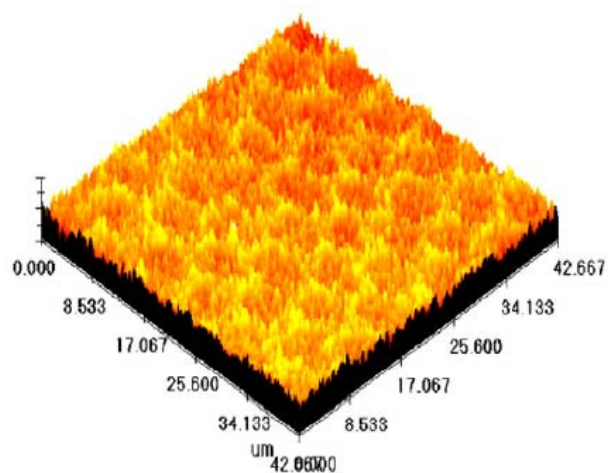


Figura 19 - Microscopia de varrimento confocal a laser – imagem 3D das amostras erodidas. (Zheng et al., 2013)

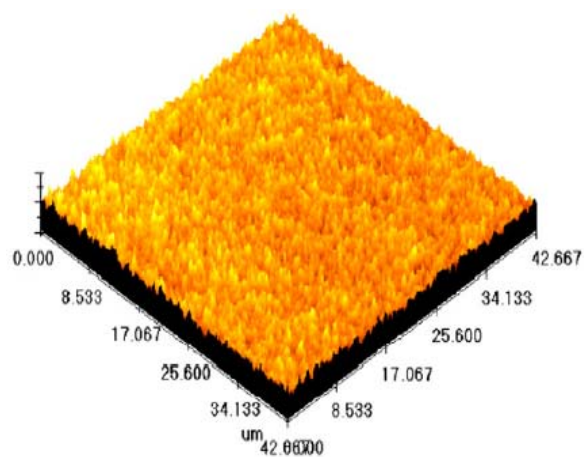


Figura 20 - Microscopia de varrimento confocal a laser – imagem 3D das amostras remineralizadas. (Zheng et al., 2013)

significa que as amostras erodidas possuem um menor conteúdo mineral. Após a remineralização com a solução de CPP-ACP, as amostras apresentavam picos de fosfato e de cálcio significativamente mais altos, o que demonstra um aumento no conteúdo mineral após o tratamento com CPP-ACP. No entanto, os picos destes minerais não se encontravam tão marcados quando comparados com as amostras originais (figura 21) concluindo-se que a perda de mineral aquando da erosão não foi totalmente revertida.

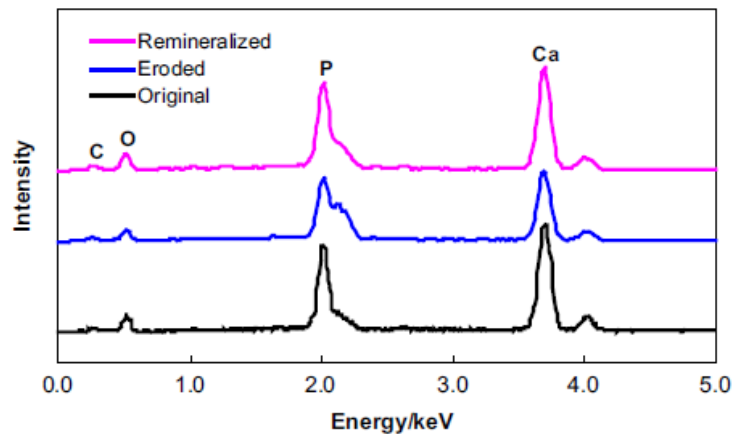


Figura 21 - Análise da energia dispersiva de raios-X dos três grupos de amostras (Zheng et al., 2013)

Propriedades mecânicas como a dureza e o módulo de elasticidade foram também avaliadas (figura 22). Ambos os parâmetros mostraram-se diminuídos após erosão por ácido cítrico, quando comparados com as amostras originais. Por sua vez, as amostras tratadas com CPP-ACP demonstraram um aumento de dureza e do módulo de elasticidade. Assim, os autores concluem que o tratamento com este sistema tem capacidade de restabelecer, em parte, a dureza e o módulo de elasticidade do esmalte erodido por ácido. No entanto, pelo facto de os valores destes parâmetros no grupo de tratamento não terem atingido os valores das amostras do grupo de controlo, pode também aferir-se que o sistema CPP-ACP não permite uma total regeneração da dureza perdida pela erosão (no tempo decorrido durante este estudo).

Por último, foi analisado o volume de desgaste de cada grupo de amostras quando submetidos a uma carga de força constante (10mN). As amostras que apresentaram maior desgaste foram as do grupo submetido a erosão cítrica. Após remineralização com o sistema CPP-ACP, o volume de desgaste apresentou-se diminuído embora não atingindo

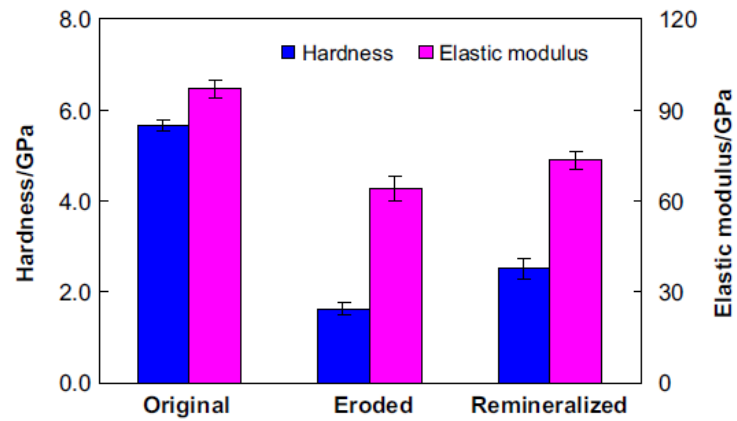


Figura 22 – Dureza e módulo de elasticidade dos três grupos de amostras. (Zheng et al., 2013)

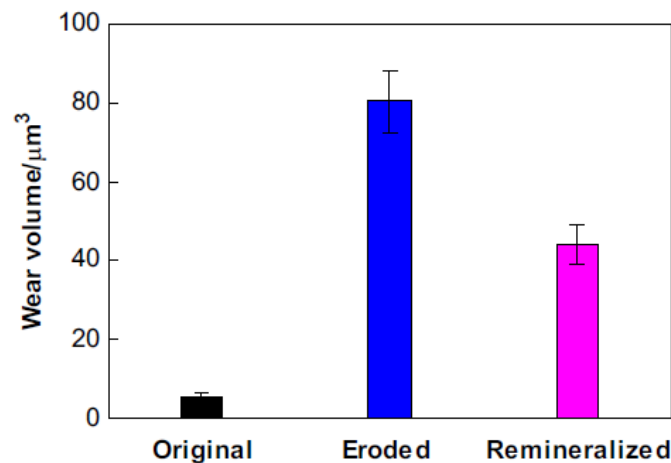


Figura 23 – Volume de desgaste por nanoriscos nos três grupos de amostras. (Zheng et al., 2013)

os valores da amostra original. Os dados são representados na figura 23. Os autores deste estudo concluem que as propriedades do esmalte erodido são passíveis de ser melhoradas com a utilização do sistema CPP-ACP, auxiliando a minorar o desgaste.

Este estudo avaliou a eficácia do sistema CPP-ACP sob diversos aspetos. O CPP-ACP proporciona melhorias na estrutura do esmalte a nível da dureza, resistência ao desgaste, módulo de elasticidade, regeneração dos cristais desmineralizados, composição mineral, e morfologia microscópica. Em todos estes parâmetros, o CPP-ACP mostrou-se eficaz embora não restituindo totalmente os valores e aspetos do esmalte, quando comparados com as amostras originais.

Grewal, Kudupudi & Grewal (2013) efetuaram um estudo *in situ* com o objetivo de avaliar o potencial de remineralização de esmalte pelo sistema CPP-ACP após o consumo de Coca-cola. Os autores recolheram 30 pré-molares hígidos de um banco de dentes e fabricaram três amostras de cada dente. Uma amostra de cada dente foi incluída no grupo controlo; a segunda foi incluída no grupo da análise por microscopia eletrónica de varrimento e a última foi incluída no grupo da análise da solubilidade de cálcio e de fósforo. As duas amostras para análise foram colocadas em aplicações removíveis para uso dos 30 participantes do estudo. Cada participante usou uma aplicação removível e ingeriu 30 ml de Coca-cola, bochechando durante 1 minuto e deitando fora. Em seguida, os indivíduos bochecharam com água durante 2 minutos. O processo repetiu-se quatro vezes por dia nos dias 1, 4, 8, 12 e 15 do estudo. Apenas uma das amostras de cada aplicação removível foi tratada com pasta dentífrica com CPP-ACP nos dias do bochecho com Coca-cola após a exposição ao refrigerante. Dos 30 participantes, em 15 realizou-se a análise com microscópio eletrónico de varrimento e nos outros 15 realizou-se a análise da solubilidade do cálcio e do fósforo. Relativamente às imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento, os autores verificaram que no início da experiência não se observava perda de esmalte interprismático. Após exposição ao refrigerante, as imagens de microscopia de varrimento mostravam desmineralização significativa, perda de mineral interprismático e margens rugosas. As imagens após aplicação de CPP-ACP apresentaram preenchimento significativo dos espaços interprismáticos, o que indica remineralização significativa. Quanto à análise de solubilidade do cálcio e do fósforo, os valores demonstraram aumento significativo apenas nos valores da solubilidade do cálcio. Os valores de solubilidade do fósforo não revelaram alterações significativas entre os três grupos. Os autores concluíram que o sistema CPP-ACP promove significativamente a remineralização de esmalte após erosão pela bebida em questão. Conclui-se também que esta remineralização está relacionada em grande parte com o aumento da solubilidade do cálcio à superfície do esmalte. Os autores reforçam a importância da prevenção nos indivíduos com hábitos de consumo deste tipo de refrigerantes devido à sua alta capacidade de erosão do esmalte. Nestes indivíduos é aconselhável a utilização de métodos adicionais de remineralização tais como o sistema CPP-ACP após o consumo destas bebidas.

Balakrishnan, Jonathan, Benin & Kuumar (2013) realizaram um estudo comparativo com o objetivo de analisar o potencial de remineralização de três dentífricos diferentes contendo: (1) CPP-ACP; (2) fosfato tricálcico e NaF; e (3) fosfossilicato de

sódio e cálcio. Os produtos possuem composição e mecanismo de ação diferentes entre si embora os três tenham capacidade de remineralização do esmalte. Para este estudo os autores utilizaram 45 pré-molares hígidos extraídos por motivos ortodônticos. Estes foram limpos e armazenados em saliva artificial. As amostras foram divididas em três grupos e cada grupo foi tratado por um dentífrico diferente. No início do estudo, as amostras foram analisadas segundo o seu conteúdo mineral e a sua dureza. Todas as amostras foram submetidas a dois ciclos de desmineralização e novamente analisadas segundo conteúdo mineral e dureza. Seguiram-se os ciclos de remineralização, iguais entre si. Cada ciclo de remineralização consistiu na utilização da pasta atribuída a cada grupo de estudo durante 3 minutos, duas vezes por dia, durante 15 dias. Os testes de conteúdo mineral e dureza foram repetidos. Depois de 15 dias repetiu-se o processo de remineralização para cada grupo utilizando a pasta atribuída. Os testes foram repetidos e as amostras armazenadas em saliva artificial. Os resultados dos testes são apresentados nas tabelas 19 e 20.

Tabela 19 – Resultados dos testes de conteúdo mineral (mg/cm<sup>3</sup>). (Adaptado de Balakrishnan et al., 2013)

Grupos	2x Desmineralização	1x Remineralização	Diferença média	2x Remineralização	Diferença média
1	2021,40 ± 12,09	2048,40 ± 49,63	36,01	2065,30 ± 67,97	52,91
2	2021,50 ± 13,02	2041,70 ± 40,25	27,21	2048,40 ± 49,14	33,91
3	2019,00 ± 14,23	2042,90 ± 36,01	20,91	2056,50 ± 57,70	34,51

Tabela 20 – Resultados dos testes de dureza. (Adaptado de Balakrishnan et al., 2013)

Grupos	2x Desmineralização	1x Remineralização	Diferença média	2x Remineralização	Diferença média
1	201,80 ± 23,89	235,32 ± 37,76	26,91	249,42 ± 36,13	39,02
2	204,06 ± 23,33	221,00 ± 26,36	24,41	230,02 ± 25,22	33,41
3	202,37 ± 22,88	224,38 ± 22,51	22,02	235,26 ± 21,69	33,89

Nas tabelas anteriores pode notar-se que os valores obtidos no grupo tratado com o dentífrico com CPP-ACP são superiores tanto na dureza como no conteúdo mineral apesar de todos os dentífricos terem aumentado significativamente os referidos valores. Desta forma, os autores concluem que entre os três dentífricos estudados, o dentífrico com CPP-ACP apresenta o maior potencial de remineralização provavelmente devido à

natureza peculiar do CPP e à sua capacidade de manter o fosfato de cálcio em solução metastável.

Li et al. (2014) realizaram uma revisão sistemática na qual incluíram estudos a longo prazo (mínimo de 3 meses de *follow up*) acerca da capacidade de remineralização de lesões iniciais de cárie *in vivo*. Os autores incluíram na sua revisão oito estudos cujas especificações eram compatíveis com os seus requisitos de inclusão. Dos oito estudos, cinco eram relativos a tratamento ortodôntico. O *follow up* dos estudos incluídos variou entre 3 meses e 2 anos. Todos os estudos comparavam o sistema CPP-ACP com outros sistemas de remineralização existentes ou com placebos. Em nenhum dos estudos analisados se declarou ocorrência de efeitos secundários provenientes da aplicação do sistema CPP-ACP. Após a análise dos estudos incluídos, os autores concluíram que apesar de o sistema CPP-ACP demonstrar capacidade de remineralização de lesões cáries iniciais, os resultados não foram melhores do que os obtidos com produtos fluoretados. Segundo os autores, são necessários mais estudos *in vivo* a longo prazo, com métodos mais rigorosos (por exemplo, maior número de amostras), para avaliar as vantagens e recomendações do sistema CPP-ACP.

Em suma, a grande maioria dos autores dos estudos realizados neste âmbito afirmam a eficácia do sistema CPP-ACP na promoção da remineralização bem como na prevenção da desmineralização do esmalte (Reynolds, 1998a; Rose, 2000; Cai et al., 2003; Ramalingam et al., 2005; Yamaguchi, Miyazaki, Takamizawa, Inage & Moore, 2006; Hegde et al., 2007; Kumar et al., 2008; Reynolds, 2008a; Morgan et al., 2008; Manton et al., 2008; Azarpazhooh & Limeback, 2008; Walker et al., 2009; Cai et al., 2009; Mathias et al., 2009; Poggio et al., 2009; Llana et al., 2009; Yengopal & Mickenautsch, 2009; Manton et al., 2010; Vashisht et al., 2010; Cochrane et al., 2010; Shen et al., 2011; Jayarajan et al., 2011; Santhosh et al., 2012; Nongonierma & FitzGerald, 2012; Gurunathan et al., 2012; Goswami et al., 2012; Zheng et al., 2013; Vashisht et al., 2013; Farooq et al., 2013; Grewal et al., 2013; Balakrishnan et al., 2013; Poggio, Lombardini, Vigorelli & Ceci, 2013; Somasundaram, Vimala & Mandke, 2013; Shetty et al., 2014). No entanto, alguns autores chegaram à conclusão que não existe vantagem na utilização do composto CPP-ACP ou CPP-ACFP relativamente a outros adjuvantes da higiene oral (Lata et al., 2010; Beerens, van der Veen, van Beek & ten Cate, 2010; Wegehaupt et al., 2012; Li et al., 2014). As controvérsias entre estudos parecem estar relacionadas com os protocolos utilizados por cada estudo. Fatores como a quantidade de produto utilizada, o tempo de exposição, o tempo de duração do estudo, o

veículo de entrega do composto ou outras condições da experiência podem alterar os resultados dos estudos (Nongonierma & Fitzgerald, 2012; Wegehaupt et al., 2012). Adicionalmente, os fatores presentes na cavidade oral não são passíveis de serem reproduzidos fielmente em estudos *in situ* ou *in vitro*. Variáveis como o fluxo salivar, a estimulação de saliva provocada pelos compostos, a interação dos compostos com proteínas e outros constituintes da saliva ou a interação dos compostos com a placa bacteriana não são analisadas nos estudos *in situ* e *in vitro*. A ausência de tais fatores nos estudos poderá estar na base das diferenças nos resultados obtidos.

### 3. CONCLUSÃO

Um dos objetivos atuais da medicina dentária conservadora deverá consistir no tratamento não invasivo das lesões de cárie não cavitadas. Este processo implica a remineralização dos cristais de HA afetados fornecendo íões de cálcio, de fosfato e de flúor de forma a formar fluorhidroxiapatite e FA, mais resistentes a futuros ataques ácidos. A medicina dentária preventiva deverá apostar nestes recursos de forma a prevenir lesões de cárie e reduzir a incidência desta doença na população visto o CPP-ACP promover o crescimento de cristais de HA.

É importante o conhecimento deste sistema de forma a instituí-lo nas práticas modernas de medicina dentária preventiva. Em indivíduos com risco de cáries é importante a capacidade de inibição da desmineralização providenciada pelo sistema CPP-ACP bem como a formação de cristais mais resistentes a futuros ataques ácidos. É de salientar a utilidade destes compostos em pacientes com alto risco de cáries como doentes com fluxo salivar diminuído (por exemplo devido a tratamento com radiação), doentes com reflexo de vômito (por exemplo devido a anorexia ou bulimia), entre outros. Nestes indivíduos o equilíbrio entre a desmineralização e a remineralização está afetado, prevalecendo a desmineralização. Uma ação preventiva promissora seria aplicar produtos contendo CPP-ACP com o intuito de diminuir o risco de cáries associado a estes pacientes. Em indivíduos nos quais já se evidenciam lesões iniciais cariosas, o CPP-ACP e o CPP-ACFP podem ser utilizados como tratamento não invasivo de forma a recuperar os cristais afetados pelo processo carioso através do fornecimento de íões de cálcio, de fosfato e de flúor.

O sistema CPP-ACP já foi incorporado com sucesso em diversos veículos de entrega como pastas dentífricas, colutórios, pastilhas elásticas, comprimidos orodispersíveis, leite, bebidas ácidas, entre outros. Os estudos apresentados ao longo deste trabalho indicam que o sistema CPP-ACP atua aumentando os níveis de íões de cálcio, fosfato e flúor na saliva, na placa bacteriana e na superfície dentária, promove a remineralização dos cristais de HA, melhora a estética reduzindo visivelmente as *white spot lesions*, aumenta a dureza e o módulo de elasticidade do esmalte, diminui a aspereza do esmalte, previne a erosão, diminui os efeitos da erosão e elimina o poder erosivo de bebidas ácidas.

Conclui-se assim que o sistema CPP-ACP é um agente de remineralização eficiente na medida em que promove a remineralização, diminui a desmineralização e localiza-se

na superfície dentária exercendo atividade. Além disto, o sistema atua não somente à superfície dentária mas também sob a superfície dentária, no corpo das lesões.

A utilização do sistema CPP-ACP é vantajosa relativamente à utilização de produtos fluoretados. Os produtos fluoretados atuam unicamente à superfície do esmalte, remineralizando-a, não atingindo o corpo da lesão, sob a superfície. Adicionalmente, o flúor pode ser tóxico quando ingerido em doses altas e pode provocar alterações no desenvolvimento do esmalte, como manchas de fluorose. A combinação de CPP-ACP com flúor tem potencial para evitar manchas de fluorose em crianças e diminuir a incidência de cáries.

O uso de adjuvantes da higiene oral suplementados com CPP-ACP é seguro e eficaz. No entanto, são necessários mais estudos de modo a aferir se estes produtos podem ou não ser aplicados em indivíduos com intolerância à lactose. Estudos *in vivo* a longo prazo são também necessários, visto a grande parte dos estudos realizados serem *in vitro* ou *in situ* a curto prazo.

Como é demonstrado ao longo deste trabalho, a maioria dos estudos existentes afirma que a tecnologia do sistema CPP-ACP e do sistema CPP-ACFP é atualmente considerada eficaz e cientificamente corroborada por inúmeros estudos, pelo que o seu uso diário é vantajoso e justificado.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attin, T. (2006). Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*, 20, 152-172. doi: 10.1159/000093361
- Azarapazhooh, A., & Limeback, H. (2008). Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc*, 139(7), 915-924; quiz 994-915.
- Balakrishnan, A., Jonathan, R., Benin, P., & Kuumar, A. (2013). Evaluation to determine the caries remineralization potential of three dentifrices: An in vitro study. *J Conserv Dent*, 16(4), 375-379. doi: 10.4103/0972-0707.114347
- Baratieri, L. N., Andrada, M. A. C., Junior, M. S., Cardoso, A. C., Polidoro, J. S., Andrada, R. C., ... Andrade, C. A. (1993). *Advanced operative dentistry*. 2ª edição. São Paulo, Brasil: Quintessence Books.
- Baratieri, L. N., Junior, M. S., Andrada, M. A. C., Vieira, L. C. C., Ritter, A. V., Cardoso, A. C. (2003). *Odontologia restauradora – fundamentos e possibilidades*. 1ª edição. São Paulo, Brasil: Quintessence Books.
- Beerens, M. W., van der Veen, M. H., van Beek, H., & ten Cate, J. M. (2010). Effects of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate paste on white spot lesions and dental plaque after orthodontic treatment: a 3-month follow-up. *Eur J Oral Sci*, 118(6), 610-617. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00780.x
- Cai, F., Shen, P., Morgan, M. V., & Reynolds, E. C. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Aust Dent J*, 48(4), 240-243.
- Cai, F., Shen, P., Walker, G. D., Reynolds, C., Yuan, Y., & Reynolds, E. C. (2009). Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *J Dent*, 37(10), 763-768. doi: 10.1016/j.jdent.2009.06.003
- Caruana, P. C., Mulaify, S. A., Moazzez, R., & Bartlett, D. (2009). The effect of casein and calcium containing paste on plaque pH following a subsequent carbohydrate challenge. *J Dent*, 37(7), 522-526. doi: 10.1016/j.jdent.2009.03.010
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*, 89(11), 1187-1197. doi: 10.1177/0022034510376046

- Cochrane, N. J., & Reynolds, E. C. (2012). Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*, 24(2), 41-47. doi: 10.1177/0022034512454294
- Cross, K. J., Huq, N. L., Palamara, J. E., Perich, J. W., & Reynolds, E. C. (2005). Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J Biol Chem*, 280(15), 15362-15369. doi: 10.1074/jbc.M413504200
- Cross, K. J., Huq, N. L., Stanton, D. P., Sum, M., & Reynolds, E. C. (2004). NMR studies of a novel calcium, phosphate and fluoride delivery vehicle-alpha(S1)-casein(59-79) by stabilized amorphous calcium fluoride phosphate nanocomplexes. *Biomaterials*, 25(20), 5061-5069. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.045
- Farooq, I., Moheet, I. A., Imran, Z., Farooq, U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) complex. *King Saud University Journal of Dental Sciences*, 4, 47-51.
- Fawcett, D. W. (1995). *Tratado de histologia – Bloom e Fawcett*. 12ª edição. Madrid: McGrawHill – Interamericana.
- Featherstone, J. D., & Lussi, A. (2006). Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*, 20, 66-76. doi: 10.1159/000093351
- FitzGerald, R. J. (1998). Potencial uses of caseinphosphopeptides. *Int. Dairy Journal* 8, 451-457.
- Goswami, M., Saha, S., & Chaitra, T. R. (2012). Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 30(1), 2-6. doi: 10.4103/0970-4388.95561
- Gravaghi, C., Del Favero, E., Cantu, L., Donetti, E., Bedoni, M., Fiorilli, A., . . . Ferraretto, A. (2007). Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells - relationship between biological activity and supramolecular structure. *FEBS J*, 274(19), 4999-5011. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06015.x
- Grewal, N., Kudupudi, V., & Grewal, S. (2013). Surface remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel eroded by cola-drinks: An in-situ model study. *Contemp Clin Dent*, 4(3), 331-337. doi: 10.4103/0976-237X.118385
- Gurunathan, D., Somasundaram, S., & Kumar, S. (2012). Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J*, 57(4), 404-408. doi: 10.1111/adj.12006

- Hannig, M., & Hannig, C. (2010). Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol*, 5(8), 565-569. doi: 10.1038/nnano.2010.83
- Hegde, M. N., Shetty, S., Pardal, D. (2007). Remineralization of enamel sub-surface lesion casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate (CPP-CP) – a quantitative energy dispersive X-ray analysis (EDAX). *J Conserv Dent*, 10, 19-25.
- Hilton, T. J., Ferracane, J. L., Broome, J. C. (2013). *Summitt's fundamentals of operative dentistry: a contemporary approach*. Chicago, EUA: Quintessence Books.
- Huq, N. L., Cross, K. J., Reynolds, E. C. (2000). Molecular modeling of a multiphosphorylated sequence motif bound to hydroxyapatite surfaces. *Journal of Molecular Modeling*, 6, 35-47.
- Jayarajan, J., Janardhanam, P., Jayakumar, P., & Deepika. (2011). Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization - an in vitro study using scanning electron microscope and DIAGNOdent. *Indian J Dent Res*, 22(1), 77-82. doi: 10.4103/0970-9290.80001
- Kitts, D. D. (2006). Calcium binding peptides. In Mine, Y., Shahidi, F. (Eds.), *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Nutraceutical science and technology* (pp. 11-27). New York, EUA: CRC Press.
- Kumar, V. L., Itthagarun, A., & King, N. M. (2008). The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Aust Dent J*, 53(1), 34-40. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.00006.x
- Kuribayashi, M., Kitasako, Y., Matin, K., Sadr, A., Shida, K., & Tagami, J. (2012). Intraoral pH measurement of carious lesions with qPCR of cariogenic bacteria to differentiate caries activity. *J Dent*, 40(3), 222-228. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.013
- Lata, S., Varghese, N. O., & Varughese, J. M. (2010). Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J Conserv Dent*, 13(1), 42-46. doi: 10.4103/0972-0707.62634
- Levine, M. (2011). *Topics in dental biochemistry*. New York, EUA: Springer.
- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *J Dent*, 42(7), 769-777. doi: 10.1016/j.jdent.2014.03.015

- Llena, C., Forner, L., & Baca, P. (2009). Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *J Contemp Dent Pract*, 10(3), 1-9.
- Manton, D. J., Cai, F., Yuan, Y., Walker, G. D., Cochrane, N. J., Reynolds, C., . . . Reynolds, E. C. (2010). Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate added to acidic beverages on enamel erosion in vitro. *Aust Dent J*, 55(3), 275-279. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01234.x
- Manton, D. J., Walker, G. D., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., & Reynolds, E. C. (2008). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by the use of three commercially available sugar-free gums. *Int J Paediatr Dent*, 18(4), 284-290. doi: 10.1111/j.1365-263X.2008.00920.x
- Marchisio, O., Esposito, M. R., & Genovesi, A. (2010). Salivary pH level and bacterial plaque evaluation in orthodontic patients treated with Recaldent products. *Int J Dent Hyg*, 8(3), 232-236. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00374.x
- Mathias, J., Kavitha, S., & Mahalaxmi, S. (2009). A comparison of surface roughness after micro abrasion of enamel with and without using CPP-ACP: An in vitro study. *J Conserv Dent*, 12(1), 22-25. doi: 10.4103/0972-0707.53337
- McDonagh, D., & FitzGerald, R. J. (1998). Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *International Dairy Journal*, 8(1), 39-45. doi: Doi 10.1016/S0958-6946(98)00019-3
- Morgan, M. V., Adams, G. G., Bailey, D. L., Tsao, C. E., Fischman, S. L., & Reynolds, E. C. (2008). The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP-ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res*, 42(3), 171-184. doi: 10.1159/000128561
- Nagamani, A., Hiremath, J. P., Murthy, N. (2012). Calcium binding and solubilizing ability of hydrophobic and hydrophilic caseinphosphopeptides (CPPs). *J. Dairying, Foods & H.S.* 31(1), 16-19.
- Nongonierma, A. B., & Fitzgerald, R. J. (2012). Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Res*, 46(3), 234-267. doi: 10.1159/000338381
- Poggio, C., Lombardini, M., Dagna, A., Chiesa, M., & Bianchi, S. (2009). Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. *J Dent*, 37(12), 949-954. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.011

- Poggio, C., Lombardini, M., Vigorelli, P., & Ceci, M. (2013). Analysis of Dentin/Enamel Remineralization by a CPP-ACP Paste: AFM and SEM Study. *Scanning*. doi: 10.1002/sca.21077
- Ramalingam, L., Messer, L. B., & Reynolds, E. C. (2005). Adding casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to sports drinks to eliminate in vitro erosion. *Pediatr Dent*, 27(1), 61-67.
- Recaldent™ (2014). *Where can I find Recaldent™?*, disponível em <http://www.recaldent.com> consultado a 18/05/2014.
- Reynolds, E. C. (1998a). Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist*, 18(1), 8-16.
- Reynolds, E. C. (1998b). *Patente Americana N°040406*. EUA: Patent Office.
- Reynolds, E. C. (2008a). Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? *Aust Dent J*, 53(3), 268-273. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00061.x
- Reynolds, E. C. (2008b). *Patente Americana N°007567*. EUA: Patent Office.
- Roberson, T. M., Heymann, H. O., Swift, E. J. (2006). *Sturdevant's art and science of operative dentistry*. 5ª edição. EUA: Mosby, Elsevier.
- Rose, R. K. (2000). Binding characteristics of *Streptococcus mutans* for calcium and casein phosphopeptide. *Caries Res*, 34(5), 427-431. doi: 16618
- Santhosh, B. P., Jethmalani, P., Shashibhushan, K. K., & Subba Reddy, V. V. (2012). Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate containing chewing gum on salivary concentration of calcium and phosphorus: an in-vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 30(2), 146-150. doi: 10.4103/0970-4388.99990
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet*, 369(9555), 51-59. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2
- Shen, P., Manton, D. J., Cochrane, N. J., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., & Reynolds, E. C. (2011). Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent*, 39(7), 518-525. doi: 10.1016/j.jdent.2011.05.002
- Shetty, S., Hegde, M. N., & Bopanna, T. P. (2014). Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *J Conserv Dent*, 17(1), 49-52. doi: 10.4103/0972-0707.124136
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.

- Somasundaram, P., Vimala, N., & Mandke, L. G. (2013). Protective potential of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate containing paste on enamel surfaces. *J Conserv Dent*, 16(2), 152-156. doi: 10.4103/0972-0707.108199
- Vashisht, R., Indira, R., Ramachandran, S., Kumar, A., & Srinivasan, M. R. (2013). Role of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate in remineralization of white spot lesions and inhibition of *Streptococcus mutans*? *J Conserv Dent*, 16(4), 342-346. doi: 10.4103/0972-0707.114370
- Vashisht, R., Kumar, A., Indira, R., Srinivasan, M. R., & Ramachandran, S. (2010). Remineralization of early enamel lesions using casein phosphopeptide amorphous calcium Phosphate: an ex-vivo study. *Contemp Clin Dent*, 1(4), 210-213. doi: 10.4103/0976-237X.76385
- Walker, G. D., Cai, F., Shen, P., Bailey, D. L., Yuan, Y., Cochrane, N. J., . . . Reynolds, E. C. (2009). Consumption of milk with added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate remineralizes enamel subsurface lesions in situ. *Aust Dent J*, 54(3), 245-249. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01127.x
- Wegehaupt, F. J., Taubock, T. T., Stillhard, A., Schmidlin, P. R., & Attin, T. (2012). Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. *Acta Odontol Scand*, 70(3), 177-183. doi: 10.3109/00016357.2011.600713
- Yamaguchi, K., Miyazaki, M., Takamizawa, T., Inage, H., & Moore, B. K. (2006). Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent*, 34(3), 230-236. doi: 10.1016/j.jdent.2005.06.005
- Yengopal, V., & Mickenautsch, S. (2009). Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. *Acta Odontol Scand*, 67(6), 321-332. doi: 10.1080/00016350903160563
- Zheng, L., Zheng, J., Zhang, Y. F., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2013). Effect of CPP-ACP on the remineralization of acid-eroded human tooth enamel: nanomechanical properties and microtribological behaviour study. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 46(40). doi: Artn 404006
- Zong, H., Peng, L. J., Zhang, S. S., Lin, Y., & Feng, F. Q. (2012). Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. *European Food Research and Technology*, 235(5), 811-816. doi: DOI 10.1007/s00217-012-1809-5

