

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 24/07/2022.

THAMIRES PRISCILA CAVAZANA SOUZA

Efeito do glicerofosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, na fisiologia, estrutura, composição da matriz, células cultiváveis, pH e nas concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato de biofilmes misto de *S. mutans* e *C. albicans*

Araçatuba

2020

THAMIRES PRISCILA CAVAZANA SOUZA

Efeito do glicerofosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, na fisiologia, estrutura, composição da matriz, células cultiváveis, pH e nas concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato de biofilmes misto de *S. mutans* e *C. albicans*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan

Coorientador: Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro

Araçatuba

2020

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729e Souza, Thamires Priscila Cavazana.
Efeito do glicerofosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, na fisiologia, estrutura, composição da matriz, células cultiváveis, pH e nas concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato de biofilmes misto de *S. mutans* e *C. albicans*/ Thamires Priscila Cavazana Souza. - Araçatuba, 2020

82 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessam

Coorientador: Prof. Douglas Roberto Monteiro

1. Fosfatos 2. Flúor 3. Biofilmes 4. *Streptococcus mutans*
5. *Candida albicans* I. T.

Black D27
CDD 617.645

Dedicatória

Aos meus pais, *Carlos e Rosana.*

Pelo amor incondicional, pelo exemplo de perseverança, por estarem sempre ao meu lado e fazerem dos meus sonhos, seus sonhos. Agradeço por toda dedicação e paciência que tiveram durante minha formação pessoal e profissional.

Minha gratidão e admiração por vocês são eternas!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À *Deus*,

por ter me sustentado até aqui, me dando forças e saúde para continuar a minha caminhada. Por me mostrar os caminhos que devo escolher e colocar pessoas brilhantes na minha vida, que me ajudam, me apoiam e me inspiram.

Aos meus pais, *Carlos* e *Rosana*, e meu irmão, *Murilo*,

pelo apoio e parceria em todas as batalhas da minha vida, por todo o carinho e amor que tem por mim. Vocês são a minha base.

Aos meus avós, *Zulmira*, *Aparecida* (*in memoriam*), *Waldemar* (*in memoriam*) e

Licurgo (*in memoriam*),

pelos exemplos e ensinamentos. Pelo amor, carinho, dedicação e valorização da nossa família. Vocês sempre estão no meu coração.

Ao meu marido, *Lucas*,

que sempre está ao meu lado me apoiando independente do que eu desejo. Me ensina, diariamente, a ser uma pessoa melhor. Obrigada pelo infinito apoio no decorrer da minha formação pessoal e profissional. Que você sempre esteja comigo nas minhas conquistas porque você faz parte delas! Agradeço também à toda sua família, que são presentes para mim, por sempre estarem ao nosso lado.

Ao meu orientador *Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem*,

por toda paciência e dedicação exemplar durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por ter acreditado em mim, ter me dado liberdade para expressar minha opinião e ter respeitado as minhas escolhas. Obrigada pela oportunidade memorável de aprender e conviver com o Senhor durante o meu doutorado.

Ao *Professor Juliano Pelim Pessan,*

um dos meus queridos coorientadores. Agradeço por ter me orientado sobre a possibilidade de continuar na pós graduação, sem o Senhor, não estaria vivendo este momento. Obrigada por todos ensinamentos, pela sua capacidade encantadora de explicar e nos encher de esperança que tudo dará certo. Sua forma humana de ensinar, se posicionar e de se relacionar com os alunos são inspiração para mim.

Ao *Professor Douglas Roberto Monteiro,*

por sua coorientação e por ser uma das peças chaves deste trabalho. Serei eternamente grata por toda sua paciência, competência, inteligência, humildade, acessibilidade e educação. Obrigada pela ótima convivência e pelo exemplo de profissional.

Aos demais professores de Odontopediatria, *Cristiane Duque, Robson Frederico Cunha, Celio Percinoto, Rosângela Santos Nery, Sandra Maria Herondina Avila de Aguiar,*

pela orientação constante, pela dedicação, por repartirem suas experiências de vida e auxiliarem-me a trilhar este caminho.

À minha amiga *Thayse Yumi Hosida,*

minha maior companheira da pós graduação. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência e principalmente pela sua amizade que vai muito além das portas do laboratório. Seu suporte foi fundamental para este momento! Gratidão por sempre estarmos juntas, independente da distância, e pelo companheirismo só aumentar, cada vez mais. Você me inspira, eu tenho muito orgulho de você!

Aos amigos *Caio e Leonardo,*

pela grande ajuda na realização da fase laboratorial deste trabalho. Vocês, com infinitos momentos de colaboração, foram fundamentais para finalização desta pesquisa. Espero que possamos dividir muito além de trabalhos futuros. Quero sempre estar por perto para aplaudir as conquistas de vocês! Obrigada, acima de tudo, pela amizade! Vocês são sensacionais, contem sempre comigo!

Aos meus amigos, *Bianca, Ana Paula, Taliana, Michelle, Jéssica e Luan Toro,*

que mesmo distantes, estão sempre presentes na minha vida. Sei e sinto que de uma forma ou de outra, estaremos sempre ligados pela linda amizade que nos une. Eu sempre estou torcendo pelo sucesso e realização de cada uma de vocês. Obrigada pelo eterno apoio!

Aos meus *amigos do departamento,*

agradeço por cada conversa, sorriso, ajuda e parceria. Serão sempre personagens especiais dessa etapa da minha vida.

À *Seção de Pós-Graduação* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP,

pelo profissionalismo e atenção que tiveram comigo, me orientando e instruindo os passos a serem realizados.

À *Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho",*

pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

À **CAPES/PROCAD 2013 Proc. n. 88881.068437/2014-01,**

pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Resumo

Souza, TPC. **Efeito do glicerofosfato de cálcio, associado ou não ao fluoreto, na fisiologia, estrutura, composição da matriz, células cultiváveis, pH e nas concentrações de fluoreto, cálcio e fosfato de biofilmes misto de *S. mutans* e *C. albicans*.** 2020. 82 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do glicerofosfato de cálcio (CaGP), associado ou não ao fluoreto (F), na fisiologia, pH e componentes da biomassa e fluido de biofilmes mistos contendo *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, formados *in vitro*. Para formação dos biofilmes colocou-se uma suspensão (1×10^7 células/mL de *C. albicans* + 1×10^8 células/mL de *S. mutans*) em saliva artificial, suplementada com sacarose, em poços de placas de microtitulação. A cada 24 horas, metade do conteúdo da saliva artificial era renovado. Após os períodos de 72, 78 e 96 horas de formação, os biofilmes recebiam tratamentos, por um minuto, com soluções contendo CaGP (0.125, 0.25 ou 0.5%) com ou sem 500 ppm F, e soluções contendo somente F (500 e 1100 ppm F), adotadas como controles positivos, e saliva artificial, considerada como controle negativo. Para estudo da fisiologia microbiológica, após o terceiro tratamento foram realizados os testes de quantificação de células cultiváveis, biomassa total (teste colorimétrico de cristal violeta), atividade metabólica (redução de XTT), análise estrutural do biofilme (microscopia eletrônica de varredura) e quantificação dos componentes da matriz extracelular (proteína, carboidrato e DNA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes. Os resultados foram submetidos à análise de variância a um critério, seguida pelo teste Fisher LSD ($p < 0.05$). Para estudo de pH e componentes do biofilme, após o período de tratamento, foram analisados F, cálcio (Ca) e fósforo (P) no biofilme total e no fluido do biofilme após a mensuração do pH do biofilme. Em outro conjunto de experimentos, após o terceiro tratamento, o biofilme foi exposto, por 3 minutos, à solução de sacarose a 20%. Esta foi removida e, após 1 minuto, analisou-se o pH do meio e as concentrações de F, Ca, e P tanto na biomassa como no fluido do biofilme. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes. Os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios, seguida pelo teste de Fisher LSD ($p < 0.05$). O CaGP, independente da sua concentração, reduziu significativamente o número de células bacterianas em comparação com o controle negativo. CaGP + F aumentaram a biomassa e a atividade metabólica do biofilme e reduziram os componentes da matriz extracelular avaliada. Os tratamentos com CaGP e 500 ppm F levaram aos maiores valores de pH e concentrações de F e Ca da biomassa do biofilme, antes e após a exposição à sacarose. CaGP, sem F, levou a

maiores concentrações de Ca e P no fluido do biofilme. Assim, é possível concluir que o CaGP interfere na biomassa, metabolismo, composição orgânica e inorgânica, bem como no pH do biofilme testado. Essas informações contribuem para o conhecimento de como CaGP atua na dinâmica de um biofilme relacionado com a doença cárie.

Palavras-chaves: fosfato, flúor, biofilmes, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Abstract

Souza, TPC. **Effect of calcium glycerophosphate, associated or not with fluoride, on the physiology, structure, matrix composition, cultivable cells, pH and on the concentrations of fluoride, calcium and phosphate of mixed biofilms of *S. mutans* and *C. albicans*.** 2020. 82 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of calcium glycerophosphate (CaGP), associated or not to fluoride (F), on the physiology, pH and components of biofilm biomass and fluid of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, formed *in vitro*. For the formation of biofilms, a suspension was placed (1×10^7 cells/mL *C. albicans* + 1×10^8 cells/mL *S. mutans*) in artificial saliva, supplemented with sucrose, in wells of microtiter plates. Every 24 hours, half of the artificial saliva content was renewed. At 72, 78 and 96 hours after the beginning of formation, biofilms were treated for one minute with solutions containing CaGP (0.125, 0.25 ou 0.5%) with or without 500 ppm F, and solutions containing only F (500 and 1100 ppm F), adopted as positive controls, and Artificial Saliva, considered as the negative control. For the study of microbiological physiology, after the third treatment, tests were performed: quantification of cultivable cells, total biomass (colorimetric crystal violet test), metabolic activity (XTT reduction), structural analysis of the biofilm (scanning electron microscopy) and quantification of matrix components (protein, carbohydrate and DNA). All assays were performed in triplicate on three different occasions. The results were submitted to one-way analysis of variance, followed by the Fisher LSD's test ($p < 0.05$). For the study of pH and biofilm components, after the last treatment, F, calcium (Ca) and phosphorus (P) were analyzed in the total biofilm and in the biofilm fluid after measuring the biofilm pH. In another set of experiments, after the third treatment, the biofilms were exposed for 3 minutes to 20% sucrose solution. This was removed and after 1 minute the biofilms were collected, and the pH of the medium and F, Ca, and P concentrations were determined both in the biomass and in the biofilm fluid. All assays were performed in triplicate on three different occasions. Data were submitted to two-way analysis of variance, followed by Fisher LSD's test ($p < 0.05$). CaGP, regardless of their concentration, significantly reduced the number of bacterial cells compared to the negative control. CaGP + F increased the biomass and metabolic activity of the biofilm and reduced the components of the extracellular matrix evaluated. Treatments with CaGP and 500 ppm F led to the highest pH values and F and Ca concentrations of the biofilm biomass, both before and after sucrose exposure. CaGP, without F, led to higher Ca and P concentrations

in the biofilm fluid. Thus, it is possible to conclude that CaGP interferes in the biomass, metabolism, organic and inorganic composition and the pH of the biofilm tested. This information contributes to the knowledge of how CaGP acts in the dynamics of a biofilm related to caries disease.

Keywords: phosphate, fluoride, biofilm, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figure 1 Absorbance values per cm² obtained for quantification of total biomass (a) and metabolic activity (b), and logarithm of colony-forming units per cm² for *S. mutans* (c) and *C. albicans* (d) in dual-species biofilms. NC: negative control (untreated biofilms). Error bars denote the standard deviations of the means. Different letters symbolize statistical differences among the groups ($p < 0.05$). 42
- Figure 2 SEM images of dual-species biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* after treatment with different experimental solutions. Magnification: 5,000 ×. Bars: 2mm. 43

Capítulo 2

- Figure 1 Mean values of F(A), Ca(B), P(C) and CaGP(D) in µg/mL of biofilm fluid, before and after contact with sucrose. Distinct upper- and lower-case letters indicate statistical difference between experimental conditions (no sucrose and sucrose) and among the groups (Fisher LSD's test; $p < 0.05$). 62
- Figure 2 Mean values of F(A), Ca(B), P(C) and CaGP (D) in µg/mL of biofilm biomass, before and after contact with sucrose. Distinct upper- and lower-case letters indicate statistical difference between experimental conditions (no sucrose and sucrose) and among the groups (Fisher LSD's test; $p < 0.05$). 63

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Table 1. Mean values (SD) of each component of the extracellular matrix of dual-species biofilms obtained after treatment with different concentrations of CaGP, associated or not to F. Different upper case letters symbolize statistical differences among the groups ($p < 0.05$). 41

Capítulo 2

- Table 1. Mean values (standard deviation) of pH of the biofilm after contact with sucrose. Distinct upper- and lower-case letters indicate statistical difference between experimental conditions (no sucrose and sucrose), and among the treatment groups, respectively (Fisher LSD's test; $p < 0.05$). 59
- Table 2. Degree of saturation values (standard deviation) in relation to hydroxyapatite (HA) and calcium fluoride (CaF₂) from biofilm fluid, before (no sucrose) and after (sucrose) contact with sucrose according to the groups. Distinct upper- and lower-case letters indicate statistical difference between experimental conditions (no sucrose and sucrose) and among the treatment groups, respectively (Fisher LSD's test; $p < 0.05$) 60
- Table 3. Possible formations of CaHPO₄⁰, HPO₄⁻² and HF⁰ in the biofilm fluid before and after contact with the sucrose. Distinct upper- and lower-case letters indicate statistical difference between experimental conditions (no sucrose and sucrose) and among the groups (Fisher LSD's test; $p < 0.05$). 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.m.	<i>Ante Meridiem</i>
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância/ <i>Analysis of Variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido Bicinchoninico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
CaHPO ₄ ⁰	Fosfato bicálcico
CaGP	Glicerofosfato de cálcio
CFU	Unidades formadoras de colônia/ <i>Colony-forming units</i>
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Cristal Violeta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DS	<i>Degree of saturation</i>
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i>
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
F	Flúor
Fig	Figura
g	Gramas
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
HF	Ácido fluorídrico
HPO ₄ ²⁻	Hydrogen phosphate
IA	Atividade Iônica
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>
KCl	Cloreto de potássio

l	Litro
Log ₁₀	Logaritmo de base 10
mg	Miligramas
Mg	Magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mmol L ⁻¹	Millimolar
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NC	Controle Negativo/ <i>Negative Control</i>
nm	Nanometro
<i>p</i>	<i>Probability</i>
P	Fósforo
p.m.	<i>Post meridiem</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
rpm	Rotações por Minuto
s	Segundos
SD	Desvio Padrão/ <i>Standard Deviation</i>
SDA	<i>Sabouraud dextrose agar</i>
SEM	Microscópio eletrônico de varredura/ <i>Scanning electron microscope</i>
TISAB	<i>Total Ionic Strength Adjustment Buffer</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNOESTE	Universidade do Oeste Paulista
XTT	<i>(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2H-Tetrazolium-5Carboxanilide)</i>
μ	Micro
μg	Microgramas
μl	Microlitros
°C	Graus Celsius
g	Gravidade

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	22
2. Capítulo 1 - Effect of calcium glycerophosphate and fluoride on dual-species biofilms of <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Candida albicans</i>	
2.1 ABSTRACT	28
2.2 INTRODUCTION	29
2.3 MATERIALS AND METHODS	30
2.4 RESULTS	33
2.5 DISCUSSION	34
2.6 REFERENCES	38
3. Capítulo 2 – Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Candida albicans</i>	
3.1 ABSTRACT	46
3.2 INTRODUCTION	47
3.3 MATERIALS AND METHODS	48
3.4 RESULTS	50
3.5 DISCUSSION	52
3.6 REFERENCES	56
APÊNDICE	64
ANEXOS	68

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária é uma das doenças mais antigas e comuns dos seres humanos. O termo cárie tem origem do latim que significa decadência e foi utilizada para descrever os orifícios nos dentes (RATHEE; SAPRA, 2019). Em resumo, ela é ocasionada pela produção bacteriana de ácidos a partir de carboidratos fermentáveis da dieta, a qual progressivamente desmineraliza a estrutura dentária (CUMMINS; BOWEN, 2006). Atualmente esta doença é considerada um problema de saúde pública, conceituada um processo dinâmico, multifatorial (VELO *et al.*, 2019) que depende de sacarose e biofilme (SHEIHAM; JAMES, 2015).

O biofilme dental é um conjunto de microrganismos nos quais as células aderem a uma superfície e/ou umas às outras (RATHEE; SAPRA, 2019). A estrutura do biofilme aumenta a cariogenicidade das bactérias produtoras de ácido, protegendo-as da defesa do hospedeiro uma vez que, esse agregado celular é envolto por uma matriz orgânica autoproduzida de polissacarídeos, proteínas e DNA (RATHEE; SAPRA, 2019). Sendo assim, o acúmulo de biofilme faz com que os microrganismos metabolizem eficientemente a sacarose (açúcar ou polímeros, tais como amido) para produzir grande quantidade de ácido láctico capaz de solubilizar o componente mineral do dente e iniciar o processo de cárie (MARSH; MARTIN, 2009; LAMONT *et al.*, 2006).

A bactéria gram positiva *Streptococcus mutans* é um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária, devido à sua capacidade de colonizar a superfície dental, metabolizar carboidratos, produzir ácido láctico, além de ter a capacidade de crescer e se multiplicar em ambiente ácido (MARSH; MARTIN, 2009; LAMONT *et al.*, 2006). O processo de formação de biofilme inicia-se com o revestimento da superfície do dente pela película salivar (BOWEN; KOO, 2011; ZIJNGE *et al.*, 2010). Várias adesinas de bactérias odontopatogênicas interagem com as glicoproteínas salivares da película adquirida na superfície dos dentes, por meio de ligação a cátions bivalentes. Na presença de sacarose, as bactérias aderem-se firmemente à superfície como resultado da produção de exopolissacarídeos (glucanos) por meio da atividade da enzima glicosiltransferase (MARSH; MARTIN, 2009).

Apesar de *S. mutans* ser citado frequentemente como o principal agente patógeno nos casos de cárie dentária, especialmente em cárie na primeira infância, este microrganismo não age sozinho. A levedura *Candida albicans* é comumente detectado nas superfícies da

mucosa humana e que muitas vezes participa na formação de biofilmes polimicrobianos em superfícies de tecidos moles e acrílicos. Estudo demonstrou que nos casos de cárie precoce da infância, *C. albicans* está frequentemente associada na placa bacteriana patogênica (FALSETTA *et al.*, 2014; HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017; JEAN *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2018). Observa-se um aumento de *S. mutans* quando *C. albicans* está presente em biofilmes associados a cárie da primeira infância (KIM *et al.*, 2017).

O meio ácido entre biofilme/dente modifica o equilíbrio mineral entre o esmalte e o ambiente circundante, induzindo a desmineralização, ou seja, a destruição dos cristais de hidroxiapatita (HA) que formam o dente (DAWES, 2003). Ocorrem períodos de desmineralização e remineralização da estrutura dentária e, quando a desmineralização predomina, ocorre a lesão de cárie (ARIFA; EPHRAIM; RAJAMANI, 2019). Como principais componentes dos HA, as concentrações de cálcio e fosfato na saliva e biofilme desempenham um papel fundamental na influência dos processos de desmineralização e remineralização dentária (LI *et al.*, 2014).

A utilização de produtos fluoretados levaram um declínio de cárie no mundo todo (PERES *et al.*, 2019) pois o fluoreto (F) aumenta a resistência do dente ao ataque ácido, sendo um componente essencial na prevenção desta doença (SHAHROOM; MANI; RAMAKRISHNAN, 2019). A utilização dos dentifrícios contendo F atrelado a escovação dos dentes é considerado o melhor método preventivo da cárie dentária, visto que associa a remoção ou desorganização periódica do biofilme dental com as propriedades cariostáticas do F (PESSAN *et al.*, 2006; TENUTA *et al.*, 2009). O F tem seu efeito pela formação de produtos da sua reação com a estrutura dental e formando o fluoreto de cálcio (CaF_2) que, quando depositado no biofilme dental em lesões de cáries iniciais, é capaz de reduzir a sua progressão (CRUZ; ROLLA, 1991). A desvantagem do uso de dentifrícios fluoretados por crianças pequenas é que elas engolem quantidade deste e assim apresentam um risco subsequente de fluorose (WALSH *et al.*, 2019). Este produto pode ser responsável por até 80% da ingestão diária total ideal de flúor, sendo os três primeiros anos de vida mais críticos (MEJÀRE, 2018).

Esta condição impulsiona a busca por estratégias que visam reduzir a quantidade de F e, concomitantemente, potencializa os efeitos preventivos de produtos fluoretados. Destas estratégias, destaca-se a importância do uso de derivados de fosfato de cálcio. Estudos *in vitro* e *in situ* demonstraram que dentifrícios com concentração reduzida de F suplementados com glicerofosfato de cálcio (CaGP) apresentam efeito semelhante à de

um dentifrício convencional (1.100 ppm F) sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dental (DO AMARAL *et al.*, 2013; ZAZE *et al.*, 2014a; ZAZE *et al.*, 2014b). Tais achados foram confirmados em um estudo clínico randomizado controlado, no qual a progressão de cárie em dentes decíduos foi semelhante em crianças que utilizaram um dentifrício contendo 500 ppm F e CaGP em comparação a crianças utilizando uma formulação convencional contendo 1100 ppm F (FREIRE *et al.*, 2016). Em relação aos efeitos do CaGP sobre o biofilme dental, estudo *in situ* observou que este fosfato orgânico com 500 ppm F não aumenta a concentração de Ca no fluido do biofilme (NAGATA *et al.*, 2017) e outro observou que não houve diferença entre a composição inorgânica da placa que recebeu CaGP-F e 1100 ppm F (DO AMARAL *et al.*, 2013). Em uma revisão de literatura sobre os efeitos anti-cárie deste polifosfato concluiu que a elevação dos níveis de Ca na placa é a explicação mais provável para o potencial anti-cárie do CaGP (LYNCH, 2004).

Fosfatos inorgânicos como o trimetafosfato de sódio e o hexametafosfato de sódio, mostraram modificações não só em componente orgânicos de biofilmes (CAVAZANA *et al.*, 2019a; HOSIDA *et al.*, 2017) como também em inorgânicos e nos valores de pH antes e após esse biofilme ser exposto à sacarose (CAVAZANA *et al.*, 2019b; SAMPAIO *et al.*, 2018). Com base no exposto, torna-se evidente que o efeito do CaGP-F sobre o esmalte dentário apresenta relatos científicos, enquanto os dados sobre os efeitos da associação CaGP-F sobre o biofilme dental ainda são escassos e conflitantes. Este aspecto reforça a necessidade de estudos adicionais avaliando os efeitos do F e do CaGP sobre o biofilme, especialmente envolvendo métodos analíticos complementares aos utilizados nos estudos supracitados, para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação destes íons sobre a cárie dentária.

Desta forma, seria interessante conduzir um estudo *in vitro* avaliando os efeitos da associação entre F e CaGP: sobre a composição orgânica e metabolismo de um biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*, sobre a retenção de F, P e Ca no biofilme total e no fluido do biofilme (antes e após a exposição deste à sacarose), e sobre o pH deste biofilme. Para abordar o tema proposto, o estudo será apresentado em dois capítulos distintos:

- Capítulo 1: **“Effect of calcium glycerophosphate and fluoride on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*”**

(artigo preparado para a submissão ao periódico Biofouling)

- Capítulo 2: **“Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*”**

(artigo preparado para a submissão ao periódico The International Journal of Biochemistry & Cell Biology)

APÊNDICE

Referências da Introdução Geral

ARIFA MK, EPHRAIM R, RAJAMANI T. Recent advances in dental hard tissue remineralization: a review of literature. **Int J Clin Pediatr Dent.**, v. 12, n. 2, p. 139-144, Mar-Apr 2019.

BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, v. 45, n.1, p. 69–86, Feb 2011.

CAVAZANA, T.P.; HOSIDA, T.Y.; PESSAN, J.P.; SAMPAIO, C.; MONTEIRO, D.R.; DELBEM, A.C.B. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. **Biofouling**, v. 27, p. 1-9, Aug 2019.

CAVAZANA, T.P.; PESSAN, J.P.; HOSIDA, T.Y.; SAMPAIO, C.; AMARANTE, V.O.Z.; MONTEIRO, D.R.; DELBEM, A.C.B. Effects of sodium trimetaphosphate, associated or not to fluoride, on the composition and pH of mixed biofilms, before and after exposure to sucrose. **Caries Res**, 2019b. No prelo.

CRUZ, R.A.; RÖLLA, G. A importância do fluoreto de cálcio como reservatório de flúor na superfície do esmalte dentário. **Rev. odontol. Univ. São Paulo.**, v. 5, n. 2, p. 134-39, Jul-Dez, 1991.

CUMMINS, D.; BOWEN, W.H. Biotechnology in oral care. Cosmetic Science and technology series. **Biotech in Personal Care.**, v. 29, n. 13, p. 23-52, 2006.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J Can Dent Assoc.**, v. 69, n. 11, p. 722–724, Dec 2003.

DO AMARAL, J.G.; SASSAKI, K.T.; MARTINHON, C.C.R; DELBEM, A.C.B. Effect of lowfluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization *in situ*. **Am J Dent.**, v. 26, n. 2, p. 75-80, Apr 2013.

FALSETTA, M.L.; KLEIN, M.I.; COLONNE, P.M.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; PAI, C.H.; GONZALEZBEGNE, M.; WATSON, G.; KRYSAN, D.J.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1968-1981, May 2014.

- FREIRE, I.R.; PESSAN, J.P.; AMARAL, J.G.; MARTINHON, C.C.R.; CUNHA, R.F.; DELBEM, A.C. Anticaries Effect of Low-Fluoride Dentifrices with Phosphates in Children: a Randomized, Controlled Trial. **J Dent.**, v. 50, p. 37-42, Jul 2016.
- FRENCKEN, J.E.; SHARMA, P.; STENHOUSE, L.; GREEN, D.; LAVERTY, D.; DIETRICH, T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **J Clin Periodontol.**, v. 44, p. S94–S105, Mar 2017.
- HAJISHENGALLIS, E.; PARSAEI, Y.; KLEIN, M.I.; KOO, H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. **Mol Oral Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 24–34, Feb 2017.
- HOSIDA, T.Y.; CAVAZANA, T. P.; MONTEIRO, D.R.; PESSAN, J.P.; DELBEM, A.C.B. Efeitos de soluções contendo hexametáfosfato de sódio sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. In: 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 2017, Campinas. **Anais Brazilian Oral Research**, 2017. v. 31. p. 303-303.
- JEAN, J.; GOLDBERG, S.; KHARE, R.; BAILEY, L.C.; FORREST, C.B.; HAJISHENGALLIS, E.; KOO, H. Retrospective analysis of Candida-related conditions in and early childhood caries. **Pediatric Dent.**, v. 40, n. 2, p. 131–135, Mar 2018.
- KIM, D.; SENGUPTA, A.; NIEPA, T.H.R.; LEE, B.H.; WELJIE, A.; FREITAS-BLANCO, V.S.; RAMIRO, M.; MURATA, R.M.; STEBE, K.J.; LEE, D.; KOO, H. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. **Sci Rep.**, v. 7, p. 41332, Jan 2017.
- LAMONT, R.J.; BURNE, R.A.; LANTZ, M.S.; LEBLANC, D.J. **Oral Microbiology and Immunology**. USA: American Society for Microbiology Press; 2006.
- LI, X.; WANG, J.; JOINER, A.; CHANG, J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. **J Dent.**, v. 42, p. S12-20, Jun 2014.
- LYNCH, R.J. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. **Int Dent J.**, v. 4, p. 310-314, 2004.
- MARSH, P.D.; MARTIN, M.V. **Oral Microbiology**. 5th edition. United Kingdom: Churchill Livingstone, 2009.
- MEJÀRE, I. Current guidance for fluoride intake: is it appropriate? **Adv Dent Res.**, v. 29, n. 2 p. 167-176, Mar 2018.

NAGATA, M.E.; DELBEM, A.C.B.; HALL, K.B.; BUZALAF, M.A.R.; PESSAN, J.P. Fluoride and calcium concentration in the biofilm fluid after use of fluoridated dentifrices supplemented with polyphosphate salts. **Clin Oral Investig.**, v. 21, n. 3, p. 831-837, Apr 2017.

PERES, M.A.; MACPHERSON, L.M.D; WEYANT, R.J.; DALY, B.; VENTURELLI, R.; MATHUR, M.R.; LISTL, S.; CELESTE, R.K.; GUARNIZO-HERREÑO, C.C.; KEARNS, C.; BENZIAN, H.; ALLISON, P.; WATT, R.G. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet.**, v. 394, p. 249-60, Jul 2019.

PESSAN, J.P.; SICCA, C.M.; DE SOUZA, T.S.; DA SILVA, S.M.; WHITFORD, G.M.; BUZALAF, M.A. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. **Eur J Oral Sci.**, v. 114, n. 6, p. 489-493, Dec 2006.

RATHEE, M.; SAPRA, A. Dental Caries. **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Nov 2019 - 15.

SAMPAIO, C.; HOSIDA, T.Y.; CAVAZANA, T.P.; MONTEIRO, D.R.; PESSAN, J.P.; DELBEM, A.C.B. Avaliação do hexametáfosfato de sódio, associado ou não ao fluoreto, em biofilme misto antes e após a exposição à sacarose. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica SBPqO, 2018, Campinas. **Anais Brazilian Oral Research**, 2018. v. 32. p. 50.

SHAHROOM, N.S.B.; MANI, G.; RAMAKRISHNAN, M. Interventions in management of dental fluorosis, an endemic disease: a systematic review. **J Family Med Prim Care.**, v. 8, n. 10, p. 3108-3113, Oct 2019.

SHEIHAM, A.; JAMES, W. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **J Dent Res.**, v. 94, n. 10, p. 1341-1347, Oct 2015.

TENUTA, L.M.; ZAMATARO, C.B.; DEL BEL CURY, A.A.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 43, n. 4, p. 278-285, May 2009.

VELO, M.M.A.C.; Scotti, C.K.; da Silveira, I.T.T.; Mondelli, R.F.L.; Atta, M.T.; Bombonatti, J.F. Management of dental caries guided by the ICDAS-LAA: a 28-month follow-up. **Gen Dent.**, v. 67, n. 5, p. 24-28, Sep-Oct 2019.

WALSH, T.; WORTHINGTON, H.V.; GLENNY, A.M.; MARINHO, V.C.C.; JERONCIC, A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. **Cochrane Database of Syst Rev**, Issue 3. Mar 2019.

XIAO, J.; HUANG, X.; ALKHERS, N.; ALZAMIL, H.; ALZOUBI, S.; WU, T.T.; CASTILLO, D.A.; CAMPBELL, F.; DAVIS, J.; HERZOG, K.; BILLINGS, R.; KOPYCKA-

KEDZIERAWSKI, D.T.; HAJISHENGALLIS, E.; KOO, H. *Candida albicans* and early childhood caries: a systematic review and meta-analysis. **Caries Research.**, v. 52, n. 1-2, p. 102-112, Dec 2018.

ZAZE, A.C.S.F.; DIAS, N.A.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. **Clin Oral Invest.**, v. 18, n. 6, p. 1619–1624, Jul 2014 (a).

ZAZE, A.C.; DIAS, A.P.; AMARAL, J.G.; MIYASAKI, M.L.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C. *In situ* evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. **J Dent.**, v. 42, n. 12, p. 1621-1625, Dec 2014 (b).

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M.B.; DEGENER, J.E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSSEN, H.J. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**; v. 5, n. 2, p. e9321, Feb 2010.