



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**TRATAMENTO DE LESÕES WHITE SPOT PELO SISTEMA
FOSFATO DE CÁLCIO CASEÍNA-FOSFOPEPTÍDEO AMORFO
(CPP-ACP): PREVENÇÃO SECUNDÁRIA**

Trabalho submetido por
Sofia Maria Rosa Mendonça
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

TRATAMENTO DE LESÕES WHITE SPOT PELO SISTEMA FOSFATO DE CÁLCIO CASEÍNA-FOSFOPEPTÍDEO AMORFO (CPP-ACP): PREVENÇÃO SECUNDÁRIA

Trabalho submetido por
Sofia Maria Rosa Mendonça
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso

Setembro de 2014

Aos meus pais

Ao meu irmão

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Carla Ascenso pela sua disponibilidade, orientação e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus pais, por toda a confiança que depositaram em mim e por toda a compreensão e apoio que demonstraram ao longo deste percurso académico.

Ao Mário e à Sara, por toda a amizade e por toda a preocupação.

RESUMO

A cárie dentária consiste num processo patológico de destruição localizada dos tecidos dentários, resultante da ação de microorganismos presentes na cavidade oral. Esta doença é uma das mais prevalentes no mundo, e a sua incidência diminuiu após a introdução de pasta dentífrica fluoretada na higiene oral.

O ião fluoreto presente na composição destas pastas dentífricas, possibilita a formação de fluorapatite e deste modo a remineralização de *white spot lesions*, ou seja, lesões iniciais de cárie. Contudo este mecanismo é limitado pela biodisponibilidade de iões cálcio e fosfato em solução. Com o objectivo de ultrapassar este obstáculo têm-se desenvolvido diversas tecnologias como o sistema CPP-ACP. Estes complexos são agentes remineralizantes eficazes, uma vez que são capazes de fornecer elevadas concentrações de fosfato de cálcio à superfície dentária, promovendo a remineralização das áreas de esmalte com défice mineral. A administração de CPP-ACP é possibilitada pela sua incorporação em diferentes vetores de entrega como pastilhas elásticas, pastas dentífricas, colutórios, refrigerantes e laticínios.

Além do tratamento de lesões de cárie iniciais, tem vindo a ser comprovada em diversos estudos a eficácia da aplicação do CPP-ACP no tratamento e prevenção da erosão dentária e no alívio da sensibilidade dentária.

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

ABSTRACT

Dental caries consists in a pathological process of localized destruction of dental tissues, resultant from the action of oral cavity microorganisms. This disease is one of the most prevalent in the world, and its incidence decreased since the introduction of fluoridated toothpaste on oral hygiene.

The fluoride ion present in this toothpaste composition, enables the formation of fluorapatite and thus the remineralization of white spot lesions (initial caries lesions). However this mechanism is limited by the bioavailability of the ions calcium and phosphate in solution. To overcome this obstacle, many technologies have been developed like the CPP-ACP system. This complexes are effective remineralizing agents, capable of providing high concentrations of calcium phosphate to the dental surface and promoting remineralization of enamel areas with mineral deficit. The administration of CPP-ACP is enabled by its incorporation in various delivery vehicles such as gums, toothpastes, mouthrinses, soft drinks and dairy products.

Apart from the treatment of initial caries lesions, it has also been proven by several studies, the efficiency of CPP-ACP application in the treatment and prevention of dental erosion, and dental sensitivity relief.

Keywords: Caries, Desmineralization, Remineralization, CPP-ACP

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE GERAL.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. DESENVOLVIMENTO	13
2.1. ESMALTE	13
2.2. CÁRIE DENTÁRIA	16
2.3. A SALIVA E A CÁRIE.....	19
2.4. PLACA BACTERIANA.....	24
2.5. <i>WHITE SPOT LESIONS</i>	25
2.5.1. DETEÇÃO DE <i>WHITE SPOT LESIONS</i>	28
2.5.2. TRATAMENTO DE <i>WHITE SPOT LESIONS</i>	29
2.5.3. CPP-ACP.....	32
2.5.4. SÍNTESE DO CPP	34
2.5.5. OBTENÇÃO DE CPP-ACP.....	35
2.5.6. APLICAÇÕES DO CPP-ACP	35
2.5.7. CPP-ACP E O FLÚOR	48
3. CONCLUSÃO	53
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do dente	13
Figura 2 - Representação dos prismas de esmalte	14
Figura 3 - Organização hierárquica do esmalte	15
Figura 4 - Relação entre os factores patológicos e protectores no desenvolvimento da cárie	18
Figura 5 - Desmineralização do esmalte, na presença de fluoretos, ao nível da placa	21
Figura 6 - Remineralização do esmalte, na presença de fluoretos, ao nível da placa.....	21
Figura 7 - Microdureza do esmalte, profundidade da lesão e fluoreto total no esmalte após remineralização	22
Figura 8 - Microdureza do esmalte, profundidade da lesão e fluoreto total no esmalte após desmineralização.....	22
Figura 9 - Conjunto de factores que contribuem para o aparecimento da cárie	23
Figura 10 - Representação da WSL	26
Figura 11 - Biofilme resultante do tratamento ortodôntico	27
Figura 12 - Microscopia electrónica de varrimento do esmalte após desmineralização e após imersão no sobrenadante do iogurte	30
Figura 13 - Motivo ácido presente em 2 sequências peptídicas.....	31
Figura 14 - Exemplos de produtos comerciais que contêm CPP-ACP.....	36
Figura 15 - Imagens de microrradiografia obtidas após cada um dos tratamentos.....	37
Figura 16 - Imagens de microscopia electrónica de varrimento da superfície do esmalte do após demineralização e após remineralização pelo CPP-ACP	40
Figura 17 - Imagens de microscopia por luz polarizada, antes e após os tratamentos.	41
Figura 18 - Comparação do desgaste dentário entre os grupos envolvidos no estudo	44
Figura 19 - Microscopia electrónica de varrimento do esmalte remineralizado.....	44
Figura 20 - Microscopia de varrimento confocal a laser do esmalte original, desmineralizado e rimineralizado	45

Figura 21 - Evolução da sensibilidade relativa à aplicação de ar da seringa.....	47
Figura 22 - Evolução da sensibilidade relativa ao estímulo táctil	47
Figura 23 - Imagens de microrradiografia após remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte	51
Figura 24 - Comparação dos resultados do DIAGNOdent [®] entre os grupos testados.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem do número de unidades formadoras de colónias de <i>Streptococcus mutans</i> , antes e depois do tratamento com Tooth Mousse Plus TM e com Cervitec Gel TM	34
Tabela 2 - Nomes comerciais de alguns produtos que contêm CPP-ACP	36
Tabela 3 - Concentrações de cálcio e fosfato salivares antes e depois de mastigar pastilhas Trident TM contendo CPP-ACP, durante 20 minutos.	38
Tabela 4 - Comparação da % de remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte após a ingestão de leite com CPP-ACP e sem CPP-ACP	39
Tabela 5 - Profundidade das lesões após os 5 tratamentos	41
Tabela 6 - Profundidade da erosão e pH, após a imersão das amostras de esmalte em refrigerantes com e sem a adição de CPP-ACP	43
Tabela 7 - Concentrações salivares dos íões cálcio, fosfato e fluoreto.após o tratamento com os diferentes produtos e saturação destes íões em respeito à HA	49
Tabela 8 - Potencial de remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte <i>in situ</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

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

FA – fluorapatite

CPP – fosfopéptido de caseína [*Casein Phosphopeptide*]

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*]

WSL – lesão *white spot* [*White Spot Lesion*]

F – íon fluoreto

JAD – junção amelo-cimentária

Ser (P) – serina fosforilada

Glu – glutamato

IgA –Imunoglobulina A

CHX – cloro-hexidina

ppm – partes por milhão

kg – quilograma

g – grama

mg – miligrama

mM – milimolar

μM – micromolar

ml – mililitro

nm – nanómetro

μm – micrómetro

mm^3 – milímetro cúbico

N – newton

GPa – gigapascal

HCl – ácido clorídrico

NaF – fluoreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

CaCl_2 – cloreto de cálcio

Na_2HPO_4 – hidrogenofosfato dissódico

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença de elevada prevalência em todo o mundo, cerca de 90%, sendo considerada um problema de saúde pública pela OMS. A progressão das lesões de cárie requer um desequilíbrio contínuo e prolongado entre os factores protectores e patológicos da doença, resultando na perda de minerais para o meio envolvente e consequente dissolução dos cristais de hidroxiapatite, HA (Cochrane, Cai, Huq, Burrow & Reynolds, 2010). Afeta qualquer indivíduo independentemente da sua idade, raça, sexo ou condição social. Medidas preventivas adequadas em conjunto com uma deteção precoce das lesões em fase inicial, assumem uma importância crescente no controlo e tratamento da doença (Melo, Azevedo & Henriques, 2008).

Como já foi referido, na cavidade oral ocorre naturalmente, de forma cíclica e equilibrada, desmineralização e remineralização das superfícies dentárias. Perante o desequilíbrio deste sistema no sentido da desmineralização, a regeneração fisiológica das áreas afetadas é limitada. A persistência deste desequilíbrio contribui para o aparecimento de *white spot lesions* (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

Um dos principais objetivos da Dentisteria moderna tem sido o tratamento das lesões iniciais de cárie através de uma abordagem não invasiva, na tentativa de tratar a doença preservando a integridade dos tecidos dentários. Esta abordagem envolve a utilização de agentes remineralizantes, nomeadamente o CPP-ACP, que fornece os componentes necessários para que ocorra a regeneração destas lesões (Elkassas & Arafa, 2013). Este tratamento está indicado para pacientes sujeitos a tratamento ortodôntico, possibilitando o tratamento de lesões iniciais de cárie. Do ponto de vista preventivo poderá ser aplicado a: (1) pacientes com perturbações do fluxo salivar (pacientes sujeitos a radioterapia, pacientes com xerostomia e idosos), uma vez que o aporte de iões às superfícies dentárias está comprometido, aumentando o risco de cárie; e (2) pacientes com anorexia, bulimia ou refluxo gastroesofágico, uma vez que a presença frequente de ácido gástrico na cavidade oral gera um desequilíbrio prolongado dos valores de pH, promovendo a desmineralização do esmalte e consequente aparecimento de lesões de cárie (Llena, Forner & Baca, 2009).

Com o presente trabalho, pretende-se abordar o sistema CPP-ACP como promotor da remineralização de lesões de cárie iniciais, desenvolvendo o conceito de cárie dentária, desmineralização e remineralização, assim como, o mecanismo de ação deste agente, sua eficácia e aplicabilidade na cavidade oral.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. ESMALTE

Os dentes são estruturas presentes na cavidade oral que desempenham um papel essencial na mastigação e no início da digestão dos alimentos. Cada peça dentária é composta por uma coroa, raiz e colo (Fig. 1). A coroa clínica é a porção do dente que está exposta à cavidade oral, protegendo-o contra as agressões externas enquanto a coroa anatómica corresponde apenas à fração da coroa clínica que é revestida por esmalte, correspondendo à camada mais externa do dente (Seeley, Stephens & Tate, 2003). A espessura do esmalte varia entre as zonas mais ativas do dente, ao nível das cúspides, e as zonas menos expostas ao desgaste, na margem cervical (West & Joiner, 2014). No interior do dente, existe uma cavidade preenchida por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos, designada por polpa dentária. A polpa é responsável pela nutrição e inervação do dente. Externamente à cavidade pulpar encontra-se a dentina, um tecido celular e calcificado. A revestir a porção radicular da dentina está presente o cimento que contribui para a fixação e estabilização do dente no osso alveolar (Seeley et al., 2003).

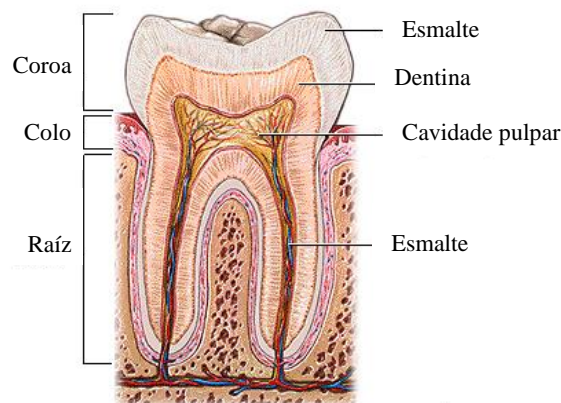


Figura 1 - Estrutura do dente. (MedlinePlus, 2013)

O esmalte é um tecido dentário acelular composto por matéria inorgânica (94-98% do seu peso), matéria orgânica (3% do seu peso) e água (3-4% do seu peso) (West & Joiner, 2014; Zheng, Zheng, Zhang, Qian & Zhou, 2013). A matéria inorgânica é constituída principalmente por cálcio (34-39% do seu peso) e fósforo (16-18% do seu

peso). Outros minerais como sódio, magnésio, potássio e zinco também estão presentes em proporções residuais. A fase mineral do esmalte apresenta-se na forma de cristais de HA, ocupando aproximadamente 80-90% do seu volume. As proteínas e os lípidos constituem a porção orgânica do esmalte (Zheng et al., 2013; García-Godoy & Hicks, 2008).

Estruturalmente, o esmalte é composto por longos prismas cilíndricos que se estendem desde a junção amelo-dentinária (JAD) até à superfície externa do esmalte. Cada prisma apresenta um diâmetro de 4-5 μm e é composto por aproximadamente 1000 cristais de HA organizados entre si, formando feixes a que correspondem os prismas. Na secção transversal dos prismas, distinguem-se 2 estruturas que os compõem: a cabeça e a cauda. A cabeça orienta-se no sentido do esmalte superficial, apresentando 5 μm de diâmetro e a cauda apresenta um comprimento de 5 μm e orienta-se em direção à dentina (West & Joiner, 2014). Dos compostos orgânicos presentes no esmalte, cerca de metade corresponde a proteínas pertencentes a uma matriz que envolve individualmente cada prisma, servindo de suporte para os cristais de HA (Featherstone & Lussi, 2006). Os cristais de HA apresentam cerca de 50nm de largura e 25nm de espessura, orientando-se de forma a que o seu longo eixo e o longo eixo dos prismas se encontrem paralelos. Contudo, na periferia de cada prisma, os cristais desviam-se ligeiramente, originando mais espaço inter-cristalino. Este espaço é preenchido por água e compostos orgânicos, constituindo um meio de difusão para pequenas moléculas como o ácido láctico, peróxido de hidrogénio e iões (Robinson et al., 2000).

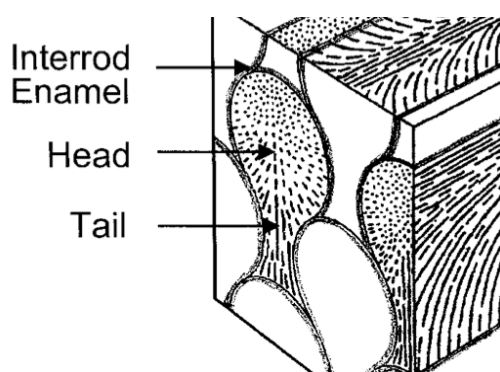


Figura 2 - Representação dos prismas de esmalte.
(Habelitz, Marshall, Marshall Jr & Balooch, 2001)

O conteúdo mineral e, portanto, a densidade dos cristais e prismas do esmalte não é uniforme ao longo do dente, diminuindo da superfície em direção à dentina, o que se traduz em variações do comportamento mecânico ao longo da estrutura dentária. Estas diferenças são verificadas num dente molar definitivo, em que o esmalte mais superficial apresenta um módulo de elasticidade superior a 100 GPa e uma dureza superior a 5 GPa, enquanto que no esmalte próximo da JAD verifica-se um módulo de elasticidade inferior a 60 GPa e uma dureza inferior a 3 GPa. Da mesma forma também a solubilidade do esmalte em meio ácido varia entre estas duas localizações, demonstrando ser superior junto à JAD (West & Joiner, 2014).

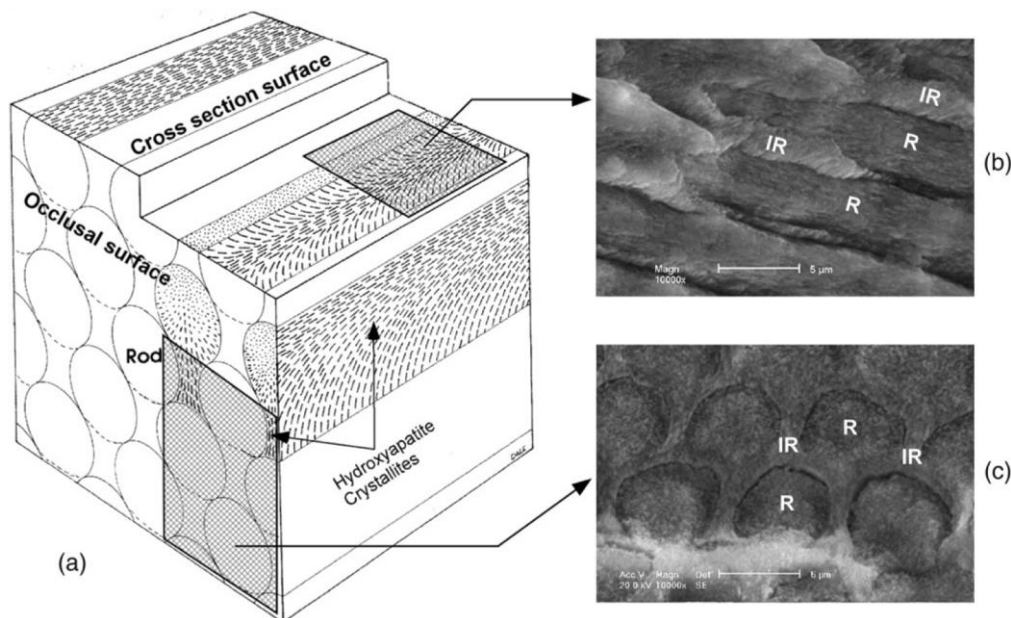
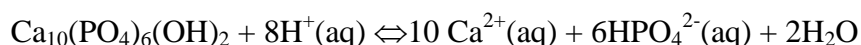


Figura 3 - Organização hierárquica do esmalte. Os cristais de HA agrupam-se em feixes, formando prismas. Os prismas, por sua vez, organizam-se para constituir o esmalte (a). Imagens de microscopia eletrônica de varredura do esmalte, corte longitudinal (b) e corte transversal (c). (He & Swain, 2008)

A HA tem como fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e apresenta possíveis variações na sua composição como resultado da perda ou substituição de iões. Deste modo, o cálcio pode ser substituído por sódio, magnésio, zinco ou potássio; o fluoreto pode substituir o hidroxilo e o carbonato pode ocupar o lugar do fosfato. Estas alterações influenciam o comportamento da HA, principalmente a sua solubilidade na presença de valores de pH

reduzidos. Em particular regiões dos cristais com déficit de cálcio ou ricas em carbonato são particularmente suscetíveis à dissolução ácida. Pelo contrário, a substituição de hidroxilo por fluoreto aumenta a resistência dos cristais à desmineralização (West & Joiner, 2014; Robinson et al., 2000; Featherstone & Lussi, 2006).

A taxa de dissolução da HA aumenta em função da diminuição do pH, sendo também influenciada pelas concentrações de íons cálcio, fosfato e hidroxilo presentes em solução, como pode ser demonstrado pela seguinte equação:



O grau de saturação em relação à HA corresponde à razão entre o produto da atividade dos íons para a HA e a constante de solubilidade da HA. Quando a saturação é inferior a 1, a solução encontra-se insaturada em relação à HA e portanto é promovida a dissolução dos cristais. Valores superiores a 1 são indicativos da supersaturação do meio em relação à HA, conduzindo à precipitação de fosfato e cálcio.

$$\text{Grau de saturação HA} = [(\text{Ca}^{2+})^5(\text{OH}^-)(\text{PO}_4^{3-})^3 / \text{constante de solubilidade HA}]^{1/9}$$

Deste modo, à medida que o pH diminui, as concentrações de fosfato e hidroxilo diminuem também, contribuindo para a redução do grau de saturação. O pH crítico do esmalte corresponde ao valor a partir do qual a saturação da saliva em relação à HA perde a sua capacidade de proteção e conduz à perda mineral do esmalte. Quando áreas suscetíveis do esmalte são sujeitas à repetida influência negativa de ácidos, resulta num aumento da sua porosidade abaixo da superfície. Caso este efeito não seja contrariado pela promoção da remineralização, através da higiene oral, aplicação de agentes remineralizantes e do consumo moderado de hidratos de carbono fermentáveis; pode evoluir estabelecendo-se uma porosidade crescente dos tecidos e consequente cavitação (West & Joiner, 2014).

2.2. CÁRIE DENTÁRIA

Segundo Fejerskov e Kidd (2008), a cárie é definida como uma doença infecciosa de etiologia microbiana e carácter multifactorial. Resulta da dissolução química dos tecidos

dentários, ou seja, da sua desmineralização. Esta destruição localizada é uma consequência de eventos metabólicos que têm lugar na placa bacteriana que recobre o dente, sendo a sua presença um requisito para que se desenvolvam estas lesões. Pode surgir ao nível do esmalte, dentina ou cimento, na dentição decídua como na definitiva e em superfícies lisas ou irregulares da dentição (Selwitz, Ismail & Pitts, 2007). Frequentemente afeta locais da dentição mais protegidos, onde a placa bacteriana se pode acumular sem perturbações mecânicas, maturando ao longo do tempo (Fejerskov & Kidd, 2008).

A manifestação clínica desta doença resulta de um desequilíbrio no processo de desmineralização-rem mineralização, no sentido da desmineralização que persiste ao durante longos períodos de tempo, na presença de placa bacteriana (Melo et al., 2008). Este desequilíbrio tem origem na produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico e ácido fórmico por bactérias cariogénicas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp) como produtos do seu metabolismo de hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta (Niu et al. 2013). Estes ácidos provocam uma diminuição do pH local da placa difundindo-se pelos poros da superfície do esmalte saudável. Ao atingirem pontos suscetíveis dos cristais de HA provocam a dissolução dos minerais que os constituem. A este processo designa-se por desmineralização (Melo et al., 2008). Esta destruição é reversível apenas numa fase inicial, enquanto não estabeleceu a cavitação da lesão. Ao mecanismo natural de reparação destas lesões denomina-se remineralização. Neste processo, os iões cálcio e os iões fosfato provenientes da saliva são fornecidos ao esmalte precipitando na forma de fosfato de cálcio, na presença de iões fluoreto, e depositando-se nas regiões afetadas. Os cristais são reparados pela incorporação de FA na sua composição, através da substituição de iões hidroxilo por iões fluoreto, resultando numa menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido em relação à estrutura original de HA (Chen & Wang, 2010). O processo de desmineralização-rem mineralização dá-se de forma cíclica na cavidade oral desde que exista um equilíbrio entre os fatores protetores e os fatores patológicos das lesões de cárie (Featherstone, 2008).

Quando o aumento de volume da placa bacteriana e a frequência de consumo de açúcares não são controlados durante longos períodos de tempo, a perda mineral sobrepõe-se ao ganho e as superfícies do esmalte afetadas não são reconstruída. Surge assim o

primeiro sinal da doença: as *white spot lesions* (WSL). Caso nenhuma medida seja aplicada para contrariar este processo, a perda de minerais pode resultar no colapso da estrutura dentária e consequente formação de uma cavidade (Cury & Tenuta, 2009).

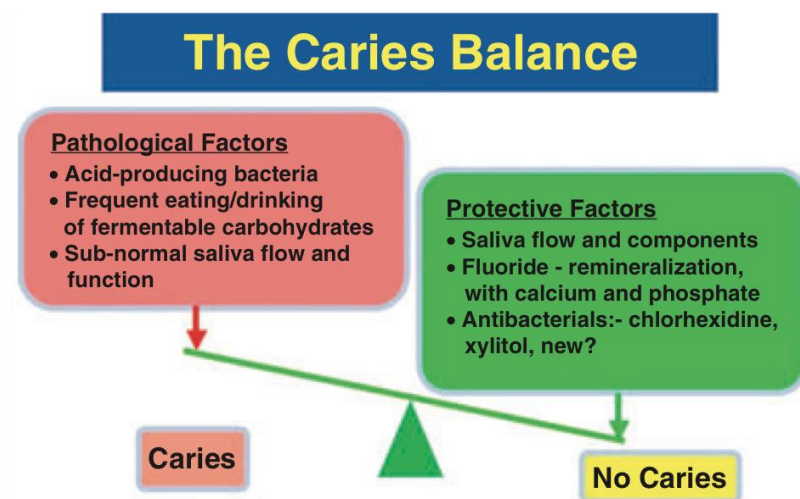


Figura 4 - Importância do equilíbrio entre os factores patológicos e protectores no desenvolvimento da cárie. (Featherstone, 2008)

O conceito multifatorial da lesão de cárie deve ser interpretado como o resultado da interação entre a dieta, as bactérias cariogénicas e a susceptibilidade. A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de hidratos de carbono fermentáveis como a sacarose, cuja metabolização resulta na produção de ácidos que desmineralizam o esmalte. Também é determinada pela frequência de consumo destes alimentos que provoca um desequilíbrio crescente no ciclo de desmineralização-remineralização, uma vez que dificulta a reposição dos valores do pH (Lima, 2007). As bactérias cariogénicas são as responsáveis pela produção destes ácidos, sendo o *Streptococcus mutans* o agente patogénico primário no desenvolvimento da cárie. A sua transmissão ocorre no início da vida de mãe para filho, mas a sua colonização só é iniciada após a erupção da dentição decídua (García-Godoy & Hicks, 2008). Estas bactérias também estão implicadas na síntese de componentes da matriz extracelular a partir da sacarose da dieta, promovendo a colonização das superfícies dentárias (Arul & Palanivelu, 2014). A carga bacteriana na cavidade oral pode ser reduzida através de uma higiene oral adequada. Em relação à susceptibilidade deve-se ter em

consideração a suscetibilidade do indivíduo e a suscetibilidade do dente. A suscetibilidade do indivíduo é determinada por fatores extrínsecos e fatores intrínsecos. Os fatores extrínsecos estão relacionados com o meio sociocultural onde o indivíduo se insere e a interferência dos mesmos nos seus comportamentos. Os fatores intrínsecos são difíceis de controlar e incluem a composição, o pH e capacidade tampão da saliva, o fluxo salivar, fatores imunológicos e aspetos hereditários. A suscetibilidade do dente é ditada pelo grau de mineralização do esmalte que se relaciona diretamente com a sua resistência ao ataque ácido. Depende de fatores intrínsecos que atuam durante o desenvolvimento do dente e fatores extrínsecos como fatores ambientais e locais (Lima, 2007).

2.3. A SALIVA E A CÁRIE

A saliva é um fluido biológico secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade oral. Na sua composição apresenta cerca 99% de água, compostos orgânicos e inorgânicos. Dos compostos orgânicos destacam-se as proteínas (principalmente enzimas, imunoglobulinas e glicoproteínas), glucose e ureia. Os compostos inorgânicos são representados pelos iões sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, fluoreto, monofosfato, bifosfato, sulfato entre outros. Apresenta inúmeras funções desde proteção e lubrificação, neutralização de ácidos (capacidade tampão), digestivas, proteção antibacteriana e manutenção da integridade do esmalte.

A proteção e lubrificação dos tecidos orais é assumida pelas mucinas, que atuam também na modulação seletiva da adesão dos microorganismos aos tecidos orais, controlando assim a sua colonização. A consistência viscosa da saliva permite remover resíduos da cavidade oral como bactérias não aderidas, restos celulares e alimentares, sendo otimizada aquando da estimulação do fluxo salivar. A sua capacidade tampão é determinada principalmente pelo ião bicarbonato, através do qual os ácidos libertados pelas bactérias cariogénicas são neutralizados, prevenindo a desmineralização. A neutralização destes ácidos impede que se reúnam as condições ótimas para a colonização de outros microorganismos patogénicos (Dawes, 2008). A nível digestivo, a α -amilase presente na saliva desempenha o papel de iniciação da digestão na cavidade oral, através da decomposição do amido em maltose, maltotriose e dextrinas. As propriedades

antibacterianas são conferidas por proteínas. O IgA é o principal componente imunológico que neutraliza vírus, bactérias e enzimas tóxicas, atua como anticorpos para antígenos bacterianos e agrega-se a bactérias inibindo a sua adesão aos tecidos (Almeida, Grégio, Machado, Lima & Azevedo, 2008).

A saliva é um dos principais mecanismos que interfere no ganho e perda mineral na interface esmalte-placa, uma vez que mantém em supersaturação os níveis de cálcio e fosfato em relação à HA, garantindo as trocas iônicas. O pH, a capacidade tampão e o fluxo salivar influenciam a perda mineral, a progressão da desmineralização e a capacidade de reparação dos tecidos dentários (Chang, Walsh & Freer, 1997). Estes parâmetros conferem à saliva a capacidade de reduzir a incidência de cáries, mantendo a integridade do esmalte (Stokey, 2008). Na sua composição encontram-se diversas substâncias que intervêm no processo de remineralização como: estaterinas, proteínas ricas em prolina e compostos inorgânicos nomeadamente íons cálcio, fosfato e fluoreto. O cálcio salivar pode encontrar-se na forma iônica ou não iônica. Este íon é fundamental para manter o equilíbrio dos níveis de fosfato de cálcio entre o esmalte e o fluido circundante, sendo que a sua concentração aumenta com a diminuição do pH. O íon fosfato tem como principal função manter a estrutura dentária sendo que a sua concentração diminui com a redução do pH e com o aumento do fluxo salivar. O íon fluoreto é essencial para manter a estabilidade dos minerais e garantir a formação de FA, sendo proveniente de fontes exógenas como a água de consumo e pastas dentífricas fluoretadas (Llena et al., 2009).

Dada a supersaturação da saliva em relação à HA, seria de esperar a precipitação espontânea do fosfato de cálcio nos ductos das glândulas salivares e o crescimento contínuo dos cristais na superfície do esmalte. Porém, esta ação é inibida pela presença das estaterinas e das proteínas ricas em prolina, que estabilizam as formas solúveis dos íons fosfato e cálcio da saliva, garantindo a sua biodisponibilidade para a remineralização do esmalte (Fejerskov & Kidd, 2008).

Segundo Fejerskov e Kidd (2008), o pH fisiológico da saliva varia entre 6,75-7,25. Cerca de 3 a 5 minutos após a ingestão de hidratos de carbono, o pH da placa desce. Ao atingir valores inferiores a 5,5 (pH crítico para o esmalte) o fluido da placa torna-se insaturado em relação à HA, resultando na dissolução de minerais. Se o pH se encontrar entre 4,5-5,5, na presença de íons fluoreto, o fluido da placa encontrar-se-á supersaturado em relação à FA, verificando-se a precipitação destes minerais e consequente formação de

FA na superfície dentária desmineralizada. À medida que os substratos se esgotam, os ácidos são eliminados pela saliva na forma de sais, resultando num aumento do pH. Para valores iguais ou superiores a 5,5 o fluído da placa encontra-se supersaturado em relação à HA e à FA. Dá-se então a precipitação de cálcio e fosfato nas regiões afetadas, apresentando uma recuperação mais eficiente na presença do ião fluoreto. Estes iões retardam a progressão da cárie, porém não atuam nos fatores etiológicos da doença, como tal não são capazes de prevenir o seu aparecimento (Cury & Tenuta, 2009).

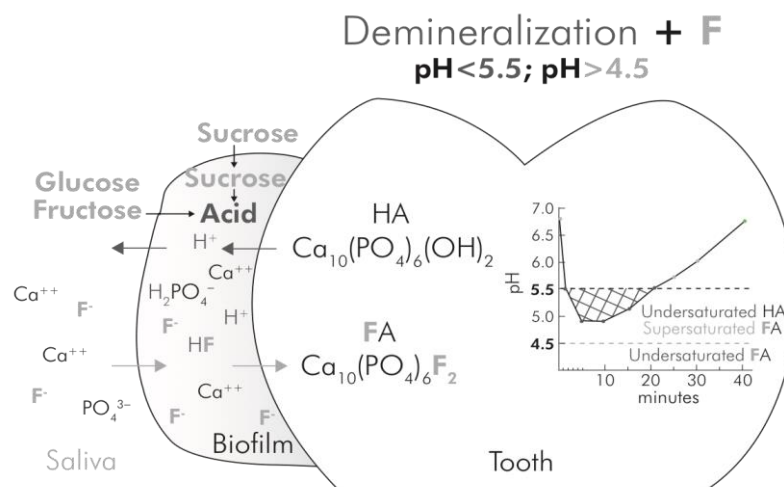


Figura 5 - Desmineralização do esmalte, na presença de fluoretos, ao nível da placa. (Cury & Tenuta, 2009)

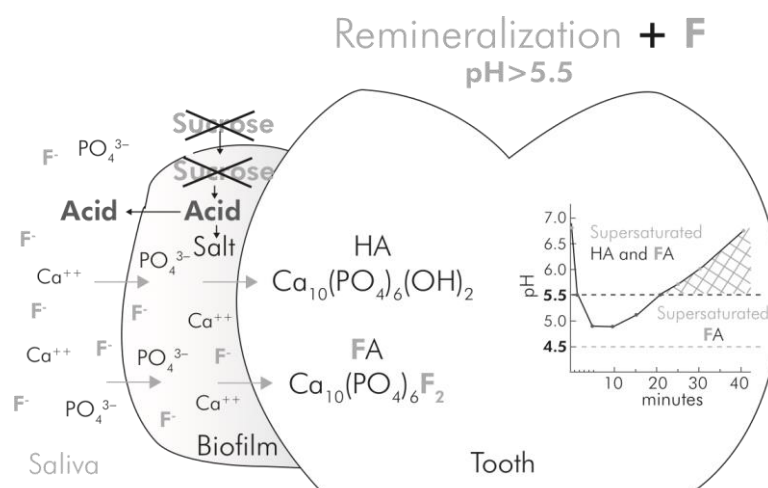


Figura 6 - Remineralização do esmalte, na presença de fluoretos, ao nível da placa. (Cury & Tenuta, 2009)

Cury & Tenuta, (2009) comprovaram *in vitro* a influência do ião fluoreto na redução da desmineralização do esmalte e o seu contributo para a sua remineralização na forma de FA, através de modelos de pH *cycling*. Deste forma, duas situações clínicas foram simuladas, sendo que numa a desmineralização prevaleceu sob a remineralização e na outra o inverso. A figura 8 mostra os resultados obtidos quando a desmineralização prevaleceu, sendo registada a diminuição da perda da dureza da superfície do esmalte e da profundidade da lesão, com aumento de fluoreto no esmalte. Em contrapartida, na figura 7 verifica-se o aumento da dureza e a redução da profundidade da lesão quando a remineralização prevaleceu.

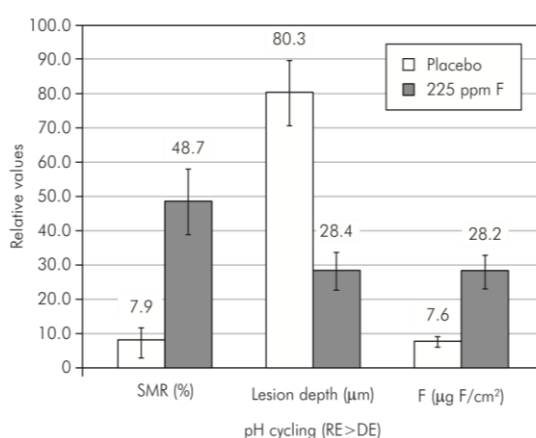


Figura 8 - Ganho de microdureza da superfície do esmalte (SMR, %), profundidade da lesão (µm) e fluoreto total presente no esmalte (µg F/cm²) após a remineralização (RE>DE) pelo método pH *cycling*. (Cury & Tenuta, 2009)

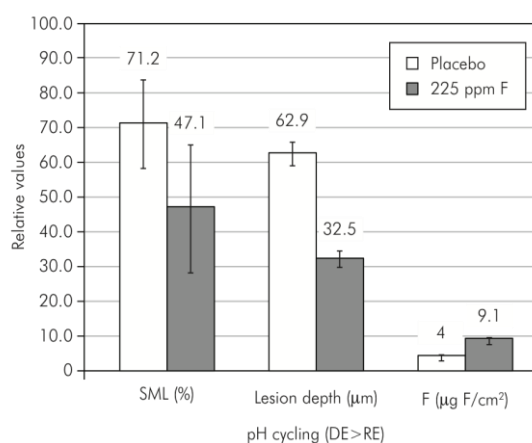


Figura 8 - Perda de microdureza da superfície do esmalte (SML, %), profundidade da lesão (µm) e fluoreto total presente no esmalte (µg F/cm²) após a desmineralização (DE>RE) pelo método pH *cycling*, na presença de cáries activas. (Cury & Tenuta, 2009)

Além das propriedades acima referidas, o fluoreto apresenta ainda ação antibacteriana. Na presença de pH ácido, o fluoreto livre combina-se com H⁺, formando fluoreto de hidrogénio (HF). Este composto migra pela placa bacteriana, atravessando a membrana das bactérias. Como o citoplasma das bactérias é alcalino, ocorre a dissociação do fluoreto de hidrogénio. Os iões fluoreto previnem o metabolismo bacteriano dos açúcares pela inibição de várias enzimas essenciais para este mecanismo, como a enolase e a ATPase. Os iões H⁺ acidificam o citoplasma, inibindo o funcionamento das bactérias.

Desta forma, as bactérias cariogénicas não libertam ácido e não se dá a desmineralização do esmalte (Hemagaran & Neelakantan, 2014).

A desmineralização ocorre até que os valores de pH da placa normalizem, aproximadamente cerca de 20 minutos após a ingestão dos substratos. Este período de tempo é controlado pelo fluxo e composição salivar. A diminuição da secreção salivar restringe o contacto da saliva com placa bacteriana, provocando uma descida acentuada do pH após exposição a hidratos de carbono, atrasando a reposição destes valores e a eliminação do substrato (Stookey, 2008). Comparando os dentes antero-inferiores com os postero-superiores, verifica-se que nos primeiros a diminuição do pH após exposição a hidratos de carbono é menos acentuada. Isto acontece porque o contacto dos dentes antero-inferiores com saliva é superior em relação aos dentes postero-superiores (Chang et al., 1997).

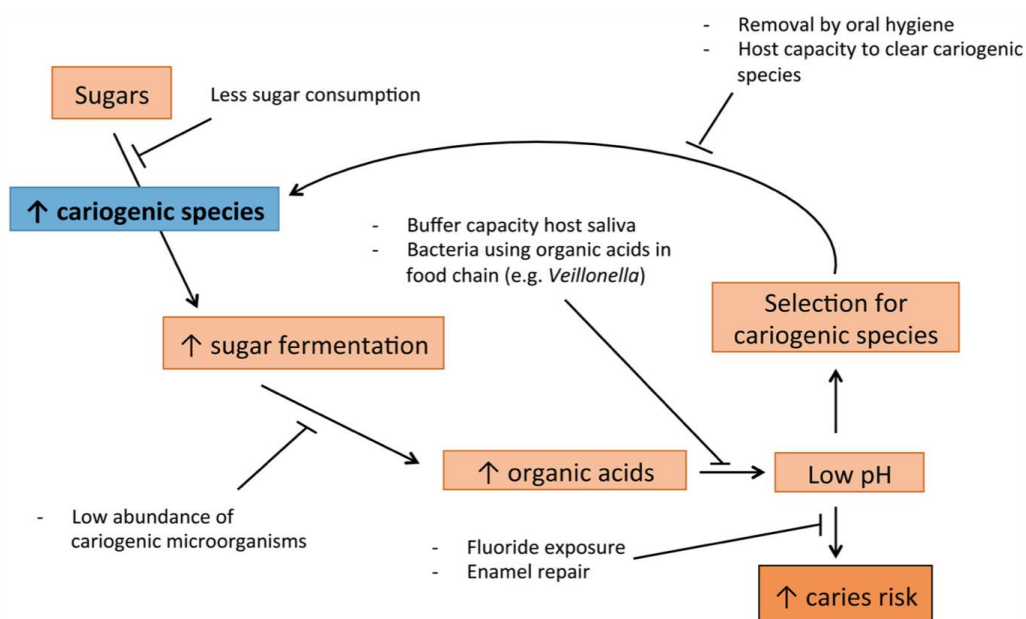


Figura 9 - Conjunto de fatores que interagem entre si e que levam ao aparecimento da cárie – doença multifactoral. (Rosier, Jager, Zaura & Krom, 2014)

Segundo Chang et al. (1997), o pH e a capacidade tampão acompanham a secreção salivar, sendo que a saliva não estimulada apresenta um pH inferior a 6, aumentando para valores de 8 quando o estimulada. No meio intraoral, valores de pH ácido favorecem a colonização por bactérias acidogénicas, principalmente o *Streptococcus mutans*,

promovendo a cariogenicidade. Valores de pH mais elevados traduzem-se numa maior capacidade tampão e condições menos favoráveis para a colonização destas bactérias (Chang et al., 1997). Segundo Dawes (2008) a saliva estimulada apresenta concentrações de bicarbonato mais elevadas que a saliva não estimulada e portanto a neutralização dos ácidos é mais eficaz.

2.4. PLACA BACTERIANA

A placa bacteriana é um biofilme responsável por várias doenças da cavidade oral, tais como a cárie, a gengivite e a periodontite. A cavidade oral é um ambiente húmido, rico do ponto de vista nutricional, com temperaturas que variam entre 35°-36°C e um pH de repouso entre 6,75-7,25. Estão assim reunidas as condições favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies bacterianas capazes de se organizar em biofilme (Rosier et al., 2014). O biofilme oral consiste em diversas comunidades de microorganismos embebidos numa matriz de polímeros extracelulares. Esta matriz não só atua como um elemento de união dos diversos componentes do biofilme mantendo a sua integridade, como também apresenta seletividade ao restringir a entrada de agentes antimicrobianos, enzimas extracelulares e agentes nocivos. Assim, a placa bacteriana garante a proteção dos microorganismos presentes na cavidade oral e promove o seu desenvolvimento (García-Godoy & Hicks, 2008). A placa bacteriana é responsável pela desmineralização do esmalte e, caso persista durante longos períodos de tempo, leva ao aparecimento de lesões iniciais de cárie, WSP, indicativas de descalcificação da subsuperfície do esmalte. A sua existência abaixo da margem gengival resulta na inflamação da gengiva e, caso não seja controlada, pode evoluir para doença periodontal, culminando na perda de peças dentárias (Ren, Jongsma, Mei, Mei & Busscher, 2014).

Logo após a escovagem ou erupção dentária, forma-se a película adquirida devido à exposição das superfícies dentárias à saliva. Esta película consiste numa camada acelular constituída por moléculas provenientes da saliva (maioritariamente proteínas como estaterinas, proteínas ricas em prolina e mucinas) e fluído gengival, que adere fortemente à HA. Adicionalmente, desempenha funções importantes de lubrificação e hidratação das superfícies. Por outro lado, dificulta o acesso dos iões mineralizadores à superfície do esmalte e atua como base para o desenvolvimento da placa bacteriana, uma vez que as

estaterinas e as proteínas ricas em prolina presentes contêm recetores aos quais as bactérias se ligam, colonizando-a. Estas bactérias são acidogénicas, pois produzem ácidos, e acidúricas, porque sobrevivem em ambientes ácidos. Também estão presentes no biofilme bactérias capazes de atenuar os efeitos cariogénicos como por exemplo a *Veillonella* spp. que é capaz de metabolizar o ácido láctico (García-Godoy & Hicks, 2008). Inicialmente, a placa é invadida por colonizadores primários como o *Streptococcus sanguinis*, o *Streptococcus oralis*, o *Streptococcus gordonii* ou o *Streptococcus mitis* bionar 1, os quais apresentam adesinas com afinidade para os componentes da película adquirida. Estas bactérias multiplicam-se originando microcolónias e simultaneamente geram modificações no habitat, tornando-o mais atrativo para colonizadores secundários como o *Actinomyces* spp., a *Veillonella* spp. a *Fusobacterium* spp. e a *Haemophilus* spp., ou então desfavorável a si mesmos. A microflora da placa sofre alterações transitando de uma placa dominada por *Streptococcus* para uma placa predominantemente colonizada por *Actinomyces* (Marsh & Martin, 2009). Segundo Fejerskov & Kidd (2008), estas alterações consistem no défice de substrato, na acumulação de produtos do metabolismo bacteriano e na diminuição do oxigénio disponível. Assim, à medida que o biofilme se desenvolve ocorre uma transição de espécies predominantemente aeróbias e anaeróbias facultativas para espécies anaeróbias. Este fenómeno denomina-se por sucessão microbiana (Fejerskov & Kidd, 2008). Simultaneamente à maturação do biofilme ocorre a libertação das bactérias, tornando-se aptas a colonizar dentes adjacentes (García-Godoy & Hicks, 2008).

A presença de placa bacteriana é um factor etiológico específico mas não determinante para o aparecimento de lesões de cárie, uma vez que é necessária a interação entre os hidratos de carbono da dieta, os depósitos microbianos presentes no biofilme e a suscetibilidade para que tal ocorra. Deste modo, a placa e as estruturas dentárias podem coexistir desde que seja mantido um equilíbrio entre ambas (Lima, 2007).

2.5. WHITE SPOT LESIONS

As WSL, ou lesões brancas do esmalte, são as primeiras manifestações clínicas de cárie no esmalte capazes de serem detetadas a olho nu (Melo et al., 2008). Segundo Chang et al. (1997) estas lesões são caracterizadas por um aumento dos poros inter-cristalinos da subsuperfície do esmalte e redução do volume dos cristais de HA. Sob a superfície intacta

hipermineralizada, o corpo da WSL sofre perdas minerais traduzindo-se em alterações das propriedades ópticas do esmalte, nomeadamente na perda de translucidez. Estas modificações conferem-lhe um aspecto esbranquiçado e opaco (Pliska, Warner, Tantbirojn & Larson 2012). Numa primeira abordagem, estas descolorações esbranquiçadas podem tanto ser identificadas como lesões de fluorose dentária bem como WSL. Com o intuito de as diferenciar, definiu-se que as lesões de fluorose são caracterizadas por uma cor branca-amarelada, de forma pouco definida, misturando-se facilmente com o esmalte íntegro e distribuindo-se de forma simétrica na cavidade oral. Já as WSL apresentam-se bem definidas, diferenciadas do esmalte envolvente e surgindo de forma aleatória na cavidade oral (Sangamesh & Kallury, 2011).

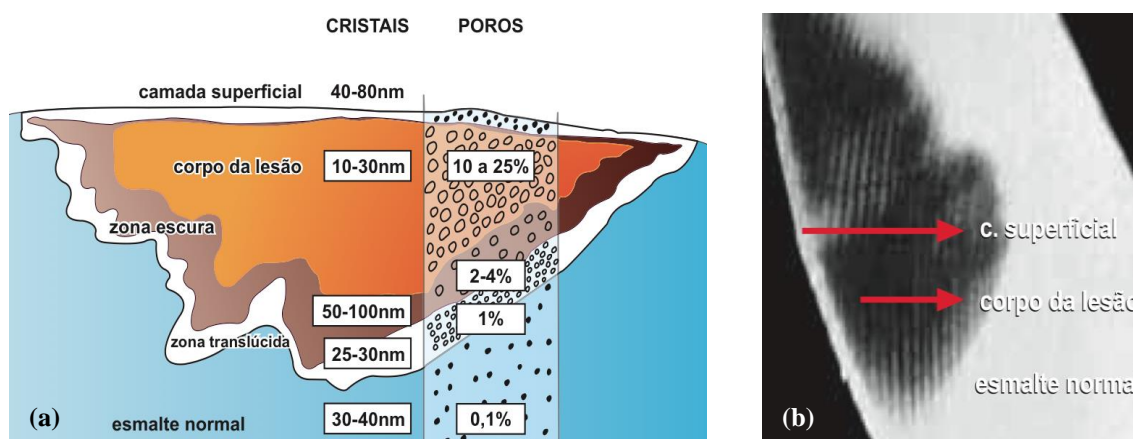


Figura 10 - Representação das WSL de acordo com a redução do volume dos cristais e aumento dos poros entre si (a). Radiomicroscopia da WSL, observando-se a diferença entre esmalte mineralizado e o esmalte cariado (b). (Consolaro, 2006)

As WSL surgem frequentemente em pacientes sujeitos a tratamento ortodôntico, constituindo o seu efeito iatrogénico mais comum. Estima-se que a sua prevalência durante o tratamento possa atingir os 97%, afetando qualquer dente com maior prevalência para os incisivos laterais superiores, caninos superiores e pré-molares inferiores. Os valores mais elevados foram registados para a face vestibular dos incisivos laterais superiores (Sangamesh & Kallury, 2011). No início do tratamento procede-se à adesão de diversos elementos às superfícies dentárias, como os *brackets*, tubos e bandas, através de resinas compostas. Estes componentes proporcionam locais adicionais de retenção de placa bacteriana, dificultando uma higiene oral eficaz e limitando a ação de limpeza natural

proporcionada pela saliva e pela musculatura oral (Sudjalim, Woods & Manton, 2006). O aparelho não só proporciona um aumento do volume de placa estagnada, como favorece a prevalência de bactérias cariogênicas, em particular do *Streptococcus mutans* e do *Lactobacillus*. A resina utilizada para a fixação dos elementos ortodônticos é propensa à adesão bacteriana ao nível da junção *bracket-resina-esmalte*, especialmente após a contração de polimerização. Esta contração pode gerar falhas na resina, possibilitando a entrada de bactérias. Uma vez que a superfície da resina é rugosa, a força de adesão das bactérias é superior quando comparada com a dos *brackets* e com a do esmalte (Ren et al., 2014). Outro fator que contribui para o aparecimento das WSP, durante o tratamento ortodôntico, é o microvazamento que ocorre em redor dos *brackets*. Ao contactar com alimentos quentes ou frios, o esmalte sofre expansão ou contração. O mesmo acontece com os *brackets* e com os sistemas adesivos, em coeficientes de expansão diferentes entre si. A contração e a expansão dos *brackets* metálicos é superior à do esmalte e à dos sistemas adesivos. A repetição destes fenómenos pode levar à formação de microfissuras entre os *brackets* e o sistema adesivo, constituindo uma porta de entrada para fluídos orais e bactérias. Encontram-se assim reunidas as condições para a formação de WSL por baixo dos *brackets* (Sangamesh & Kallury, 2011).



Figura 11 - Biofilme resultante do tratamento ortodôntico, antes (inferior) e depois (superior) da remoção do aparelho, revelado pelo Gum Red-Cote. (Ren et al., 2014)

Clinicamente, tem-se vindo a observar que as WSL podem regredir a longo prazo, mas a capacidade natural de reparação é limitada. Por vezes a superfície da lesão remineraliza enquanto o corpo permanece poroso e, portanto, a sua aparência esbranquiçada e pouco estética persiste. Em certos casos pode até ocorrer a incorporação de pigmentos exógenos na lesão, conferindo-lhe uma tonalidade acastanhada (Gugnani et

al., 2014). São requisitos para a remineralização natural do esmalte, o restabelecimento das condições fisiológicas entre o esmalte e os fluidos orais, e a integridade da camada superficial do esmalte poroso (Cury & Tenuta, 2009). Caso o pH da placa permaneça abaixo dos valores críticos dos tecidos dentários durante longos períodos de tempo, o desequilíbrio no sentido da desmineralização persiste e a lesão evolui para a cavitação. Nesta situação, apenas o tratamento restaurador invasivo é uma solução (Zong, Peng, Zhang, Lin & Feng, 2012). A prevalência das lesões após o tratamento ortodôntico é bastante elevada, até 5 anos após a remoção do aparelho e segundo Beerens et al. (2010) a maioria das WSL permanece estável e cerca de 10% progride de severidade 6 meses após o tratamento.

2.5.1. DETEÇÃO DE *WHITE SPOT LESIONS*

Os métodos mais convencionais para a detecção destas lesões compreendem a observação clínica e a utilização da sonda exploratória. Esta avaliação clínica é meramente subjetiva pois baseia-se em parâmetros como a cor, dureza e brilho das estruturas dentárias. Deste modo, é frequentemente complementada com um exame radiográfico de rotina. Porém, as cáries iniciais não são detetadas desta forma. Apenas são traduzidas radiograficamente perdas minerais superiores a 30-40%, correspondentes a um estágio mais avançada da doença, aproximadamente de 9 meses após o início da desmineralização. Como tal, as técnicas convencionais apresentam uma fraca sensibilidade e especificidade tanto para a detecção de cáries iniciais como para o fornecimento de informações relativas à sua atividade (Choo-Smith, Dong & Cleghorn, 2008). Nos últimos anos várias tecnologias têm vindo a ser desenvolvidas no sentido de possibilitar uma detecção mais eficaz destas lesões e a determinação de um diagnóstico mais preciso. O laser fluorescente (DIAGNOdent[®]), a fluorescência induzida por luz quantitativa (QLF) e espectroscopia de impedância (CarieScan[®]) são alguns exemplos. Apesar do seu potencial, muitos destes aparelhos ainda dependem da subjetividade da interpretação dos resultados. As informações relativas à perda e ganho mineral não são obtidas e a presença de pigmentações, cálculos e depósitos orgânicos nas superfícies dentárias induzem falsos positivos (Choo-Smith et al., 2008). Uma vez que nenhum dos métodos apresenta a confiança desejada, a estratégia mais adequada passa pela combinação de diferentes sistemas (Li et al., 2014)

2.5.2. TRATAMENTO DE *WHITE SPOT LESIONS*

Múltiplos estudos indicam que a detecção e tratamento não invasivo das WSL são estratégias importantes no controlo da progressão e tratamento da doença. De forma a compensar a falta de eficácia do tratamento destas lesões pela remineralização natural da saliva, diversas medidas têm vindo a ser adotadas, desde a instrução da rotina de higiene oral, à aplicação tópica de sistemas remineralizantes e colutórios com agentes antimicrobianos.

A aplicação clínica de fosfato de cálcio é, por si só, ineficaz no tratamento destas lesões. A sua incapacidade de promover a remineralização do esmalte está relacionada com a sua baixa solubilidade, particularmente na presença de iões fluoreto. A insolubilidade intrínseca do fosfato de cálcio só permite a sua administração em concentrações baixas, na presença de ácido, de forma a possibilitar a libertação dos iões fosfato e cálcio passíveis de serem difundidos pelo esmalte afetado (Gurunathan, Somasundaram & Kumar, 2021). Por outro lado, o fosfato de cálcio insolúvel é de difícil aplicação e não se posiciona de forma eficaz na superfície dentária. Como tal, as concentrações de cálcio e fosfato necessárias para que ocorra a remineralização das lesões não são atingidas (Reynolds, 2008). Com o objetivo de ultrapassar estas limitações, novas tecnologias de remineralização têm vindo a ser desenvolvidas, tais como o sistema Fosfato de Cálcio Caseína-Fosfopeptídeo Amorfo (CPP-ACP).

Idealmente os agentes de remineralização devem proporcionar uma biodisponibilidade de iões cálcio, fosfato e fluoreto que favoreça o ganho mineral em profundidade na lesão e não apenas a sua deposição a nível superficial, em detrimento da desmineralização. A remineralização superficial do esmalte apresenta poucos benefícios na recuperação das propriedades estruturais e estéticas a um nível subsuperficial da lesão (Cochrane et al., 2010). Portanto, o agente remineralizante deve ter como requisitos básicos: segurança para uso humano, garantir biodisponibilidade dos iões, promover a precipitação rápida sobre as regiões desmineralizadas, proporcionar a formação de apatite estável e resistente a futuros ataques ácidos e agentes erosivos, apresentar uma ação eficaz sobre a superfície e subsuperfície da lesão e capacidade de difusão pelo biofilme e pela subsuperfície da lesão (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

O leite e os seus derivados apresentam propriedades anti-cárie, contribuindo de forma ativa na manutenção da saúde oral. O seu efeito cariostático é atribuído essencialmente à presença de iões cálcio, fosfato e caseínas (Rose, 2000). Ferrazzano et al., (2008) demonstrou *in vitro* o efeito protetor do iogurte, contra a desmineralização do esmalte. Para tal recorreram a diversas amostras de esmalte previamente desmineralizado pelo ácido láctico. De seguida, estas amostras permaneceram submersas durante 96 horas no sobrenadante do iogurte, obtido por centrifugação. Como resultado, verificou-se um aumento da remineralização do esmalte lesado, visível nas imagens de microscopia electrónica de varrimento apresentadas na figura 12. Após o ataque ácido, a superfície do esmalte tornou-se irregular, com a presença de lacunas correspondentes às perdas minerais. A imersão no sobrenadante do iogurte, proporcionou uma superfície mais homogénea devido à precipitação de fosfato de cálcio para preenchimento das falhas.

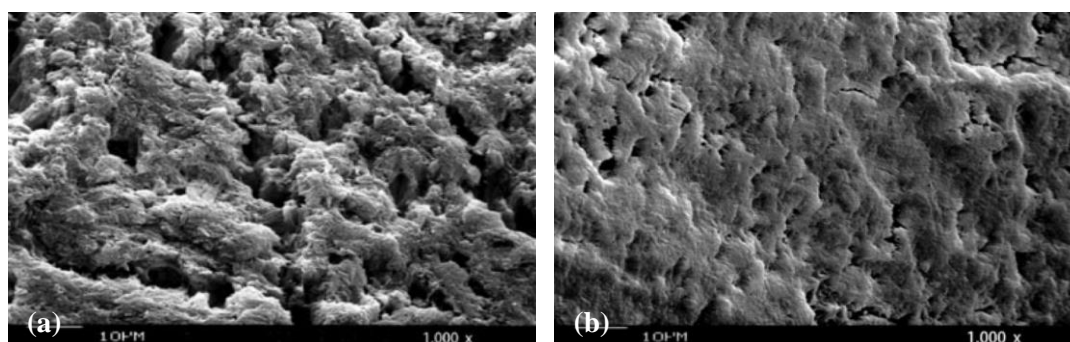


Figura 12 - Microscopia electrónica de varrimento do esmalte após a desmineralização pelo ácido láctico (a) e após a imersão no sobrenadante do iogurte (b), com uma ampliação de 1000x. (Ferrazzano et al., 2008)

A caseína é a fosfoproteína mais abundante no leite bovino. O conhecimento da sua interação com o cálcio e fosfato, assim como a sua disponibilidade em produtos alimentares, rapidamente transformaram a caseína num potencial agente anticariogénico. Porém, foi demonstrado que este efeito apenas se manifesta quando a caseína é administrada em concentrações elevadas. Este fato, em conjunto com as suas propriedades organolépticas desfavoráveis, descartaram a hipótese da caseína ser diretamente utilizada na estratégia de redução da incidência de cáries (Reynolds, 1998). A caseína organiza-se em micelas com cerca 100nm de raio, as quais são capazes de estabilizar até 800 nanocomplexos de fosfato de cálcio (Little & Holt, 2004). Esta capacidade é possível

devido à presença de sequências de aminoácidos específicas. Por acção da tripsina, estas sequências podem ser libertadas na forma de Fosfopéptidos de Caseína (CPP), conservando as suas propriedades (Cochrane et al., 2010).

Os CPP são péptidos ricos em aglomerados de resíduos de serina fosforilada e ocasionalmente treonina. A proporção de resíduos fosforilados é determinada por polimorfismos genéticos, resultando em diversos tipos de caseínas (Nongonierma & FitzGerald, 2012). A sequência Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu (motivo ácido) é característica do CPP, proporcionando regiões de cargas negativas propensas à ligação de cátions bivalentes como o cálcio, o magnésio, o ferro, o zinco, o níquel ou o bário, e contribuindo para o aumento da sua solubilidade. Os resíduos de serina fosforilados, Ser(P), são os principais locais de ligação ao cálcio e esta cinética varia consoante as concentrações de cálcio disponíveis e o grau de fosforilação da caseína. Deste modo a α_{s2} -caseína é a que apresenta a maior proporção de serinas fosforiladas e, portanto, maior afinidade com o cálcio (Kitts, 2006). Cada péptido tem a capacidade de se ligar a 25 iões cálcio, 15 iões fosfato e 5 iões fluoreto. A pH neutro ou alcalino, o CPP estabiliza o fosfato de cálcio em solução, formando complexos colóides que aderem à placa bacteriana. Deste modo previne o crescimento descontrolado dos cristais e sua posterior precipitação nas superfícies dentárias (Llena et al., 2009).

α_{s1} -casein f(59-79)5P

Gln-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys

β -casein f(1-25)4P

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg

Figura 13 - Motivo ácido presente na α_{s1} - caseína f(59–79)5P e na β - caseína f(1-25)4P (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

A ação anticariogénica do CPP deriva da sua capacidade de: estabilizar o fosfato de cálcio em solução, permitir a supersaturação dos iões cálcio e fosfato, promover a remineralização, reduzir a perda mineral, atuar como sistema tampão no pH da placa bacteriana e dificultar a adesão do *Streptococcus mutans* e do *Streptococcus sobrinus* ao competir pelos seus locais de ligação ao esmalte (Llena et al., 2009).

In vivo, a síntese de CPP ocorre durante a digestão da caseína estimando-se que são gerados aproximadamente 5mg por cada 200g de caseína (Kitts, 2006). A resistência à degradação proteolítica leva à sua acumulação na porção distal do intestino delgado. As concentrações elevadas juntamente com a capacidade de formar complexos solúveis com o fosfato de cálcio, promove a absorção intestinal de cálcio mesmo quando se verifica um déficit de vitamina D (Cross, Huq, Palamara, Perich & Reynolds, 2005).

2.5.3. CPP-ACP

Segundo Gurunathan et al. (2012), o CPP preserva e estabiliza os íons cálcio e fosfato na sua forma amorfa ou mais solúvel denominada por Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP). Garante assim a sua elevada biodisponibilidade, promovendo a remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte. O ACP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) é um precursor na formação da HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)\text{OH}_2$). Em solução aquosa, é rapidamente convertido em fosfato octacálcico ou apite devido à sua elevada solubilidade, o que o torna um agente remineralizante eficaz (Azarpazhooh & Limeback, 2008). A sua formulação simples, sólida e a sua biocompatibilidade com tecidos duros semelhantes à HA, são as suas principais vantagens (Gurunathan et al., 2012).

A ligação do CPP ao ACP, funciona como um reservatório de íons. Durante o ataque ácido, o CPP-ACP liberta íons cálcio e fosfato de modo a garantir a supersaturação da saliva em relação ao esmalte (Li et al., 2014). A manutenção dos níveis elevados de fosfato e cálcio em solução, permite a neutralização dos ácidos libertados pelas bactérias (sistema tampão), impedindo a diminuição do pH e portanto a desmineralização adicional do esmalte (Gurunathan et al., 2012; Azarpazhooh & Limeback, 2008). Encontrando-se aumentada a biodisponibilidade destes íons, a remineralização do esmalte é favorecida em detrimento da sua desmineralização. O efeito protetor da HA é dose-dependente, verificando-se ação máxima para concentrações de 10mg/ml (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

Além da forte adesão à HA, o CPP-ACP também apresenta a capacidade de se ligar à placa bacteriana. Proporciona assim um aumento das concentrações de íons cálcio e fosfato no fluído da placa, até 5 vezes superior aos valores normais (Gurunathan et al., 2012). Segundo Rose (2000) e Gurunathan et al. (2012), CPP-ACP mesmo em

concentrações baixas (0,1%) promove uma diminuição do coeficiente de difusão do cálcio livre, de 65% a pH 7 e 35% a pH 5. Ao aderir à placa, o CPP-ACP fornece potenciais locais de ligação ao cálcio libertado pelo esmalte, durante o ataque ácido. Deste modo, constitui um reservatório que poderá fornecer iões em desmineralizações subsequentes. O CPP-ACP presente na placa, pode penetrar na lesão como complexo intacto, ou pode libertar os iões no fluido da placa permitindo a sua difusão pela lesão. Estudos recentes (Cochrane & Reynolds, 2012) recorrendo a metodologias de imunolocalização, permitiram detetar a presença de CPP no interior do esmalte subsuperficial remineralizado, sugerindo que este péptido tem a capacidade de ultrapassar a seletividade relativa ao tamanho e carga molecular. Porém, a concentração de CPP na placa é tempo-dependente, apresentando uma de semi-vida de 124,8 minutos. A limitação da sua ação poderá estar relacionada com a influência de enzimas provenientes da placa como as peptidases e as fosfoproteases (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

A ação anticárie do CPP-ACP também passa pela sua influência na formação de placa bacteriana, uma vez que interfere na adesão de bactérias à mesma. Através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, é capaz de se ligar diretamente à superfície das bactérias, interferindo com a sua aderência. Reduz a aderência para 83% no caso do *Streptococcus mutans* e para 75% no caso do *Streptococcus sobrinus* (Rose, 2000). O mesmo efeito foi também demonstrado por Subramaniam e Naidu (2009), neste caso recorrendo a um estudo comparativo entre a eficácia da pasta de CPP-ACP (Tooth Mousse Plus™) e do gel de cloro-hexidina (Cervitec Gel™), na redução dos níveis de *Streptococcus mutans* presentes na placa. A amostra consistiu em 30 crianças, divididas aleatoriamente em 2 grupos consoante o tratamento a que foram submetidas. No grupo 1 foi aplicado Tooth Mousse Plus™ e no grupo 2 o Cervitec Gel™. A recolha de placa foi realizada 30 minutos após o pequeno-almoço no 1º dia do estudo, antes da aplicação dos agentes, e 30 minutos após o pequeno-almoço no 16º dia, após concluídos os tratamentos. As bactérias presentes na placa recolhida foram inoculadas, prosseguindo-se com a contagem de unidades formadoras de colónias após 48 horas de incubação. Com base nos resultados obtidos (tabela 1), foi possível verificar que ambos os sistemas favoreceram a redução de *Streptococcus mutans* na placa, tendo-se atingido 79,5 % para o Tooth Mousse Plus™ e 51,5% para o Cervitec Gel™. Os complexos de CPP-ACP mostraram-se mais eficaz uma vez que inibem a adesão destas bactérias à placa e consequentemente

reduzem a sua cariogenicidade. Ambos os produtos apresentavam na sua composição 900 ppm de fluoreto que desempenha também uma ação antibacteriana relevante, como será também descrito mais à frente.

Tabela 1 - Contagem do número de unidades formadoras de colónias de *Streptococcus mutans*, antes e depois do tratamento com Tooth Mousse Plus™ e com Cervitec Gel™. (Adaptado de Subramaniam & Naidu, 2009)

	Grupo 1 (CPP-ACP)	Grupo 2 (CHX)
Antes do tratamento	30,60 ± 18,73	39,53 ± 29,73
Depois do tratamento	6,27 ± 1,14	19,13 ± 24,69

2.5.4. SÍNTESE DO CPP

O CPP representa cerca de 10% da sequência primária da caseína e necessita de ser extraído para se tornar num composto ativo. Existem diversas abordagens para este processo: (1) hidrólise *in vitro* seguida de proteólise por enzimas de origem animal, microbiana ou vegetal, ou então seguida de processo físicos e químicos como ultrassons e microondas; (2) hidrólise por bactérias proteolíticas, durante a fermentação de produtos lácteos e (3) digestão *in vivo* através da ação combinada das hidrolases gástricas e pancreáticas, durante o trânsito gastro-intestinal. Do ponto de vista comercial, o CPP é obtido pelo primeiro mecanismo referido.

O processo de síntese do CPP inicia-se com a hidrólise enzimática do caseinato de sódio, pela tripsina. Após a hidrólise é adicionado ácido clorídrico para o ajuste do pH a 4,7 (valor do ponto isoelétrico da caseína), promovendo a precipitação da caseína não hidrolizada. Os CPP que permanecem em solução são separados por centrifugação das caseínas precipitadas. De seguida, é adicionado CaCl₂ e etanol ao sobrenadante, o primeiro como fonte de cálcio para a formação de complexos e a combinação dos iões cálcio com o etanol para induzir a precipitação dos CPP que apresentam o motivo ácido. O passo seguinte consiste em adicionar novamente ácido clorídrico até se obter um valor de pH de 3,5. Seguidamente adiciona-se uma mistura de acetona:NaOH e submete-se a solução a centrifugação. O sobrenadante é descartado e o sedimento é novamente ressuscitado com ácido clorídrico. Obtém-se assim uma fração contendo CPP que poderá ser sujeito a

diálise, para maior purificação. A secagem por pulverização permite transformar o CPP num pó estável (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

2.5.5. OBTENÇÃO DE CPP-ACP

Segundo Nongonierma e FitzGerald (2012) a formação dos complexos de CPP-ACP inicia-se adicionado ao CPP uma solução contendo CaCl_2 como fonte de cálcio, NaOH para ajustar o pH entre 7-5 e Na_2HPO_4 que fornecerá o fosfato para a formação dos complexos. Caso se pretenda a síntese de CPP-ACPF, é necessário um passo adicional que consiste na adição de NaF à solução. Ambos os compostos são solúveis, e como tal é possível a separação recorrendo a técnicas que se baseiam nas diferenças de peso molecular.

2.5.6. APLICAÇÕES DO CPP-ACP

O Recaldent foi a primeira tecnologia envolvendo complexos CPP-ACP a ser desenvolvida por Eric Reynolds e seus colegas na Universidade de Melbourne (Azarpazhooh & Limeback, 2008). Em 1999, foi aprovada a sua segurança para aplicação tópica pela U.S. Food and Drug Administration (FDA). Várias evidências científicas apontam estes complexos como responsáveis pela melhoria da saúde oral, devido ao seu papel preponderante na promoção da remineralização do esmalte e no combate contra a progressão de lesões de cárie (Nongonierma & FitzGerald, 2012). Os complexos que constituem o Recaldent são estáveis e solúveis, tendo sido demonstrado por Shen et al. (2011) que proporcionam um aumento da concentração salivar de iões cálcio (6,5 vezes) e de iões fosfato (7,9 vezes) após a sua utilização, quando comparado com uma pasta placebo. Do ponto de vista comercial, o CPP-ACP tem sido divulgado como um composto natural proveniente principalmente das proteínas do leite, apresentando propriedades notáveis de ligação a vários minerais (Reynolds, 1998).

O sistema CPP-ACP pode ser incorporado em diversos vetores de entrega de forma a poder exercer o seu efeito nas superfícies dentárias (Fig. 14). Estes vetores incluem: pastas dentífricas, pastas tópicas, colutórios, pastilhas elásticas, comprimidos orodispersíveis, produtos de confeitaria, laticínios, refrigerantes e ainda cimentos de

ionómero de vidro (Sudjalim et al., 2006; Walsh, 2009; Chen & Wang, 2010; Nongonierma & FitzGerald, 2012). As pastas dentífricas e as pastas tópicas estão disponíveis em diferentes sabores, o que estimula o fluxo salivar, aumentando a eficácia do tratamento. Também se encontram disponíveis na versão fluoretada.



Figura 14 - Exemplos de produtos comerciais que contêm CPP-ACP. (Recaldent™, 2014)

Tabela 2 - Nomes comerciais de alguns produtos que contêm CPP-ACP. (Adaptado de Recaldent™, 2014)

Produto	Marca comercial
Pastilhas elásticas	Trident Xtra Care™ Recaldent™
Pasta dentífricas	MI Paste™ MI Paste Plus™ (adição de F-)
Pastas tópicas	GC Tooth Mousse™ GC Tooth Mousse Plus™ (adição de F-)

A adição CPP-ACP a pastilhas elásticas é bastante vantajosa uma vez que: (1) podem ser fabricadas de maneira a concentrar elevadas quantidades de iões, (2) constituem um vetor de entrega eficiente, (3) permitem um contacto prolongado do CPP-ACP com as superfícies dentárias, pois podem ser mastigadas durante longos períodos de tempo e (4) estimulam o fluxo salivar, promovendo a ação de limpeza das superfícies dentárias

(Santhosh, Jethmalani, Shashibhushan & Reddy, 2012). Segundo Gurunathan et al. (2012) esta conjugação refletiu-se num aumento significativo da remineralização das lesões subsuperficiais, dependente da dose. A presença de CPP-ACP em pastilhas de sabor ácido, contrariou o efeito desse mesmo ácido e gerou um efeito de remineralização superior ao verificado em pastilhas sem açúcar e sem sabor ácido.

Cai et al. (2003) determinaram a eficácia da incorporação do CPP-ACP em comprimidos orodispersíveis sem açúcar, na remineralização do esmalte *in situ*. Para tal, foram utilizadas amostras de esmalte, previamente desmineralizadas e incorporadas em aparelhos intraorais, as quais foram sujeitas a 4 tratamentos diferentes: grupo controlo (sem tratamento), comprimidos com 56,4 mg de CPP-ACP (3%); comprimidos com 18,8 mg de CPP-ACP (1%) e comprimidos sem CPP-ACP. Os aparelhos foram utilizados por 10 indivíduos que realizaram cada um dos tratamentos durante 14 dias, sendo substituída a amostra de esmalte entre cada um, para posterior análise.

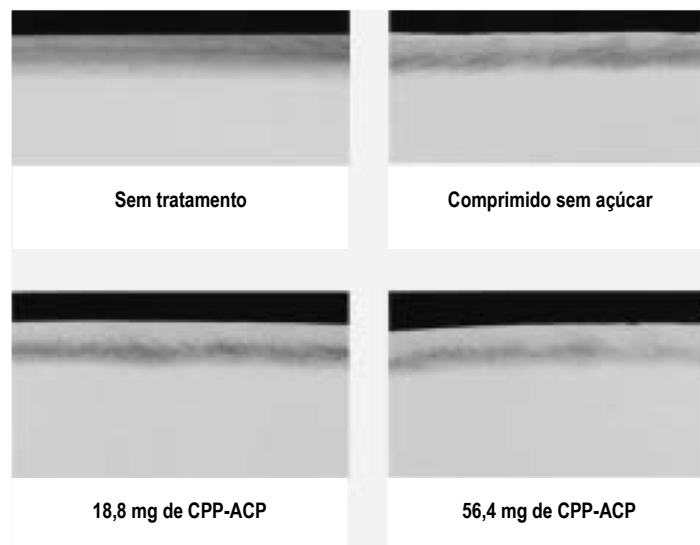


Figura 15 - Imagens de microrradiografia obtidas após cada um dos tratamentos. (Adaptado de Cai et al., 2003)

Nos resultados obtidos neste estudo, verificou-se um aumento considerável da remineralização, cerca de 176% para os comprimidos com 56,4 mg de CPP-ACP e 78% para os comprimidos com 18,8 mg de CPP-ACP (Fig. 15). Deste modo conclui-se que a

incorporação deste agente remineralizante nos comprimidos sem açúcar resultou num aumento da remineralização subsuperficial, dose dependente.

Santhosh et al. (2012) procuraram demonstrar a eficácia do CPP-ACP na remineralização de lesões iniciais de cárie, quando adicionado a pastilhas elásticas sem açúcar (Trident™). Para tal 24 crianças com boa higiene oral e sem cáries activas estiveram envolvidas. Procedeu-se à recolha de amostras de 1,5 ml de saliva não estimulada. As amostras de 1,5 ml de saliva estimulada foram obtidas após a mastigação de 2 pastilhas Trident™ com CPP-ACP, durante 20 minutos. Em laboratório as amostras foram analisadas e determinadas as concentrações de cálcio e fosfato presentes (Tabela 3). Da análise dos resultados obtidos, verificou-se que após a estimulação da saliva, as concentrações de cálcio aumentaram 70,6% enquanto que as de fosfato diminuíram 28,3%. Segundo Almeida et al.(2008), as concentrações de fosfato na saliva variam de acordo com o fluxo salivar, diminuindo aquando a estimulação do mesmo. Geralmente a diferença de concentrações de fosfato entre a saliva estimulada e não estimulada aproxima-se dos 29%. Neste estudo atingiu-se uma diferença de 28,3% o que indica que a diminuição verificada é fisiológica. Deste modo pode ser concluído que as pastilhas elásticas com CPP-ACP proporcionam um aumento dos níveis de cálcio salivares, disponibilizando-o para potencial remineralização do esmalte. Segundo os autores do estudo é necessário ainda pesquisar a influência de diferentes períodos de mastigação destas pastilhas na alteração das concentrações de cálcio e fosfato salivares.

Tabela 3 - Concentrações de cálcio e fosfato salivares antes e depois de mastigar pastilhas Trident contendo CPP-ACP, durante 20 minutos. (Adaptado de Santhosh et al., 2012)

	Saliva não estimulada	Saliva estimulada após 20 minutos (Trident™ + CPP-ACP)
Cálcio (mg/dl)	7,08 ± 3,96	12,08 ± 4,48
Fosfato (mg/dl)	17,48 ± 3,55	12,53 ± 3,04

O CPP-ACP é um composto apropriado para ser adicionado a certos alimentos, nomeadamente no leite, sem interferência nas suas propriedades anticárie. Deste modo, foi desenvolvido um estudo por Walker et al. (2009) com o objetivo de comprovar a

capacidade de remineralização de lesões subsuperficiais do esmalte, após o consumo de CPP-ACP adicionado ao leite bovino. A amostra consistiu em 10 indivíduos, aos quais foram atribuídos aparelhos intraoral removíveis. Nestes aparelhos foram incorporadas porções de esmalte apresentando lesões subsuperficiais. Testaram-se 3 tipos de leite: leite sem adição de CPP-ACP (contolo), leite com 0,2% de CPP-ACP e leite com 0,3% de CPP-ACP. Cada tipo de leite foi consumido individualmente (5-8 golos diários, em 30 segundos) durante 15 dias pelos 10 indivíduos. No final de cada um dos tratamentos, seguiu-se uma semana de intervalo e as amostras de esmalte do aparelho foram substituídas e posteriormente analisadas por microrradiografia.

Tabela 4 - Comparação da % de remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte após a ingestão de leite com CPP-ACP e sem CPP-ACP. (Adaptado de Walker et al., 2009)

Tipos de leite	% Remineralização
Sem CPP-ACP	3,02 ± 0,1
0,2% de CPP-ACP	5,46 ± 0,15
0,3% de CPP-ACP	7,99 ± 0,12

Os resultados neste estudo (tabela 4) demonstraram que a exposição das lesões de esmalte ao leite suplementado por CPP-ACP proporcionou um aumento significativo da sua remineralização, em comparação com o leite controlo. A adição de 0,2% e 0,3% de CPP-ACP promoveu um aumento de 81% e 164% na remineralização destas lesões, respetivamente. O potencial remineralizador provou ser dose dependente, uma vez que as concentrações de 0,3% de CPP-ACP aumentaram a remineralização das lesões cerca de 46%, em relação às concentrações de 0,2%. A reparação do esmalte desmineralizado verificou-se principalmente no corpo da lesão. Da análise dos resultados conclui-se que a adição de CPP-ACP ao leite bovino é bastante vantajosa uma vez que potencia a remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte. O leite, por si só, apresenta propriedades anticariogénicas, atribuídas à presença de caseína, iões cálcio e fosfato. Apresenta, aproximadamente, 30 mM de cálcio na sua composição, maioritariamente ligado a micelas de caseína. Deste modo, apenas 2 mM de cálcio se encontra na forma de iões livres, constituindo a fração que se encontra disponível para intervir na remineralização, o que explica os valores obtidos pela ingestão do leite controlo. As

concentrações de 0,2% e 0,3% de CPP-ACP proporcionaram a adição de 6,5 mM e 9,75 mM de cálcio biodisponível no leite, respetivamente, e promoveram uma maior remineralização das lesões.

Vashisht et al. (2010) desenvolveram um estudo que teve como objetivo a avaliação qualitativa do potencial de remineralização de lesões de cárie iniciais pelo sistema CPP-ACP em *ex-vivo*. Neste estudo estiveram envolvidos 10 indivíduos sem cáries ativas, os quais foram sujeitos a um tratamento ortodôntico que envolveu a exodontia de pré-molares. Em cada indivíduo, foram selecionados 2 dos pré-molares a extrair nos quais se simularam WSL através da aplicação de ácido ortofosfórico a 37% e durante 20 minutos. Os dentes em causa foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: o grupo experimental e o grupo controlo. No grupo experimental, bandas ortodônticas personalizadas com uma janela (4x3mm) foram cimentadas aos dentes e foi aplicada uma pasta com 10% de CPP-ACP (GC Tooth MousseTM) durante 14 dias, 3 vezes ao dia, 3 min/aplicação. No grupo controlo foram cimentadas bandas ortodônticas comuns, sem janela e nenhuma pasta foi aplicada. Após o período de estudo, os dentes foram extraídos, prosseguindo-se com a análise das WSL por microscopia electrónica de varrimento. As imagens de microscopia obtidas (Fig. 16) revelaram alterações evidentes na morfologia da superfície do esmalte, previamente desmineralizado, promovidas pela aplicação de CPP-ACP e contribuindo para a reparação das lesões.

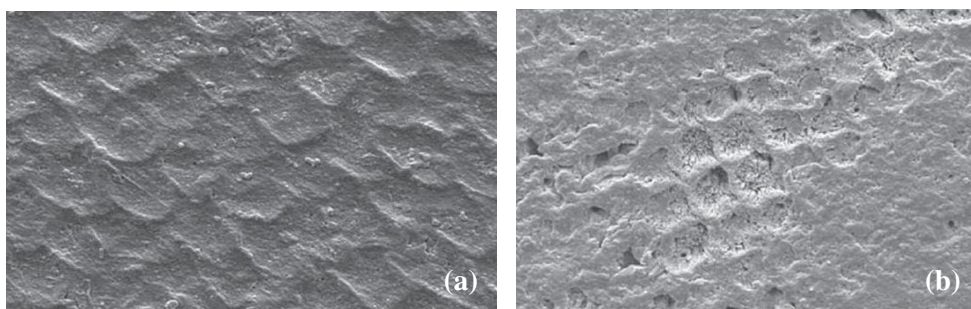


Figura 16 - Imagens de microscopia electrónica de varrimento da superfície do esmalte do grupo experimental após demineralização (a) e após 14 dias de aplicação de CPP-ACP (b). (Vashisht et al., 2010)

De forma a estabelecer uma comparação entre o potencial remineralizador de pastas de CPP-ACP e de pastas fluoretadas; Kumar, Itthagaran e King (2008)

desenvolveram uma investigação envolvendo amostras de esmalte submetidas a desmineralização prolongada, gerando assim lesões de cárie. Estas amostras foram repartidas aleatoriamente em 5 grupos, consoante o tratamento a que foram submetidas: pasta com 1000 ppm de fluoreto (grupo A - controlo positivo), pasta não fluoretada (grupo B - controlo negativo), CPP-ACP como pasta dentífrica (grupo C), CPP-ACP como camada tópica (grupo D) e aplicação tópica de CPP-ACP após tratamento com a mesma pasta fluoretada utilizada no grupo A. A análise das amostras foi realizada antes e depois dos tratamentos, por microscopia por luz polarizada.

Tabela 5 - Profundidade das lesões após cada um dos tratamentos. (Adaptado de Kumar et al., 2008)

		Profundidade da lesão (µm)	Varição da profundidade (%)
Grupo A (1000 ppm F ⁻)	<i>Antes</i>	168,2 ± 16,7	-7 ± 4,9
	<i>Depois</i>	156,2 ± 17,7	
Grupo B (pasta sem F ⁻)	<i>Antes</i>	168,9 ± 19,6	23,2 ± 9,8
	<i>Depois</i>	207,2 ± 20	
Grupo C (CPP-ACP pasta)	<i>Antes</i>	167 ± 24,5	-10,1 ± 8,6
	<i>Depois</i>	150 ± 27,1	
Grupo D (CPP-ACP tópico)	<i>Antes</i>	167,2 ± 14,2	-10,1 ± 9,8
	<i>Depois</i>	150,3 ± 21	
Grupo E (F ⁻ + CPP-ACP)	<i>Antes</i>	168,5 ± 23,6	-13,1 ± 8,2
	<i>Depois</i>	145,8 ± 21,4	

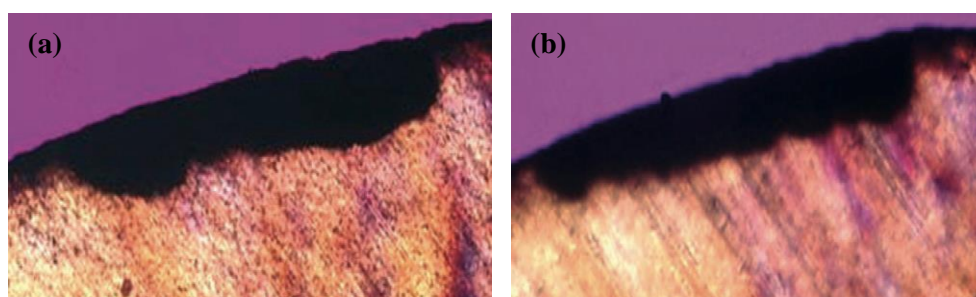


Figura 17 - Imagens de microscopia por luz polarizada do grupo E, antes (a) e após (b) o tratamento. (Kumar et al., 2008)

Em todos os grupos deste estudo se verificou a diminuição das lesões, exceto no grupo B. A tabela 5 e a figura 17 mostram os resultados obtidos neste estudo. A maior diminuição foi verificada no grupo E, cerca de 13%, o que demonstra que a interação entre o CPP-ACP e o fluoreto resulta num efeito anticárie potenciado, formando-se complexos estáveis. Os resultados obtidos pela aplicação de CPP-ACP, tanto em pasta como topicamente, não se mostraram diferentes. Contudo a aplicação de fluoretos não superou os resultados obtidos pelo CPP-ACP nas diferentes técnicas aplicadas. Deste modo, conclui-se que a associação de CPP-ACP com o fluoreto é benéfica, uma vez que promove maior remineralização das lesões, comparativamente com a aplicação de CPP-ACP isoladamente.

Além da remineralização das WSL, o CPP-ACP apresenta outros potenciais campos de aplicação como o tratamento e prevenção da erosão do dentária e o alívio da sensibilidade dentária. A erosão dentária é definida como o desgaste dentário resultante da dissolução química dos tecidos por ação de ácidos não provenientes do metabolismo bacteriano dos hidratos de carbono (Tehrani et al., 2011). A etiologia destes ácidos inclui condições patológicas como o refluxo gastro-esofágico, anorexia e bulimia e o consumo excessivo de alimentos ácidos como os sumos de fruta e refrigerantes. Os refrigerantes carbonatados apresentam na sua composição ácido carbónico e ácidos orgânicos, geralmente o ácido cítrico, adicionados com o intuito de melhorar o seu sabor. O anião citrato é quelante dos iões cálcio, diminuindo a sua concentração na saliva e na superfície do esmalte e limitando desta forma o potencial de remineralização da saliva (Manton et al., 2010). Recentemente tem sido demonstrado o potencial efeito dos complexos CPP-ACP na redução da erosão dentária resultante da ação do ácido cítrico, vinho branco e bebidas desportivas (Ranjitkar, Kaidonis, Richards & Townsend, 2009).

Manton et. al., 2010 desenvolveram um estudo com o objetivo de determinar o efeito CPP-ACP na erosão do esmalte, quando adicionado a 4 refrigerantes de pH compreendidos entre 2,2-2,4. O controlo negativo foi realizado em água destilada. A metodologia consistiu na imersão de amostras de esmalte em soluções constituídas por refrigerante e 0,2% de CPP-ACP, durante 30 minutos. Os resultados obtidos (tabela 6) mostram uma diminuição significativa na profundidade das lesões, entre 7,73-12,42 μm , e portanto uma redução considerável do potencial erosivo dos refrigerantes. Esta redução pode ser explicada pelo aumento da biodisponibilidade de iões cálcio e fosfato proporcionada pelo CPP-ACP e pela diminuição de pontos suscetíveis à dissolução de

minerais, pela adesão destes complexos à superfície do esmalte. Os valores de pH aumentaram ligeiramente, contudo permaneceram abaixo de 2,92 o que pressupõe a persistência do potencial erosivo *in vivo*. A diferença da profundidade da lesão entre refrigerantes com CPP-ACP e a água destiladas foi pouco significativa.

Tabela 6 - Profundidade da erosão e pH, após a imersão das amostras de esmalte em refrigerantes com e sem a adição de CPP-ACP. (Adaptado de Manton et al., 2010)

Refrigerante	CPP-ACP (%)	Profundidade da erosão (μm)	pH (37°C)
Solo	0	9,45	2,27
	0,2	0,7	2,83
Solo Sub	0	8,21	2,42
	0,2	0,48	2,91
Cottee's Coola	0	11,45	2,37
	0,2	1,07	2,91
Cotte's Light Coola	0	13,18	2,24
	0,2	0,76	2,90
Água destilada	0	0,51	-

Ranjitkar et al., (2009a) procuraram demonstrar a eficácia do CPP-ACP na redução do desgaste do esmalte, simulando a combinação da erosão ácida gerada pelo refluxo gástrico-esofágico (pH 1,2) e a abrasão severa resultante da escovagem dentária. O estudo consistiu em amostras de esmalte sujeitas a 10.000 ciclos de desgaste com uma carga de 100 N, na presença de ácido clorídrico (pH 1,2). No grupo 1, a cada 160 ciclos (2 minutos) a máquina parou e foi aplicada CPP-ACP em pasta (Tooth MousseTM) durante 5 minutos. O mesmo protocolo foi aplicado no grupo 2, utilizando-se uma pasta de composição semelhante mas sem CPP-ACP. O grupo controlo foi sujeito às mesmas condições que os grupos anteriores mas não foi aplicada nenhuma pasta. Com base no resultados obtidos, o desgaste médio dentário no grupo 1 foi de $0,44 \pm 0,05 \text{ mm}^3/1000$ ciclos, no grupo 2 foi $0,63 \pm 0,06 \text{ mm}^3/1000$ ciclos e no grupo controlo rondou os $0,92 \pm 0,11 \text{ mm}^3/1000$ ciclos. Verificou-se, assim, uma redução significativa do desgaste no grupo 1 e 2, comparativamente com o grupo controlo em 52,5% e 31,5%; respetivamente. Estes resultados sugerem uma possível ação remineralizadora do CPP-ACP na redução da profundidade das lesões resultantes da erosão e atrição.

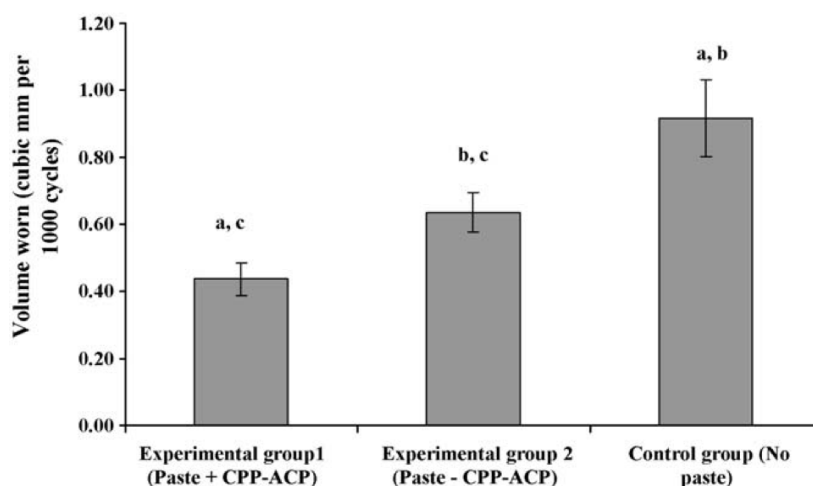


Figura 18 - Comparação do desgaste dentário médio entre os diferentes grupos envolvidos no estudo. (Ranjitkar et al., 2009a)

O objetivo da pesquisa desenvolvida por Zheng et al. (2013) foi demonstrar o potencial efeito do CPP-ACP a 2% na remineralização das lesões de erosão dentária. Amostras de esmalte provenientes de 10 dentes foram divididas em 3 grupos: no primeiro grupo (controle) as amostras não foram submetidas a nenhum tratamento; no segundo grupo as amostras foram imersas numa solução de ácido cítrico (pH 3,2) durante 10 minutos sob agitação magnética contínua, representando o esmalte erodido e no terceiro grupo, as amostras foram colocadas numa solução de CPP-ACP a 2% durante 2 horas, correspondente ao esmalte remineralizado. Como resultado deste procedimento obtiveram-se 3 tipos de superfícies com morfologias distintas.

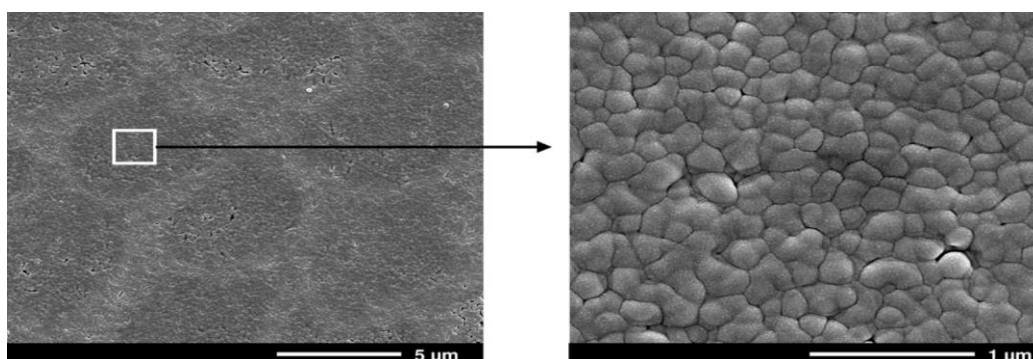


Figura 19 - Microscopia electrónica de varrimento da superfície do esmalte remineralizado. Regiões mais escura correspondente a maior densidade de deposição de minerais. (Zheng et al., 2013)

O esmalte intacto apresentou-se suave e compacto. Quando exposto ao ataque ácido, a sua estrutura modificou-se, assemelhando-se a um favo de mel. Na presença do CPP-ACP a remineralização foi induzida. Ocorreu a deposição de minerais na superfície do esmalte de forma irregular, resultando em regiões mais densas e mais escuras que outras. Estes depósitos foram identificados pelos autores do estudo como ACP, ocupando parcialmente a estrutura em favo de mel e contribuindo para a diminuição da rugosidade da superfície (Fig. 19). Relativamente à dureza da superfície do esmalte, verificou-se a sua diminuição após a erosão ácida, ao contrário do aumento notório observado após a remineralização pelo CPP-ACP. Deste modo, é demonstrada a sua capacidade de reendurecimento do esmalte promovendo maior resistência contra o desgaste, comparativamente com esmalte enfraquecido pela ação de ácidos (Fig. 20).

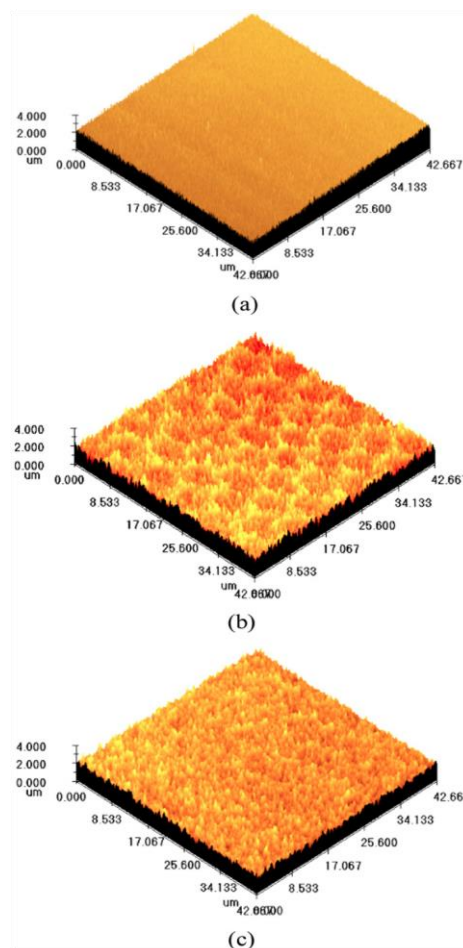


Figura 20 - Microscopia de varrimento confocal a laser: (a) esmalte original, (b) esmalte desmineralizado e (c) esmalte remineralizado. (Zheng et al., 2013)

Com base nos estudos acima referenciados, é possível concluir que o sistema CPP-ACP apresenta potencial de reparação de lesões de erosão. Após a sua aplicação *in vitro* verificou-se: (1) uma diminuição significativa da profundidade das lesões originadas por refrigerantes (Manton et al., 2010); (2) a diminuição do desgaste do esmalte quando simuladas condições de atrição severas em meio ácido (Ranjitkar et al., 2009a) e (3) um aumento da dureza da superfície do esmalte remineralizado após erosão ácida (Zheng et al., 2013). Contudo esta capacidade de reparação é limitada uma vez que se dá principalmente pela deposição de ACP nas regiões porosas do esmalte erodido e não pela reparação do cristais de HA dissolvidos (Ranjitkar et al., 2009b; Zheng et al., 2013). Forma-se assim numa camada heterogénea de depósitos minerais, estruturalmente diferente do esmalte saudável (Zheng et al., 2013). O aumento do grau de dureza verificado após a aplicação do CPP-ACP, não é suficiente para se obter uma dureza semelhante à da estrutura original e como tal é mais facilmente desgastada.

A sensibilidade dentária é um problema frequente na prática clínica diária. Consiste numa dor aguda e intensa resultante da exposição dos túbulos dentinários a estímulos térmicos, tácteis, osmóticos ou químicos. A exposição da dentina pode surgir como consequência da recessão gengival ou da perda de esmalte. Entre as principais causas de recessão gengival encontram-se: doença periodontal, traumatismos e uso excessivo de fio dentário (Parveen, Lal, Hafeez & Ahmed, 2014). A perda de esmalte pode ser provocada por bruxismo, atrição, abrasão, abfração, erosão, mastigação unilateral e escovagem excessiva (Minglani, Aggarwal & Ahuja, 2010).

A eficácia do sistema CPP-ACP na redução da sensibilidade dentária foi testada por Torwane et al. (2013), comparativamente com a do extrato etanólico da própolis a 30%. Este estudo envolveu uma amostra de 73 dentes de 13 pacientes com sensibilidade dentária e apresentou uma duração de 3 semanas. As amostras foram distribuídas de forma aleatória por 3 grupos, consoante o material utilizado: no grupo A foi utilizado o extrato etanólico de própolis a 30%, no grupo B o RecaldentTM (CPP-ACP) e no grupo C apenas água destilada (controlo negativo). Os diferentes agentes foram administrados no 1º, 7º, 14º e 21º dias. Registou-se a intensidade da dor gerada pelo estímulo táctil e pelo estímulo evaporativo térmico (ar de uma seringa), no início do estudo e após cada aplicação. Da análise dos resultados verificou-se que tanto o extrato etanólico de própolis a 30%, como o RecaldentTM se mostraram eficazes na redução da sensibilidade dentária, apresentando

como resultados 78% e 92%, respetivamente. A intensidade da dor registada transitou de severa para ligeira ou moderada. A diminuição mais significativa foi verificada entre a primeira e a segunda aplicação, de 78% para extrato etanólico de própolis e 81% para o CPP-ACP, o que leva a concluir que para uma ação dessensibilizante superior, a aplicação do agente deve ser repetida em intervalos de tempo inferiores a 7 dias. A água destilada apresentou, de todos os resultados, a menor diminuição da sensibilidade (35,4%) o que poderá estar associado ao efeito placebo.

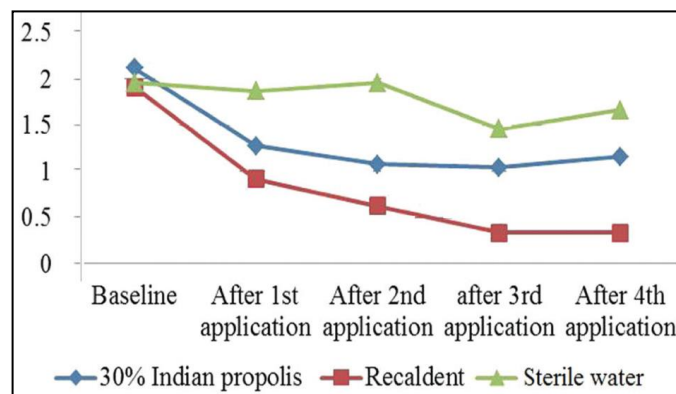


Figura 21 - Evolução da sensibilidade relativa à aplicação de ar da seringa. (Torwane et al. 2013)

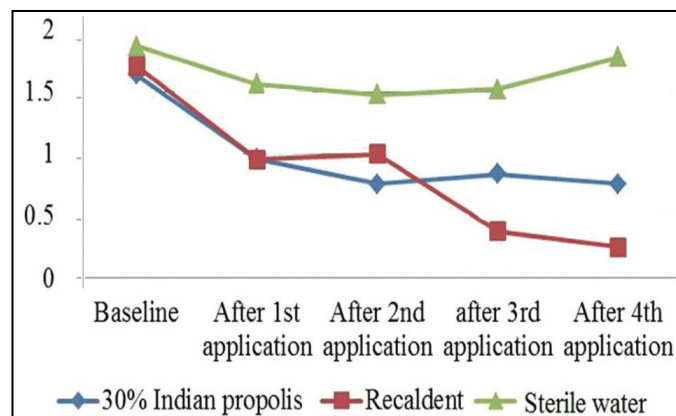


Figura 22 - Evolução da sensibilidade relativa ao estímulo tátil. (Torwane et al. 2013)

2.5.7. CPP-ACP E O FLÚOR

Atualmente é consensual que o efeito anticariogênico do fluoreto não resulta da sua administração sistêmica mas sim da aplicação tópica local. Portanto, é essencial que este ião esteja presente no fluido da placa bacteriana e na saliva durante o ataque ácido, de forma a poder interferir no desenvolvimento das lesões de cárie iniciais (Cury & Tenuta, 2009). Porém, a sua capacidade de promover remineralização é limitada pela biodisponibilidade de iões cálcio e fosfato, uma vez que para cada 2 iões fluoreto são necessários 10 iões cálcio e 6 iões fosfato para a formação da FA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) (Cochrane et al., 2010). Após a aplicação tópica, formam-se complexos de fluoreto de cálcio (CaF_2) que precipitam sobre a placa e sobre as WSL. Estes complexos funcionam como reservatórios do ião fluoreto e a sua libertação ocorre durante o ataque ácido, para valores de pH superiores a 4,5 (limite do seu efeito) (Sangamesh & Kallury, 2011).

O CPP-ACP interage com o ião fluoreto e induz a formação de nanocomplexos de iões cálcio, fosfato e fluoretos denominados por CPP-ACFP. Este complexo apresenta o mesmo potencial anticárie que o CCP-ACP em conjunto com os benefícios da adição de fluoretos, o que permite a remineralização das lesões pela incorporação de FA (Beerens et al., 2010). O efeito sinérgico do CPP-ACP e do fluoreto no controlo e tratamento das lesões de cárie iniciais, pode ser atribuído à formação da fase ACFP estabilizada e à sua localização na superfície dentária, determinada pelo CPP. Desta forma é possível a coexistência de cálcio, fosfato e fluoreto na superfície do esmalte, em proporções adequadas para a formação de FA (Reynolds, 2008). Shen et al., (2011) desenvolveram um estudo com o objetivo de comparar a eficácia dos novos produtos dentários compostos por fosfato de cálcio e fluoreto, em relação aos produtos fluoretados convencionais, na remineralização de lesões subsuperficiais do esmalte. Amostras de esmalte humano com lesões subsuperficiais foram preparadas e inseridas em aparelhos intraorais e atribuídos a 5 voluntários. Foram testados 6 produtos: Tooth MousseTM contendo 10% de CPP-ACP (TM), Tooth Mousse PlusTM contendo 10% CPP-ACP e 900 ppm de fluoreto (TMP), pasta dentífrica com 1000 ppm de fluoreto, pasta dentífrica com 5000 ppm de fluorets, pasta dentífrica contendo fosfato tricálcico e 950 ppm de fluoreto (ClinproTM) e pasta dentária não fluoretada como placebo. Para cada um dos produtos, os participantes realizam durante 10 dias, 4 vezes ao dia, bochechos de 60 segundos com uma solução constituída

por 1g do produto em causa e 4ml de água destilada. Após cada bochecho, procedeu-se à sua recolha para determinação dos níveis de iões cálcio, fosfato e fluoreto. Os diferentes tratamentos foram intervalados uma semana, substituindo-se também as amostras de esmalte presentes no aparelho. Estas amostras foram posteriormente analisadas e recolhidas imagens microrradiográficas. Os participantes foram instruídos para removerem o aparelho antes da higiene diária e das refeições.

Tabela 7 - Concentrações salivares de cálcio, fosfato e fluoreto após os diferentes tratamentos e a sua saturação em relação à HA. (Shen et al., 2011)

Produto	Cálcio ($\mu\text{M/ml}$)	Fosfato ($\mu\text{M/ml}$)	F ⁻ (ppm)	Saturação (FA)
TM	48,6 \pm 4,6	34,0 \pm 4,0	-	-
TMP	51,6 \pm 15,7	35,4 \pm 10,3	108,3 \pm 38,1	586,7 \pm 12,8
1000 ppm F ⁻	2,4 \pm 0,9	2,4 \pm 0,7	106,5 \pm 23,0	80,5 \pm 19,3
5000 ppm F ⁻	5,6 \pm 1,4	6,2 \pm 3,9	584,6 \pm 92,5	172,4 \pm 15,2
Clinpro™	1,4 \pm 0,2	2,5 \pm 1,4	91,1 \pm 9,9	60,7 \pm 15,1
Placebo	3,1 \pm 1,2	2,1 \pm 0,5	-	-

Nos resultados deste estudo relativos às concentrações salivares dos iões cálcio, fosfato e fluoreto, após cada tratamento (tabela 7), verificou-se que apenas o TM e o TMP aumentaram de forma considerável os níveis de cálcio e fosfato da saliva. A pasta com 5000 ppm de fluoreto promoveu a mais elevada libertação deste ião, porém o TMP produziu um grau de saturação em relação à FA bastante superior, devido às elevadas concentrações de cálcio e fosfato proporcionadas pelo mesmo. Entre o TMP, a pasta com 1000 ppm de fluoreto e o Clinpro™ não se verificaram diferenças significativas nas concentrações de fluoreto libertadas, aproximando-se dos 100 ppm. A tabela 6 resume os resultados obtidos. Relativamente ao potencial remineralizante dos diferentes produtos testados no estudo descrito, constatou-se que o nível mais elevado foi conseguido com a aplicação do TMP e o mais baixo com o placebo. Entre a pasta com 1000 ppm de fluoreto e o Clinpro™ não se observaram diferenças significativas. A remineralização resultante da aplicação das pastas com 1000 e 5000 ppm de fluoreto, demonstrou ser dose dependente em relação às concentrações de fluoreto. Em suma, por ordem crescente de potencial de remineralização, do mais reduzido para o mais elevado: placebo < 1000 ppm fluoreto =

Clinpro < 5000 ppm de fluoreto < TM < TMP. A tabela 8 resume as percentagens de remineralização estimadas para cada produto testado

Tabela 8 - Potencial de remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte *in situ*. (Adaptado de Shen et al., 2011)

Produtos	% Remineralização
TM	24,2 ± 2,3
TMP	29,4 ± 1,8
1000 ppm F ⁻	7,9 ± 2,1
5000 ppm F ⁻	16,3 ± 1,3
Clinpro™	9,5 ± 1,1
Placebo	3,7 ± 2,1

Com base nas imagens microrradiográficas obtidas após cada tratamento (Fig. 23), observou-se que as pastas com 1000 ppm de fluoreto, com 5000 ppm de fluoreto e o Clinpro™ remineralizaram essencialmente o esmalte superficial da lesão, ao contrário do TM e do TMP que remineralizaram tanto a superfície como o corpo da lesão, de forma mais homogênea. A análise dos resultados demonstrou que a presença de fluoreto em pastas que contêm CPP-ACP (TMP), melhora a capacidade de remineralização das lesões subsuperficiais do esmalte. Tanto o TM como o TMP, ao libertarem íons cálcio, fosfato e fluoreto (caso do TMP), aumentam a sua biodisponibilidade na saliva e conseqüentemente induziram uma maior remineralização do esmalte. A presença de CPP permite estabilizar as elevadas concentrações destes íons, inibindo a sua precipitação e promovendo a sua difusão pela subsuperfície da lesão. Ao contrário do que acontece na presença do CPP, após a aplicação de pastas apenas fluoretadas, o fluoreto ao contactar com o cálcio e fosfato livres rapidamente forma FA na superfície da lesão. Deste modo constrói-se uma barreira impeditiva à difusão de íons até ao corpo da lesão, o que torna estes agentes pouco eficientes no tratamento das mesmas. Como já foi referido anteriormente, o TMP e a pasta com 1000 ppm de fluoreto libertam concentrações semelhantes de fluoreto. Porém o TMP apresenta um potencial remineralizador 3,7 vezes superior, uma vez que promove também o aumento de cálcio e fosfato da saliva. Estes dados confirmam que os níveis de cálcio e fosfato presentes na saliva podem ser limitantes na remineralização das lesões, aquando a aplicação tópica de produtos somente fluoretados.

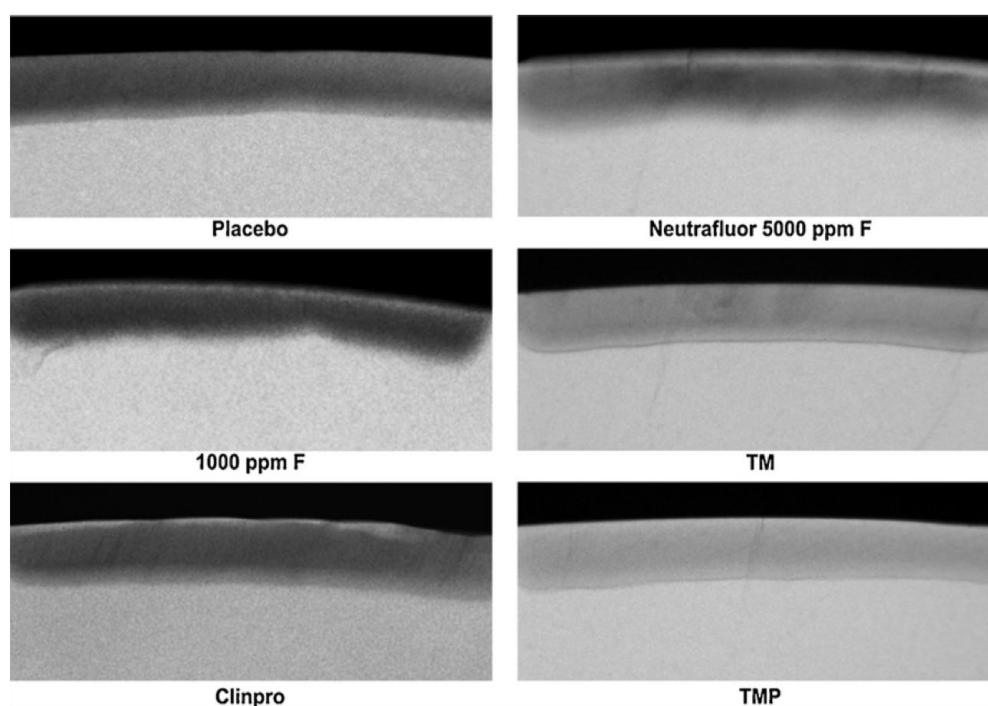


Figura 23 - Imagens de microrradiografia após a remineralização das lesões subsuperficiais das amostras. (Shen et al., 2011)

Taranath, Pai e Chakravarthy (2013) realizaram um outro estudo, neste caso para demonstrarem a eficácia do CPP-ACFP na remineralização de lesões de cárie iniciais no esmalte, em comparação com CPP-ACP *in vitro*. As amostras de esmalte testadas foram repartidas em 4 grupos consoante o agente aplicado: grupo 1 (CPP-ACP), grupo 2 (CPP-ACFP), controlo positivo (saliva artificial) e controlo negativo (soro fisiológico). Com o objetivo de simular lesões de cáries incipientes, as amostras foram desmineralizadas por ácido láctico durante 16 horas. Os agentes remineralizantes foram aplicados diariamente durante 14 dias, sendo posteriormente realizado outro ciclo de desmineralização. As amostras foram analisadas pelo sistema DIAGNOdent[®] no início do estudo, após a primeira desmineralização, após a remineralização pelos diferentes compostos e após a segunda desmineralização. A leitura dos resultados sugere que: valores entre 0-10 representam esmalte estruturalmente normal, entre 11-20 cáries superficiais de esmalte, entre 21-30 cáries profundas de esmalte e superiores a 30 cáries de dentina. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que tanto no início do estudo como na primeira desmineralização não se verificaram diferenças significativas entre os 4 grupos. Durante a

remineralização, os valores do controlo positivo e negativo foram consideravelmente mais elevados que o dos agentes remineralizantes, demonstrando a capacidade de remineralização das lesões iniciais de esmalte. Também na segunda desmineralização os valores mais elevados foram conseguidos pelo controlo negativo e positivo. Estes valores refletem o efeito protetor do CPP-ACP e do CPP-ACFP, impedindo perdas minerais maiores. Na segunda desmineralização, o CPP-ACFP apresentou um efeito de proteção do esmalte superior ao do CPP-ACP. A adição de fluoretos ao CPP-ACP foi responsável por este aumento, possibilitando a formação de FA mais estável e resistente ao ataque ácido, comparativamente com a HA. A figura 24 ilustra os resultados obtidos neste estudo.

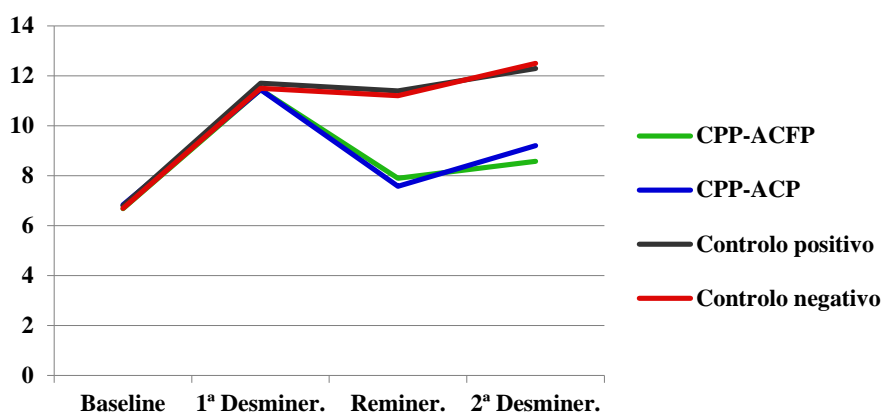


Figura 24 - Comparação dos resultados do DIAGNOdent® entre os diferentes grupos testados. (Adaptado de Taranath et al., 2013)

O estudo anterior sugere que tanto o CPP-ACP como CPP-ACFP são eficazes no tratamento de lesões iniciais de cárie. Porém, o CPP-ACP promove uma remineralização menos resistente a futuros ataques ácidos, ao contrário do que acontece com o CPP-ACFP. Ambos os compostos podem ser administrados de forma segura em crianças com elevado risco de cáries, pacientes sujeitos a tratamentos ortodônticos, erosão dentária e em casos de xerostomia. A sua única limitação é a intolerância à lactose, especialmente em crianças, pelo risco de deglutição dos agentes.

3. CONCLUSÃO

Cada vez mais se torna urgente a aplicação de medidas de forma a prevenir o aparecimento de cáries e a diminuir a sua incidência. Estas medidas incluem a introdução de pastas dentífricas fluoretadas na higiene oral diária, técnicas de higienização correctas assim como a sensibilização para as consequências do consumo excessivo e frequente de hidratos de carbono fermentáveis.

O exame objectivo deve ser complementado por meios auxiliares de diagnóstico de forma a possibilitar uma detecção mais eficaz das lesões de cárie. O papel do Médico Dentista é fulcral na identificação precoce destas lesões, de forma a determinar a abordagem terapêutica mais adequada. Na Medicina Dentária Conservadora, os tratamentos não invasivo das lesões iniciais de cárie (WSL) têm apresentado um desenvolvimento notório ao longo dos anos. Possibilitam o controlo da evolução da cárie, no sentido de maior perda de estrutura dentária e proporcionam, de forma progressiva, a recuperação dos aspectos estéticos comprometidos. Deste modo, têm vindo a contribuir para a diminuição da incidência de cáries.

A eficácia aplicação de agentes remineralizantes, nomeadamente o CPP-ACP, foi demonstrada pelos vários estudos mencionados ao longo deste trabalho. Verificou-se a sua eficaz ação remineralizadora nas WSL, tanto ao nível superficial como subsuperficial da lesão. Este efeito resulta da sua capacidade de manter elevados e estáveis os níveis de iões cálcio, fosfato e fluoreto na saliva e no fluído da placa bacteriana. Este complexo também demonstrou influência no alívio da sensibilidade dentária e na recuperação de lesões de erosão dentária, através da diminuição da profundidade das lesões e aumento da dureza do esmalte. Ao contrário do CPP-ACP, a aplicação de produtos fluoretados mostrou-se apenas eficaz na superfície da lesão. O ião fluoreto em contacto com os iões cálcio e fosfato livres, promove a formação rápida de FA na superfície da lesão, actuando como barreira à passagem de iões e não possibilitando a remineralização mais profunda da lesão. Contudo, a conjugação de CPP-ACP com o ião fluoreto mostrou ser vantajosa, uma vez que promove a remineralização das WSL e aumenta a resistência do esmalte a futuros ataques ácidos, pela presença de FA.

A biofuncionalidade do CPP-ACP como fonte de iões na cavidade oral foi demonstrado através de vários estudos. A biodisponibilidade de iões que este confere permite reverter as white spot lesions. Esta abordagem conservadora tem contribuído de

forma significativa para a diminuição da incidência de cáries, sendo este complexo um agente remineralizante eficaz e seguro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, P. V., Grégio, A. M., Machado, M. A., Lima, A. A., Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9 (3), 1-11
- Akin, M., Basciftci, F. A. (2012). Can white spot lesions be treated effectively?. *Angle Orthodontist*, 82 (5), 770-775. doi: 10.2319/090711.578.1
- Arul, A. S., Palanivelu, P. (2014). Biofilm forming ability of a new bacterial isolate from dental caries: an atomic force microscopic study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5 (2), 278-283. doi: 10.4103/0976-9668.136162
- Azarpazhooh, A., Limeback, H. (2008). Clinical efficacy of casein derivatives - a systematic review of the literature. *The Journal of American Dental Association*, 139 (7), 915-924. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0278
- 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. *European Journal of Oral Sciences*, 118 (6), 610-617. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00780.x
- Cai, F., Shen, P., Morgan, M., Reynolds, E. C. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions *in situ* by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal*, 48 (4), 240-243. doi: 10.1111/j.1834-7819.2003.tb00037.x
- Carvalho, F. G., Brasil, V. L., Silva Filho, T. J., Carlo, H. L., Santos, R. L., Lima, B. A. (2013). Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Brazilian Oral Research*, 27 (6), 463-470. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242013000600004>
- Chang, H. S., Walsh, L. J., Freer, T. J. (1997). Enamel demineralization during orthodontic treatment: aetiology and prevention. *Australian Dental Journal*, 42 (5), 322-3
- Chen, F., Wang, D. (2010). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opinion Ther Pat.*, 20 (5), 681-694. doi:10.1517/13543771003720491
- Choo-Smith, L. P., Dong, C. C., Cleghorn, B. (2008). Shedding new light on early caries detection. *Journal of the Canadian Dental Association*, 74 (10), 913-918

- Consolaro, A. (2006). Lesões cariosas incipientes e formação de cavidades durante o tratamento ortodôntico – é papel do ortodontista diagnosticar, prevenir e até tratar manchas brancas cariosas e não cariosas no esmalte?. *Revista Clínica de Ortodontia Dental Press*, 5 (4), 104-111
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of Dental Research*, 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. *Advances in Dental Research*, 24 (2), 41-47. doi: 10.1177/0022034512454294
- Cross, K. J., Huq, N. L., Palamara, J. R., Perich, J. W., Reynolds, E. C. (2005). Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (15), 15362-15369. doi: 10.1074/jbc.M413504200
- Cross, K. J., Huq, N. L., O'Brien-Simpson, N. M., Perich, J. W., Attard, T. J., Reynolds, E. C. (2007). The role of multiphosphorylated peptides in mineralized tissue regeneration. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13 (4), 479-495. doi: 10.1007/s10989-007-0105-0
- Cury, J. A., Tenuta, L. M. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. *Brazilian Oral Research*, 23 (1), 23-3
- Dawes, C. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *The Journal of American Dental Association*, 139 (2), 18s-24s. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0351
- Elkassas, D., Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42 (4), 466-474. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.017
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53 (3), 286-29. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00064.
- Featherstone, J. D., Lussi, A. (2006). Understanding the chemistry of dental erosion. *Monographs in Oral Science*, 20, 66-76. doi: 10.1159/000093351
- Ferrazzano, G. F., Cantile, T., Quarto, M., Ingenito, A., Chianese, L., Addeo, F. (2008). Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Australian Dental Journal*, 53 (4), 314-319. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00072.x

- Fejerskov, O., Kidd, E. (2008). *Dental caries – the disease and its clinical management*. 5ª edição. UK: Oxford, Elsevier.
- García-Godoy, F., Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface - the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of American Dental Association*, 139 (2), 25s-34s. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0352
- Gugnani, N., Pandit, I. K., Goyal, V., Gugnani, S., Sharma, J., Dogra, S. (2014). Esthetic improvement of white spot lesions and non-pitted fluorosis using resin infiltration technique: series of four clinical cases. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 32 (2), 176-180. doi: 10.4103/0970-4388.130996
- Gurunathan, D., Somasundaram, S., Kumar, S. (2012). Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Australian Dental Journal*, 57 (4), 404-408. doi: 10.1111/adj.12006
- Habelitz, S., Marshall, S. J., Marshall Jr, G. W., Balooch, M. (2001). Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Archives of Oral Biology*, 46 (2), 173-183
- He, L. H., Swain, M. V. (2008). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1 (1), 18-29. doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.05.001
- Hemagaran, G., Neelakantan, P. (2014). Remineralization of the tooth structure - the future of dentistry. *International Journal of PharmTech Research*, 6 (2), 487-493
- Kitts, 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. N., 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. *Australian Dental Journal*, 53 (1), 34-40. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.00006.x
- 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. *Journal of Dentistry*, 42 (7), 769-777. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
- Lima, J. (2007). Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12 (6), 119-130

- Little, E. M., Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *European Biophysics Journal*, 33 (5), 435-447. doi: 10.1007/s00249-003-0376-x
- Llena, C., Forner, L., Baca, P. (2009). Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 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. *Australian Dental Journal*, 55 (3), 275–279. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01234.x
- Marsh, P., Martin, M., Lewis, M. O., Williams, D., W. (2009). *Oral microbiology*. 5ª edição. UK
- MedlinePlus (2013). *Tooth Anatomy (image)*, disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1121.htm> consultado a 4/09/2014
- Melo, P., Azevedo, A., Henriques, M. (2008). Cárie dentária – a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 39 (6), 253-259. doi: 0873-9781/08/39-6/253
- Minglani, S., Aggarwal, V., Ahuja, B. (2010). Dentin hypersensitivity: recent trends in management. *Journal of Conservative Dentistry*, 13 (4), 3218-224. doi: 10.4103/0972-0707.73385
- Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2012). Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Research*, 46 (3), 234-267. doi: 10.1159/000338381
- Niu, L. N., Zhang, W., Pashley, D. H., Breschi, L., Mao, J., Chen, J. H., Tay F. R. (2013). Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*, 30 (1), 77-96. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.013
- Parveen, N., Lal, V., Hafeez, S., Ahmed, B. (2014). Clinical effectiveness of tooth mousse in dentinal hypersensitivity. *Pakistan Oral & Dental Journal*, 34 (2), 344-347
- Pliska, B. T., Warner, G. A., Tantbirojn, D., Larson, B. E. (2012). Treatment of white spot lesions with ACP paste and microabrasion. *Angle Orthodontist*, 82 (5), 765-769. doi: 10.2319/111611-710.1
- Ranjitkar, S., Kaidonis, J. A., Richards, L. C., Townsend, G. C. (2009a). The effect of CPP–ACP on enamel wear under severe erosive conditions. *Archives of Oral Biology*, 54 (6), 527–532. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.03.006>

- Ranjitkar, S., Rodriguez, J. M., Kaidonis, J. A., Richards, L. C., Townsend, G. C., Bartlett, D. W. (2009b). The effect of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *Journal of Dentistry*, 37 (4), 250-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2008.11.013>
- Recaldent™ (2014). *Where can I find Recaldent™?*, disponível em <http://www.recaldent.com> consultado a 12/09/2014
- Ren, Y., Jongsma, M. A., Mei, L., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2014). Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation - a potential public health threat?. *Clinical Oral Investigations*, 18 (7), 1711-1718. doi: 10.1007/s00784-014-1240-3
- Reynolds, E. C. (1998). Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Special Care in Dentistry*, 18 (1), 8-16
- Reynolds, E. C. (2008). Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence?. *Australian Dental Journal*, 53 (3), 268–273. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00061.x
- Robinson, C., Shore, R. C., Brokes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., Kirkham J. (2000). The chemistry of enamel caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11 (4), 481-495. doi: 10.1177/10454411000110040601
- Rose, R. K. (2000). Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Archives of Oral Biology*, 45 (7), 569-575. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00017-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00017-0)
- Rosier, B. T., De Jager, M., Zaura, E., Krom, B. P. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4 (92), 1-11. doi: 10.3389/fcimb.2014.00092
- Rošin-Grget, K., Peroš, K., Šutej, I., Bašić, K. (2013). The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, 42 (2), 179-188. doi: 10.5644/ama2006-124.85
- Sangamesh, B., Kallury, A. (2011). Iatrogenic effects of orthodontic treatment – review on white spot lesions. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 2 (5), 1-7
- Santhosh, B. P., Jethmalani, P., Shashibhushan, K. K., 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. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 30 (2), 146-150. doi: 10.4103/0970-4388.99990

- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2003). *Anatomia e Fisiologia*. 6ª edição. USA
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The 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. *Journal of Dentistry*, 39 (7), 518-525. doi: 10.1016/j.jdent.2011.05.002
- Stookey, G. K. (2008). The effect of saliva on dental caries. *The Journal of American Dental Association*, 139 (2), 11s-17s. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0347
- Subramaniam, P., Naidu, P. (2009). Effect of tooth Mousse plus and cervitec gel on S. mutans. *Journal of Minimum Intervention in Dentistry*, 2 (3), 164-169
- Sudjalim, T. R., Woods, M. G., Manton, D. J. (2006). Prevention of white spot lesions in orthodontic practice: a contemporary review. *Australian Dental Journal*, 51 (4), 284-289.
- Taranath, A., Pai, D., Chakravarthy, K. (2013). The role of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate products in remineralization of incipient enamel lesions and its substantivity. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 4 (1), 67-70. doi: 10.5455/jeim.261113.br.018
- Tehrani, M. H., Ghafournia, M., Samimi, P., Savabi, O., Parisay, I., Askari, N., Abtahi, S. H (2011). Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and acidulated phosphate fluoride gel on erosive enamel wear. *Dental Research Journal*, 8 (1), S64-S70
- Torwane, N. A., Hongal, S., Goel, P., Chandrashekar, B. R., Jain, M., Saxena, E. (2013). A clinical efficacy of 30% ethenolic extract of Indian propolis and recaldent™ in management of dentinal hypersensitivity: a comparative randomized clinical trial. *European Journal of Dentistry*, 7 (9), 461-468. doi: 10.4103/1305-7456.120675
- 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. *Contemporary Clinical Dentistry*, 1 (4), 210-213. doi: 10.4103/0976-237X.76385
- Walker G. D., Cai, F., Shen, P., Bailey, D. L., Yuan, Y., Cochrane, ... Reynolds, E. C. (2009). Consumption of milk with added casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate remineralizes enamel subsurface lesions *in situ*. *Australian Dental Journal*, 54 (3), 245-249. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01127.x

- Walsh, L. J. (2009). Contemporary technologies for remineralization therapies: a review. *International Dentistry SA*, 11 (6), 6-16
- West, N. X., Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42 (1), s2-s11. doi: 10.1016/S0300-5712(14)50002-4
- 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), 1-9. doi: 10.1088/0022-3727/46/40/404006
- Zong, H., Peng, L., Zhang, S., Lin, Y., Feng, F. (2012). Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. *European Food Research and Technology*, 235 (5), 811-816. doi: 10.1007/s00217-012-1809-5

