

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/07/2024.

IGOR RENAN ZEN

**Efeito de soluções ou dentifrícios contendo
trimetafosfato de sódio, xilitol, eritritol e fluoreto, em
diferentes associações, sobre biofilmes de interesse
cariogênico**

Araçatuba
2022

IGOR RENAN ZEN

**Efeito de soluções ou dentifrícios contendo
trimetafosfato de sódio, xilitol, eritritol e fluoreto, em
diferentes associações, sobre biofilmes de interesse
cariogênico**

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 Ciência Odontológica – Área: Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan

Coorientadores: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro

Araçatuba
2022

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Zen, Igor Renan.

Z54e Efeito de soluções ou dentifrícios contendo trimeta-
fosfato de sódio, xilitol, eritritol e fluoreto, em diferentes
associações, sobre biofilmes de interesse cariogênico /

Igor Renan Zen. - Araçatuba, 2022

128 f. : il. ; tab.

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

Orientador: Prof. Juliano Pelim Pessan

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Douglas Roberto Monteiro

1. Fluoretos 2. Biofilmes 3. Fosfatos 4. Xilitol
5. Eritritol I. T.

Black D27
CDD 617.645

Zen, IR. **Efeito de soluções ou dentifrícios contendo trimetafosfato de sódio, xilitol, eritritol e fluoreto, em diferentes associações, sobre biofilmes de interesse cariogênico.** 2022. 128 f. (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2022.

RESUMO GERAL

Este estudo avaliou o efeito de dentifrícios ou soluções contendo trimetafosfato de sódio(TMP), xilitol(X), eritritol(E) e fluoreto(F), em diferentes associações, sobre cepas e biofilmes cariogênicos. Três subprojetos (SP1, SP2 e SP3) apresentaram os objetivos: SP1) Avaliar o efeito de dentifrícios contendo “TMP(0,25%)”, “X(16%)”, “E(4%)”, “F(200 e 1100 ppm)” sozinhos ou em diferentes associações, sobre cepas isoladas de *Streptococcus mutans*(SM), *Lactobacillus casei*(LC), *Actinomyces israelii*(AI) e *Candida albicans*(CA). SP2) Avaliar o efeito de soluções contendo “TMP”(0,075%), “X”(4,8%), “E”(1,2%), “F”(60 e 330 ppm) e saliva artificial pura, sozinhos ou em diferentes associações sobre biofilmes mistos de SM e CA. SP3) Avaliar o efeito das mesmas soluções de SP2 sobre biofilmes microcosmos patogênicos com a incorporação ou não de SM. No SP1, cepas de SM, LC, AI e CA foram incorporadas ao meio de BHI-água, vertidas em placas, realizados poços no ágar e diferentes diluições de slurries dos dentifrícios foram adicionados. Os halos foram medidos com paquímetro digital. A análise estatística se deu por ANOVA dois critérios, e teste de Tukey HSD ($p<0,05$). Para SM, o maior halo foi observado por “200F+TMP” em todas as diluições, seguido por “200F+X+E”. Para LC, a tendência mostrou inibição microbiana promovida pelos polióis, potencializado pela associação com os outros compostos. Para AI, observou-se uma tendência menos definida. Para CA, o dentifrício experimental “200F+X+E+TMP” foi mais eficaz que os outros. No SP2, as mesmas soluções e grupos do SP1 foram usados a uma concentração final de 30% do valor inicial dos dentifrícios. Biofilmes mistos de SM e CA foram cultivados na presença contínua desses ativos e avaliou-se a quantificação de células viáveis (UFCs), biomassa total, atividade metabólica e componentes da matriz extracelular. A análise estatística se deu por ANOVA um

critério e teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). As contagens de UFCs foram afetadas pelo F, enquanto a biomassa e atividade metabólica pelo TMP. Adicionalmente, observou-se efeito sinérgico desses ativos. Os polióis tiveram efeitos mais pronunciados nos carboidratos da matriz extracelular, com pouca ou nenhuma ação nas demais variáveis. A associação dos quatro ativos promoveu aumento no efeito antibiofilme, e foi afetado por F e/ou TMP, com pouco efeito dos polióis isoladamente. No SP3, biofilmes microcosmos foram formados em um modelo de biofilme de alto rendimento com ou sem a incorporação da cepa de SM. As mesmas soluções e concentrações de SP2 estavam constantemente presentes no meio de cultura. Analisou-se as UFCs e produção de ácido láctico dos biofilmes. Os dados foram analisados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). O grupo “60F+TMP” produziu quantidades de ácido láctico significativamente menor, e apresentou reduções na contagem total de UFCs em biofilmes microcosmos, incorporados ou não com SM, comparado ao grupo controle. O grupo experimental promoveu diminuições sobre os parâmetros analisados. A associação de “F+TMP” e o grupo experimental reduziram as contagens de UFCs total e de SM, e a produção de ácido láctico por biofilmes microcosmos derivados de saliva. Os resultados permitiram concluir que a associação dos quatro compostos ativos e “F+TMP” apresentaram reduções em todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chaves: Fluoretos. Biofilmes. Fosfatos. Xilitol. Eritritol.

Zen, IR. **Effect of solutions or dentifrices containing sodium trimetaphosphate, xylitol, erythritol and fluoride, in different associations, on biofilms of cariogenic interest.**128 f. [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University;2022.

GENERAL ABSTRACT

This study evaluated the effect of dentifrices or solutions containing sodium trimetaphosphate(TMP), xylitol(X), erythritol(E) and fluoride(F), in different associations, on cariogenic strains and biofilms. Three subprojects (SP1, SP2 and SP3) presented the objectives: SP1) To evaluate the effect of dentifrices containing “TMP(0.25%)”, “X(16%)”, “E(4%)”, “F(200 and 1100 ppm)” alone or in different associations, on isolated strains of *Streptococcus mutans*(SM), *Lactobacillus casei*(LC), *Actinomyces israelii*(AI) and *Candida albicans*(CA). SP2) Evaluate the effect of solutions containing “TMP”(0.075%), “X”(4.8%), “E”(1.2%), “F”(60 and 330 ppm) and pure artificial saliva, alone or in different associations on mixed SM and CA biofilms. SP3) To evaluate the effect of the same SP2 solutions on pathogenic microcosm biofilms with or without the incorporation of SM. In SP1, SM, LC, AI and CA strains were incorporated into the BHI-agar medium, poured into plates, wells were made in the agar, and different dilutions of dentifrice slurries were added. The halos were measured with a digital caliper. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA and Tukey HSD test ($p<0.05$). For SM, the largest halo was observed by “200F+TMP” in all dilutions, followed by “200F+X+E”. For LC, the trend showed microbial inhibition promoted by polyols, potentiated by the association with the other compounds. For AI, a less defined trend was observed. For CA, the experimental dentifrice “200F+X+E+TMP” was more effective than the others. In SP2, the same solutions and groups of SP1 were used at a final concentration of 30% of the initial value of the dentifrices. Mixed biofilms of SM and CA were cultured in the continuous presence of these actives, and the quantification of viable cells (CFUs), total biomass, metabolic activity and extracellular matrix components were evaluated. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Tukey HSD test ($p<0.05$). CFU counts were affected by F, while biomass and

metabolic activity by TMP. Additionally, a synergistic effect of these actives was observed. Polyols had more pronounced effects on extracellular matrix carbohydrates, with little or no action on other variables. The association of the four actives promoted an increase in the antibiofilm effect and was affected by F and/or TMP, with little effect of polyols alone. In SP3, microcosm biofilms were formed in a high-throughput biofilm model with or without the incorporation of the SM strain. The same SP2 solutions and concentrations were constantly present in the culture medium. The CFUs and lactic acid production of biofilms were analyzed. Data were analyzed by ANOVA or Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$). The “60F+TMP” group produced significantly lower amounts of lactic acid and showed reductions in total CFU counts in microcosm biofilms, whether or not incorporated with SM, compared to the control group. The experimental group promoted decreases in the analyzed parameters. The association of “F+TMP” and the experimental group reduced total and SM CFU counts and lactic acid production by saliva-derived microcosm biofilms. The results allowed us to conclude that the association of the four active compounds and “F+TMP” showed reductions in all evaluated parameters.

Key words: Fluorides. Biofilms. Phosphates. Xylitol. Erythritol.

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

1100F	1100 ppm F
200F	200 ppm F
200F+TMP	200 ppm F + trimetafosfato de sódio/sodium trimetaphosphate
200F+X+E	200 ppm F + xilitol + eritritol/ 200 ppm F + xylitol + erythritol
<i>Al/A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
ANOVA	Análise de Variância/Analysis of Variance
AS	Saliva artificial/Artificial saliva
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BPW	Água Peptonada Tamponada/ Buffered Peptone Water
<i>CA/C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca ⁺	Cálcio/Calcium
CaF ₂	Fluoreto de Cálcio/Calcium Fluoride
Cm	Centímetros/Centimeters
CO ₂	Dióxido de Carbono/Carbon dioxide
CV	Cristal Violeta/Crystal Violet
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
E	Eritritol/Erythritol
<i>e.g./exempli gratia</i>	Por exemplo/ For example
EXP/200F+TMP+X+E	Grupo experimental/Experimental Group / 200 ppm F + Trimetafosfato de sódio + Xilitol + Eritritol/ 200 ppm F + Sodium trimetaphosphate + Xylitol + Erythritol
F	Flúor/Fluoride
g	Gramas/Grams
Gtfs	Glicosiltransferases/Glycosyltransferase

h	Hora/Hour
H ₂	Hidrogênio/Hydrogen
HSD	Diferença Significativa Honesta/Honestly Significant Difference
<i>i.e./id est</i>	Isto é/That is
KCl	Cloreto de Potássio/ Potassium Chloride
L/l	Litros/Liters
LC/ <i>L.casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Log ₁₀	Logaritmo na base 10/ Logarithm, base 10
Mg	Miligramas/Miligrams
Mg ⁺	Magnésio/Magnesium
Min	Minutos/Minutes
mL	Mililitros/Mililiters
mm	Milímetros/Milimetres
Mmol	Milimol
Modelo AAA	Amsterdam Active Attachment Model
<i>n</i>	Número/Number
N ₂	Nitrogênio/Nitrogen
NaCl	Cloreto de Sódio/Sodium Chloride
NaF	Fluoreto de Sódio/Sodium Fluoride
NaOH	Hidróxido de Sódio/Sodium Hydroxide
NC	Controle Negativo/Negative Control
Nm	Nanômetro/Nanometer
°C	Graus Celsius/ Degrees Celcius
p	Probabilidade/Probability
pH	Potencial de Hidrogênio/Potential of Hydrogen
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
ppm	Parte por milhão/Parts per million
Rpm	Rotação por minuto/Revolutions per minute
SAB	Ágar Sacarose Bacitracina/ Sucrose Agar Bacitracin
SD	Desvio Padrão/Standard Deviation

SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SM/ <i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TMP	Trimetafosfato de sódio/Sodium trimetaphosphate
TMP+X+E	Trimetafosfato de sódio + xilitol + eritritol/ Sodium trimetaphosphate + xylitol + erythritol
TSBA	Ágar Sangue /Tryptic Soy Agar Blood
UFC/CFU	Unidades de Formação de Colônias/Colony-Forming Unit
v/v	Volume por volume/Volume per volume
VU	Vrije Universiteit
W	Watts
X	Xilitol/Xylitol
X+E	Xilitol + eritritol/ Xylitol + erythritol
XTT	2,3-bis (2-methoxy-6 4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide
µL	Microlitros/microliters

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Fig. 1. Logarithm of colony-forming units cm^{-2} for *S. mutans* (a) and *C. albicans* (b), and absorbance values cm^{-2} obtained for the total biomass (c) and metabolic activity (d) quantification assays. Error bars denote the SD of the means. Different lowercase letters symbolize statistical differences among the groups ($p < 0.05$, $n = 9$). NC: negative control (untreated biofilms), “60F” = 60 ppm F; “330F” = 330 ppm F; “X” = 4.8% Xylitol; “E” = 1.2% Erythritol.....56

CAPÍTULO 3

Fig. 1. A: AAA-model with glass cover lips attached to a stainless-steel lid using nylon clamps. B: The lid is fitted on top of flat-bottomed 24-well plates.75

Fig. 2. Logarithm of total colony-forming units for (A): saliva-derived microcosm biofilms and (B): saliva-derived microcosm biofilms supplemented with *Streptococcus mutans* (C180-2) (ANOVA and Student-Newman-Keuls' tests, $p < 0.05$, $n = 9$). Error bars denote the SD of the means. Different uppercase letters symbolize statistical differences among the groups. NC: negative control (untreated biofilms), “60F” = 60 ppm F; “330F” = 330 ppm F; “TMP” = 0.075% Sodium trimetaphosphate; “X” = 4.8% Xylitol; “E” = 1.2% Erythritol.....76

Fig. 3. Logarithm of colony-forming units of *Streptococcus mutans* from saliva-derived microcosm biofilms supplemented with *Streptococcus mutans* (C180-2). (Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls' tests, $p < 0.05$, $n = 9$). Bars denote the interquartile ranges. Different uppercase letters symbolize statistical differences among the groups. NC: negative control (untreated biofilms), “60F” = 60 ppm F; “330F” = 330 ppm F; “TMP” = 0.075% Sodium trimetaphosphate; “X” = 4.8% Xylitol; “E” = 1.2% Erythritol.77

Fig. 4. Concentration of lactate (mM) produced by (A): saliva-derived microcosm biofilms and (B): saliva-derived microcosm biofilms supplemented with *Streptococcus mutans* (C180-2). (ANOVA and Student-Newman-Keuls' tests, $p < 0.05$, $n = 9$). Error bars denote the SD of the means. Different uppercase letters symbolize statistical differences among the groups. NC: negative control (untreated biofilms), “60F” = 60 ppm F; “330F” = 330 ppm F; “TMP” = 0.075% Sodium trimetaphosphate; “X” = 4.8% Xylitol; “E” = 1.2% Erythritol.....78

Fig. 5. Mean (SD) pH of the spent medium of saliva-derived microcosm biofilms from the day-period (unbuffered McBain medium supplemented with 0.2% sucrose) and night-period (buffered McBain medium without sucrose). Distinct upper-case letters indicate significant differences between day and night within each treatment solution. Different lower-case letters represent significant

differences among the groups within a day and night periods of A: saliva-derived microcosm biofilms and B: saliva-derived microcosm biofilms supplemented with *S. mutans* (C180-2). Distinct upper-case letters indicate significant differences between day and night within each treatment solution. Different lower-case letters represent significant differences among the groups, separately for day and night periods (two-way, repeated measures ANOVA and Student-Newman-Keuls' tests, $p < 0.05$, $n = 9$). NC: negative control (untreated biofilms), "60F" = 60 ppm F; "330F" = 330 ppm F; "TMP" = 0.075% Sodium trimetaphosphate; "X" = 4.8% Xylitol; "E" = 1.2% Erythritol. 79

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Zone of inhibition of toothpastes containing different active compounds, at 5 dilutions, on <i>Streptococcus mutans</i>	30
Table 2. Zone of inhibition of toothpastes containing different active compounds, at 5 dilutions, on <i>Lactobacillus casei</i>	31
Table 3. Zone of inhibition of toothpastes containing different active compounds, at 5 dilutions, on <i>Actinomyces israelii</i>	31
Table 4. Zone of inhibition of toothpastes containing different active compounds, at 5 dilutions, on <i>Candida albicans</i>	33

CAPÍTULO 2

Table 1. Mean (standard deviation) of protein, carbohydrate and DNA of dual-species biofilms obtained after treatment with different concentrations of fluoride, sodium trimetaphosphate, xylitol or erythritol, alone or in different associations.	57
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
CAPÍTULO 1.....	22
Abstract.....	24
Introduction	25
Material and methods.....	26
Results	28
Discussion	29
Conclusion	32
References.....	32
Tables	30
CAPÍTULO 2.....	34
Abstract.....	36
Introduction	37
Materials and methods	38
Results	41
Discussion	42
References.....	47
Tables	57
Figures	56
CAPÍTULO 3.....	57
Abstract.....	59
Introduction	60
Materials and methods	61
Results	64
Discussion	65
Conclusion	68
References.....	69
Figures	75
ANEXOS.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária é uma doença que afeta mais de 3,5 bilhões de pessoas durante a dentição permanente e mais de 620 milhões de crianças durante a dentição primária (Kassebaum et al., 2017; Phantumvanit et al., 2018). Esta doença é mediada por biofilmes formados por um consórcio de diferentes micróbios. Também é modulada pela dieta na presença de açúcares fermentáveis, não transmissível e é considerada multifatorial (Machiulskiene et al., 2020). Um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária é a bactéria gram-positiva *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), devido a sua capacidade de colonizar a superfície dental, metabolizar carboidratos e produzir ácido láctico, além de ter a capacidade de crescer e se multiplicar em ambiente ácido (Falsetta et al., 2014; Lemos et al., 2019), levando à formação do biofilme dentário, o qual é definido como uma comunidade microbiana organizada, aderida a superfícies vivas ou inertes e envolvida por uma matriz extracelular produzida pelas células (Bowen, Burne, Wu, & Koo, 2018).

No biofilme, os microrganismos apresentam-se embebidos em uma matriz extracelular composta por glicoproteínas e polissacarídeos (Lemos et al., 2019). Inicialmente, várias adesinas das bactérias odontopatogênicas interagem com as glicoproteínas salivares da película adquirida na superfície dos dentes através de cátions bivalentes. Na presença de sacarose, as bactérias aderem-se firmemente à superfície do dente como resultado da produção de exopolissacarídeos (glucanos) por meio da atividade da glicosiltransferase (*Gtfs*). Sendo assim, o acúmulo de biofilme faz com que o *S. mutans* metabolize eficientemente a sacarose (açúcar ou polímeros) para produzir grande quantidade de ácido láctico, capaz de solubilizar o componente mineral do dente e iniciar o processo de cárie (Lemos et al., 2019). Além do *S. mutans*, a cavidade bucal é habitada por mais de 700 diferentes espécies de microrganismos, dentre esses, espécies bacterianas como de *Lactobacillus*, *Actinomyces* e fúngicas como *Candida* sp.. *Candida albicans* (*C. albicans*) é o fungo mais comumente encontrado na cavidade oral, que pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de cárie dentária (Kilian et al., 2016). A presença de *C. albicans* é importante na cárie na infância, uma vez que contribui para a patogênese em crianças cárie-ativas (Menon, Scofield, Jackson, & Zhang, 2022).

O uso dos dentifrícios contendo fluoreto (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 (Walsh, Worthington, Glenny, Marinho, & Jeroncic, 2019). Sendo assim, o íon flúor tem seu efeito por meio da manutenção da concentração de flúor na saliva devido ao uso frequente dos dentifrícios, e pela formação de produtos da reação esmalte-dentina com fluoreto, formando o mineral fluoreto de cálcio (CaF_2), que, depositado no biofilme em lesões iniciais de cárie, é capaz de evitar a progressão da mesma (Buzalaf, Pessan, Marques Honório, & Ten Cate, 2011).

A suplementação com sais de fosfato tem sido uma possibilidade para aumentar a efetividade dos dentifrícios fluoretados. Estudos *in vitro* e *in situ* demonstraram que dentifrícios com concentração reduzida de F suplementados com trimetafosfato de sódio (TMP) apresentam efetividade semelhante a de um dentifrício convencional ($1.100 \mu\text{g F/g}$) (Takeshita, Danelon, Castro, Cunha, & Delbem, 2016; Takeshita, Danelon, Castro, Sasaki, & Delbem, 2015). Além disso, a concentração de F e cálcio no biofilme formado na presença destes dentifrícios foi semelhante à observada para um dentifrício convencional (Takeshita et al., 2015). No entanto, o mecanismo pelo qual soluções contendo TMP, associados ou não ao F, atuam no biofilme ainda é incerto.

Além desses sais de fosfato, existem produtos naturais que são fontes de agentes terapêuticos, e que podem ser utilizados na prevenção da cárie dentária, pois apresentam efeito sobre os microrganismos do biofilme. O xilitol e o eritritol são polióis utilizados como substitutos do açúcar em muitos produtos de cuidados bucais, pois não são cariogênicos e apresentam efeitos favoráveis sobre a saúde bucal (Kauko Mäkinen, 2000; Runnel et al., 2013). A literatura mostra que o xilitol diminui a acidogenicidade e volume do biofilme, e é capaz de inibir o crescimento de *S. mutans* (Kauko Mäkinen, 2000). Da mesma forma, o eritritol parece apresentar mecanismos semelhantes ao do xilitol e promove a redução dos microrganismos patogênicos relacionados à cárie dentária (*S. mutans*) (Park et al., 2014).

Diante de todo contexto supracitado, e tendo em vista a eficácia dos ativos sozinhos, os objetivos do presente estudo foram: 1) Avaliar o efeito de dentifrícios contendo trimetafosfato de sódio (TMP), xilitol (X), eritritol (E) e fluoreto (F), em diferentes associações, sobre cepas isoladas de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*

casei, *Actinomyces israelii* e *Candida albicans* na formação de halos de inibição. 2) Avaliar o efeito de soluções contendo trimetafosfato de sódio (TMP), xilitol (X), eritritol (E) e fluoreto (F), em diferentes associações sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. 3) Avaliar o efeito de soluções contendo trimetafosfato de sódio (TMP), xilitol (X), eritritol (E) e fluoreto (F), em diferentes associações sobre biofilmes microcosmos (polimicrobianos) suplementados ou não com *Streptococcus mutans*.

Os dentifrícios foram testados no capítulo 1 e as soluções nos capítulos 2 e 3, sendo respectivamente:

Dentifrícios: Trimetafosfato de sódio (0,25%), F (200 ppm), xilitol (16%) e eritritol (4%), 1100 ppm F (controle positivo) e placebo (sem adição de nenhum composto ativo).

Soluções: Trimetafosfato de sódio (0,075%), F (60 ppm), xilitol (4,8%) e eritritol (1,2%), 330 ppm F (controle positivo) e Saliva artificial ou McBain puro (controle negativo).

Para alcançar os objetivos propostos, o presente estudo foi dividido em três capítulos, como detalhado abaixo:

- Capítulo 1: “Antimicrobial effect of low-fluoride toothpastes containing polyphosphate and polyols” (artigo submetido ao periódico Saudi Dental Journal);
- Capítulo 2: “Evaluation of solutions containing fluoride, sodium trimetaphosphate, xylitol and erythritol on dual-species biofilms” (artigo submetido ao periódico Biofouling);
- Capítulo 3: “Assessment of the effects of fluoride, sodium trimetaphosphate, xylitol and/or erythritol on saliva-derived microcosm biofilms” (artigo formatado nas normas do periódico Archives of Oral Biology).

As referências da Introdução Geral encontram-se no anexo A.

ANEXO A

Referências Introdução Geral

- Amaral, J. G., Pessan, J. P., Souza, J. A. S., Moraes, J. C. S., & Delbem, A. C. B. (2018). Cyclotriphosphate associated to fluoride increases hydroxyapatite resistance to acid attack. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(7), 2553–2564. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34072>
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>
- Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Marques Honório, H., & Ten Cate, J. (2011). Mechanisms of action of fluoride for. *Monogr Oral Sci.*, 22, 97–114.
- Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., ... Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and Immunity*, 82(5), 1968–1981. <https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14>
- Kassebaum, N. J., Smith, A. G. C., Bernabé, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., ... Yonemoto, N. (2017). Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *Journal of Dental Research*, 96(4), 380–387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., ... Zaura, E. (2016). The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Klein, M. I., Hwang, G., Santos, P. H. S., Campanella, O. H., & Koo, H. (2015). *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010>
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., ... Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1), 1–26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>
- Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., ... Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309>

- Mäkinen, K. (2000). The rocky road of xylitol to its clinical application. *Journal of Dental Research*, 79(6), 1352–1355. <https://doi.org/10.1177/00220345000790060101>
- Menon, L. U., Scofield, J. A., Jackson, J. G., & Zhang, P. (2022). *Candida albicans* and Early Childhood Caries. *Frontiers in Dental Medicine*, 3. <https://doi.org/10.3389/fdmed.2022.849274>
- Park, Y. N., Jeong, S. S., Zeng, J., Kim, S. H., Hong, S. J., Ohk, S. H., & Choi, C. H. (2014). Anti-cariogenic effects of erythritol on growth and adhesion of *Streptococcus mutans*. *Food Science and Biotechnology*, 23(5), 1587–1591. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0215-0>
- Phantumvanit, P., Makino, Y., Ogawa, H., Rugg-Gunn, A., Moynihan, P., Petersen, P. E., ... Ungchusak, C. (2018). WHO Global Consultation on Public Health Intervention against Early Childhood Caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 46(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12362>
- Runnel, R., Mäkinen, K. K., Honkala, S., Olak, J., Mäkinen, P. L., Nömmela, R., ... Saag, M. (2013). Effect of three-year consumption of erythritol, xylitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries-related variables. *Journal of Dentistry*, 41(12), 1236–1244. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.09.007>
- Takeshita, E. M., Danelon, M., Castro, L. P., Cunha, R. F., & Delbem, A. C. B. (2016). Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Research*, 50(6), 571–578. <https://doi.org/10.1159/000449358>
- Takeshita, E. M., Danelon, M., Castro, L. P., Sasaki, K. T., & Delbem, A. C. B. (2015). Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Research*, 49(4), 394–400. <https://doi.org/10.1159/000381960>
- Walsh, T., Worthington, H. V., Glenny, A. M., Marinho, V. C. C., & Jeroncic, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007868.pub3>