

(11) Número de Publicação: **PT 1689350 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 8/64 (2007.10) **A61K 8/98** (2007.10)
A61Q 11/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.12.01	(73) Titular(es): ARLA FOODS AMBA SKANDERBORGVEJ 277 8260 VIBY J DK
(30) Prioridade(s): 2003.12.01 DK 200301777 2003.12.01 US 525828 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.08.16	(72) Inventor(es): HANS BURLING SE ESBEN SKIPPER SORENSEN DK HANS BERTELSEN DK ANDERS STEEN JORGENSEN DK GITTE GRAVERHOLT DK
(45) Data e BPI da concessão: 2008.01.30 057/2008	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE OSTEOPONTINA EM FORMULAÇÕES DENTAIS**

(57) Resumo:
UTILIZAÇÃO DE OSTEOPONTINA EM FORMULAÇÕES DENTAIS

Resumo**"UTILIZAÇÃO DE OSTEOPONTINA EM FORMULAÇÕES DENTAIS"**

Utilização de osteopontina para reduzir o crescimento bacteriano na placa, sobre o esmalte dos dentes, e formulações dentais, contendo osteopontina.

Descrição

"UTILIZAÇÃO DE OSTEOPONTINA EM FORMULAÇÕES DENTAIS"

Área técnica da invenção

A presente invenção é relativa a formulações dentais. Em particular a invenção é relativa à utilização de osteopontina (OPN) para reduzir significativamente o crescimento bacteriano na placa, sobre o esmalte dos dentes.

Antecedentes da invenção

Ocorrem muitos problemas relacionados com os cuidados a ter com os dentes, quer cosméticos quer terapêuticos, tais como formação de placa dental, crescimento bacteriano na placa dental, cárie dental, calculus dental (tártaro), doença periodontal e desmineralização dos dentes.

A placa dental é um biofilme complexo que se acumula nos tecidos duros (dentes) na cavidade oral. Embora a placa compreenda mais de 500 espécies bacterianas, a colonização segue um padrão bem controlado com aderência dos colonizadores iniciais ao filme de saliva do esmalte dos dentes seguida de colonização secundária através de aderência bacteriana. É bem conhecido que um leque de espécies de estreptococos pertence aos colonizadores iniciais. Assim, é importante controlar a adesão destas bactérias. Uma variedade de adesinas e de interações moleculares estão subjacentes às interações adesivas e contribuem para o desenvolvimento da placa e em última análise para doenças tais como a cárie e a doença periodontal.

O esmalte dos dentes é constituído por hidroxiapatite. Na boca existe um equilíbrio natural entre, por um lado, a hidroxiapatite do esmalte dos dentes que se dissolve e, por outro lado, a hidroxiapatite que se forma à superfície ou no interior dos dentes a partir de substâncias que ocorrem naturalmente na saliva. Quando o equilíbrio é tal que a hidroxiapatite se dissolve, ocorre uma situação cariogénica que é referida como desmineralização.

É sabido desde há muito que a incorporação de iões fluoreto no esmalte dos dentes os protege da desmineralização. Assim, o fluoreto é frequentemente incorporado na pasta de dentes. No entanto o fluoreto pode dar origem a fluorose, especialmente se o doente engolir a pasta de dentes ou outro dentífrico ou produto de higiene oral, o que é frequentemente o caso, por exemplo nas crianças pequenas. Pode também ser um problema em áreas em que a água para beber contenha quantidades bastante elevadas de fluoreto.

O objectivo deste pedido de patente é o de propor a utilização de uma proteína originária do leite, a osteopontina, adicionada a uma formulação dental para controlar ou inibir o crescimento de bactérias na superfície dos dentes e assim prevenir ou reduzir a formação de placa e as cáries.

Há um par de patentes que descrevem a utilização de fracções de proteínas do leite, isto é hidrolisados de caseína, fosfopéptidos de Ca /CPP e glucomacro-péptido / GMP do primeiro coalho do leite, para reparar os danos no esmalte dos dentes com base na hipótese de que servem como fonte de fosfato de cálcio amorfo para o esmalte dos dentes.

- WO 03/059304 propõe uma composição para a higiene oral contendo uma fonte de ião fluoreto e fracção de CPP. Esta formulação estabiliza o fosfato de cálcio adicionado à formulação oral numa forma amorfa e ao mesmo tempo estabiliza o nível de fluoreto na formulação.

- WO 00/07454 descreve o GMP que, adicionado a uma formulação alimentar especial à base de leite, tem um efeito anticariogénico em ratos.

Em contraste com os péptidos CPP e GMP, a OPN introduz uma nova dimensão na cavidade oral, através do seu potencial para influenciar a ligação de organismos orais ao esmalte dos dentes e assim afectar o desenvolvimento de cáries. Como o CPP e o GMP, a OPN apresenta também um efeito sobre os níveis de fosfato de cálcio amorfo, na saliva, disponível para reparação dos dentes.

A OPN tem diversas funções no contexto da higiene dentária.

A grande vantagem da utilização da OPN em, por exemplo, pasta de dentes e solução para lavagem da boca é a de ser um componente de uma proteína natural do leite bovino e, assim, haver uma necessidade limitada de realizar ensaios clínicos.

Sumário da invenção

Surpreendentemente, foi agora mostrado que a osteopontina utilizada em formulações orais reduz a aderência e o crescimento bacteriano nas superfícies de esmalte dos dentes.

A invenção é relativa a composições orais, contendo osteopontina incluindo pasta de dentes, solução para lavagem da boca e goma para mascar bem como composições semelhantes.

Descrição detalhada da invenção

Um estudo *in vitro*, utilizando, um análogo de um dente, um disco de hidroxiapatite (HA) finamente polido mergulhado numa solução diluída de OPN produz um filme de OPN na superfície da HA, que não pode ser removida com água. Quando tais discos tratados foram colocados em contacto com saliva humana, verificou-se, surpreendentemente, que o filme de OPN reduzia significativamente a aderência e o crescimento bacteriano nas superfícies do análogo de dente, resultando numa formação de placa significativamente menor. Os ensaios foram realizados utilizando amostras de saliva de um grupo de doentes com diferentes idades e flora oral. Estes resultados implicam a utilização potencial da OPN em formulações orais, tais como pasta de dentes e solução para lavagem da boca, mas também como um ingrediente numa goma para mascar.

Assim, a invenção é relativa à utilização de osteopontina para a redução do crescimento bacteriano na placa sobre o esmalte dos dentes e a formulações para uso dental contendo osteopontina.

O termo "osteopontina" ou "OPN", tal como é aqui utilizado, significa osteopontina obtida a partir de leite, incluindo péptidos ou fragmentos de ocorrência natural derivados da OPN por clivagem proteolítica no leite ou pelas variantes de glicosilação, de fosforilação ou de "splicing" dos genes como se pode obter pelo método proposto na WO 01/49741. O leite pode ser leite de quaisquer animais produtores de leite, tais como vacas, camelos, cabras, ovelhas, dromedários e lamas. No entanto, a OPN do leite bovino é preferida devido à sua disponibilidade. Todas as quantidades são baseadas em OPN de leite bovino natural, mas podem facilmente ser corrigidas para as quantidades correspondentes de uma sua fracção activa ou para OPN de outra origem. A OPN ou os seus derivados podem também ser preparados por engenharia genética.

As formulações para uso dental podem ser qualquer dentífrico ou produto relacionado relevante para a higiene oral, tal como por exemplo pó dental, gel dental, solução para lavagem da boca, solução para pulverização bucal ou goma para mascar. A osteopontina (OPN) é uma proteína acídica, altamente fosforilada, rica em ácido siálico e ligante de cálcio. A OPN liga 28 mole de fosfato e cerca de 50 mole de cálcio por mole. O ponto isoeléctrico é de cerca de 3,0. A proteína existe em muitos tecidos no corpo e tem um papel como proteína de regulação e de sinalização. É uma proteína activa em processos de biomineralização. A OPN é expressada por determinados tipos de células incluindo células ósseas, células de músculo liso e células epiteliais.

A OPN encontra-se presente no leite bovino. Uma concentração típica é de 20 mg por litro.

A OPN pode ser isolada com relativa simplicidade por cromatografia aniônica, por exemplo, a partir de soro de leite ácido a pH 4,5, tal como descrito pela patente WO 01/497741 ou WO 02/28413. Pode facilmente ser obtida uma pureza até 90-95%.

A quantidade de osteopontina situa-se normalmente entre 50 mg de OPN e 1500 mg de osteopontina por kg de formulação dental. No entanto, uma quantidade menor também terá um efeito. Podem utilizar-se quantidades superiores, mas o efeito não será significativamente aumentado. Uma quantidade útil é 100 - 1000 mg de OPN por kg, de preferência 200 - 500 mg e a mais preferida de cerca de 350 mg. As quantidades superiores presumivelmente não proporcionarão melhores resultados e não são por isso recomendadas, dado que a OPN é um ingrediente bastante caro.

Composições preferidas da invenção em apreço encontram-se, como já referido, sob a forma de pastas dentífricas, geles dentais e pós dentais. Os componentes de tais pastas dentífricas e geles dentais incluem um ou mais dos seguintes: um abrasivo dental (de 10% a 50%), um surfactante (de 0,5% a 10%), um agente espessante (de 0,04% a 0,5%), um humectante (de 0,01% a 3%), um agente aromatizante (de 0,04% a 2%), um agente edulcorante (de 0,1% a 3%), um corante (de 0,01% a 0,5%) e água (de 2% a 45%). Agentes anticárie contêm de 0,001% a 1% de OPN. Agentes anti-calculus contêm de cerca de 0,1% a 13% de OPN.

É claro, que os pós dentais estão substancialmente livres de quaisquer componentes líquidos.

Outras composições preferidas da invenção em apreço são soluções dentais para lavagem da boca, incluindo soluções para

pulverização bucal. Os componentes de tais soluções para lavagem da boca e soluções para pulverização bucal incluem tipicamente um ou mais dos seguintes: água (de 45% a 95%), etanol (de 0% a 25%), um humectante (de 0% a 50%), um surfactante (de 0,01% a 7%), um agente aromatizante (de 0,04% a 2%), um agente edulcorante (de 0,1% a 3%) e um corante (de 0,001% a 0,5%), um agente anticárie incluindo OPN, de 0,001% a 1% e um agente anti-calculus (de 0,1% a 13%).

Uma terceira área de aplicação é, em termos gerais, em formulações de goma de mascar com diversas composições.

A invenção é ainda ilustrada pelos exemplos e ensaios seguintes.

EXEMPLOS

Antecedentes

Era objectivo deste estudo provar duas coisas:

A OPN liga-se a superfícies de hidroxiapatite de uma forma estável. O filme não pode ser removida enxaguando com água ou com um tampão.

A OPN influencia a aderência de bactérias à superfície de análogo de dente.

A capacidade da OPN de prevenir a formação de placa *in vitro* foi investigada neste estudo em discos de hidroxiapatite (HA) servindo como modelo do esmalte dos dentes. Os discos foram mergulhados em solução de OPN e subsequentemente incubados com saliva. O crescimento nos substratos foi estudado com contagem de bactérias de diferentes estirpes bacterianas formadoras de placa na Faculdade de Odontologia da Universidade de Malmö, Suécia.

Como referência para as superfícies de HA revestidas com OPN, utilizaram-se discos de HA não revestidos e tratados com BSA (albumina de soro bovino).

O estudo foi conduzido em amostras de saliva bem caracterizadas de 6 doadores como descrito abaixo.

Materiais e Métodos

Produtos químicos

A osteopontina foi preparada pela Aria Foods com uma pureza cromatográfica de 95%. A albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida à Sigma-Aldrich. O dodecilsulfato de sódio (SDS) foi obtido da Sigma (St. Louis, MO, EUA, L-6026). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e a água utilizada era de qualidade Milli-Q. Os pré-tratamentos de substratos e os ensaios de adsorção foram realizados em tampão de fosfato contendo 0,01 M fosfato e 0,05 M cloreto de sódio a pH 7. Todo o material de vidro e pontas de pipeta, etc., bem como os tampões foram esterilizados em autoclave. As soluções de

proteína utilizadas nos ensaios foram esterilizadas por filtração (ponto de corte 0,22 μ m).

Amostras de saliva

A saliva estimulada para os ensaios foi recolhida após mascar uma peça de parafina. Um sumário dos dados das amostras de saliva estimulada é apresentado no Apêndice 1.

Não foi admitida alimentação sólida ou líquida nas duas horas anteriores à colheita.

Substratos

Os discos de hidroxiapatite (HA), 10 mm de diâmetro, foram adquiridos ao Instituto Sueco de Cerâmica, Gotemburgo. Os discos nos estudos SEM foram polidos em ambas as faces de modo a que pudessem ser limpos por ultra-sons. Antes de se iniciarem os ensaios, os substratos (discos) foram tratados com uma solução de detergente suave e cuidadosamente enxaguados com água. Finalmente foram enxaguados com etanol e água. Os substratos foram armazenados em etanol a 70% até à utilização altura em que foram enxaguados com água e secos em caudal de azoto. Depois da secagem, os substratos utilizados em medições de elipsometria foram limpos a plasma com ar residual de baixa pressão (10-30 Pa) utilizando uma unidade de descarga incandescente em radiofrequência (Harrick PDC 3XG, Harrick Scientific Corp., Ossining, Nova Iorque).

Formação de filme bacteriano

As superfícies de substrato foram pré-incubadas durante 1 h em solução de proteína a 37°C. Os substratos foram então enxaguados com tampão e incubados a 37°C durante 40 h. Nos ensaios foi aplicada agitação durante o pré-tratamento e a incubação. Após a incubação os discos de HA foram enxaguados com tampão.

Elipsometria

A interacção da OPN com as proteínas da saliva em substratos HA foi seguida por elipsometria, que é um método óptico para medir as mudanças na polarização da luz após reflexão numa superfície (3). O instrumento utilizado foi um elipsómetro de filme fino de Rudolph, tipo 436 (Rudolph Research, Fairfield, N. J.), equipado com uma lâmpada de xénon filtrada para 4015 Å, e operada numa montagem como descrito por Landgren e Jönsson (1993). Para determinar os ângulos elipsométricos Δ e Ψ , para o substrato isolado foi determinada a posição de intensidade mínima. A partir das mudanças em Δ e Ψ após a adsorção foram calculados a espessura e o índice de refração para o filme de proteína adsorvida, de acordo com Mc-Crackin et al. (4) assumindo um filme homogéneo na superfície. A massa adsorvida, Γ (mg/m^2), foi calculada de acordo com Cuypers et al. (5). Tal como mostrado por estes autores, a massa adsorvida pode, para uma cobertura da superfície reduzida, ser determinada mais precisamente do que a espessura do filme e o índice de refração, e foi por essa razão apresentada aqui. Os valores da razão entre o peso molecular e a refractividade molar e do volume específico parcial utilizado foram respectivamente de 4,1

g/ml e 0,75 ml/g. Estes valores são habitualmente utilizados para proteínas e foram anteriormente aplicados em diversos ensaios relativos a adsorção de componentes da saliva (cf. (6,7)).

As superfícies preparadas, como descrito na secção do substrato acima, foram colocadas na cuvete do elipsómetro contendo tampão. Excepto quando indicado o contrário, a cuvete foi termostatada a 37°C e a solução foi agitada com um agitador magnético. Quando os ângulos elipsométricos se encontravam estáveis adicionou-se saliva para uma concentração final de 10% (v/v). A adsorção foi medida durante 1 h seguida de enxaguamento da cuvete com um caudal contínuo de tampão de 12 ml/min durante 5 min. A dessorção foi então seguida durante outros 25 min. Este foi o processo standard para a formação de película. De modo a obter-se uma medida das propriedades de coesão da película os ensaios incluíram uma adição final de SDS. No ensaio standard adicionou-se uma concentração 17 mM (duas vezes a cmc em água e aproximadamente nove vezes a cmc no tampão) e depois disso efectuou-se um enxaguamento final com tampão, 5 min após a adição de SDS.

Métodos para análises microbiológicas

Meio de cultura

Os meios de agar básicos utilizados para isolamento de microrganismos foram agar sangue (8), agar Mitis Salivarius (MSA, Difco Lab.), agar Mitis Salivarius-bacitracina (MSB) (9), agar Selectivo para Candida de acordo com Nickerson (Merck), agar Mac Conkey (Difco Lab) e meio 110 de Staphylococcus (Difco Lab).

Processos de Cultura para Amostras de Saliva

As amostras de saliva foram transportadas em meio convencional VMG II (preservação da viabilidade), misturadas no vortex nas 24 h após a recolha, diluídas e inoculadas em agares de sangue, de MSA e de MSB. O agar de sangue foi incubado numa câmara anaeróbica (10% de hidrogénio, 10% de dióxido de carbono em azoto) durante 4 dias, o agar de MSA numa atmosfera de 5% de dióxido de carbono durante 2 dias. O número total de unidades formadoras de colónia (CFU) nas placas de agar foi contado com o auxílio de um estereomicroscópio.

Remoção de microrganismos dos discos

Os microrganismos fixados aos discos foram removidos por sonicação num Vibracell Sonics com uma microponeta utilizando 10 impulsos de 1 s. A remoção das células por sonicação confirmou-se ser eficiente pela ausência de crescimento bacteriano observado.

Processos de cultura para amostras de dessorbato

As amostras de dessorbato foram misturadas no vortex, diluídas e inoculadas nos meios seguintes: agar de sangue, MSA, agar Selectivo para Candida, agar Mac Conkey e meio 110 de Estafilococos. O agar de sangue foi incubado numa câmara anaeróbica (10% de hidrogénio, 10% de dióxido de carbono em azoto) durante 5 dias, o MSA numa atmosfera de 5% de dióxido de

carbono durante 2 dias e o agar Selectivo para *Candida*, o agar Mac Conkey e o meio 110 de *Staphylococcus* aerobicamente durante 2 dias. O número total de CFU nos agares foi contado com a ajuda de um estereomicroscópio. O CFU no MSA foi analisado dando uma atenção especial à morfologia, tamanho e número de tipos de colónia diferentes. As células de colónias representativas de cada tipo morfológico foram coradas com Gram e inoculadas em agar de sangue para identificação posterior. Para futura caracterização, os isolados que cresciam em MSA foram mantidos a -79°C em leite desnatado (10% de leite desnatado em pó em água destilada, p/v, Oxoid Lab. L31, Hampshire, Reino Unido).

Identificação de isolados de *Streptococcus*

Os cocos Gram-positivos, catalase negativos, em cadeias foram considerados ser estreptococos e estes isolados serão identificados relativamente aos níveis de espécie e subespécie com base em características previamente descritas (10).

Resultados e discussão

De modo a investigar a interacção entre a OPN e a HA e a OPN e a saliva foi conduzido um ensaio de elipsometria. Na Fig.1 apresenta-se o efeito da temperatura de adsorção. A partir desta figura pode observar-se que a adsorção da OPN nas superfícies de HA ocorre quase instantaneamente. Uma quantidade mais elevada de OPN foi adsorvida a uma temperatura mais elevada (37°C), embora do enxaguamento resultasse alguma dessorção a 37°C até uma carga superficial estável de 1 mg por m^2 . Para simular o efeito químico

da lavagem com escova de dentes, adicionou-se SDS à cuvete durante 5 minutos, seguido de enxaguamento com tampão. Após este passo de limpeza não se verificou diferença significativa na quantidade adsorvida às duas temperaturas.

Os resultados obtidos indicam que a OPN dá uma cobertura da superfície dos discos de HA que é estável, embora se verifique uma redução da espessura do filme após enxaguamento com água e tratamento com SDS.

Formação de filme bacteriano

As contagens de bactérias apresentadas nas tabelas 1 e 2, sujeitas a dessorção por sonificação suave apresentam, para discos de HA tratados com soluções de OPN com concentrações de 0,1 mg/ml e 1mg/ml, respectivamente, um efeito significativo na aderência das bactérias em contagens totais em placas de agar de sangue e de agar de MSA para todos os dadores de saliva. Os discos de HA tratados com BSA ou saliva exibiam mais bactérias nas superfícies. As contagens totais de microrganismos foram 10 a 1000 vezes mais baixas em discos revestidos com OPN do que nos discos de controlo (saliva ou revestidos com BSA). As amostras de saliva estimulada apresentaram uma composição microbiana muito diversificada o que é considerado ser uma característica comum da microflora da saliva. De interesse foi a descoberta de que os discos revestidos com OPN apresentavam significativamente menos colonizações por estreptococos do que os discos de controlo.

Tabela 1.

Análise bacteriana de discos completos, polidos em ambas faces incubados em saliva estimulada após diferentes pré-tratamentos.

Contagem total (CFU) em placas de agar de sangue incubadas anaerobicamente.

Dador	Pré-tratamento	BSA	Saliva	OPN 0,1	OPN 1
ME		33000	6800	102	0
K		12600	5200	280	48
Br		45200	71400	8800	4800
ML		19900	41000	7100	13800
Be			6700	1280	3400

Tabela 2.

Análise bacteriana de discos completos, polidos em ambas faces incubados em saliva estimulada após diferentes pré-tratamentos.

Contagem total em Agar Mitis Salivarius incubado, facultativamente, anaerobicamente.

Dador	Pré-tratamento	BSA	Saliva	OPN 0,1	OPN 1
ME		19	50	15	0
K		9400	44	11	1
Br		1220	2140	480	960
ML		2190	360	30	90
Be		120	120	30	70

Sumário

Os resultados mostram um efeito claro do pré-tratamento com OPN de discos de HA sobre a quantidade de bactérias após incubação em saliva estimulada. O efeito anti-adesivo parece ser quase independente da concentração no intervalo investigado 0,1 - 1 mg/ml de solução de OPN para imersão dos análogos de dentes.

Para uma cobertura em mono-camada apenas é necessária uma pequena quantidade de OPN.

É interessante notar que há uma aderência de estreptococos significativamente menor nos discos revestidos com OPN comparativamente com os discos de controle.

REFERÊNCIAS

1. Hanh Berg, C, et al.
2. Dawes, C., "Rhythms in Salivary flow Rate and Composition", International Journal of Chronobiology, 2 (1974) 253-279.
3. Azzam, R. M. A. e Bashara, N. M., Ellipsometry and Polarized Light, North-Holland Amsterdam, 1977.
4. McCrackin, F. L., Passaglia, E., Stromberg, R. R. e Steinberg, H. L., "Measurement of the Thickness and Refractive Index of very Thin Films and Optical Properties of Surfaces by Ellipsometry", J. Res. Nat. Bur. Stand., A67 (1963) 363-377.
5. Cuypers, P. A., Corsel, J. W., Janssen, M. P., Kop, J. M. M., Hermens, W. T. e Hemker, H. C., "The adsorption of

- Prothrombin to Phosphatidylserine Multilayers Quantitated by Ellipsometry", *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 2426-2434.
6. Vassilakos, N., Arnebrant, T. e Glantz, P.-O., "Adsorption of Whole Saliva onto Hydrophylic and Hydrophobic Solid Surfaces. The Influence of Concentration, Ionic Strength and pH", *Scand. J. Dent. Res.*, 100 (1992) 346-353.
 7. Vassilakos, N., Arnebrant, T., Rundegren, J., e Glantz, P.-O., "In vitro Interactions of Anionic and Cationic Surfactants with Salivary Fractions on Well Defined Solid Surfaces", *Acta Odontol. Scand.*, 50 (1992) 179-188.
 8. Beighton, D., Russell RRB, Whaley, RA, "A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*", *Caries Res.*, 1991, 25: 174-178.
 9. Gold, OG, Jordan, HV, van Houte, J, "A selective medium for *Streptococcus mutans*" *Arch. Oral Biol.*, 1973, 18: 1357-1364.
 10. Holdeman, LV, Cato, EP, Moore, WEC, "Anaerobic Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

Lisboa, 11 de Março de 2008

Reivindicações

1. A utilização da osteopontina do leite para reduzir ou evitar o crescimento bacteriano na placa, sobre o esmalte dos dentes.
2. Uma formulação dental contendo 5 mg de osteopontina do leite a 1500 mg de osteopontina por kg de formulação.
3. Uma formulação dental, de acordo com a reivindicação 2, sob a forma de pasta de dentes, pó dental, gel dental, solução para lavagem da boca, solução para pulverização bucal ou goma para mascar.
4. Uma formulação dental, de acordo com a reivindicação 3, compreendendo 100 mg de osteopontina do leite a 1000 mg de osteopontina do leite por kg de formulação.
5. Uma formulação dental, de acordo com a reivindicação 4, compreendendo 200 mg de osteopontina do leite a 500 mg de osteopontina do leite por kg de formulação.
6. Uma formulação dental, de acordo com a reivindicação 5, compreendendo 350 mg de osteopontina do leite por kg de formulação.

Lisboa, 11 de Março de 2008

Figura 1.

Adsorção de OPN em disco de hidroxiapatite medida por elipsometria a diferentes temperaturas. R simboliza enxaguamento da superfície com tampão e SDS simboliza o enxaguamento com dodecilsulfato de sódio.

