

Viviane de Oliveira Zequini Amarante

Efeito do trimetafosfato de sódio micro e nanoparticulado, associadas ou não ao fluoreto, sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*: avaliação da composição orgânica e inorgânica

Araçatuba
2022

Viriane de Oliveira Zequini Amarante

Efeito do trimetafosfato de sódio micro e nanoparticulado, associadas ou não ao fluoreto, sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*: avaliação da composição orgânica e inorgânica

Dissertação 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 Mestre em Ciência Odontológica – Área Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^a. Dra. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba
2022

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Amarante, Viviane de Oliveira Zequini.

A485e Efeito do trimetafosfato de sódio micro e nanoparticulado, associadas ou não ao fluoreto, sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* : avaliação da composição orgânica e inorgânica / Viviane de Oliveira Zequini Amarante. – Araçatuba, 2022
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Fosfatos 2. Fluoretos 3. Biofilmes 4. *Streptococcus mutans* 5. *Candida albicans* 6. Nanotecnologia I. T.

Black D27

CDD 617.645

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, *Gilberto e Claudia*, por me ensinarem que não seria fácil e que seria necessário não desistir, por me apoiar e incentivar quando eu precisava de uma palavra de encorajamento, por nunca medir esforços e por fazer o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço por sempre ter acreditado que este dia chegaria. A minha gratidão por todo empenho será eterna, e espero poder retribuir todos os dias.

Agradecimentos

Agradeço a *Deus*, por ter me sustentado até aqui, sei que sem ele nada disso teria acontecido. Por sempre me mostrar o melhor caminho e as melhores pessoas para a minha vida. Espero continuar trilhando os passos que ele planejou a mim.

Aos meus pais, *Gilberto e Claudia*, por todo apoio e incentivo oferecido até aqui.

As minhas irmãs, *Linac e Vitoria*, obrigada por sempre acreditar em mim e por sempre estarem presentes quando eu precisei. Amo vocês.

A minha avó, *Maria Helena*, por toda a parceria e disposição para me cuidar e orientar.

Aos meus tios, *Aparecida* (in memoriam) e *Cicero*, por sempre acreditarem que eu conseguiria e sempre incentivar a buscar o melhor para mim e a realizar meus sonhos. Vou levar os ensinamentos de você para sempre em meu coração.

A minha família, tias, tios e avô, por todo apoio e empenho na minha caminhada.

A minha orientadora, *Thayse*, por sempre se fazer presente, sempre me incentivar e guiar a pensar no melhor a ser feito, por me apoiar a não desistir, me ensinar a perseverar, por acreditar que eu fosse capaz, e sempre proporcionar o necessário para que este projeto pudesse ser concluído.

Ao meu coorientador, Professor *Alberto Carlos Botazzo Delbem*, por me dar a oportunidade de iniciar carreira na área acadêmica. Por todo o suporte dado ao decorrer deste projeto, e disponibilidade para que ele fosse concluído.

Aos professores do departamento de Odontopediatria, *Juliano, Douglas, Cristiane e Robson*, por ter proporcionado o melhor aprendizado e oportunidades para que eu desempenhasse de forma proveitosa a pós-graduação.

Aos meus amigos, *Matheus, Leonardo, Caio e Gabriel*, por todo apoio e incentivo, por toda orientação e paciência. Que nossas conquistas possam ser compartilhadas e comemoradas juntos! Vocês foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

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.

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

Amarante, VOZ. **Efeito do trimetafosfato de sódio micro e nanoparticulado, associadas ou não ao fluoreto, sobre biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*: avaliação da composição orgânica e inorgânica.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2022.

Este estudo avaliou o efeito de nanopartículas de TMP (TMPn) sobre a composição inorgânica e componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Biofilmes de duas espécies de *S. mutans* e *C. albicans* foram cultivados em saliva artificial em placas de 6 poços e tratados três vezes (72, 78 e 96 h após o início de sua formação), por 1 minuto, com soluções contendo TMP microparticulado (TMPm) e TMPn nas concentrações de 1% e 3%, combinadas ou não com 1100 ppm F. Além disso, solução de 1100 ppm F (F) e saliva artificial (CTL) foram testadas como controles positivos e negativos, respectivamente. Após o último tratamento, a composição da matriz extracelular foi analisada em termos de proteína e carboidrato, e o pH e as concentrações de F, cálcio (Ca), fósforo (P) e P do TMP da biomassa e fluido do biofilme foram determinadas. Em outro conjunto de experimentos, após o último tratamento, os biofilmes foram expostos a uma solução de sacarose a 20%, e o pH e componentes inorgânicos dos biofilmes foram avaliados conforme mencionado acima. Os dados de proteínas e carboidratos foram submetidos a ANOVA a 1 critério, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, enquanto os dados da composição inorgânica do biofilme foram submetidos a ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Tratamentos com TMPn a 3% combinado com F levou a reduções significativamente maiores nas concentrações de carboidratos da matriz extracelular, maior concentração iônica de F no fluido, e um pH significativamente mais alto, se comparado a todos os outros grupos. Além disso, TMPn a 3% sem F levou a concentrações de P significativamente mais altas em comparação a todos os outros grupos, antes da exposição a sacarose. Conclui-se que o TMPn afetou a composição da matriz extracelular, o pH dos biofilmes analisados, além de interferir nos componentes inorgânicos dos biofilmes ao aumentar os níveis de fósforo no fluido do biofilme.

Palavras-chave: Fosfatos; Fluoretos; Biofilmes; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; Nanotecnologia.

Abstract

This study evaluated the effect of TMP nanoparticles (nTMP) on the inorganic composition and extracellular matrix components of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Biofilms of two species of *S. mutans* and *C. albicans* were cultivated in artificial saliva in 6-well plates and treated three times (72, 78 and 96 h after the beginning of their formation), for 1 minute, with Solutions containing microparticulate TMP (TMPm) and TMPn at concentrations of 1% and 3%, combined or not with 1100 ppm F. In addition, 1100 ppm F (F) solution and artificial saliva (CTL) were tested as positive and negative controls, respectively. After the last treatment, the composition of the extracellular matrix was analyzed in terms of protein and carbohydrate, and the pH and concentrations of F, calcium (Ca), phosphorus (P) and P of the TMP of the biomass and biofilm fluid were determined. In another set of experiments, after the last treatment, the biofilms were exposed to a 20% sucrose solution, and the pH and inorganic components of the biofilms were evaluated as mentioned above. Protein and carbohydrate data were subjected to 1-way ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test, while biofilm inorganic composition data were subjected to 2-way ANOVA, followed by the Fisher LSD test ($p < 0.05$). Treatments with 3% nTMP combined with F led to significantly greater reductions in extracellular matrix carbohydrate concentrations, and significantly higher pH, compared to all other groups. In addition, 3% nTMP without F led to significantly higher P concentrations compared to all other groups before sucrose exposure. It is concluded that TMPn affected the composition of the extracellular matrix, the pH of the analyzed biofilms, in addition to interfering with the inorganic components of the biofilms by increasing phosphorus levels in the biofilm fluid.

Keywords: Phosphates; Fluorides; Biofilms; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; Nanotechnology.

Listas

Lista de figuras

Figura 1. Valores médios (DP) de proteína (a) e carboidrato (b) da matriz extracelular de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* obtidos após tratamento com diferentes concentrações de TMPm ou TMPn, combinados ou não com F. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL: controle negativo (saliva artificial); F: 1.100 ppm F; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado. Teste do estudante Newman Keuls ($p < 0,05$, $n = 9$).

Figura 2. Valores médios de F (A), Ca (B), P (C) e TMP (D) no fluido do biofilme, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, teste de Fisher LSD; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

Figura 3. Valores médios de F (A), Ca (B), P (C) e TMP (D) na biomassa do biofilme, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, teste de Fisher LSD; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

Figura 4. Valores médios de pH, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, teste LSD de Fisher; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

Lista de abreviaturas e siglas

°C – Celsius

°C - Graus Celsius

Abs – Absorbância

ANOVA - Análise de Variância

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

BCA - Ácido Bicinchoninico

BHI - Brain Heart Infusion

C. albicans – *Candida albicans*

Ca - Cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CaF₂ - Fluoreto de cálcio

CaHPO₄⁰ - Fosfato bicálcico

CO₂ - Dióxido de carbono

CTL - Controle

EPS - Polissacarídeo Extracelular

F - Flúor

Fig - Figura

g - Gramas

g - Gravidade

h - Hora

HA - Hidroxiapatita

HCl - Ácido clorídrico

HPO₄²⁻ - Hydrogen phosphate

IA - Atividade Iônica i.e. id est

KCl - Cloreto de potássio

l - Litro

Log₁₀ - Logaritmo de base 10

mg - Miligramas Mg Magnésio

min - Minutos

ml - Mililitro mmol

mol/L - Molaridade

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NC - Controle Negativo

nm - Nanometro

P - Fósforo

p - Probability

pH - Potencial hidrogeniônico

ppm - partes por milhão

rpm - Revoluções por Minuto

s - Segundos

S. Mutans – *Streptococcus mutans*

SD - Desvio Padrão

TISAB - Total Ionic Strength Adjustment Buffer

TMPm - Trimetafosfato de Sódio Microparticulado

TMPn – Trimetafosfato de Sódio Nanoparticulado

UNESP - Universidade Estadual Paulista

w - Watt

xg – Força gravitacional

μ - Micro

μg - Microgramas

μl - Microlitros

μm – Micrômetro

Sumário

1. Introdução	22
2. Materiais e Métodos	23
3. Resultados	27
4. Discussão	32
5. Referências	37
6. Anexo A	41
6.1 Anexo B	49
6.2 Anexo C	50
6.3 Anexo D	52
6.3 Anexo E	53
6.4 Anexo F	54
6.5 Anexo G	55
6.6 Anexo H	56

Este estudo avaliou o efeito de nanopartículas de TMP (TMPn) sobre a composição inorgânica e componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Biofilmes de duas espécies de *S. mutans* e *C. albicans* foram cultivados em saliva artificial em placas de 6 poços e tratados três vezes (72, 78 e 96 h após o início de sua formação), por 1 minuto, com soluções contendo TMP microparticulado (TMPm) e TMPn nas concentrações de 1% e 3%, combinadas ou não com 1100 ppm F. Além disso, solução de 1100 ppm F (F) e saliva artificial (CTL) foram testadas como controles positivos e negativos, respectivamente. Após o último tratamento, a composição da matriz extracelular foi analisada em termos de proteína e carboidrato, e o pH e as concentrações de F, cálcio (Ca), fósforo (P) e P do TMP da biomassa e fluido do biofilme foram determinadas. Em outro conjunto de experimentos, após o último tratamento, os biofilmes foram expostos a uma solução de sacarose a 20%, e o pH e componentes inorgânicos dos biofilmes foram avaliados conforme mencionado acima. Os dados de proteínas e carboidratos foram submetidos a ANOVA a 1 critério, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, enquanto os dados da composição inorgânica do biofilme foram submetidos a ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Tratamentos com TMPn a 3% combinado com F levou a reduções significativamente maiores nas concentrações de carboidratos da matriz extracelular, maior concentração iônica de F no fluido, e um pH significativamente mais alto, se comparado a todos os outros grupos. Além disso, TMPn a 3% sem F levou a concentrações de P significativamente mais altas em comparação a todos os outros grupos, antes da exposição a sacarose. Conclui-se que o TMPn afetou a composição da matriz extracelular, o pH dos biofilmes analisados, além de interferir nos componentes inorgânicos dos biofilmes ao aumentar os níveis de fósforo no fluido do biofilme.

Palavras-chave: Fosfatos; Fluoretos; Biofilmes; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; Nanotecnologia.

Introdução

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença não transmissível, multifatorial, mediada pelo biofilme e modulada pela dieta. Ela é uma doença determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. [Machiulskiene *et al.*, 2020]. Dentre principais microrganismos envolvidos no processo cariogênico, a bactéria *Streptococcus mutans* se destaca por sua capacidade de colonizar a superfície dental, produzir polissacarídeo extracelular a partir da sacarose, além de metabolizar glicoproteínas salivares [Kirthiga *et al.*, 2019]. Além do *S. mutans*, o fungo *Candida albicans* também tem sido apontado como um microrganismo importante no desenvolvimento e progressão da cárie, atuando de forma sinérgica com o *S. mutans*, contribuindo para a manutenção de fatores de virulência de biofilmes cariogênicos [Bachtiar and Bachtiar, 2018].

Tendo em vista que a cárie é uma das doenças mais prevalentes em grupos populacionais mais vulneráveis no mundo todo [Kassebaum *et al.*, 2015], tem se estudado estratégias visando potencializar a ação anticárie de veículos fluoretados com diferentes compostos. Dentre os diversos compostos estudados, pode-se destacar o trimetafosfato de sódio (TMP), o qual possui, entre suas principais propriedades, grande capacidade de adsorção na superfície do esmalte dentário, atuando na permeabilidade seletiva do esmalte, facilitando a difusão dos íons cálcio (Ca), fósforo (P) e flúor (F). Ao se adsorver, esse fosfato se liga a hidroxiapatita formando uma barreira parcial aos ácidos. Esta barreira retém os íons que são liberados durante a desmineralização, auxiliando na remineralização dentária [Danelon *et al.*, 2015; Nagata *et al.*, 2017].

A suplementação de dentifrícios fluoretados com TMP demonstrou promover um efeito superior ao de dentifrícios convencionais (*i.e.*, dentifrícios contendo 1100 ppm F) não suplementados com o fosfato sobre os processos de des- e remineralização de esmalte, além de afetar substancialmente a composição inorgânica de biofilmes *in vivo* e *in situ* [Danelon *et al.*, 2013; de Castro *et al.*, 2015; Takeshita *et al.*, 2015]. Além disso, essa combinação demonstrou um efeito pronunciado sobre a progressão de cárie dentária na dentição decídua de crianças com idade média de 48 meses [Freire *et al.*, 2016]. Ademais, estudos avaliando os efeitos de TMPm em três concentrações (0,25, 0,5 ou 1%), com ou sem F a 500 ppm. sobre biofilmes de duas espécies de *S.*

mutans e *C. albicans* verificaram que essa associação demonstrou ter capacidade de manter o pH do biofilme próximo ao neutro quando exposto a um desafio cariogênico, além de aumentar as concentrações dos íons F e P no fluido do biofilme [Cavazana *et al.* 2020]. É importante ressaltar que apesar de o TMP não apresentar atividade antimicrobiana [Cavazana *et al.*, 2019; Mendes-Gouvêa *et al.*, 2018], a combinação TMP e F foi capaz de reduzir o metabolismo e componentes da matriz extracelular destes biofilmes, fatores que comprovam sua ação na dinâmica da cárie dentária [Cavazana *et al.*, 2019].

Foi comprovado anteriormente que íons F e Ca acabam sendo retidos no biofilme na forma de depósitos minerais, quando este biofilme é exposto a um desafio cariogênico, esses íons retidos na biomassa podem ser liberados no fluido do biofilme e então participarem da des e remineralização. Por isso, a avaliação da composição mineral do fluido do biofilme é de suma importância [Nagata *et al.*, 2017].

A ação do TMP foi potencializada quando o fosfato foi administrado em forma de nanopartículas (TMPn), na qual a nanopartícula combinada ao F demonstrou aumentar o efeito protetor de veículos fluoretados contra a desmineralização dentária, além de contribuir para uma melhora nos padrões de remineralização destes produtos, quando comparado a veículos fluoretados contendo TMP microparticulado (TMPm) [Danelon *et al.*, 2015; 2017; 2018].

Apesar dos resultados promissores supramencionados acerca do efeito do TMPm sobre a biomassa e fluido de biofilmes [Cavazana *et al.*, 2019; 2020], informações acerca do efeito de sua versão nanoparticulada combinada ao F ainda são escassas. Tendo em vista os efeitos superiores referentes ao uso da nanopartícula (*i.e.*, TMPn) comparado às partículas convencionais (*i.e.*, TMPm) sobre os processos de des- e remineralização do esmalte dentário, seria interessante avaliar se a utilização do TMPn combinado ao F poderia potencializar o efeito deste fosfato sobre biofilmes. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito do TMPn sobre a composição inorgânica e sobre os componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*. A hipótese nula do estudo foi de que o TMPn combinado ao F não afetaria os biofilmes analisados.

2. Materiais e métodos

2.1. Cepas dos microrganismos e suas condições de crescimento

Foram usadas cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231. As culturas destes microrganismos foram mantidas a -70°C em glicerol. As culturas de *C. albicans* foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França) e cultivadas por 24h a 37°C. Enquanto culturas de *S. mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Após, o cultivo, das placas de ASD foi suspenso 10 mL em caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação de 120 rpm para *C. albicans*. Já para o *S. mutans* uma alça foi suspensa em 10 mL de BHI caldo (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO₂ a 37 °C.

Depois de incubados os microrganismos foram recuperados por meio da centrifugação a 8000 rpm, por 5 min, a 15 °C, formaram-se pellets, que foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina (0,85% NaCl). Posteriormente as células tiveram sua concentração ajustada, as fúngicas a 10⁷ células/mL, por intermédio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico e as células bacterianas através do espectrofotômetro a 640 nm para uma concentração de 10⁸ células/mL em saliva artificial. A saliva artificial usada teve sua suplementação feita com sacarose, sendo composta por: para 1L de água deionizada: 2 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 5 g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 4 g de sacarose (Sigma-Aldrich), 1 g de mucina (Sigma-Aldrich), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2 g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). Caso houvesse necessidade a saliva teve seu pH ajustado com NaOH para 6,8. Para a confecção dos biofilmes, foram feitas suspensões de 4 mL (1 × 10⁷ células/mL *C. albicans* + 1 × 10⁸ células/mL *S. mutans*) em saliva artificial, e então foram inseridos aos poços das placas de microtitulação de seis e noventa e seis poços, dependendo do teste que foi realizado. E então foram incubados a 37 °C por 72 h, a renovação da saliva artificial foi feita com 2mL a cada 24 h [Cavazana *et al.*, 2018].

2.2. Tratamento dos biofilmes

Os biofilmes pré-formados por 72h foram tratados por um total de três vezes (72, 78 e 96 h) durante 1 min [Cavazana *et al.*, 2018]. Para o processamento e a caracterização das nanopartículas de TMP foi realizado como descrito por Danelon *et al.* [2015]. As soluções de tratamento utilizadas foram: 1% TMPm (1TMPm), 3% TMPm (3TMPm), 1% TMP + 1100 ppm F (1TMPmF), 3% TMPm + 1100 ppm F

(3TMPmF), 1% TMPn (1TMPn), 3% TMPn (3TMPn), 1% TMPn + 1100 ppm F (1TMPnF) e 3% TMPn + 1100 ppm F (3TMPnF) [Danelon *et al.*, 2015; Emerenciano *et al.*, 2018; de Castro *et al.*, 2015]. Para o grupo controle positivo foi usado 1100ppm F (F) e o controle negativo a saliva artificial (CTL).

2.3. Análise da composição da matriz extracelular dos biofilmes

2.3.1. Extração da fase líquida da matriz extracelular

Os biofilmes foram formados como descrito acima, em placas de seis poços, contendo 4 mL do inóculo, permitindo a obtenção de quantidade de biofilme suficiente para as análises. Após tratamento com as soluções, os biofilmes foram lavados com solução salina (0,85%) e raspados do fundo dos poços usando raspadores de células (Kasvi) e ressuspensos em solução salina (0,85%). Na sequência, as amostras de biofilmes foram sonicadas por 30 segundos a 30 W e as suspensões obtidas foram homogeneizadas a vórtex por 2 min. Finalmente, as suspensões foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 10 min e o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro de nitrocelulose (0,22 μm ; Orange Scientific) [Silva *et al.*, 2009]. Este sobrenadante foi utilizado para a análise de proteínas e polissacarídeos solúveis em água (EPS).

2.3.2. Determinação do peso seco dos biofilmes

Uma amostra dos biofilmes raspados foi filtrada em membrana de acetato de celulose (0,22 μm) e a membrana foi seca a 60 °C até que o peso seco fosse constante [Monteiro *et al.*, 2012]. A membrana também foi pesada antes da filtragem dos biofilmes. Portanto, o peso seco final dos biofilmes foi a diferença entre as duas medidas.

2.3.3. Quantificação de proteínas e polissacarídeos extracelulares (EPS) da matriz extracelular

O conteúdo proteico da matriz extracelular dos biofilmes foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (Kit BCA, Sigma-Aldrich), usando albumina de soro bovino como padrão. Para isso, um volume de 25 μL do sobrenadante obtido foi transferido para poços de placas de 96 poços contendo 200 μL da mistura dos reagentes A e B do kit BCA. As placas ficaram incubadas a 37 °C, por 30 min, e a

absorbância das soluções obtidas foi lida a 562 nm [Silva *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2012].

O carboidrato foi quantificado da forma descrita por Dubois *et al.* [1956] que usa glicose como padrão. Foi coletado 500 µL do sobrenadante e depositado em tubos falcon de vidro, ao sobrenadante foi adicionado 500 µL de fenol 9 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico (95-98%; Sigma-Aldrich). A solução obtida foi homogeneizada e mantida em repouso por 15 min em temperatura ambiente, após foi lida a absorbância a 490 nm.

2.4. Medição de pH

Foi realizado a determinação do pH por meio de um eletrodo de pH (PHR-146 Micro Combination pH Electrode; Fisher Científico), que estava previamente calibrado com padrões com pH 7,0 e 4,0. Em outro momento dos experimentos, após o último tratamento, o biofilme foi exposto a solução de sacarose 20% por três min simulando um desafio cardiogênico. A sacarose foi então removida, os biofilmes raspados e transferidos para microtubos (após 1min a remoção da sacarose) permitindo a determinação do pH [Cavazana *et al.*, 2018].

2.5. Análise de F, Ca, P e TMP no fluido de biofilme

Após a transferência do biofilme para microtubos, eles foram centrifugados ($15.267 \times g$) a 4 °C por 5 min e o fluido do biofilme foi separado e coletado. A análise do íon F foi feita através de eletrodo específico (Orion 9409 BN) e eletrodo de referência (Orion 900100), ambos acoplados a um potenciômetro (Orion; Thermo Scientific). As curvas de calibração para análise F no fluido foram confeccionadas usando padrões de 0,09, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções sem F) e 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções contendo F). Foi adicionado o tampão ajustador de força iônica total (TISAB II) que foi administrado nas mesmas condições das amostras, na proporção de 1:1. O íon Ca foi mensurado por espectrofotometria em leitor de placas (EONC Spectrophotometer; EONC, Biotek, Winooski, VT, USA) no comprimento de onda de 650 nm, adaptando o método descrito por Vogel *et al.* [1983]. O reagente Arsenazo III foi usado com um método colorimétrico. Uma alíquota de 5 µL em duplicata para ambos os padrões e amostras foi adicionada com 50 µL de Arsenazo III e 50 µL de água deionizada. Posteriormente, foram agitados por 60 s no leitor de microplacas,

promovendo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes da obtenção da absorbância resultante.

O íon fósforo e fósforo proveniente do TMP foram mensurados de acordo com o método de Fiske e Subbarow [1925]. Enquanto que, para as amostras que foram expostas ao desafio cariogênico, determinação de P a partir de TMP, foi feita pelo processo de banho-maria em ebulição a 60 ° C por 6 h [Cavazana *et al.*, 2020].

2.6. Avaliação de F, Ca, P e TMP na biomassa do biofilme

Para a mensuração da composição inorgânica da biomassa do biofilme, foi adicionado 0,5 mol/L de HCL aos microtubos que continham os biofilmes transferidos na proporção de 0,5 mL/10 mg de peso úmido da placa [Cury *et al.*, 2000] e então foi homogeneizado. A combinação resultante foi mantida por 3h à temperatura ambiente sob agitação constante (120 rpm) e depois centrifugada (11.000 x g) por 1 min [Nobre Dos Santos *et al.*, 2002]. Uma quantidade conhecida da amostra foi removida e o mesmo volume de 0,5 mol/L de NaOH foi adicionado.

O íon F foi mensurado como foi descrito anteriormente, usando padrões contendo 0,09, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções sem F) e 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 e 12,8 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções contendo F). Para biofilmes expostos ao desafio cariogênico, a curva de calibração foi realizada usando padrões de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 µg F/mL. Ca e P foram determinados como foi descrito anteriormente para o fluido de biofilme.

2.7. Análise estatística

Os dados de proteínas e carboidratos da matriz extracelular passaram nos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e foram submetidos a ANOVA de 1 critério, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os dados de composição inorgânica do biofilme, foi submetido ANOVA 2 critérios, seguida pelo teste de Fisher LSD. As análises estatísticas foram realizadas com o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), adotando-se $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Composição da matriz extracelular

Todos os tratamentos foram capazes de reduzir as concentrações de proteína e carboidrato em relação ao grupo CTL. Para proteína, os grupos 1TMPnF, 1TMPmF, 3TMPmF e 3TMPnF apresentaram concentrações deste componente significativamente menores quando comparada a dos demais grupos. Em relação aos carboidratos, o grupo 3TMPnF apresentou concentrações deste componente significativamente menores que a dos demais grupos, seguido pelas dos grupos 3TMPmF e 1TMPmF, sem diferença estatística entre eles.

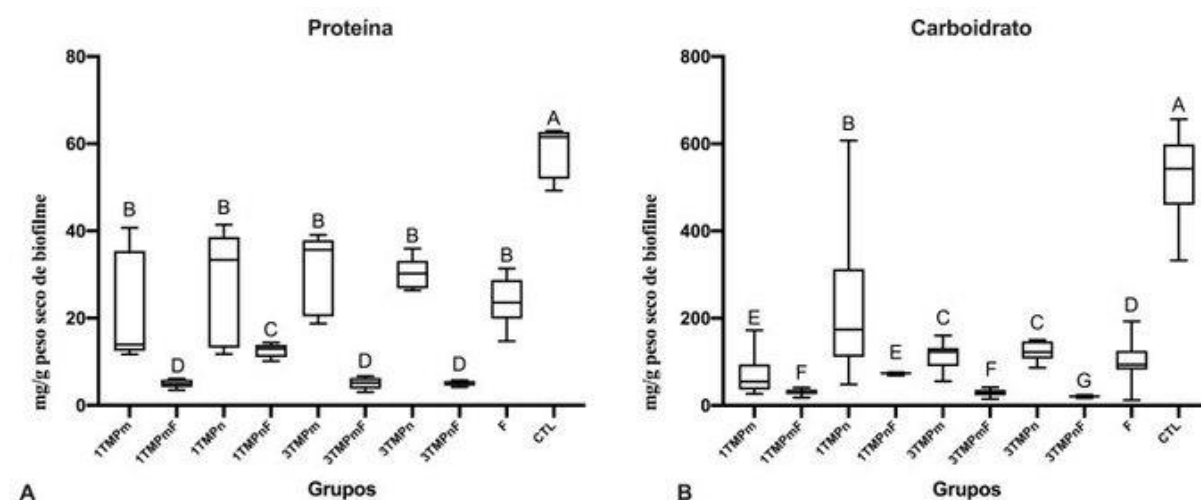


Figura 1. Valores médios (DP) de proteína (A) e carboidrato (B) da matriz extracelular de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* obtidos após tratamento com diferentes concentrações de TMPm ou TMPn, combinados ou não com F. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos. F: fluoreto (1100 ppm F); TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

3.2. F, Ca, P e TMP no fluido do Biofilme

Após a exposição a sacarose as concentrações de íons F, P e TMP no fluido do biofilme foram menores quando comparado aos biofilmes sem exposição ($p < 0,001$), independentemente do tratamento (Figura 2). O grupo 3TMPnF apresentaram maior concentração de F quanto comparado a todos os outros tratamentos antes da exposição de sacarose. Após a exposição a sacarose, os grupos 3TMPmF e 3TMPnF apresentaram níveis de F semelhantes ao 1100 ppm F e superior aos grupos 1TMPmF e 1TMPnF ($p < 0,001$).

Para as concentrações de Ca, após exposição à sacarose, o grupo 1100 ppm F, apresentou concentrações significativamente maiores deste íon quando comparado

antes da exposição. Com relação aos outros tratamentos com TMPn, estes não levaram a alterações nas concentrações de Ca após a exposição à sacarose.

As concentrações de P foram maiores para os grupos tratados com TMP sem F, independentemente do tamanho da partícula, tanto antes quanto após a exposição a sacarose ($p < 0,001$; Figura 2C), com exceção do grupo 3TMPn e 3TMPnF que foram semelhantes após a exposição. A concentração de TMPm e TMPn no fluido do biofilme (Figura 2D) foi maior quando TMP não foi associado a F ($p < 0,009$), com exceção do 1TMPn e 1TMPnF, semelhantes entre si ($p = 0,054$), antes da exposição, e dos grupos com 3TMPm e 3TMPn ($p = 0,499$), na qual a presença do F aumentou a concentração do TMP quando comparado as suas contrapartes sem F, após a exposição a sacarose. Além disso, uma relação de dose-resposta foi observada para as concentrações de TMPm e TMPn no fluido do biofilme com relação às soluções de tratamento, ou seja, quanto maior a concentração do fosfato maior a quantidade de P proveniente do TMP (Figura 2).

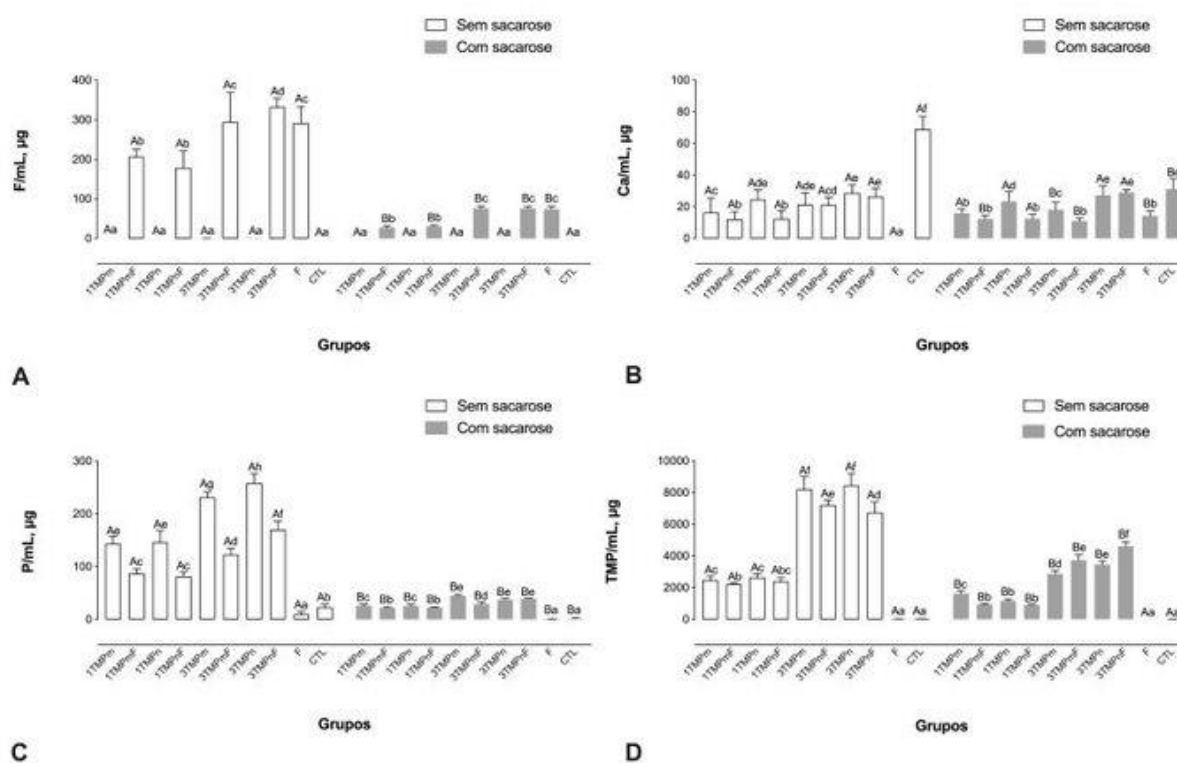


Figura 2. Valores médios de F (A), Ca (B), P (C) e TMP (D) no fluido do biofilme, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, teste de Fisher LSD; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

3.3. F, Ca, P e TMP na biomassa do Biofilme

As concentrações de F, P e TMP na biomassa do biofilme foram menores após o desafio cariogênico em comparação com suas contrapartes não expostas à sacarose expostas ($p < 0,001$), independentemente do tratamento (Figura 3). Em relação às concentrações de F, os biofilmes tratados apenas com F apresentaram concentrações destes íons significativamente maiores quando comparados a todos os outros grupos, antes e após a exposição à sacarose (Figura 3A). Além disso, os grupos 1TMPmF e 1TMPnF apresentaram valores de F significativamente maiores quando comparado ao 3TMPmF e 3TMPnF, antes e após a exposição a sacarose.

Quanto às concentrações de Ca, o grupo F apresentou concentração deste íon significativamente maior quando comparado aos demais grupos, antes e após a exposição a sacarose. Além disso, os grupos tratados com 3TMPm e 3TMPn, com e sem F, apresentaram maiores concentrações de Ca quando comparado aos grupos tratados com 1TMPm e 1TMPn, com ou sem F.

Com relação ao P na biomassa, foram observados valores significativamente maiores para os biofilmes tratados com maior concentração de TMP (*i.e.*, 3% de TMP), independentemente do tamanho da partícula ou da presença de F, mostrando um padrão dose-dependente (Figura 3C), antes da exposição a sacarose. Quanto aos níveis de TMP na biomassa, estes foram proporcionais aos observados nas soluções de tratamento, na qual 3TMPnF promoveu maior quantidade de TMP na biomassa quando comparada aos demais grupos, antes da exposição da sacarose (Figura 3D).

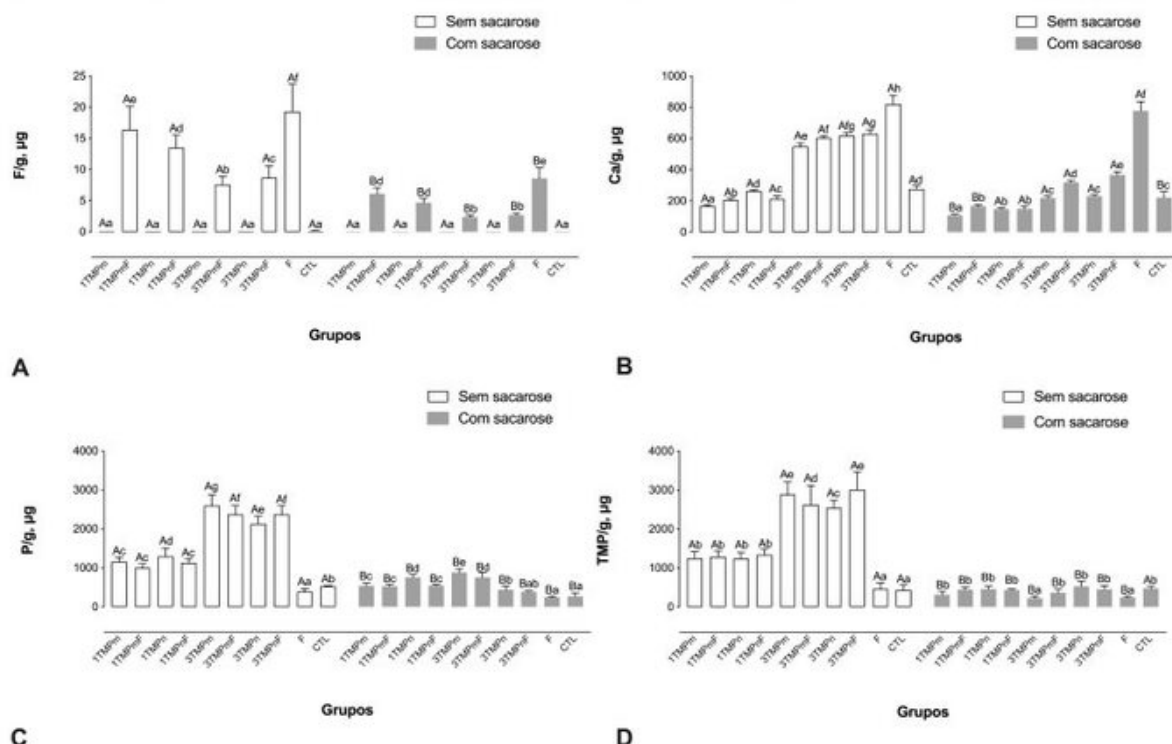


Figura 3. Valores médios de F (A), Ca (B), P (C) e TMP (D) na biomassa do biofilme, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA, teste de Fisher LSD; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

3.4. Medição de pH

O pH dos biofilmes após o desafio cariogênico foi menor em relação aos não expostos à sacarose ($p < 0,001$), (Figura 4). Os grupos 1TMPnF, 3TMPmF e 3TMPnF apresentam pH significativamente maiores quando comparado aos de biofilmes tratados apenas com F (1100 ppm F), antes e após a exposição de sacarose. Os tratamentos com 1TMPnF e 3TMPnF levaram a pH mais alto quando comparado aos outros tratamentos, após a exposição a sacarose (Figura 4), com exceção do 3TMPmF que foi semelhante ao 1TMPnF.

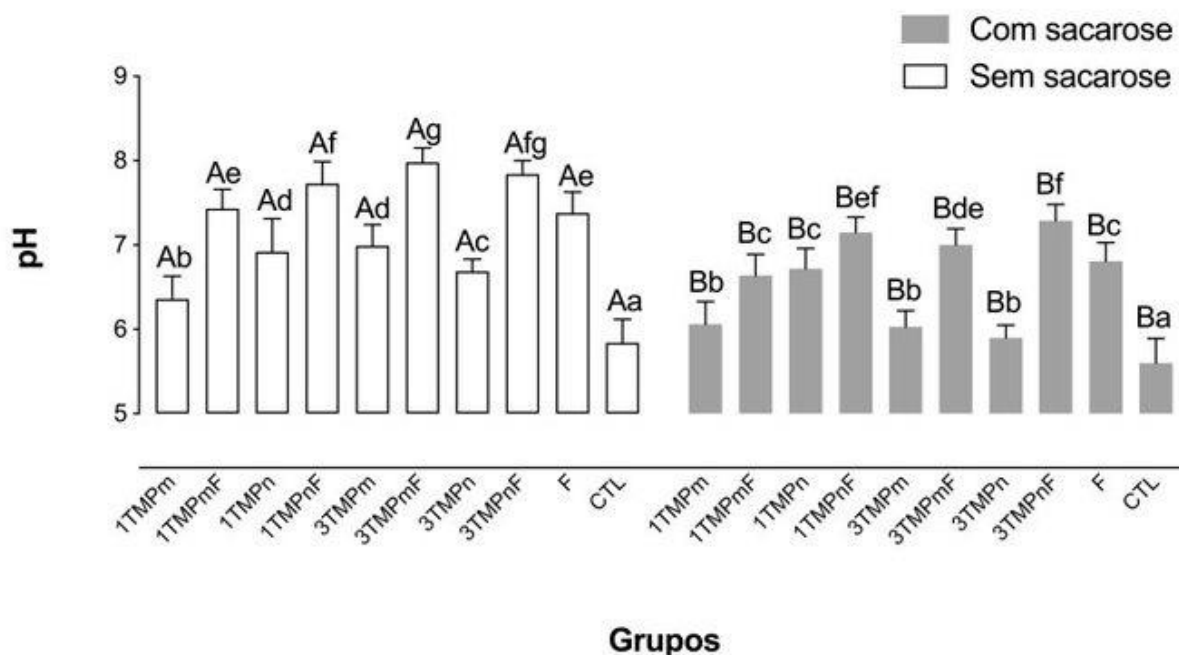


Figura 4. Valores médios de pH, antes e após a exposição à sacarose (desafio cariogênico). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos. (ANOVA, teste LSD de Fisher; $p < 0,05$). As barras denotam os desvios padrão dos grupos. Ca: cálcio; F: fluoreto; P: fósforo; TMPm: trimetafosfato de sódio microparticulado; TMPn: trimetafosfato de sódio nanoparticulado; CTL: controle negativo.

4. Discussão

Estudos recentes observaram que o TMP combinado ao F levou a efeitos marcantes no pH, na composição da matriz extracelular (*i.e.*, carboidratos e proteína), e componentes inorgânicos de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* [Cavazana *et al.*, 2019; 2020]. Além disso, foi demonstrado que a redução do tamanho das partículas para escala nanométrica (*i.e.*, TMPn) melhorou a efetividade desta combinação [Danelon *et al.*, 2015; Emerenciano *et al.*, 2018]. O presente estudo avaliou os efeitos do TMPn associado ou não ao F (1100 ppm F) sobre a composição inorgânica do biofilme, sobre o pH e os componentes da matriz extracelular de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*, demonstrando que a nanopartícula levou a maior concentração de F no fluido do biofilme se comparado a sua contraparte microparticulada, além de promover um pH mais próximo do neutro e diminuir significativamente a expressão de carboidratos e proteínas da matriz extracelular

destes biofilmes, se comparado a sua contraparte microparticulada ou à solução contendo somente 1100 ppm F, levando então à rejeição da hipótese nula do estudo.

A produção de matriz extracelular contendo glucanos insolúveis em água é um fator de virulência importante associado à patogênese da cárie dentária [Xiao *et al.* 2018]. Logo, a redução de proteína e carboidrato observadas neste estudo são interessantes (Figura 1), visto que poderá influenciar na redução da troca de informações genéticas, na adesão e agregação celular e na formação de nichos ácidos nos biofilmes [Bowen *et al.*, 2018]. O grupo 3TMPnF apresentou maior redução de proteína e carboidrato, o que pode ser reflexo da concentração de TMP e F, e principalmente pelo tamanho da partícula, pois essas partículas menores apresentam alta proporção de área de superfície em relação ao volume, bem como uma alta porcentagem de átomos na superfície em comparação com partículas maiores, o que as torna mais reativas [Danelon *et al.*, 2015]. Esses resultados corroboram com estudo *in situ*, que mostrou que a associação de 1100 ppm F e 3% de TMPm ou TMPn levou a uma redução de polissacarídeos extracelulares (EPS) maior que tratamentos com 1100 ppm F sem TMP [Emerenciano *et al.* 2018].

A ação do TMP na redução de carboidratos na matriz extracelular pode estar parcialmente relacionada à maior disponibilidade de Ca no biofilme [Boyd, 1978 ; Souza *et al.*, 2017 ; Takeshita *et al.*, 2015], entretanto, para biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans*, os grupos que apresentaram maiores valores de Ca (CTL para o fluido de biofilme, e F para a biomassa do biofilme) (Figura 2A), não demonstraram as maiores reduções nos componentes da matriz avaliados (Figura 1). Embora as razões para esse padrão não estejam totalmente esclarecidas, alguns fatores podem ter exercido influência nesses resultados. Diferentemente dos estudos supramencionados [Boyd, 1978; Souza *et al.*, 2017; Takeshita *et al.*, 2015], o presente trabalho avaliou a concentração iônica separadamente, fluido do biofilme e biomassa, sem a presença de um substrato dentário para formação do biofilme e ausência de fluxo salivar contínuo. Além disso, partículas nanométricas de TMP, por apresentarem, uma porcentagem maior de átomos na superfície e acarretar em uma maior reatividade [Xu *et al.*, 2010, Danelon *et al.*, 2015, Emerenciano *et al.*, 2018] com o biofilme e possivelmente uma maior interação com o íon Ca presente no meio de cultura e nas estruturas dos microrganismos (*i.e.*, parede celular e membrana externa), fazendo com que este íon não fique disponível para quantificação no fluido do biofilme ou na biomassa [Sampaio *et al.*, 2018].

A redução do tamanho da partícula do TMP levou a um efeito aditivo no pH dos biofilmes, visto que, mesmo após exposição à sacarose, os biofilmes tratados com 1TMPn e 3TMPn, combinado com F apresentaram pH significativamente mais alto em comparação com sua contraparte microparticulada e o controle positivo (*i.e.*, 1.100 ppm F). É importante ressaltar também que altas concentrações de TMP na fase fluida do biofilme podem interferir no pH, uma vez que esse polifosfato inorgânico também é utilizado como agente tamponante [Lanigan, 2001]. Entretanto, apesar do grupo 3TMPnF apresentar menor concentração de TMP no fluido do biofilme quando comparado a sua contraparte sem F, este apresentou pH mais alto, possivelmente devido a diminuição da acidogenicidade de *S. mutans* promovida pelo F, pois este se liga ao H^+ produzido pelas bactérias, chega ao citoplasma bacteriano e inibe as enzimas glicólicas, causando uma diminuição na produção de ácido por *S. mutans* [Buzalaf *et al.*, 2011]; bem como inibição da síntese de polissacarídeos extracelulares pela diminuição da expressão genética ligada a glicosiltransferases e glicólise, processos que levam à queda do pH [Pandit *et al.*, 2018]. A capacidade tampão do TMP associado F na queda de pH já foi relatada em um estudo anterior, no qual 1% TMPm associado a 500 ppm F foi capaz de manter o pH de biofilmes próximo ao neutro mesmo após ao desafio cariogênico [Cavazana *et al.*, 2020]. Esses resultados estão relacionados à capacidade tamponante que este fosfato possui, devido à sua propriedade quelante; seguindo esse raciocínio, a presença de TMP no fluido do biofilme leva à ligação de TMP a H^+ e de Na a OH^- [Lanigan, 2001].

Com relação à composição inorgânica dos biofilmes, o presente estudo demonstrou uma redução nas concentrações de F e P do biofilme após a exposição a sacarose, como observado *in situ* [Cury *et al.*, 1997] e *in vivo* [Bayrak *et al.*, 2011], visto que quase todos os minerais do biofilme (fluido e biomassa) sofrem redução após o desafio cariogênico [Tenuta *et al.*, 2006]. Ademais, uma relação dose-resposta com relação às concentrações de TMP das soluções de tratamento sobre os níveis de P iônico e P proveniente do TMP, tanto no fluido do biofilme quanto na biomassa; concomitantemente, uma maior concentração de F foi observada no fluido do biofilme expostos à maiores concentrações de fosfato (Figura 2A). O tratamento 3TMPnF promoveu uma maior concentração de F no fluido do biofilme quando comparado aos outros grupos contendo a mesma concentração F (*i.e.*, 1100 ppmF), porém menor concentração de P iônico e P proveniente do TMP quando comparado com a sua contraparte sem F, possivelmente devido ao fato do TMP ser considerado um

polifosfato inorgânico e, portanto, um quelante de metais [Lee et al., 1994]. Sendo assim, é possível que cátions do biofilme, como o Ca, induza a ligação do TMP as célula bacterinas, ao invés do F [Domon-Tawarayaetal., 2013, Rose et al., 1996], diminuindo os números de ligação do F com as bactérias, reduzindo seus os níveis na biomassa e aumentando os níveis no fluido do biofilme, evidenciando que o tamanho da partícula do TMP pode potencializar essa interação.

A maior disponibilidade de P no fluido do biofilme após o tratamento com soluções contendo TMP também pode interferir na formação de CaHPO_4^0 ; a formação deste composto é de extrema importância em relação à remineralização do esmalte, devido ao seu maior coeficiente de difusão no esmalte em comparação com o Ca iônico [Cochrane et al., 2008]. Em relação a combinação de TMP e F em maiores concentrações no fluido do biofilme, possibilitaria maior liberação de CaF^+ no meio bucal, reagindo ainda mais com HPO_4^{2-} , e formando CaHPO_4^0 e HF^0 , elementos que apresentam maior coeficiente de difusão em lesões de cárie subsuperficiais em comparação ao cálcio iônico [Cochrane et al., 2008, Manarelli et al., 2015; Freire et al., 2016], o que pode impactar na dinâmica mineral e desmineralização do esmalte.

O fato do TMP atuar como quelante de metais pode influenciar no aumento da concentração de Ca principalmente na biomassa. Logo, uma maior concentração de Ca foi observada nos grupos tratados com 3% TMPm ou TMPn, associado ou não F. O tratamento com 1100 ppmF apresentou maiores concentrações de Ca na biomassa, e as concentrações de F foram proporcionais e esses níveis, corroborando com o estudo anterior [Pessan et al., 2010].

A quantidade limitada de microorganismos utilizados, a ausência de um substrato dentário para que o biofilme fosse formado sobre ele e a falta de fluxo salivar contínuo, são situações que ocorrem in vivo, que tem função limitante no protocolo usado no presente estudo. Essas limitações, tornaram-se necessárias para que as possíveis interferências fossem minimizadas e os resultados não fossem induzidos. Com base no exposto, seria interessante desenvolver novos estudos com outros modelos experimentais.

Tendo em vista o contexto abordado acima, pode-se concluir que TMPn combinado com F influenciou na redução dos componentes da matriz extracelular e no pH dos biofilmes de duas espécies analisados, além de afetar os componentes inorgânicos destes biofilmes, aumentando a disponibilidade de P e F no fluido do biofilme. Os dados apresentados neste estudo contribuem para o entendimento de

como TMPn e F atuam na dinâmica da cárie dentária, elucidando a atividade desta combinação sobre o biofilme.

REFERÊNCIAS

1. Anderson W, Dingwall D, Stephen KW. Dissolution of two commercial preparations of calcium glycerophosphate in human saliva. *Arch Oral Biol.* 1977;22(3):159-62.
2. Bachtiar EW, Bachtiar BM. Relationship between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in early childhood caries, evaluated by quantitative PCR. *F1000Res.* 2018 Oct 16;7:1645.
3. Bayrak S, Okte Z, Fidanci UR. Relação entre cárie e composição da placa dentária. *Am J Dent.* 2011 fev;24(1):45–8.
4. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018 Mar;26(3):229-242.
5. Boyd RF. The effect of some divalent cations on extracellular polysaccharide synthesis in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res.* 1978 Feb;57(2):380-3.
6. Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. *Biofouling.* 2019 Jul;35(6):710-718.
7. Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Monteiro DR, Botazzo Delbem AC. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions in vitro. *Arch Oral Biol.* 2018 Jun;90:9-12.
8. Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Sampaio C, Amarante VOZ, Monteiro DR, Delbem ACB. Effects of Sodium Trimetaphosphate, Associated or Not with Fluoride, on the Composition and pH of Mixed Biofilms, before and after Exposure to Sucrose. *Caries Res.* 2020;54(4):358-368.
9. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res.* 2008;42(2):88–97.
10. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. Relação in situ entre a exposição à sacarose e a composição da placa dentária. *Cárie Res.* 1997;31(5):356-60.
11. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec;34(6):491-7.
12. Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent.* 2015 Jul;43(7):806-13.

13. Danelon M, Pessan JP, Santos VRD, Chiba EK, Garcia LSG, de Camargo ER, Delbem ACB. Fluoride toothpastes containing micrometric or nano-sized sodium trimetaphosphate reduce enamel erosion in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2018 Mar;76(2):119-124.
14. Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2017 Jun;78:82-87.
15. Danelon M, Takeshita EM, Sassaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent*. 2013 Feb;26(1):15-20.
16. de Castro LP, Delbem AC, Danelon M, Passarinho A, Percinoto C. In vitro effect of sodium trimetaphosphate additives to conventional toothpastes on enamel demineralization. *Clin Oral Investig*. 2015 Sep;19(7):1683-7.
17. Domon-Tawaraya H, Nakajo K, Washio J, Ashizawa T, Ichino T, Sugawara H, et al. Os cátions bivalentes aumentam a ligação do flúor às células de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* e subsequentemente inibem a produção de ácido bacteriano. *Cárie Res*. 2013;47(2):141–9.
18. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 1956;28(3):350-6.
19. Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, de Camargo ER, Danelon M. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol*. 2018 Dec;96:223-229.
20. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Biol Chem*. 1925;66:375–400.
21. Freire IR, Pessan JP, Amaral JG, Martinhon CC, Cunha RF, Delbem AC. Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: A randomized, controlled trial. *J Dent*. 2016 Jul;50:37-42.
22. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015 May;94(5):650-8.
23. Kirthiga M, Murugan M, Saikia A, Kirubakaran R. Risk Factors for Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case Control and Cohort Studies. *Pediatr Dent*. 2019 Mar 15;41(2):95-112.

24. Lanigan RS. Final report on the safety assessment of sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, and sodium hexametaphosphate. *Int J Toxicol.* 2001;20(3):75–89.
25. Lee RM, Hartman PA, Stahr HM, Olson DG, Williams FD. Mecanismo antibacteriano de polifosfatos de cadeia longa em *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot.* 1994 abril;57(4):289–94.
26. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, Schulte AG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14.
27. Maltz, M., Tenuta, L. M. A., Groisman, S., & Cury, J. A. *Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador: Série Abeno: Odontologia Essencial-Parte Clínica.* Artes Medicas(2016).
28. Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig.* 2015 Nov;19(8):2141–6.
29. Mendes-Gouvêa CC, do Amaral JG, Fernandes RA, Fernandes GL, Gorup LF, Camargo ER, Delbem ACB, Barbosa DB. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: characteristics and antimicrobial efficacy. *Biofouling.* 2018 Mar;34(3):299-308.
30. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, *et al.* Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett. Appl. Microbio.* 2012;54(5):383-91.
31. Nagata ME, Delbem AC, Hall KB, Buzalaf MA, Pessan JP. Fluoride and calcium concentrations in the biofilm fluid after use of fluoridated dentifrices supplemented with polyphosphate salts. *Clin Oral Investig.* 2017 Apr;21(3):831-837.
32. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res.* 2002 Sep-Oct;36(5):347-52.
33. Pandit S, Ca JN, Jung JE, Jeon JG. Effect of 1-minute fluoride treatment on potential virulence and viability of a cariogenic biofilm. *Caries Res.* 2016;49(4):449–457.
34. Pessan JP, Alves KM, Ramires I, Taga MF, Sampaio FC, Whitford GM, *et al.* Efeitos de dentifrícios regulares e com baixo teor de flúor no flúor da placa. *J Dent Res.* 2010 Out;89(10):1106–10.

35. Rose RK, Shellis RP, Lee AR. O papel da ponte catiônica na ligação microbiana de flúor. *Cárie Res.* 1996;30(6):458–64.
36. Sampaio C, Hosida TY, Cavazana TP, Monteiro DR, Pessan JP, Delbem ACB. Evaluation of sodium hexametaphosphate, associated or not with fluoride, in mixed biofilm before and after exposure to sucrose, In: *Proceedings of the 35th SBPqO Annual Meeting, Braz. Oral Res.* 2018;32:50.
37. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009 Nov;47(7):681-9.
38. Souza MDB, Pessan JP, Lodi CS, Souza JAS, Camargo ER, Souza Neto FN, Delbem ACB. Toothpaste with Nanosized Trimetaphosphate Reduces Enamel Demineralization. *JDR Clin Trans Res.* 2017 Jul;2(3):233-240.
39. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sassaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. *Caries Res.* 2015;49(4):394-400.
40. Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res.* 2006 Sep;85(9):834-8.
41. Vogel GL, Chow LC, Brown WE: A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res.* 1983;17:23-3
42. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, Castillo DA, Campbell F, Davis J, Herzog K, Billings R, Kopycka-Kedzierawski DT, Hajishengallis E, Koo H. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res.* 2018;52(1-2):102–112.
43. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, *et al.* Strong nanocomposites with Ca, PO(4) and F release for caries inhibition. *J. Dent. Res.* 2010;89:19–28.

ANEXO A

Caries Research

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online.

Should you experience problems with your submission, please contact

Prof. David Beighton
(Editor-in-Chief, Caries Research)
Department of Microbiology
The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research
KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower
London Bridge SE1 9RT (UK)
Tel. +44 2071887465
Fax +44 2071887466
cre@karger.com

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

For legal reasons, we must receive your '**Submission Statement**' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope. Reviews are not subject to page charges.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- ☐ the title, which should be informative but concise;
- ☐ the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;

- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surface-softened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence:

"The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- ☐ Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- ☐ Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- ☐ Figures with a screen background should not be submitted.
- ☐ When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2. Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional information which is directly pertinent to the content and conclusion of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The editors reserve the right to reject or limit the scope and length of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. Acceptable file formats are word or pdf, excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a pdf file), video files (.mov, .avi, .mpeg), and audio files (.wav), either free standing or incorporated into html or ppt files in each case to illustrate the sound.

Accepted supplementary material will be published as submitted and no proofs will be provided to the authors.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org.

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. For all self-archiving, the posted manuscripts must:

Be used for noncommercial purposes only

Be linked to the final version on www.karger.com

Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g. Cytogenet Genome Res 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)].

For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

Author'sChoice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice. The final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

Follow the terms of the relevant Creative Commons license

Be linked to the final version on www.karger.com

Include the following statement:

'The final, published version of this article is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Funding Organizations (NIH etc.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their paper Open Access through Author's Choice™, the embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility of the article. Karger also complies with other funders' requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC.

Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

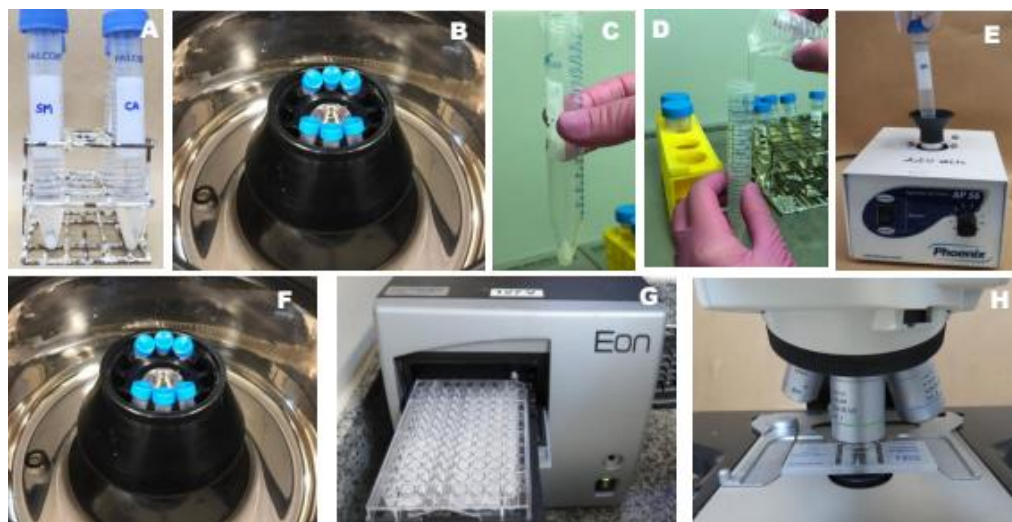
Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.

ANEXO B

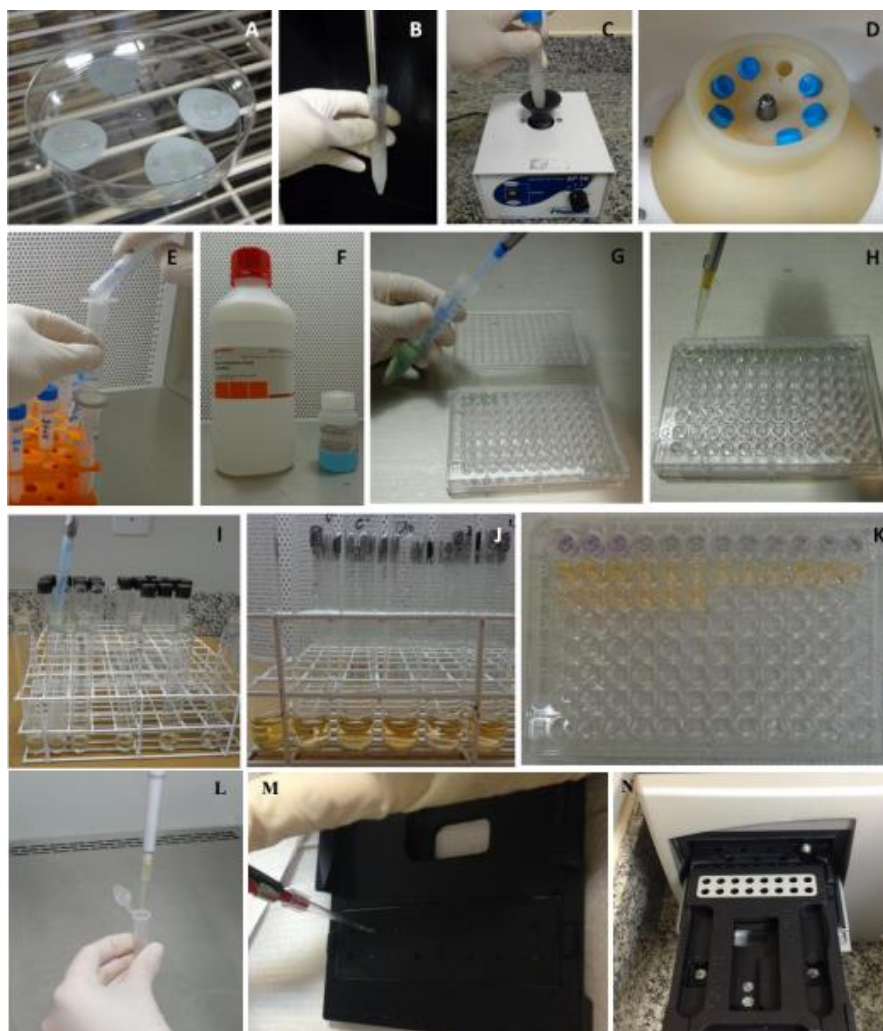
ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DO INÓCULO DA CEPA

DE *S. mutans* E *C. albicans*

(A) Preparação do pré-inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231; (B) Centrifugação do inóculo a 8000 rpm durante 5 min; (C) Obtenção do pellet de células e descarte do sobrenadante; (D) Lavagem das células de *S. mutans* e *C. albicans* NaCl (0,85%), (E) Homogeneização em vórtex e (F) Centrifugadas novamente (foram realizadas duas lavagens com NaCl); (G) Alíquotas de 200 µl adicionadas aos poços de placas de 96 poços e levadas para leitura em espectrofotômetro a 640 nm afim de ajustar o número de células de *S. mutans* para 10^8 células/mL em saliva artificial (SA); (H) O número de células de *C. albicans* ajustado para 10^7 células/mL em SA usando uma câmara de Neubauer.

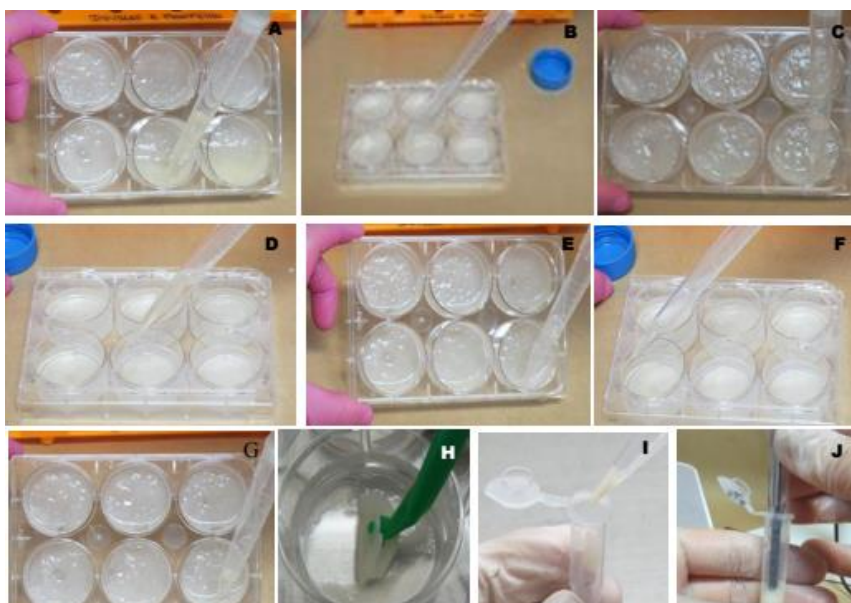
ANEXO C

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E CARBOIDRATO DA MATRIZ EXTRACELULAR DOS BIOFILMES



(A) Secagem das amostras de biofilmes após tratamento com TMP e/ou F em membrana de acetato de celulose (previamente pesada), para determinação do peso seco dos biofilmes; (B) Amostra sonicada a 30 w por 30 s e (C) homogeneizada em vórtex; (D) centrifugação das amostras durante 10 min a 3000 g; (E) filtração do sobrenadante obtido anteriormente; (F) Kit BCA utilizado para quantificação do conteúdo proteico da matriz extracelular; (G) Pipetagem de 200 μ l da mistura dos reagentes do kit em poços de placa de 96 poços; (H) Pipetagem de 25 μ l do sobrenadante da amostra de biofilme para quantificação de proteínas; (I) Para determinação do conteúdo de carboidrato da matriz extracelular, 500 μ l do sobrenadante das amostras foram adicionados à mistura de 500 μ l de fenol a 9% e 2,5 mL de ácido sulfúrico em tubos de ensaio de vidro; (J) Diferentes tonalidades de cores nos tubos

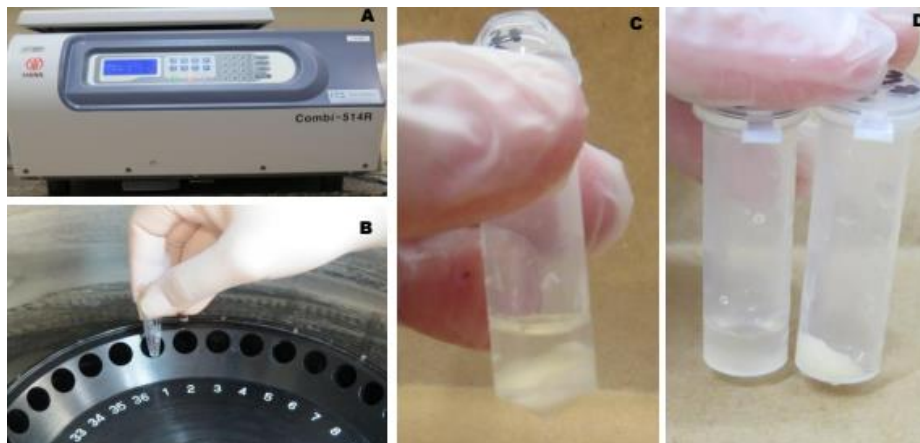
demonstrando diferentes teores de carboidrato; (K) As quantidades de proteína e carboidrato da matriz dos biofilmes foram determinadas colorimetricamente por leitura em espectrofotômetro a 562 e 490 nm, respectivamente.

ANEXO D**TRATAMENTO E MEDIÇÃO DO pH DOS BIOFILMES**

(A) Remoção do meio de cultura (saliva artificial); (B) Tratamento com as soluções; (C) remoção do tratamento; (D) Introdução de saliva artificial (2 mL); (E) remoção da saliva artificial; (F) Solução de sacarose a 20%; (G) Remoção da sacarose após 3 minutos; (H) Raspagem dos biofilmes dos poços utilizando um raspador de células após 1 minuto da remoção da sacarose; (I) Biofilmes transferidos para microtubos; (J) pH do biofilme depois da exposição à sacarose.

ANEXO E

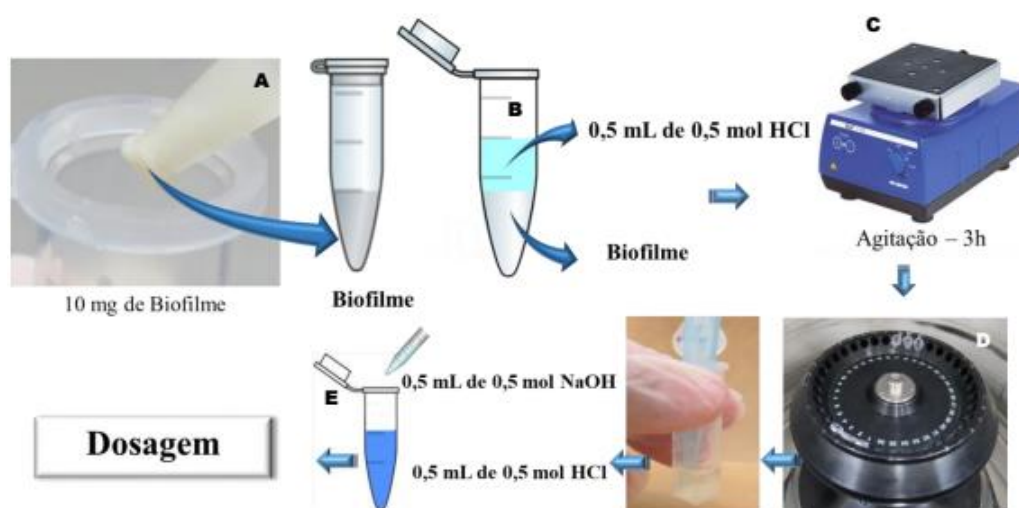
SEPARAÇÃO DO FLUIDO DO BIOFILME



(A) e (B) Centrifugação dos microtubos ($1,5267 \times g$ á 4°C por 5 minutos); (C) Aspecto do biofilme após a centrifugação (biomassa e fluido); (D) Separação do fluido com biofilme.

ANEXO F

EXTRAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DA BIOMASSA



(A) Pesagem de 10 mg de biofilme; (B) Adicionado 0,5 mol/L de HCl aos microtubos contendo os biofilmes na proporção de 0,5 mL/10,0 mg de peso úmido da placa e homogeneizados; (C) Mistura resultante mantida por 3 horas à temperatura ambiente sob agitação constante (120 rpm); (D) Centrifugação (11.000 × g) por 1 minuto; (E) Remoção de quantidade conhecida do líquido e adicionado o mesmo volume de NaOH a 0,5 mol/L.

ANEXO G

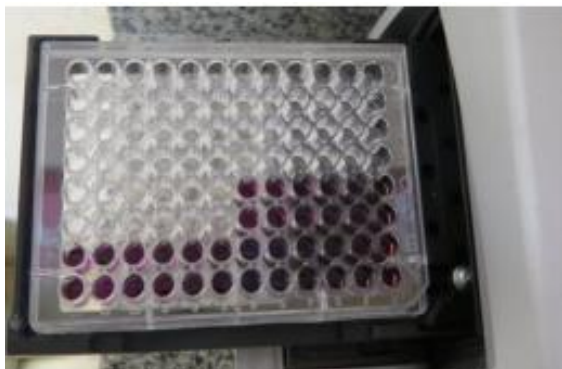
DOSAGEM DE F NO FLUIDO E NO BIOFILME



(A) Eletrodo específico (Orion 9409 BN) e eletrodo de referência (Orion 900100), ambos acoplados a um potenciômetro (Orion - Thermo Scientific); (B) Proporção tampão (TISAB II) e amostra de 1:1 (40 μ L de TISAB II + 40 μ L de AMOSTRA).

ANEXO H

DOSAGEM DE Ca DO FLUIDO E DA BIOMASSA



5 μL da amostra + 50 μL de água deionizada + 50 μL de Arsenazo

Placas foram agitadas por 60 segundos - reação entre a amostra e Arsenazo III

Leitura da absorbância a 650 nm

DOSAGEM DE P_i DO FLUIDO E DA BIOMASSA

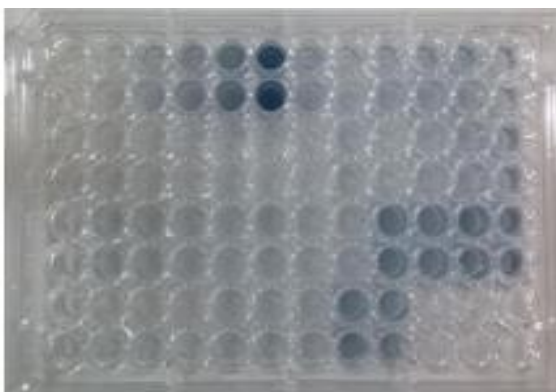


100 μL da amostra + 50 μL de Molibdato de Amônia + 20 μL Reativo Redutor

Placas foram agitadas por 10 minutos - reação entre a amostra e Mobilidato de amônia + 20 min – reação com Reativo Redutor.

Leitura da absorbância a 660 nm

DOSAGEM DE P PROVENIENTE DO TMP DO FLUIDO E DA BIOMASSA



100 μL da amostra + 100 μL de 1Mol Ác. Clorídrico + Aquecimento 100°C – 1h + 100 μL de 1Mol NaOH

50 μL Molibdato amônia + 20 μL Reativo Redutor

Placas foram agitadas por 10 minutos - reação entre a amostra e Mobilidato de amônia + 20 min – reação com Reativo Redutor.

Leitura da absorbância a 660 nm