UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

BRUNA DO AMARAL

Influência da quantidade de dentifrício e concentração de fluoreto sobre a concentração de flúor de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans in vitro*

Araçatuba
2023

BRUNA DO AMARAL

Influência da quantidade de dentifrício e concentração de fluoreto sobre a concentração de flúor de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), para a obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan

Araçatuba
2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e a oportunidade de realizar este curso.

À minha família por todo amor, compreensão e paciência.

Ao meu orientador, professor Juliano Pelim Pessan, que durante todo o tempo esteve presente, dividindo seus conhecimentos, experiências e sabedoria.

Ao professor Caio Sampaio, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

À professora Thayse Yumi Hosida por ter aceitado fazer parte desse momento e por todos ensinamentos compartilhados durante a clínica de odontopediatria.

Aos amigos Maria Bethânia, Iago e Maria Eduarda e a todos aqueles que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente projeto foi desenvolvido com o apoio da CNPq através da concessão de bolsa de estudo de Auxílio a Projeto de pesquisa, número da proposta 4647 - Edital PIBIC 2021-2022.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Código de financiamento 001.

AMARAL, B. **Influência da quantidade de dentifrício e concentração de fluoreto sobre a concentração de flúor de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans in vitro*.** 2023. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Este estudo avaliou a influência da quantidade de dentifrício e concentração de fluoreto (F) no produto sobre a composição inorgânica e pH de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Biofilmes foram formados e tratados 72, 78 e 96 horas após o início de sua formação com suspensões de dentifrícios fluoretados por 1 min. Os tratamentos incluíram dentifrícios contendo 550 ou 1100 ppm F (550F ou 1100F, respectivamente) administrados em intensidades (i) comparáveis: (i-1) 550F/0,08 g ou 1100F/0,04 g; (i-2) 550F/0,16 g ou 1100F/0,08 g; e (i-3) 550F/0,32 g ou 1100F/0,16 g. Um dentifrício placebo (sem NaF, 032 g) foi utilizado como controle negativo. Após o último tratamento, os biofilmes tiveram o seu pH determinado, e as concentrações de F, fósforo (P) e cálcio (Ca) foram analisadas na biomassa e no fluido dos biofilmes. Os dados foram submetidos à ANOVA ou teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (p<0,05). Observou-se que todos os biofilmes tratados com dentifrícios com F apresentou valores de pH maiores que o placebo (PLA). Os maiores valores de pH foram observados para os biofilmes tratados com 1100 ppm F, na intensidade 3. As concentrações de F (biomassa e fluido) aumentaram proporcionalmente tanto em relação à concentração de F no dentifrício, como à quantidade aplicada. De forma geral, 1100F resultou em concentrações de F semelhantes a 550F para i-1 e i-2. Para i-3, entretanto, maiores concentrações de F foram observadas para tratamento com 1100F. Em acréscimo, 550F aplicado a intensidades maiores (i-2 e i-3) levou a concentração de F significativamente maiores na biomassa e no fluido em comparação a 1100F aplicado em menores intensidades (i-1 e i-2, respectivamente). Para o Ca no fluido do biofilme, grupos tratados com dentifrícios fluoretados apresentaram valores significativamente menores que o PLA. Na biomassa, o grupo que apresentou o menor nível de Ca foi o 1100F, na intensidade 3. As concentrações de P no fluido dos biofilmes tratados com dentifrícios fluoretados foram significativamente menores que os dos biofilmes tratados com placebo, sem

diferenças marcantes, entretanto, entre biofilmes tratados com dentifrícios dentro das mesmas concentrações de F. Conclui-se que a intensidade do tratamento é um parâmetro mais relevante que a concentração de F ou quantidade de dentifrício considerados isoladamente.

Palavras–chave: Fluoretos. Biofilmes. Criança.

AMARAL, B. **Influence of the amount of toothpaste and fluoride concentration on the fluoride concentration of mixed biofilms of Streptococcus mutans and Candida albicans in vitro.** 2023. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of the amount of toothpaste and fluoride (F) concentration in the product on the inorganic composition and pH of mixed biofilms of Streptococcus mutans and Candida albicans. Biofilms were formed and treated 72, 78 and 96 hours after the beginning of their formation with fluoridated toothpaste suspensions for 1 min. Treatments included toothpastes containing 550 or 1100 ppm F (550F or 1100F, respectively) administered at comparable intensities (i): (i-1) 550F/0.08 g or 1100F/0.04 g; (i-2) 550F/0.16 g or 1100F/0.08 g; and (i-3) 550F/0.32 g or 1100F/0.16 g. A placebo toothpaste (without NaF, 032 g) was used as a negative control. After the last treatment, the biofilms had their pH determined, and the concentrations of F, phosphorus (P) and calcium (Ca) were analyzed in the biomass and fluid of the biofilms. Data were submitted to ANOVA or Kruskal Wallis test, followed by Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$). It was observed that all biofilms treated with toothpastes with F presented pH values higher than placebo (PLA). The highest pH values were observed for biofilms treated with 1100 ppm F, at intensity 3. The concentrations of F (biomass and fluid) increased proportionally both in relation to the concentration of F in the toothpaste and to the amount applied. Overall, 1100F resulted in F concentrations similar to 550F for i-1 and i-2. For i-3, however, higher F concentrations were observed for treatment with 1100F. In addition, 550F applied at higher intensities (i-2 and i-3) led to significantly higher F concentration in biomass and fluid compared to 1100F applied at lower intensities (i-1 and i-2, respectively). For Ca in the biofilm fluid, groups treated with fluoridated toothpastes presented significantly lower values than PLA. In the biomass, the group that presented the lowest level of Ca was the 1100F, at intensity 3. The concentrations of P in the fluid of biofilms treated with fluoridated toothpastes were significantly lower than those of biofilms treated with placebo, with no marked differences, however, between biofilms treated with toothpastes within the same concentrations of F. It is concluded that the

intensity of treatment is a more relevant parameter than the concentration of F or amount of toothpaste considered alone.

Keywords: Fluorides. Biofilms. Child.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de estudo conforme a quantidade de dentifrício a ser utilizada e concentração de fluoreto dos dentifrícios 16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - pH dos biofilmes após tratamentos de acordo com os grupos experimentais. Letras distintas denotam diferença entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, $p<0,05$, $n=9$) 18

Figura 2 - Concentrações de fluoreto no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, $p<0,05$, $n=9$) 19

Figura 3 - Concentrações de cálcio no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, $p<0,05$, $n=9$) 19

Figura 4 - Concentrações de fósforo no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, $p<0,05$, $n=9$) 20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODO	15
3 RESULTADO	18
4 DISCUSSÃO	21
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Considerando-se a etiologia da cárie dentária, tem-se atribuído ao uso difundido de dentifrícios fluoretados como a uma das principais razões para o declínio na prevalência e incidência de cárie dentária no mundo, o que se deve, ao fato de o método combinar os efeitos terapêuticos do flúor com a remoção mecânica do biofilme (PITTS *et al.*, 2017). O biofilme dentário pode ser definido como uma comunidade microbiana organizada, aderida à superfícies vivas ou inertes, e envolvido por uma matriz extracelular produzida pelas células (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999]. Além da matriz extracelular, o biofilme dentário possui a sua porção líquida denominada fluido do biofilme, o qual exerce papel fundamental na dinâmica da manutenção da integridade mineral do dente (MARGOLIS E MORENO, 1992).

Apesar do importante papel que a utilização de F exerce sobre o controle da cárie dentária no mundo todo, a ingestão em excesso de F (principalmente a partir de dentifrícios) no período de formação dos dentes permanentes (*i.e.*, especialmente aos 2-3 anos de idade) pode levar à fluorose dentária (WONG *et al.*, 2010). Sendo assim, algumas alternativas têm sido propostas com a finalidade de se minimizar a ingestão de F por estas fontes, as quais incluem o uso de dentifrícios com concentração reduzida de F. Entretanto, as evidências científicas para a recomendação destes dentifrícios ainda são inconclusivas ou até mesmo contraditórias (SANTOS *et al.*, 2013; WALSH *et al.*, 2019), de forma que a prescrição destas formulações deve considerar riscos e benefícios para o paciente (PESSAN; TOUMBA; BUZALAF, 2011).

Diante do exposto, alguns profissionais têm recomendado o uso de dentifrícios com concentração convencional de F (1000-1100 µg F/g), mas em quantidades reduzidas. No entanto, um estudo avaliou as recomendações de práticas de higiene bucal de crianças por organizações odontológicas e pediátricas, tendo demonstrado haver grande variação na quantidade de dentifrício recomendada (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2011). Estas incluíram “pequena quantidade”, “borrão” (*smear*), “grão de ervilha”, “grão de arroz”, “tamanho da unha menor da mão da criança” e “técnica transversal”. É necessário ressaltar, entretanto, que as evidências disponíveis para tais recomendações são

inconsistentes. Para se maximizar os efeitos dos fluoretos na manutenção da saúde bucal, a frequência de escovação, hábitos de enxágue da boca, quantidade de dentifrício utilizada e a duração da escovação são fatores a serem considerados (PESSAN; TOUMBA; BUZALAF, 2011; ZERO *et al.*, 2010).

A influência da quantidade de dentifrício utilizada e do tempo de escovação sobre os níveis salivares de F, na incorporação de F pelo esmalte, bem como na remineralização de lesões incipientes de cárie foi estudada em um modelo *in situ* [ZERO *et al.*, 2010], de acordo com o qual os autores demonstraram uma relação direta entre as variáveis estudadas (tempo e quantidade de dentifrício) e a incorporação de F no esmalte, retenção na saliva e remineralização do esmalte. Desta forma, o uso de 1,5 g de dentifrício (em comparação a 0,5 g) demonstrou ser mais eficaz em aumentar a retenção de fluoreto nas superfícies bucais, incluindo o esmalte, o que pode, assim, ter o potencial para aumentar a eficácia do dentifrício [ZERO *et al.*, 2010]. Evidências de estudos prévios sobre a influência da quantidade de dentifrício utilizada, entretanto, são conflitantes. Estudos retrospectivos demonstraram não haver diferenças na progressão de cárie (ASHLEY *et al.*, 1999) e na retenção de F no biofilme dental (DUCKWORTH; MORGAN; BURCHELL, 1989) entre indivíduos utilizando diferentes quantidades de dentifrício durante a escovação. Por outro lado, Den Besten e Ko (1996) demonstraram haver um aumento 3 vezes maior na concentração de F na saliva de crianças utilizando 1 g de dentifrício na escovação, em comparação a crianças utilizando 0,25 g. Estes autores sugeriram, com base nestes resultados, que crianças deveriam usar quantidades maiores de dentifrício fluoretado tão logo não estejam em idade de risco para o desenvolvimento de fluorose dentária.

Considerando-se que a efetividade clínica de dentifrícios fluoretados é diretamente proporcional à retenção intrabucal de F (DUCKWORTH; MORGAN; GILBERT, 1992), estudos prévios avaliaram o impacto do uso de diferentes quantidades de dentifrício na retenção de F na saliva de crianças utilizando um dentifrício fluoretado padrão (1000-1100 µg F/g) e um dentifrício com concentração reduzida de F (500-550 µg F/g). Um estudo avaliando a concentração de F na saliva de crianças de 8-10 anos de idade, após o uso de dentifrícios contendo 0, 550 e 1100 ppm F, utilizando quantidades padronizadas equivalentes a aplicação do dentifrício em toda a extensão da escova (0,5 g), pela técnica transversal (0,3 g) ou

em quantidade semelhante a um grão de ervilha (0,1 g), seguindo um protocolo duplo-cego e cruzado. Foi observado que a escovação com um dentifrício contendo 550 ppm F aplicando a técnica transversal promove uma maior concentração de F na saliva em comparação a um dentifrício convencional usando a quantidade semelhante a uma ervilha (HALL *et al*., 2016), sugerindo que o uso de quantidades pequenas de um dentifrício convencional pode não ser tão efetivo quanto o uso de um dentifrício com concentração reduzida de flúor aplicado utilizando a técnica transversal. No entanto, recentemente, um estudo com crianças de 2-3 anos verificou que a escovação com um dentifrício de 1100 ppm F, aplicado a 0,16 g, levou a concentrações de F significativamente maiores que um dentifrício de 550 ppm F, aplicado a 0,32 g (SAMPAIO *et al*., 2020). Tendo em vista que as referidas intensidades de tratamentos (*i.e.*, quantidade de dentifrício e concentração de F no produto) levavam a mesma concentração quantidade final de F, os autores sugeriram que a maior ingestão de F a partir da escovação com maior quantidade de dentifrício, como demonstrado previamente na literatura (KOBAYASHI *et al*., 2011), poderia ter levado a uma menor retenção intrabucal de F a partir destas intensidades de tratamentos.

Apesar dos padrões supracitados acerca das concentrações de F na saliva de crianças após utilização de diferentes combinações de quantidades de dentifrícios e concentração de F no produto, informações sobre o efeito destas variáveis sobre biofilmes ainda são escassas. Diversos estudos relataram que a concentração de F afetou diretamente a virulência e composição de biofilmes cariogênicos formados *in vitro* (PANDIT *et al*., 2011; 2013; 2015; 2018). No entanto, até agora nenhum estudo avaliou a influência da intensidade de tratamento sobre a composição destes biofilmes. Sendo assim, tendo em vista o importante papel que o biofilme dentário exerce sobre o processo cariogênico, somado à escassez de informações sobre a influência da intensidade de tratamento sobre a composição do biofilme, a realização de um trabalho semelhante aos estudos supracitados poderia trazer informações relevantes acerca deste assunto. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de *slurries* de dentifrícios contendo 0, 550 ou 1100 ppm F, aplicados em diferentes quantidades, sobre o pH e concentrações de F, fósforo (P) e cálcio (Ca) em biofilmes (fluido e biomassa) mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. A hipótese nula do estudo é que a quantidade de dentifrício utilizada

durante o tratamento e a concentração de F no produto não exercem influência na composição inorgânica e no pH do biofilme analisado.

2 MATERIAL E MÉTODO

a. *Preparo da saliva artificial*

Foi preparada saliva artificial de acordo com Lamfon *et al*. (2003), conforme modificado por Cavazana *et al.* (2018), com a seguinte composição, para 1 L de água deionizada: 2 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich, St Louis, 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 $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado com NaOH 1M para 6,8.

b. Cepas de microrganismos, condições de crescimento e tratamento

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231. Culturas dos microrganismos mantidas a -70 °C em glicerol foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França), para *C. albicans*, e cultivadas por 24 horas a 37 ºC. Culturas de *S. mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO_2 a 37 ºC, por 24 horas. Para *C. albicans*, uma alçada obtida das placas de ASD foi suspendida em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada a 37 ºC durante a noite, sob agitação de 120 rpm. Colônias de *S. mutans* foram suspendidas em 10 mL de BHI caldo (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO_2 a 37 ºC. Após o período de incubação, as células fúngicas e bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm, por 5 minutos, a 15 ºC, e os pellets de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina (0,85% NaCl). A quantidade de células fúngicas foi ajustada para uma concentração de 10^7 células/mL em saliva artificial com auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico, enquanto a quantidade de células bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente para uma concentração de 10^8 células/mL em saliva artificial. A cada 24 h, a saliva artificial foi renovada (CAVAZANA *et al*., 2018). Os biofilmes foram formados no fundo dos poços de placas de microtitulação de 6 poços. Para tanto, 4 mL de suspensão foi adicionados aos poços e as placas foram, então, incubadas a 37 ºC por 24 horas. Em seguida, os biofilmes foram tratados, durante 1 minuto, após 72,

78 e 96 h de formação (totalizando 3 tratamentos), de acordo com os seguintes grupos experimentais (CAVAZANA *et al*., 2020).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de estudo conforme a quantidade de dentifrício a ser utilizada e concentração de fluoreto dos dentifrícios

GRUPO	Quantidade de dentifrício	Concentração de fluoreto no dentifrício
1	0,32 g	Placebo (sem fluoreto)
2	0,08 g	550 ppm F
3	0,16 g	
4	0,32 g	
5	0,04 g	1100 ppm F
6	0,08 g	
7	0,16 g	

Fonte: Autor, 2023

c. *Determinação de pH e Análise de F, P e Ca da biomassa e do fluído do biofilme*

Após o último tratamento, os biofilmes foram raspados com um raspador de células (Kasvi) e transferidos, com o auxílio de uma pipeta, para microtubos (MCT-200-C-Axygen). Os biofilmes tiveram o seu pH mensurado com auxílio de eletrodo de pH, previamente calibrado com padrões de pH 4 e 7. Os microtubos contendo os biofilmes raspados foram, então, centrifugados (15267 × *g*) a 4 ºC, por 5 minutos, e o fluido do biofilme foi coletado (NAGATA *et al*., 2017). As concentrações de F foram analisadas usando um 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 de F no fluido foram realizadas usando padrões de 0,09, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções livres de F) e 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções contendo F). Um tampão regulador de força iônica total (TISAB II) foi usado sob as mesmas condições que as amostras, na proporção de 1:1.

As concentrações de Ca foram determinadas por espectrofotometria em um leitor de placas (espectrofotômetro EONC da EONC, Biotek, EUA), a um comprimento de onda de 650 nm, adaptando o método descrito por Vogel, Chow e Brown (1983). Em resumo, o Arsenazo III foi utilizado como reagente colorimétrico.

Uma alíquota de 5 µL em duplicata para ambos os padrões e amostras foi misturada com 50 µL de Arsenazo III e 50 µL de água deionizada, sendo agitados por 60 segundos no leitor de microplacas, promovendo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes de obter as absorbâncias resultantes. As concentrações de P total foram determinadas de acordo com o método proposto por Fiske e Subbarow (1925).

Para a análise de F, Ca e P do biofilme total, adicionou-se 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 (Cury *et al*., 2000) e homogeneizados. A mistura resultante foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante (120 rpm) e, em seguida, centrifugada (11000 × *g*), por 1 minuto (NOBRE DOS SANTOS *et al*., 2002). Uma quantidade conhecida do líquido foi removida e o mesmo volume de NaOH a 0,5 mol/L foi adicionado.

O conteúdo de F da biomassa foi analisado conforme descrito anteriormente, utilizando padrões contendo 0,09, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções livres de F) e 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 e 12,8 µg F/mL (para biofilmes tratados com soluções contendo F).

Os componentes Ca e P da biomassa também foram analisados seguindo os mesmos métodos descritos anteriormente. O Ca foi dosado pelo método colorimétrico de Arsenazo III. O P pelo método colorimétrico do Reativo Redutor (Fiske e Subbarow, 1925).

d. Análise estatística

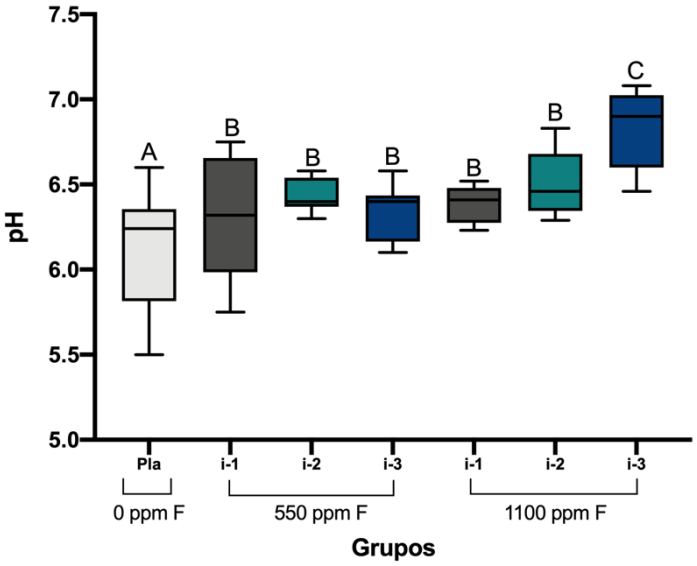
Os dados de concentrações de Ca e P no fluido do biofilme passaram nos testes de normalidade e homogeneidade e foram submetidos a ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os dados de pH, e concentrações de F, Ca e P na biomassa dos biofilmes e F no fluido do biofilme não passaram nos testes de normalidade e homogeneidade e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0, adotando $p<0,05$.

3 RESULTADO

A concentração média (desvio-padrão) de flúor iônico e total dos dentifrícios foram respectivamente de 539,4 (44,1) e 597,2 (21,1) ppm F para o dentifrício de 550 ppm F, e de 1149,7 (24,1) e 1174,3 (35,4) ppm F para o dentifrício de 1100 ppm F. Para o dentifrício placebo (i.e., sem F, a concentração média (desvio-padrão) de flúor iônico e total foram respectivamente de 11,9 (2,1) e 12,7 (2,8) ppm F.

Observou-se que todos os biofilmes tratados com dentifrícios com F, independentemente da intensidade de tratamento, apresentaram valores de pH maiores que o placebo. Os biofilmes tratados com 1100 ppm F, na intensidade 3 apresentaram os maiores valores de pH (Figura 1).

Figura 1 - pH dos biofilmes após tratamentos de acordo com os grupos experimentais. Letras distintas denotam diferença entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, *p*<0,05, *n*=9)

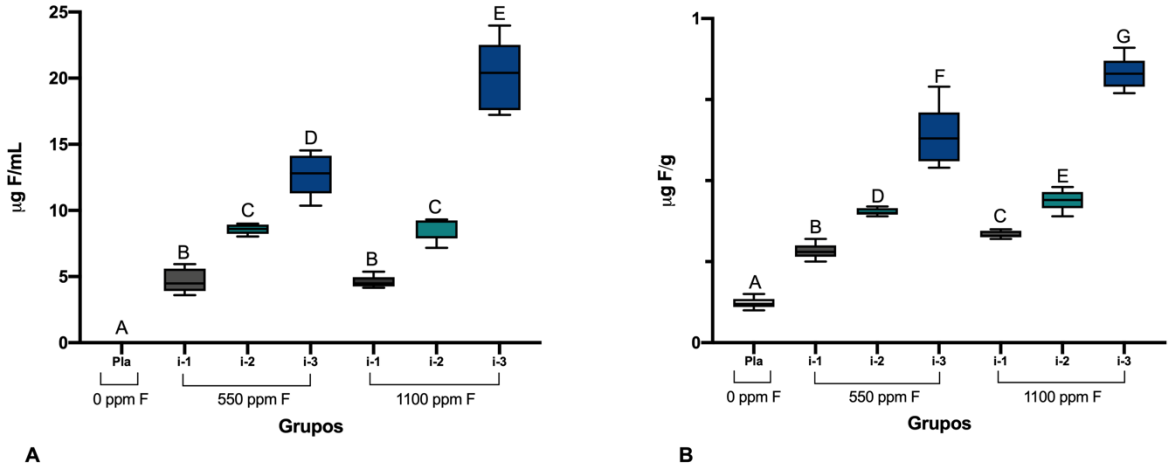


Fonte: Autor, 2023

As concentrações de F (biomassa e fluido) aumentaram proporcionalmente tanto em relação à concentração de F no dentifrício, como à quantidade aplicada. De forma geral, 1100F resultou em concentrações de F semelhantes a 550F para i-1 e i-2. Para i-3, entretanto, maiores concentrações de F foram observadas para tratamento com 1100F. Em acréscimo, 550F aplicado a intensidades maiores (i-2 e i-3) levou a concentração de F significativamente maiores na biomassa e no fluido

em comparação a 1100F aplicado em menores intensidades (i-1 e i-2, respectivamente) (Figura 2).

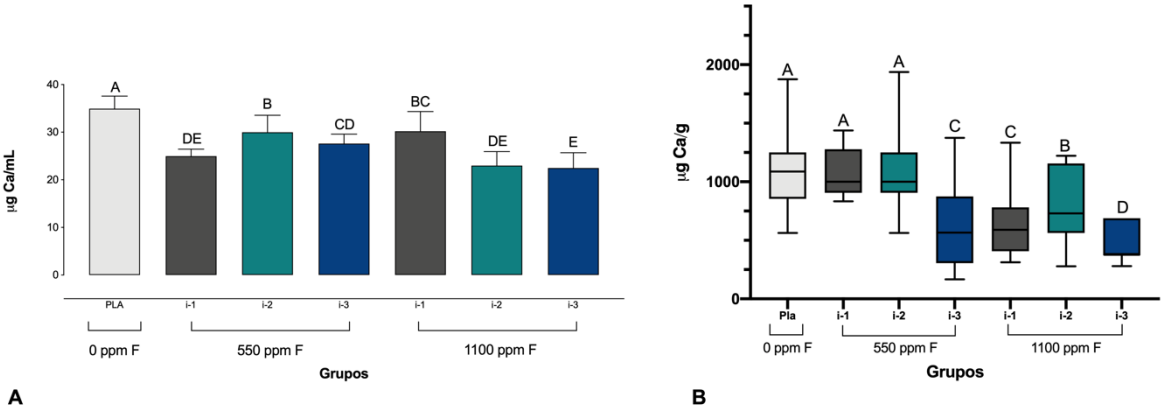
Figura 2 - Concentrações de fluoreto no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, *p*<0,05, *n*=9)



Fonte: Autor, 2023

Para as concentrações de Ca, observou-se que, no fluido do biofilme, todos os grupos tratados com dentifrícios fluoretados apresentaram valores significativamente menores deste componente se comparado ao grupo PLA. Na biomassa do biofilme, foi possível observar que o grupo que apresentou o menor nível de Ca foi o grupo 1100F, na intensidade 3 (Figura 3).

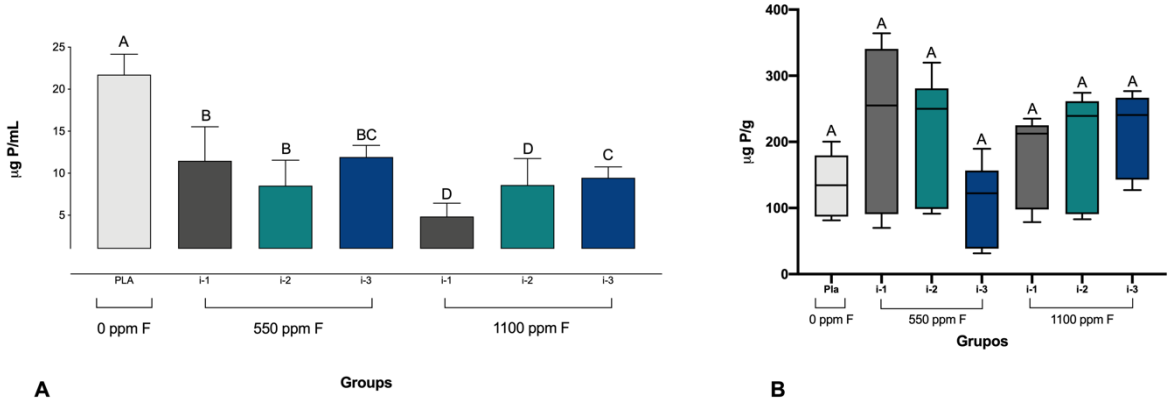
Figura 3 - Concentrações de cálcio no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, *p*<0,05, *n*=9)



Fonte: Autor, 2023

Notou-se que as concentrações de P no fluido dos biofilmes tratados com dentifrícios fluoretados foram significativamente menores que os dos biofilmes tratados com placebo, sem diferenças marcantes, entretanto, entre biofilmes tratados com dentifrícios dentro das mesmas concentrações de F (Figura 4).

Figura 4 - Concentrações de fósforo no fluido (A) e biomassa (B) dos biofilmes. Letras distintas denotam diferença significativa entre os grupos (Teste de Student-Newman-Kels, *p*<0,05, *n*=9)



Fonte: Autor, 2023

4 DISCUSSÃO

As lacunas referentes à influência da intensidade de tratamento (*i.e.*, quantidade de dentifrício utilizada × concentração de F no produto) em desfechos relacionados à cárie dentária impulsionou o desenvolvimento deste estudo. Foi demonstrado que a composição inorgânica e o pH de biofilmes de interesse cariogênico (*S. mutans* e *C. albicans*) variou em função de tratamentos com dentifrícios contendo fluoreto em diferentes concentrações, aplicados em diferentes quantidades, levando à rejeição da hipótese nula do estudo.

Observou-se neste trabalho que os dentifrícios aplicados nas menores quantidades, independentemente da concentração de F no produto, levou às menores concentrações resultantes de F no biofilme (fluido e biomassa). Além disso, foi demonstrado que as concentrações de F, especialmente na biomassa do biofilme, apresentaram-se significativamente maiores para os grupos tratados com 1100 ppm F em comparação à 550 ppm F, dentro das mesmas intensidades de tratamento. Tais padrões corroboram os encontrados em um estudo prévio, o qual demonstrou que um dentifrício de 1100 levou a maiores concentrações de F na saliva de bebês, quando comparado a um dentifrício de 550 ppm F, dentro da mesma intensidade de tratamento (SAMPAIO *et al.*, 2020). Na ocasião, dentro das possíveis hipóteses, os autores consideraram que a ingestão de dentifrício durante a escovação, bem como a diluição e estabilidade do produto poderia ter influenciado os resultados encontrados. Embora a variável ingestão não tenha sido testada devido ao protocolo *in vitro* deste estudo, é possível que a segunda hipótese tenha exercido influência nos padrões encontrados. A ausência da variável “ingestão”, entretanto, serviu para evidenciar a importância de um outro aspecto possivelmente relacionado aos padrões encontrados no presente estudo: a consistência dos *slurries* utilizados como tratamentos. É razoável pensarmos que *slurries* mais consistentes obtidos por meio de intensidades de tratamentos contendo dentifrícios em maior quantidade pode ter apresentado uma maior dificuldade de penetração nos biofilmes, dificultando, portanto, a incorporação de fluoreto. Além disso, é possível que uma mesma concentração de fluoreto disposto numa maior quantidade de dentifrício possa ter favorecido interações com outros componentes dos dentifrícios, prejudicando a sua penetração nos biofilmes.

Interessantemente, os padrões supracitados acerca das concentrações de F foram refletidos nos valores de pH dos biofilmes após os tratamentos, tendo em vista que 1100F na intensidade 3 levou aos maiores pHs. Sabe-se que o fluoreto apresenta capacidade tampão sobre biofilmes de *S. mutans*, bem como demonstrado previamente (MARQUIS; CLOCK; MOTA-MEIRA, 2003), e confirmado por dados recentes (SAMPAIO *et al*., 2022). Em resumo, HF penetra na membrana celular bacteriana, dissociando-se em H^+ e F^-, os quais são mais alcalinos que o meio externo. Então, o F^- apresenta uma atividade sobre enzimas glicolíticas, levando à redução na produção ácida a partir da glicólise. Este estudo foi o primeiro a verificar a influência que a quantidade de dentifrício utilizado, bem como a concentração de F do produto exercem sobre o pH de biofilmes de interesse cariogênico.

Um outro achado que merece comentário é acerca das concentrações de Ca na biomassa do biofilme. Foi possível observar que os biofilmes do grupo 1100F na maior intensidade de tratamento apresentaram valores significativamente menores deste componente, em contraste com dados de estudos realizados *in vivo* com crianças (PESSAN *et al*., 2008; 2010). Embora as razões para tais divergências não estarem claras, ressalta-se a marcante diferença que os desenhos dos estudos apresentam. Enquanto os estudos mencionados *in vivo* incluem variáveis como enxágue e fluxo salivar, no presente trabalho, os biofilmes passavam por condições idênticas de enxágue com água deionizada, além não apresentar um fluxo salivar ativo; sendo assim, é razoável considerar que estes aspectos podem ter influenciado substancialmente nas concentrações de Ca encontradas nos estudos mencionados, bem como no presente trabalho.

Apesar dos achados mencionados acima com relação ao pH e das concentrações de F e Ca nos biofilmes, um padrão menos demarcado foi observado para os níveis de P nos biofilmes (fluido e biomassa). Embora a razão para estes dados não estejam bem estabelecidas, considera-se que possíveis interações entre os componentes dos dentifrícios com o meio de cultura (*i.e.*, saliva artificial), possa ter exercido influência neste cenário, razão pela quais menores valores deste componente foram observados para grupos tratados com dentifrícios fluoretados, independentemente da sua concentração. Futuros estudos abordando esta variável devem ser desenvolvidos, portanto, no intuito de esclarecer tais padrões.

Embora os padrões encontrados nesse estudo tenham trazido informações importantes acerca da composição inorgânica e pH de biofilmes após o uso de diferentes intensidades de tratamentos, algumas limitações devem ser enfatizadas. É importante mencionar que o presente protocolo não incluiu uma importante variável envolvida no processo dinâmico do meio bucal que é o clearance salivar. Além disso, a ausência de um substrato mineral inviabiliza extrapolações mais avançadas sobre a temática. Nesse sentido, estudos futuros envolvendo tais variáveis podem trazer informações relevantes sobre as trocas iônicas de biofilmes com o meio bucal e substrato mineral, de acordo com diferentes protocolos de utilização de dentifrícios fluoretados, considerando quantidades distintas do produto, utilizando concentrações variadas de F.

5 CONCLUSÃO

Com base nas informações acima expostas, é possível concluir que a intensidade do tratamento é um parâmetro mais relevante que a concentração de F ou quantidade de dentifrício considerados isoladamente. Os achados apresentados neste estudo favorecem o melhor entendimento acerca desta temática, contribuindo para a elaboração de regimes de utilização de dentifrícios fluoretados que sejam devidamente eficazes no controle da cárie dentária.

REFERÊNCIAS

Ashley FP, Attrill DC, Ellwood RP, Worthington HV, Davies RM: Toothbrushing habits and caries experience. Caries Res 1999; 33: 401–402.

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.

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.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22.

Cury JA, Rebelo 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.

Den Besten P, Ko HS. Fluoride levels in whole saliva of preschool children after brushing with 0.25 g (pea-sized) as compared to 1.0 g (full-brush) of a fluoride dentifrice. Pediatr Dent. 1996; 18: 277–280.

dos Santos AP, Nadanovsky P, de Oliveira BH. Inconsistencies in recommendations on oral hygiene practices for children by professional dental and paediatric organisations in ten countries. Int J Paediatr Dent. 2011 May;21(3):223-31.

Duckworth RM, Morgan SN, Burchell CK. Fluoride in plaque following use of dentifrices containing sodium monofluorophosphate. J Dent Res. 1989 Feb;68(2):130-3.

Duckworth RM, Morgan SN, Gilbert RJ. Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments. J Dent Res. 1992 Apr;71 Spec No:836-40.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. Biol. Chem. 1925;66:375-400.

Hall KB, Delbem AC, Nagata ME, Hosida TY, de Moraes FR, Danelon M, Cunha RF, Pessan JP. Influence of the amount of dentifrice and fluoride concentrations on salivary fluoride levels in children. Pediatr Dent. 2016 Oct 15;38(5):379-384.

Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of Candida albicans biofilms on non-shedding oral surfaces. Eur J Oral Sci. 2003 Dec;111(6):465-71.

Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries- positive individuals following sucrose exposure. J. Dent. Res. 1992;71(11):1776-84.

Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. FEMS Microbiol Rev. 2003 Jan;26(5):493-510.

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.

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.

Pandit S, Cai JN, Jung JE, Jeon JG. Effect of 1-minute fluoride treatment on potential virulence and viability of a cariogenic biofilm. Caries Res. 2015;49(4):449-57.

Pandit S, Jung JE, Choi HM, Jeon JG. Effect of brief periodic fluoride treatments on the virulence and composition of a cariogenic biofilm. Biofouling. 2018 Jan;34(1):53-61.

Pandit S, Kim HJ, Song KY, Jeon JG. Relationship between fluoride concentration and activity against virulence factors and viability of a cariogenic biofilm: in vitro study. Caries Res. 2013;47(6):539-47.

Pandit S, Kim JE, Jung KH, Chang KW, Jeon JG. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of Streptococcus mutans biofilms. Arch Oral Biol. 2011 Jul;56(7):643-9.

Pessan JP, Alves KM, Ramires I, Taga MF, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA. Effects of regular and low-fluoride dentifrices on plaque fluoride. J Dent Res. 2010 Oct;89(10):1106-10.

Pessan JP, Silva SM, Lauris JR, Sampaio FC, Whitford GM, Buzalaf MA. Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. J Dent Res. 2008 May;87(5):461-5.

Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR. Topical use of fluorides for caries control. Monogr Oral Sci. 2011;22:115-132.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 2017 May 25;3:17030.

Sampaio C, Delbem ACB, Hosida TY, Fernandes AVP, Alves GDSG, Souza JAS, Monteiro DR, Pessan JP. Buffering capacity and effects of sodium hexametaphosphate nanoparticles and fluoride on the inorganic components of cariogenic-related biofilms in vitro. Antibiotics. 2022 Aug 30;11(9):1173.

Sampaio C, Delbem ACB, Paiva MF, Zen I, Danelon M, Cunha RF, Pessan JP. Amount of dentifrice and fluoride concentration influence salivary fluoride concentrations and fluoride intake by toddlers. Caries Res. 2020;54(3):234-241.

Santos AP, Oliveira BH, Nadanovsky P. Effects of low and standard fluoride toothpastes on caries and fluorosis: systematic review and meta-analysis. Caries Res. 2013;47(5):382-90.

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(1):23-31.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Marinho VC, Jeroncic A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. Cochrane Database Syst Rev. 2019 Mar 4;3(3):CD007868.

Wong MC, Glenny AM, Tsang BW, Lo EC, Worthington HV, Marinho VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Jan 20;2010(1):CD007693.

Zero DT, Creeth JE, Bosma ML, Butler A, Guibert RG, Karwal R, Lynch RJ, Martinez-Mier EA, González-Cabezas C, Kelly SA. The effect of brushing time and dentifrice quantity on fluoride delivery in vivo and enamel surface microhardness in situ. Caries Res. 2010;44(2):90-100.