



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marina Lins Miranda

Efeito antibiofilme e anticárie da arginina sozinha ou em associação a outras substâncias

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marina Lins Miranda

Efeito antibiofilme e anticárie da arginina sozinha ou em associação a outras substâncias

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria

Orientador: Fernanda Lourenção Brighenti

Araraquara

2021

M672e Miranda, Marina Lins
 Efeito antibiofilme e anticárie da arginina sozinha ou em
 associação a outras substâncias / Marina Lins Miranda. --
 Araraquara, 2021
 80 p. : il., tabs.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
 Orientadora: Fernanda Lourenção Brighenti
 Coorientadora: Marcelle Danelon

 1. Microbiologia. 2. Biofilmes. 3. Cárie dentária. 4. Arginina. I.
 Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Marina Lins Miranda

Efeito anticárie e antibiofilme da arginina sozinha ou em associação a outras substâncias

Dissertação para obtenção do título de mestre em ciências odontológicas com área de concentração em odontopediatria

Fernanda Lourenção Brighenti

Alberto Carlos Botazzo Delbem

Hernane da Silva Barud

Araraquara, 22 de janeiro de 2021

DADOS CURRICULARES

Marina Lins Miranda

NASCIMENTO: 25/09/1992 Maceió/Alagoas - Brasil

FILIAÇÃO: Leonilson Lima de Miranda
Marta Maria Vieira Lins

2013/2018: Curso de graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas

2018/2020: Curso de mestrado em Ciências Odontológicas
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser sempre minha maior fonte de apoio e refúgio. Obrigada, Senhor, por sempre colocar pessoas como teu instrumento em meu caminho que auxiliam nessa caminhada da vida. Sem fé, nada seria possível. Obrigada por todas as bençãos concedidas.

À **minha mãe**, por ser sempre ser colo, ouvidos, fonte inesgotável de cuidado e proteção e a maior certeza de que nunca estarei sozinha nessa jornada chamada de vida. Mãe, obrigada por todo amor e apoio incondicional. Mesmo distante, eu nunca me senti sozinha por saber que tenho você.

Ao **meu pai**, meu maior incentivador. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu consigo acreditar, por incentivar cada batalha e comemorar cada vitória. Obrigada por todo apoio.

Ao meu noivo, **Felipe**, por sempre apoiar meus sonhos. Obrigada por não medir esforços para me ver bem e incentivar todas as minhas escolhas. Você foi e é essencial em cada degrau construído. Obrigada por todo apoio emocional por trás de tudo.

Aos **meus irmãos**, verdadeiros amigos da vida, incentivadores e apoiadores. Eu amo vocês.

À **Bianca**, irmã que a pós-graduação me deu, quem vivenciou comigo todos os momentos bons e difíceis. Você foi essencial em tornar isso tudo mais leve. Obrigada por tanta parceria, apoio e cuidado, por segurar minha mão nos momentos difíceis e por tantos momentos maravilhosos. Sem sua amizade tudo teria sido muito mais difícil. Aos amigos **Silas, Rafael e Luciana**, por todo companheirismo. Vocês tornaram os momentos prazerosos e bons de serem compartilhados. Muito obrigada por tudo.

A todos os amigos do **LPBM**, por toda troca de ensinamentos, experiências, vivência compartilhada, parceria e horas de laboratório compartilhadas. Vocês foram a certeza de que sozinho a gente não chega a lugar nenhum e que juntos somos mais fortes.

À minha querida orientadora, **Fernanda**, por me acolher tão bem em seu espaço e grupo de pesquisa. Quem me incentivou e acreditou em mim desde o começo. Obrigada por tantos ensinamentos e por buscar o meu melhor sempre. Obrigada por todas as oportunidades concedidas e pelo crescimento profissional e pessoal ao seu lado. Toda minha admiração à profissional exemplar que és. Gratidão e admiração eterna a ti.

Ao professor **Alberto Delbem**, por compartilhar suas experiências e tanto nos auxiliar, mesmo à distância. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório e oferecer seus ensinamentos.

À minha co-orientadora, professora **Marcelle Danelon**, por todos os ensinamentos e parceria. Obrigada pela contribuição.

Aos **colegas de Araçatuba**, especialmente Sarah e Gabriel, por me receberem tão bem e por toda ajuda oferecida. Vocês serão sempre especiais.

A **todos os funcionários** que fazem parte da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP que fazem o possível e impossível para o funcionamento louvável dessa instituição. Vocês são fundamentais. Aos **porteiros**, que sempre nos recebem com um sorriso de bom dia e cuidam do nosso acesso diário. Obrigada as **meninas da limpeza**, por prepararem o ambiente de trabalho de cada dia. Aos **secretários da pós-graduação**, por toda paciência e atenção, obrigada por ajudarem prontamente no que é necessário. A **todos os professores** que passaram por mim na pós-graduação, obrigada por todos os ensinamentos. Cada um plantou alguma semente de conhecimento no caminho. À coordenadora do programa de pós-graduação, prof **Fernanda Brighenti**, por toda dedicação e esforço para o melhor andamento do curso, por seu senso de justiça e imparcialidade perante todos

os alunos. Aos **Diretores da faculdade**, pelo trabalho e por permitirem o funcionamento da faculdade e do incentivo a pesquisa.

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

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (19/08375-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao **CNPq** – O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar... Decidi não esperar as oportunidades e, sim, eu mesmo buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução. Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz. Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las. Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tenha sido. Deixei de me importar com quem ganha ou perde. Agora, me importa simplesmente saber melhor o que fazer. Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima e, sim, deixar de subir. Aprendi que o melhor triunfo que posso ter é ter o direito de chamar a alguém de "amigo". Descobri que o amor é mais que um simples estado e enamoramento, "o amor é uma filosofia de vida". Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser a minha própria tênue luz deste presente. Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais. Naquele dia, decidi trocar tantas coisas... Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade. E desde aquele dia já não durmo para descansar... Agora simplesmente durmo para sonhar.”*

* Walt Disney. Decidi triunfar.

Miranda ML. Efeito anticárie e antibiofilme da arginina sozinha ou em associação a outras substâncias. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Este trabalho está dividido em 2 publicações cujos objetivos foram: a) realizar uma revisão sistemática da literatura sobre o efeito da arginina nos microrganismos envolvidos na cárie dentária (publicação 1); b) Avaliar a capacidade anticárie e antibiofilme da associação da arginina com glicerofosfato de cálcio e flúor em um modelo *in vitro* polimicrobiano de biofilme proveniente da saliva de um doador. Publicação 1: Esta revisão sistemática foi projetada de acordo com os itens da lista de verificação PRISMA e com as diretrizes da Cochrane. Foram incluídos apenas estudos *in vitro* que avaliaram o efeito da arginina em diferentes concentrações nos microrganismos da cavidade oral em modelos de biofilmes de interesse cariogênico. As bases de dados utilizadas foram: PubMed (incluindo MedLine), Scopus, LILACS, SciELO e Web of Science. Para capturar a “literatura cinza” e evitar o viés de seleção e publicação foram consultados o Open Gray e o OpenThesis. Publicação 2: Utilizou-se um inóculo polimicrobiano e blocos de esmalte bovino para mimetizar o biofilme formado *in vivo*. Os grupos utilizados foram: controle negativo; 110 ppm F (F); Glicerofosfato de cálcio (0,05%) (CaGP); Arginina (0,8%) (Arg); F + CaGP; Arg + F; Arg + CaGP; Arg + F + CaGP. Foram analisadas a acidogenicidade e composição microbiana do biofilme e a perda de dureza de superfície dos blocos de esmalte. A arginina promoveu uma elevação do pH, independente da associação. O F promoveu a maior redução de bactérias totais.; Arg; Arg + CaGP e Arg + F + CaGP de bactérias acidúricas e, Arg + F e Arg + F + CaGP, de estreptococos do grupo mutans. A menor perda de dureza de superfície foi observada na associação Arg + F + CaGP. A arginina apresenta uma abordagem promissora para o manejo ecológico da cárie dentária e demonstrou ser capaz de controlar fatores de virulência do biofilme dentária. Sua associação com o glicerofosfato de cálcio e fluoreto pode potencializar seu mecanismo de ação e agir em fatores como acidogenicidade, controle de espécies patogênicas e diminuição da desmineralização do esmalte dentário.

Palavras-chave: Microbiologia. Biofilmes. Cárie dentária. Arginina.

Miranda ML. Anti-caries and antibiofilm effect of arginine alone or in association with other substances. [Master's Dissertation]. School of Dentistry UNESP, Araraquara.

ABSTRACT

This work is divided into 2 publications whose objectives were: a) to carry out a systematic review about the effect of arginine on microorganisms involved in dental caries (publication 1); b) to evaluate the anti-caries and antibiofilm capacity of the association of arginine with calcium glycerophosphate and fluoride in an *in vitro* polymicrobial model of biofilm grown from the saliva of a donor. Publication 1: This systematic review was designed according to the items included in the PRISMA list and Chocrane guidelines. Only *in vitro* studies that evaluated the effect of arginine at different concentrations using cariogenic biofilms were included. The searched databases used were: Pubmed (including MedLine), Scopus, LILACS, SciELO and Web of Science. "Gray literature" was searched on Open Gray and OpenThesis. Publication 2: A polymicrobial inoculum and bovine enamel blocks were used to mimic the biofilm formed in vivo. The groups used were: negative control; 110 ppm F (F); Calcium glycerophosphate (0.05%) (CaGP); Arginine (0.8%) (Arg); F + CaGP; Arg + F; Arg + CaGP; Arg + F + CaGP. The acidogenicity and microbial composition of the biofilm and the loss of surface hardness of the enamel blocks were analyzed. Arginine promoted an increase in pH, regardless of the association. F promoted the greatest reduction in total bacteria; Arg; Arg + CaGP and Arg + F + CaGP from aciduric bacteria and Arg + F and Arg + F + CaGP from streptococci mutans group. The lowest loss of surface hardness was observed in the association Arg + F + CaGP. Arginine presents a promising approach for the ecological management of dental caries and has been shown to be able to control virulence factors of dental biofilm. Its association with calcium glycerophosphate and fluoride can enhance its mechanism of action and act on factors such as acidogenicity, control of pathogenic species and decreased demineralization of tooth enamel.

Keywords: Microbiology. Biofilms. Dental caries. Arginine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	15
3 PUBLICAÇÕES.....	16
3.1 Publicação 1*	16
3.2 Publicação 2	46
4 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS*	73
APÊNDICE A.....	75
APÊNDICE B.....	76
ANEXO A	77
ANEXO B	78
ANEXO C	80

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada um problema de saúde pública que afeta grande parte da população mundial de todas as idades^{1,2}, com alta prevalência em crianças pré-escolares¹. A cárie não tratada em dentes decíduos e permanentes é uma das condições mais prevalentes em todo o mundo², o que pode resultar em dor, infecção, dificuldades de fala e mastigação³.

No processo cariioso, as bactérias presentes no biofilme dentário produzem ácidos a partir dos carboidratos fermentáveis provenientes da dieta, gerando ambientes com baixo pH no biofilme⁴. Os ácidos produzidos são responsáveis pela desmineralização na superfície dentária e, quando esses períodos de desmineralização são mais frequentes do que os de remineralização, há o desenvolvimento da cárie dentária^{5,6}. Apesar de o seu controle individual basear-se na remoção mecânica do biofilme por meio da escovação com dentífrício fluoretado, novas estratégias preventivas voltadas para o controle ecológico da doença estão sendo desenvolvidas⁷.

Esse olhar mais amplo voltado para o controle da cárie é decorrente da sua complexidade e etiologia multifatorial⁸. Nesse processo, o pH ácido causado pelo metabolismo de açúcares induz uma adaptação microbiana e seleção de bactérias acidogênicas e desempenha um papel crítico em desestabilizar o equilíbrio do biofilme. Com isso, as bactérias acidúricas e acidogênicas tornam-se mais frequentes e podem promover um ambiente patogênico com períodos frequentes de perda mineral, promovendo o desenvolvimento da lesão cariiosa⁵.

Em contraste, interações benéficas entre espécies que neutralizam os efeitos deletérios e interferem no desenvolvimento de um biofilme cariogênico também estão presentes no biofilme dentário⁹. Um dos mecanismos envolvidos nesse processo é produção de compostos básicos com manutenção de um pH próximo da neutralidade⁶. Essa capacidade de gerar álcalis é fundamental para manter a homeostasia do pH e do biofilme^{5,10}. Nesse contexto, a arginina tem sido utilizada como estratégia para controlar a patogenia da cárie dentária.

A arginina é um aminoácido semi-essencial, secretado pelas glândulas salivares em sua forma livre em concentrações micromolares e disponibilizado naturalmente a partir

de fontes de proteínas provenientes da dieta^{11,12}. Algumas espécies microbianas orais, como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parassanguinis*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus* spp. são conhecidas como “arginolíticas” e possuem a capacidade de metabolizar a arginina por meio do sistema arginina deiminase (ADS). Essa via metabólica é constituída por três enzimas e cataboliza a molécula de arginina com produção de amônia, ornitina, CO₂ e liberação de ATP^{12,13}.

A amônia liberada age como um aceptor de íons hidrogênio, o que promove um aumento do pH no biofilme e exerce um efeito tampão, ajudando a manter o pH neutro. Como consequência do aumento do pH, há um controle de espécies patogênicas acidogênicas e acidúricas, com subsequente hegemonia das espécies comensais orais que são menos tolerantes a um baixo pH. Adicionalmente, o ATP liberado na reação contribui para o crescimento e manutenção celular das espécies arginolíticas¹². Além da manutenção de uma comunidade microbiana mais saudável, a manutenção do pH neutro altera o balanço químico na interface dente e biofilme em favor da remineralização^{14,15}. Estudos clínicos demonstraram que pacientes livres de cárie apresentam níveis mais elevados de atividade do sistema arginina deiminase comparando com indivíduos cárie-ativos¹⁵⁻¹⁷.

Além disso, estudos tem apontado para a existência de um sinergismo da arginina com fluoreto e a capacidade de formação de complexos com íons cálcio^{18,19}. Entretanto, a potencialização da ação anticariogênica de formulações odontológicas contendo arginina, cálcio e fluoreto ainda precisa ser comprovada. Nesse contexto, a associação da arginina com outras substâncias com propriedades anticárie pode ser uma estratégia satisfatória para controlar ecologicamente biofilmes cariogênicos. Dessa maneira, esse estudo visa avaliar *in vitro* a capacidade antibiofilme e anticárie da arginina em associação a outras substâncias em biofilmes polimicrobianos.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

- 1) Realizar uma revisão sistemática da literatura de estudos *in vitro*, avaliando o efeito da arginina em microrganismos envolvidos na cárie dentária;
- 2) Avaliar a capacidade antibiofilme e anticárie da associação da arginina com glicerofosfato de cálcio e flúor pela análise do pH do meio de cultura, viabilidade bacteriana e inibição na desmineralização do esmalte pela microdureza de superfície.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1*

Miranda ML, Silva BNS, Salomão KB, de Oliveira AB, Gabbai-Armelin PR, Brighenti FL. Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of in vitro studies. *Biofouling*. 2020 Jul;36(6):696-709. doi: 10.1080/08927014.2020.1802587. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32752889.

This is an Accepted Manuscript of an article published by Taylor & Francis in Biofouling on July, 2020, available online:

<http://www.tandfonline.com/10.1080/08927014.2020.1802587>. (Anexo A)

* O artigo segue as normas da revista *BIOFOULING: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*.

Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of *in vitro* studies

Marina Lins Miranda^{a*}, Bianca Núbia Souza Silva^a, Karina Borges Salomão^a, Analú Barros de Oliveira^a, Paulo Roberto Gabbai-Armelin^a and Fernanda Lourenção Brighenti*.

^aDepartament of Morphology and Pediatric Dentistry, Araraquara Dental School, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil

* Correspondence:

DDS, MSc, PhD Fernanda Lourenção Brighenti.

f.brighenti@unesp.br

Tel.: +55-16-3301-6551.

Rua Humaitá, 1680, 14801-903.

The aim of this systematic review was to discuss the effects of arginine on the microorganisms involved in the pathogenesis of dental caries in different biofilm models formed *in vitro*. The eligibility criteria were *in vitro* studies that evaluated the effect of arginine at different concentrations on microorganisms in the oral cavity in biofilm models of cariogenic interest. Eighteen studies, published between 2012 and 2019 were included. Different bacterial species were studied. Seventeen studies (94,4%) achieved a low risk of bias and only one presented a medium risk of bias. Arginine has been shown to be a promising approach for the ecological management of dental caries and the focus of this review was to evaluate the effects of arginine on microorganisms involved in the mechanism of dental caries disease.

Keywords: arginine; dental caries; microorganisms, *in vitro* studies

Introduction

Human oral cavity is a highly complex and diversified microbiome, consisting of bacteria, fungus, virus, archaea and protozoa in its composition (Dewhirst et al. 2010; Wade 2013). It is characterised as an open system frequently exposed to exogenous bacteria originating from food, water, air and social contact, besides consisting of different microbial niches, such as saliva, oral mucosal surface, tongue and teeth surface (Wade 2013; Bowen et al. 2018). The dental surface is continuously bathed by saliva with distinct and irregular surface topographies, providing retention sites for microorganisms capable of interacting physically and metabolically, forming the dental biofilms (Bowen et al. 2018). The primary portion of microorganisms present in the oral cavity consist of bacteria, which play a vital role in the pathogenesis and development of oral diseases such as dental caries (Wade 2013).

Dental caries is the most common health problem in the oral cavity, being a result of the interaction between bacteria producers of acid present in the dental biofilm and fermentable carbohydrates from human diet (Ferjeskov 1997). The acid produced as a result of carbohydrate fermentation causes a reduction on environmental pH and the consequent dissolution of the dental structure, known as demineralization (Ferjeskov 1997; Takahashi and Nyvad 2008). The ability of producing and tolerating an acid environment is a crucial feature in microorganisms responsible for caries, with these microorganisms having a selective advantage over other species, disturbing the biofilm homeostasis (Takahashi and Nyvad 2011).

Establishing biofilm homeostasis can be an effective way of controlling the disease, given that the production of acids responsible for the demineralization problem would be controlled (Zheng et al. 2017). Some bacteria have the capacity of increasing biofilm pH from arginine metabolization (Burne and Marquis 2000; Chakraborty and Burne 2017). Arginine metabolism takes place through the arginine deiminase system (ADS), which causes deterioration of the arginine molecule in ammonia and carbon dioxide with the production of ATP, helping to neutralize intracellular and environmental pH from this alkali production. The species that present such mechanisms are known as arginolytic species, which are less tolerant to acid medium (Liu et al. 2012; Huang et al.

2015; Burne and Marquis 2000). These include non-mutans streptococci species, such as *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parassanguinis*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus salivarius* and *Actinomyces* spp. which, with arginine hydrolysis, become predominant in the dental biofilm and prevent the hegemony of pathogenic species (Burne and Marquis 2000; Chakraborty and Burne, 2017).

Taking into account the mechanism of action of arginine in the dental biofilm, its application can help to control the health problem of dental caries. Several studies use formulations containing arginine in different concentrations to analyse its effect on oral microorganisms (Huang et al. 2012; Fu et al. 2013; Sharma et al. 2014; Kolderman et al. 2015). Systematic reviews previously carried out evaluated clinical outcomes of formulations containing arginine. Nevertheless, these studies evaluated only the clinical outcomes of the treatment with arginine, as caries incidence and progression, without considering the arginine effected on the biofilm. Moreover, these reviews pointed out to insufficient evidence to support the use of arginine and reported that more rigorous studies should be carried out (Li et al. 2015; Ástvaldsdóttir et al. 2016). In this context, a review of *in vitro* studies is important to summarize essential information about response variables involved in arginine treatment - such as pH, arginine concentration, salt and treatment time - which may guide future clinical studies. This systematic review aimed to discuss the effects of different concentrations and formulations of arginine in *in vitro* biofilm models and to reach a better understanding of the arginine mechanisms of action. The main questions addressed were: a) if arginine controls the pH of the biofilm, b) if arginine promotes the ecological balance in the oral microbiota, c) if arginine reduces the amount of cariogenic microorganisms and d) if arginine controls virulence factors of dental biofilm.

Materials and Method

Protocol

This systematic literature review was designed according to the items included in the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) list ([Liberati et al. 2009](#)) and Cochrane guidelines ([Higgins and Green 2011](#)).

Eligibility criteria

This study only included *in vitro* studies that analysed the effect of arginine in different concentrations in microorganisms of the oral cavity in biofilm models with cariogenic interest under different growth conditions, without any restrictions regarding the year of publication, language or publication status.

In turn, the following studies were not included: 1) studies not related to the subject; 2) literature reviews, letters to the editor, book chapters, abstracts, case reports and editorials; 3) studies that assessed the effects of arginine on microorganisms that are not part of the oral microbiota; 4) studies which exclusively analysed the functioning and regulation of the arginine deiminase system (ADS).

Information and search sources

The following databases were used as sources of information: PubMed (including MedLine), Scopus, LILACS, SciELO and Web of Science. In order to consider the grey literature and avoid any selection or publication bias, Open Gray and OpenThesis databases were also consulted. In addition, a manual search was carried out in the list of references of the eligible studies.

The review was separately carried out by two reviewers (MLS and KBS). Health Science Descriptors (DeCS), Medical Subject Headings (MeSH) and Embase Subject Headings (Emtree) were used for the selection of keywords. In order to potentialize the search strategy, Boolean operators “AND” and “OR” were used (Table 1). The literature review was carried out in August 2019, with no search restrictions. The records obtained were exported to EndNote™ X8 software to detect and exclude any duplications.

Table 1. Search strategies specifically designed for each electronic database.

Data base	Research strategy	Results
PubMed	("arginine"[MeSH Terms] OR "arginine"[All Fields]) AND ("dental caries"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "caries"[All Fields]) OR "dental caries"[All Fields]) AND ("biofilms"[MeSH Terms] OR "biofilms"[All Fields] OR "biofilm"[All Fields])	
	("arginine"[MeSH Terms] OR "arginine"[All Fields]) AND ("dental plaque"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "plaque"[All Fields]) OR "dental plaque"[All Fields]) AND ("dental caries"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "caries"[All Fields]) OR "dental caries"[All Fields])	103
Scopus	TITLE-ABS-KEY ((arginine)) AND TITLE-ABS-KEY ((dental AND caries OR dental AND caries))	
	TITLE-ABS-KEY ((arginine)) AND TITLE-ABS-KEY ((biofilm OR biofilms))	531
LILACS	tw:(arginine AND dental caries OR dental AND caries) AND (instance:"regional") AND (db:"LILACS")	6
SciELO	Arginine and dental caries Arginine and biofilms	4
Web of Science	((“arginine” and “biofilms” or “biofilm”)) ((“arginine” and “dental caries”))	11
OpenGrey	arginine and biofilms	1
OpenThesis	arginine and dental caries and biofilms	15
TOTAL		671

Selection of Studies

The selection of studies was carried out in three phases by two previously calibrated reviewers (MLM, KBS). In September 2019, in the first phase, the titles were read. Studies with titles compatible with the research subject were selected for the second phase, which consisted in reading the abstract of the respective document. In the third phase (September - October 2019), the full text was read. The studies with compatible titles, though without an abstract, were also fully read in this phase. The kappa concordance coefficient and the peer assessment rating score between authors (MLM and KBS) was 0.96, IC 95% = [0,93 - 0,97], showing a “nearly perfect” ($p < 0.01$)

agreement between the reviewers. When both reviewers were in disagreement, a third reviewer (BNSS) was consulted for a final decision.

Data Extraction

The data was extracted by two authors (MLM and KBS), in November and December 2019, through a form including the following information: author(s) and year of publication, objective, control and experimental group, type of biofilm growth, main results and conclusion. In case of disagreements between the two reviewers, a third reviewer was consulted (BNSS).

Risk of individual bias and Level of evidence

A blind assessment of the risk of bias was carried out by two independent reviewers, prioritizing the clear description of the methods and omitting the name of the journals and authors to avoid any conflict of interest or bias. The articles were separately assessed through an adapted list based on previous systematic reviews of *in vitro* approach (Mask et al. 2017; Bohrer et al. 2018), considering the following items: 1- presence of a control group, 2- sample standardization (teeth, glass slides, or other surfaces), 3- description of statistical analysis (statistical test), 4- contamination control, 5- description of the concentration of the products tested, 6- description of the carbohydrate source and 7- description of specific treatment time.

If an item was reported, the study was marked with a Y (yes) in the respective item; otherwise, if the information was not found, the work was marked with an N (no). The risk-of-bias was classified according to the sum of the number of “yes” marked, as follows: 1 to 3 = high; 4 to 5 = average; 6 to 7 = low risk of bias.

The Level of Evidence (LoE) was determined according to the guidelines of the Oxford University Center for Evidence-Based Medicine (Durieux et al. 2013).

Data synthesis

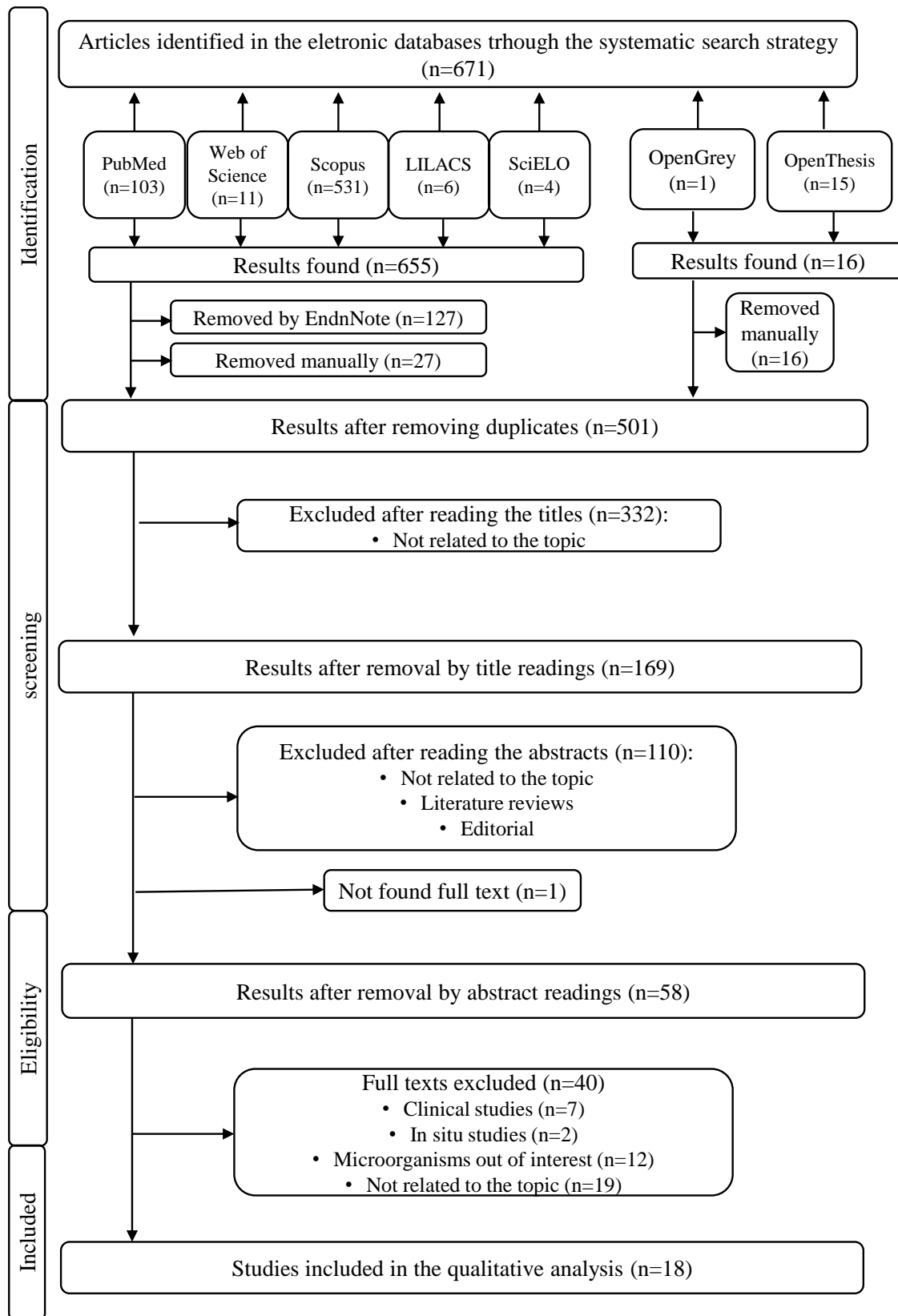
Due to the heterogeneity of the 18 articles selected, no compatible data was available to enable a meta-analysis.

Results

Selection of Studies

A systematic search on 7 different electronic databases resulted in 671 studies, of which 501 remained after the exclusion of duplicates. Simultaneously, the grey literature review detected 16 studies. After reading the titles and abstracts, 58 articles were considered eligible for reading the full text. The phase consisting of the full reading of the article excluded 40 studies. Subsequently, the list of references of the 18 articles selected was verified. After reading the list of references, no article was considered eligible for the quantitative analysis of the results (Figure 1).

Figure 1. Flow diagram for the systematic review based on PRISMA guidelines.



Aspects of the studies included

Table 2 shows the main aspects of the studies presented in this systematic review. All studies included in this review were published between 2012 and 2019. Several bacteria species were analysed, as follows: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus sobrinus*. The microorganism most frequently studied was *S. mutans*. Ten studies only used *S. mutans* (Fu et al. 2013; Sharma et al. 2014; Zheng et al. 2015; Tada et al. 2016; Chakraborty and Burne 2017; Geraldeli et al. 2017; Huang et al. 2017; Sirin Karaaslan et al. 2018; Berto et al. 2019; Bijle et al. 2019), with one study analysing *S. gordonii*. (Jakubovics et al. 2015). Eight studies used polymicrobial biofilms originating from human saliva (Huang et al. 2012; Kolderman et al. 2015; Koopman et al. 2015; Tada et al. 2016; Zheng et al. 2017; Agnello et al. 2017; Huang et al. 2017; Ledder et al. 2017). The control group more frequently used was the control-without-intervention group or distilled water. The most common source of carbohydrate used was sucrose (Huang et al. 2012; Fu et al. 2013; Koopman et al. 2015; Zheng et al. 2015; He et al. 2016; Tada et al. 2016; Agnello et al. 2017; Huang et al. 2017; Ledder et al. 2017; Zheng et al. 2017; Sirin Karaaslan et al. 2018; Berto et al. 2019; Bijle et al. 2019), followed by glucose (Jakubovics et al. 2015; Chakraborty and Burne 2017; Geraldeli et al. 2017). The study carried out by Sharma et al. (2014) used sucrose, mannose and glucose, all at a concentration of 1%, while Kolderman et al. (2015) used clarified saliva as the only source of nutrients.

In the experimental group, arginine was used in different concentrations (0.00000871% - 10.5%), in either marketed toothpastes or solutions. Arginine suppressed *S. mutans* growth (Fu et al. 2013; Zheng et al. 2015; He et al. 2016; Tada et al. 2016; Chakraborty and Burne 2017; Geraldeli et al. 2017; Huang et al. 2017; Zheng et al. 2017; Sirin Karaaslan et al. 2018; Berto et al. 2019) and promoted and increase in the arginolytic species *S. sanguinis* and *S. gordonii* (Zheng et al. 2015; He et al. 2016; Geraldeli et al. 2017; Zheng et al. 2017; Berto et al. 2019; Bijle et al. 2019). In polymicrobial biofilms, arginine increased the pH to alkaline levels (1.5-1.6%; Berto et al. 2019; Huang et al. 2012; Koopman et al. 2015; Ledder et al. 2017), reduced

microbial viability (0.8 -1.6%; Huang et al. 2017; Kolderman et al. 2015) and reduced biomass formation (8.71%; Tada et al. 2016).

Three different arginine salts were studied. Nine studies reported the use of L-arginine (Sharma et al. 2014; Koopman et al. 2015; He et al. 2016; Tada et al. 2016; Agnello et al. 2017; Chakraborty and Burne 2017; Geraldeli et al. 2017; Huang et al. 2017; Berto et al. 2019), while five studies used L-arginine monohydrochloride (L-arginine HCl) (Jakubovics et al. 2015; Kolderman et al. 2015; Zheng et al. 2015; Zheng et al. 2017; Bijle et al. 2019) and one study used arginine-bicarbonate (Ledder et al. 2017). Four studies used marketed toothpastes containing arginine (Fu et al., 2013; Ledder et al., 2017; Sirin Karaarslan et al., 2018; Berto et al., 2019).

Additionally, the treatment time was different among the studies, with the constant utilization of the arginine in the culture medium (Huang et al. 2012; Jakubovics et al. 2015; Kolderman et al. 2015; Koopman et al. 2015; Zheng et al. 2015; Tada et al. 2016; Geraldeli et al. 2017; Huang et al. 2017; Zheng et al. 2017; Berto et al. 2019), treatment during 30 min (Tada et al. 2016), 10 min / 3x a day (He et al. 2016; Ledder et al. 2017), 5 min / 3x a day (Zheng et al. 2017), 4 min (Sirin Karaarslan et al. 2018), 1 min (Bijle et al. 2019), 30s – 3 h (Agnello et al. 2017) and 10 s (Berto et al. 2019).

Table 2: Summary of the main aspects and results found.

Author/ year	Experimental groups	Control group	Biofilm model	Biofilm growth	Energy source	Main results	Conclusion
Huang et al. 2012	1.6% Arg, with / without Pipes buffer (3.25 mM - 50 mM)	Negative	Polymicrobial derived from saliva	Anaerobiosis	0.2% Sucrose	Arginine gradually increases pH value and ammonia concentration of the culture medium. All groups with arginine reached an alkaline pH, more than 7, and produced ammonia. However, the lower the buffer concentration, the longer the time to raise the pH and ammonia production.	Sucrose, pH, buffer capacity, and biofilm age influenced pH control and NH ₃ production from arginine in dental biofilms. Production of NH ₃ and lactic acid was pH-dependent.
Fu et al. 2013	Dentifrice containing 8% arginine and calcium carbonate / Pumice	Negative	<i>S. mutans</i>	5% CO ₂	1% Sucrose	The group treated with arginine presented a less thick and dense biofilm structure, as well as a decreased number of viable cells and minor lactic acid production in comparison with other groups.	The application of the arginine-desensitising paste directly to the hypersensitive surfaces of the teeth can significantly suppress the formation and maturation of the <i>S. mutans</i> biofilm.
Sharma et al. 2014	L-arginine: 0.05% / 0.1% / 0.5%*	Negative	<i>S. mutans</i>	5% CO ₂	1% Sucrose, mannose and glucose	Biofilms grown in the presence of arginine showed a decrease in surface roughness and lower density of the extracellular matrix. As the arginine concentration was increased, the adhesion forces were significantly reduced.	Arginine may influence <i>S. mutans</i> adhesion to tooth and may have anti-cariogenic potential.

Jakubovics et al. 2015	L-arginine: 0.0000871% - 8.71%, with a tenfold increase in concentration**	Negative	<i>S. gordonii</i>	5% CO ₂ Anaerobiosis and aerobiosis	0.2% Glucose	Biofilms supplemented with arginine in high concentrations (0.871% - 8.71%) significantly modified biofilm architecture, thickness and biomass. The biofilms were became unequal with the increased arginine concentration. The presence of aggregated micro-colonies was reduced. The number of viable cells did not change with the treatment, demonstrating that arginine is not toxic against <i>S. gordonii</i> .	Arginine modulates growth and biofilm formation of <i>S. gordonii</i> .
Kolderman et al. 2015	Arg-HCl: 0.001% / 0.01% / 0.1% / 1% / 2.1% / 5.26% / 10.5% CPC: 0.05% / 0.01% CPC + Arg-HCl: 0.05% + 10.5% / 0.01% + 10.5%**	Negative	Polymicrobial derived from saliva	Not informed	Clarified saliva	Biofilm architecture was substantially altered and is arginine dose- dependent. Large biofilm towers were reduced at higher Arg-HCl concentrations in favor of smaller biofilm microcolonies with very occasional large biofilm masses. At concentrations $\geq 2.1\%$, there were significant reductions in biofilm biovolume, thickness and roughness. Biofilms grown with 1% and 10.5% reduced bacterial viability. Association of arginine with CPC increased CPC penetration into the biofilm.	Arginine modulates the development of oral biofilm of various species and the composition of the community and improves CPC activity. The incorporation of Arg-HCl in oral health products can be useful for improved biofilm control.

Koopman et al. 2015	1.6% L-arginine; pH 6.8.	Negative	Polymicrobial derived from saliva	Aerobiosis	10% Sucrose	The arginine group showed a higher similarity on bacterial community, compared to the highly dispersed Control. During the resting phase, the pH in the Arginine microcosms (7.7) was significantly higher than in the Control (6.5). It was observed a higher ammonia concentration in the biofilms treated with arginine comparing to the control.	Arginine facilitates the stability of oral microbial communities in relation to the effects of acidification.
Zheng et al. 2015	Arg-HCl: 0.625% / 2.5% Arg + NaF: 2.5% + 125 ppm F / 0.625 + 31.25 ppm F pH 7.	Positive Negative	1 specie (<i>S. mutans</i> / <i>S. sanguinis</i>) 2 species (<i>S. mutans</i> + <i>S. sanguinis</i>) 3 species (<i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> + <i>P. gingivalis</i>)	Aerobiosis and Anaerobiosis (3 species)	1% Sucrose	The association of arginine with fluoride suppressed <i>S. mutans</i> in the one-specie biofilm comparing to the isolated agents. In the biofilms containing 2 and 3 species, the association suppressed <i>S. mutans</i> and promoted the dominance of <i>S. sanguinis</i> . Isolated arginine or its association with fluorine inhibit the EPS production. In the mono-specie biofilms, the isolated fluoride was capable of increasing the pH; in the dual-species one, the arginine increased even more this parameter, and the three-specie biofilm, the association led to a pH increase in a dose-dependent manner.	Arginine and fluoride has a potential synergistic effect in maintaining the balance of oral microflora and, therefore, is a promising ecological approach to the prevention of dental caries.

He et al. 2016	L-arginine: 0.75% / 1.5% / 3%, pH 8 – 8.5	Negative	Mixed-species containing <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> and <i>A. naeslundii</i> .	Not informed	1% Sucrose	1.5% or 3% of L-arginine suppressed the dominance of <i>S. mutans</i> for an increase in the dominance of <i>S. gordonii</i> , decreased the biomass of the biofilm and production of insoluble EPS. The 1.5% arginine treatment led to values of pH significantly higher compared to the control.	L-arginine affects the biofilm matrix and the dynamic microbial interactions associated with the development of pathogenic biofilm, indicating the potential to cause biofilm rupture.
Tada et al. 2016	8.71%** L-arginine with 10 mM citrate buffer (pH 3.5)	Negative	<i>S. mutans</i> and Polymicrobial derived from saliva	Anaerobiosis	2% Sucrose	The acidic structure of L-arginine destabilized or reduced the production of <i>S. mutans</i> insoluble glucan, inhibited the formation of <i>S. mutans</i> biofilm and destabilized human oral biofilm, reducing the biofilm mass.	The acidic solution of L-arginine described can be used as an additive that increases the effectiveness of mouthwashes used in oral hygiene.
Agnello et al. 2017	L-arginine: 1.3%** / Arg + sucrose / Arg (sucrose after 6 h) / Arg (sucrose after 20 h) / Arg (sucrose after 48 h), pH 7	Negative	Polymicrobial derived from saliva of 7 individuals	5% CO ₂	0.5% Sucrose	The addition of arginine 6 h before sucrose challenge resulted in a final pH of 8. When arginine and sucrose were added simultaneously, no pH increase was detected. Pre-treatment with arginine 20 h before sucrose challenge made the microbial community similar to that treated with arginine without sucrose.	Arginine can be effective for treating dental caries. Its absorbed and metabolized by biofilm cells and improves pH homeostasis.
Chakraborty and Burne, 2017	L-arginine: 1.5%	Negative	<i>S. mutans</i>	Aerobiosis	0.5% Glucose	Supplementing with arginine at pH 5.5 caused a delayed growth phase of <i>S. mutans</i> , slower exponential growth and lower final yields.	L-arginine affects the physiology of <i>S. mutans</i> and compromises its colonization ability.

Geraldeli et al. 2017	Adhesive system containing L-arginine: 5% / 7% / 10%	Negative	Single species and dual species (<i>S. mutans</i> + <i>S. gordonii</i>)	Aerobiosis	0.2% Glucose	Bacterial growth was minimal or absent with 7% arginine at pH 7 and, there was a slow growth at pH 5.7, with similar growing pattern for the mono and dual-species biofilms. There was a minor biofilm formation in the presence of 7% arginine. <i>S. gordonii</i> biofilms formed with 7% arginine presented a greater number of viable cells compared to control, to dual-specie <i>S. mutans</i> biofilms and to dual-specie groups treated with 7% arginine.	Adhesive system containing 7% arginine demonstrated antibacterial effects.
Huang et al. 2017	L-arginine: 0.1% / 0.2% / 0.4% / 0.8% / 1.2% / 1.6%	Negative	Biofilm single species: <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. sobrinus</i> . Polymicrobial derived from saliva	Anaerobiosis	0.2% Sucrose	Arginine at 0.8% and 1.6% reduced the biomass of polymicrobial biofilms. 1.6% arginine reduced EPS / bacteria ratios and the thickness of polymicrobial and <i>S. mutans</i> biofilms. Arginine presented inhibitory effect and reduced the biomass of <i>S. mutans</i> biofilms.	Arginine can contribute to healthy oral biofilms considering its capacity to maintain pH homeostasis.

Ledder et al. 2017	Dentifrice containing 1.5% Arg-bicarbonate, 1.450 ppm F (SMF) and 10% calcium carbonate	Positive Negative	Polymicrobial derived from saliva	Anaerobiosis and aerobiosis	5% Sucrose	The use of toothpaste with arginine was associated with significant increase in pH when compared to toothpaste without arginine. For the culture medium without sucrose and treated with arginine, there was an increase of the number of total anaerobic bacteria and a decrease of total streptococcus and lactobacilli. In the medium containing sucrose and treated with arginine, the total number of aerobic bacteria was reduced.	The exposure of dental microcosms to arginine in dentifrice formulations significantly decreased plaque acidification and cariogenic species.
Zheng et al. 2017	Arg-HCl: 0.625% / 1.25% / 2.5% / 5% / 10% (dual species biofilms), pH 7 2.5% Arg-HCl / NaF: 500 ppm F / 2.5% Arg-HCl + 500 ppm F (polymicrobial biofilms)	Negative	dual-species (<i>S. mutans</i> and <i>S. sanguinis</i>) Polymicrobial derived from saliva	Aerobiosis (dual-species) Anaerobiosis (polymicrobial)	1% Sucrose	In dual-species biofilms, treatment with 2.5% arginine inhibited <i>S. mutans</i> growth and led to an increase in the number of <i>S. sanguinis</i> . In polymicrobial biofilms, Arg alone or in combination with fluoride suppressed <i>S. mutans</i> growth and increased <i>S. sanguinis</i> growth.	The arginine treatment promoted a favorable change in the oral microbiome and represents a favorable approach for controlling dental caries.

Sirin Karaarslan et al. 2018	Dentifrices one of the following active ingredients: Fluoride, Ozone, Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, 8% Arginine, Novamin	Negative	<i>S. mutans</i>	Not informed	2% Sucrose	In comparison to the control group, arginine treatment decrease <i>S. mutans</i> counts.	Arginine-treated biofilms showed lower bacterial adherence.
Berto et al. 2019	1.5% L-arginine and dentifrices containing 1450 ppm F (SMF) + Arginine 1,5%	Negative Positive	Single- and multispecies biofilms (<i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> and <i>S. sobrinus</i>)	5% CO ₂	5% Sucrose	In the presence of 1.5% arginine, the pH values increased after 6 h of incubation on <i>S. sanguinis</i> and <i>S. gordonii</i> culture medium. CFU counts in the cultures with 1.5% arginine were always slightly less than in those without. After 2, 4 and 10 weeks of daily brushing with an arginine, the biofilm that formed on the enamel surface had a higher proportion of <i>S. sanguinis</i> and <i>S. gordonii</i> . After 4 weeks, the pH in the SMF + Arg group was higher than in the SMF group and the control group	The results suggest that regular brushing using dentifrices containing arginine, calcium carbonate and fluoride can protect against dental caries.
Bijle et al. 2019	Dentifrices containing L-arginine HCl and NaF: 2% Arg-0.147% NaF / 4% Arg-0,144% NaF / 8% Arg-0.138% NaF	Positive Negative	Single- and multispecies biofilms (<i>S. mutans</i> , <i>S. sanguis</i> and <i>S. gordonii</i>)	Anaerobiosis	1% Sucrose	Arg-NaF 2% had a disruptive effect on biofilms, inhibited <i>S. mutans</i> growth and increased <i>S. sanguinis</i> and <i>S. gordonii</i> growth. Although Arg-NaF 4% and 8% increased <i>S. sanguinis</i> and <i>S. gordonii</i> growth, their inhibitory effect on <i>S. mutans</i> was reduced.	Arg-NaF 2% promoted <i>S. sanguinis</i> and <i>S. gordonii</i> growth, maintaining a microbial ecology homeostasis.

Arg: arginine; Arg-HCl: L-arginine monohydrochloride; Cetylpyridinium chloride: CPC; NaF: sodium fluoride; SMF: sodium monofluorophosphate fluoride

*values converted from mg·ml⁻¹ to percentage (%); ** values converted from μM and mM to percentage (%)

Individual Risk of Bias and Level of Evidence

Seventeen studies (94.4%) were marked as a low risk of bias and, consequently, with high methodological quality (Table 3). Only the study carried out by Sharma et al. (2014) exhibited an average risk of bias, as a result of not describing the statistical analysis carried out and due to the presence of a contamination control. All studies included the description of a control group (item 1) and sample standardization (item 2). “no” was applied more frequently in item 4 (contamination control), followed by item 7 (specific treatment time). The articles presented level of evidence of 3, in accordance to the guidelines from Oxford University Center for Evidence-Based Medicine.

Table 3: Risk of bias assessed for each eligible study.

Author	Item 1	Item 2	Item 3	Item 4	Item 5	Item 6	Item 7	¹ Risk of bias
Huang et al. 2012	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Fu et al. 2013	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	L
Sharma et al. 2014	Y	Y	N	N	Y	Y	N	M
Jakubovics et al. 2015	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Kolderman et al. 2015	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Koopman et al. 2015	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	L
Zheng et al. 2015	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	L
He et al. 2016	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Tada et al. 2016	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Agnello et al. 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Chakraborty and Burne 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	L
Geraldeli et al. 2017	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	L
Huang et al. 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Ledder et al. 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Zheng et al. 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Sirin Karaarslan et al. 2018	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Berto et al. 2019	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L
Bijle et al. 2019	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	L

Adapted from Mask et al. 2017; Bohrer et al. 2018.

¹Risk of bias: Low – L, Medium – M, High – H.

Item 1: presence of a control group; item 2: sample standardization (teeth, glass slides, or other surfaces); item 3: description of statistical analysis (statistical test); item 4: contamination control; item 5: description of the concentration of the products tested; item 6: description of the carbohydrate source; item 7: description of specific treatment time.

Discussion

The need of new strategies for controlling dental caries is evident, as it is still considered a world health problem and, in the absence of treatment, it can lead to total tooth destruction (Petersen et al. 2005; Pinto-Sarmiento et al. 2016). Studies show that the risk of developing the disease is associated to the ability of microorganisms in the oral cavity producing acids from fermentable carbohydrates originated from diet (Takahashi and Nyvad 2011; Pitts et al. 2017). With this in mind, monitoring the production of acids and balancing the microorganisms responsible for the disease can be an alternative to control it. In this context, arginine can be a promising approach for managing dental caries, as it improves pH homeostasis and consequently alters the microbial ecology (Huang et al. 2017). Arginine or L-arginine is a semi-essential amino acid secreted by saliva in micromolar concentrations, accessible in proteins from diet and administered as a dietary supplement (Albaugh et al. 2017).

This review aimed at assessing the effects of arginine in microorganisms involved in the mechanism of dental caries, without analysing the functioning of the arginine deiminase system (ADS) in itself, such as through genes responsible for regulating this system and capable of capturing arginine through microorganisms. Although many systematic reviews about the clinical effects of arginine have been published, to date, there is no compilation about the *in vitro* effects of arginine. The knowledge about the *in vitro* mechanisms of arginine might optimize its clinical application in the future and contribute to improve its clinical evidence. Despite the variations found in the arginine salt, concentration and treatment time of the included studies, the results suggest that the treatment with arginine modifies the biofilms, reducing their biomass, thickness and roughness, and concentration of extracellular polysaccharides, besides increasing the local pH and maintaining the ecological balance of the mouth microbiota, controlling the concentration of cariogenic species and also increasing the concentration of arginolytic species.

Arginine has proven to be a promising approach for the ecological management of dental caries, and its association with other dental formulations, such as fluoride, has also been investigated. Fluoride interferes with the carious process by reducing enamel demineralization and enhancing enamel remineralization (Cury and Tenuta 2009). Fluoride also decreases *S. mutans* biofilm's biomass and thickness, and bacterial viability (Fernandez et al. 2016). When combined with

arginine, it potentializes microbial balance and improves biofilm homeostasis (Zheng et al. 2015, Bijle et al. 2019). The studies carried out by Zheng et al. (2015, 2017), Ledder et al. (2017), Bijle et al. (2019) and Berto et al. (2019) analysed the effect of the association of fluoride with arginine in different concentrations (0.625% - 8%). These studies showed that this association has a synergic effect on the maintenance of the equilibrium of healthy oral microbiota. Bijle et al. (2019) demonstrated that 2% arginine-sodium fluoride disrupted both *S. mutans* monospecies biofilms and multispecies biofilm (*S. mutans*, *S. gordonii* and *S. sanguinis*), by inhibiting *S. mutans* growth and enhancing *S. sanguinis* and *S. gordonii* growth. Similar results with 0.625% and 2.5% arginine were found for the biofilm of one (*S. mutans* or *S. sanguinis*), two (*S. mutans* and *S. sanguinis*) or three (*S. mutans*, *S. sanguinis* and *P. gingivalis*) species by Zheng et al. (2015). The arginine-sodium fluoride combination indicates a synergistic effect against *S. mutans* in suspension by decreasing *S. mutans* / *S. sanguinis* ratio toward an *S. sanguinis*-predominant consortium and by neutralization of biofilm acidification (Zheng et al. 2015). These authors speculate that, although this microbial selection mechanism is not yet clear, these findings can possibly be attributed to the contribution of fluoride in the reduction of acid production by biofilm microbiota and to the an additional contribution of arginine in the increase of biofilm pH, hampering the selection of *S. mutans* and consequently favouring the hegemony of alkali-producing species, such as *S. sanguinis*.

Regarding biofilm formation, bacterial adhesion contributes to the maturation and development process. Adhesion and colonization of bacteria can be affected by the presence and quality of the extracellular matrix, due to specific microorganism interactions, as well as bacterial vitality and biofilm surface roughness (Koo et al. 2013, Sharma et al. 2014, Kolderman et al. 2015). Studies demonstrated that arginine reduced biofilm surface roughness (Sharma et al. 2014, Kolderman et al. 2015) and adhesion forces (Sharma et al. 2014). The reduction in adhesion forces can occur due to the lower glucan production, which is one of the components of the extracellular matrix. (Bowen et al. 2018). This lower extracellular polysaccharide production during arginine treatment was confirmed by Zheng et al. (2015), He et al. (2016), Tada et al. (2016) and Huang et al. (2017) in *S. mutans* biofilms. The extracellular polysaccharide matrix improves biofilm stability, enabling cells to be organised into cohesive multicellular ecosystems, modulating growth and providing protection to pathogens, becoming a virulence factor of the biofilm (Koo et al. 2013).

Therefore, a reduction in the quantity of extracellular polysaccharides as well as changes in the type or in the composition of the extracellular polysaccharides might modify the three-dimensional biofilm structure (He et al. 2016; Koo and Yamada 2016). Changes in the architecture, thickness and biomass were found in the study carried out by Jakubovics et al. (2015), which demonstrated a more irregular biofilm with a reduction in thickness and biomass when treated with 8.71% arginine. However, when treated with arginine in a lower concentration (0.00871%), greater thickness and biovolume were verified. In addition, He et al. (2016) and Huang et al. (2017) observed a reduction of biomass in biofilms treated with arginine, while Kolderman et al. (2015) noted a change in biovolume and architecture as arginine concentration increased. This architecture destabilisation promoted by arginine (Tada et al. 2016) can allow other substances to more easily penetrate the biofilm. In the study carried out by Kolderman et al (2015), who associated 10.5% arginine with 0.01% cetylpyridinium chloride (CPC), a cationic antimicrobial that is commonly used in oral healthcare products, it was demonstrated the occurrence of greater CPC penetration in the biofilm and an almost cell death when compared with CPC applied alone.

The increase in pH seen in biofilms occurs due to the production of ammonia in response to arginine metabolism by microorganisms (Liu et al. 2012). The ammonia released acts as an acceptor of hydrogen ions, which promotes an increase in the biofilm pH and exerting a buffer effect, which helps to maintain a neutral pH (Huang et al. 2012). Therefore, arginine hydrolysis allows acidogenic microorganisms to remain in low concentrations in the biofilm, preventing the emergence of pathogenic species and promoting the maintenance of a healthier microbial community (Marsh et al. 2015; Chakraborty and Burne, 2017). Studies demonstrated that arginine alone (He et al. 2016) or associated with fluoride (Zheng et al. 2015) suppressed *S. mutans* outgrowth and promoted *S. gordonii* or *S. sanguinis* growth. Therefore, arginine supplementation modulates biofilm development, leading to a dominance of the species which cope better with an alkali environment. This mechanism promotes a more ecologically balanced environment, leads to the formation of a less virulent biofilm and highlights the potential of arginine in controlling dental caries.

Regarding the different types of biofilms used, eleven of the studies presented in this review used monospecies biofilms. These are more often recommended for

studies aimed at analysing specific experimental conditions, such as the response of a certain microorganism to some peculiar conditions in the medium or to a treatment solution, which would be difficult to measure in a multispecies biofilm (Maske et al. 2017). *S. mutans* was the microorganism which was more frequently used in monospecies biofilm models, due to its role in the development of dental caries that includes its capacity of producing acids and extracellular polysaccharides from sugars (Bowen et al. 2018). In *S. mutans* biofilm models, arginine disturbed the architecture and inhibited biofilm formation (Zheng et al. 2015), reduced glucan production (Tada et al. 2016) and inhibited *S. mutans* growth (Zheng et al. 2015, Tada et al. 2016, Chakraborty and Burne 2017). Nevertheless, these monospecies models have a drawback when compared to multispecies models, as the oral biofilm is cultivated as a result of the interaction between different microorganisms and not only as result of a specific strain (Maske et al. 2017).

On the other hand, eight studies used polymicrobial biofilms from human saliva, which have the advantage of maintaining much of the complexity and heterogeneity of the original sample when compared with monotypic culture or defined consortium (McBain 2009). In this type of biofilm, microorganisms interact and compete with each other for establishing a microbial community (Angker et al. 2011; Mei et al. 2013; Li et al. 2014; Maske et al. 2016; Signori et al. 2016). However, this model is limited by the fact that many microorganisms from the oral cavity are not cultivable (Rudney et al. 2012). In the studies with polymicrobial biofilms that used saliva as inoculum, a reduction of *S. mutans* and an increase of *S. sanguinis* was observed in the treatment with 2.5% arginine (Zheng et al. 2017), as well as a reduction of biomass in biofilms when treated with 0.8% and 1.6% arginine (Huang et al. 2017) and a reduction in bacterial viability for biofilms treated with 1.05% and 10.5%. Additionally, sparser and less thick biofilms in concentrations higher than 2.1% (Kolderman et al. 2015) and a shift towards higher pH with 1.3% (Agnello et al. 2017), 1.5% (Ledder et al. 2017) and 1.6% arginine (Huang et al. 2012) were also found.

The studies included in this review demonstrate the capacity of arginine in acting on the dental biofilm and promoting a reduction of virulence factors, such as the formation of the extracellular polysaccharide matrix and accumulation of an acid-producing and tolerant microbiota, besides helping to maintain ecological equilibrium. These results of the studies emphasize the beneficial potential of arginine in

controlling dental caries. This is a very up to date subject, since all papers elected to be included in this systematic review are from 2012 or later. The increased interest is probably associated to the fact that arginine alone, or in association with fluoride or other anti-caries substances, is able to control biofilm's virulence instead of simply eliminating it. This is of great importance since elimination of biofilms from oral cavity is virtually impossible. The studies included showed high methodological quality, low risk of bias and level of evidence 3 according to the guidelines of Oxford University Center for Evidence-Based Medicine, which provide credibility to the results.

In vitro biofilm models are able of producing carious lesions bring a better comprehension of the mechanisms involved in their initiation and progression (Maske et al. 2017). Nevertheless, the bacterial interactions and the ecological diversity that is observed in the dental biofilm, may be not be fully reproduced (Takahashi and Nyvad, 2008). The studies included in this review show some limitations, mainly related to the lack of standardization of important factors for the arginine mechanism of action. Only seven studies (39%) reported the use of a buffer solution or pH adjustment of arginine solutions (Huang et al. 2012, Koopman et al. 2015, Zheng et al. 2015, He et al. 2016, Tada et al. 2016, Agnello et al. 2017, and Zheng et al. 2017). This is an important step, since arginolytic activity is influenced by pH (Hoogenkamp and ten Cate 2014). Information about the salt used is lacking in eight studies (44%; Huang et al. 2012; Fu et al. 2013; Kolderman et al. 2015; Tada et al. 2016; Chakraborty and Burne 2017; Ledder et al. 2017; Sirin Karaarslan et al. 2018; Berto et al. 2019). Treatment time was not informed in three studies (16%; Fu et al. 2013; Sharama et al. 2014; Chakraborty and Burne 2017).

Arginine has been pointed out as a potential modulator of dental biofilm. Its capacity of increasing environmental pH and promoting the equilibrium of alkali-producing species by suppressing aciduric species emphasizes the role of arginine in biofilm homeostasis. The results summarized in this study show that arginine can maintain the balance of oral microbiota and might be a strategy for controlling dental caries under an ecological point of view. Moreover, the studies included in this systematic review point that the frequent use of topical arginine - such as dentifrices – would be the best form of arginine use. The compilation of the results obtained from the *in vitro* studies demonstrate that several challenges need to be overcome for an enhanced comprehension of the arginine behavior over microorganisms in dental

caries, such as the choice of the (i) salt, (ii) arginine concentration and (iii) duration of the treatment. Moreover, it is necessary to improve the understanding of the mechanism of action of arginine and its behavior when associated with other substances. An enhanced comprehension of the arginine behavior, given these variable responses, may help on potentializing its effect and on pointing future directions for *in situ* and clinical studies.

Acknowledgments

This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) - Finance Code 001, São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grants number 13/12326-8 and 18/18440-0] and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (grant number 304383/2016-3 and scholarship received by MLM). FAPESP, CAPES and CNPq had no involvement in study design in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Declaration of interest statement

The authors declare no conflict of interest

References

- Agnello M, Cen L, Tran NC, Shi W, McLean JS, He X. 2017. Arginine improves pH homeostasis via metabolism and microbiome modulation. *J Dent Res.* 96(8):924-930.
- Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A. 2017. Arginine metabolism and cancer. *J surg Oncol.* 115(3):273-280.
- Angker, L, Swain MV, Wong L, Sissons C. 2011. The effects of fluoride and mineralising treatments on plaque microcosm Ca, P and F, pH responses and cariogenicity. *N Z Dent J.* 107(1):12-18.
- Ástvaldsdóttir Á, Naimi-Akbar A, Davidson T, Brolund A, Lintamo L, Attergren Granath A, Tranæus S, Östlund P. 2016. Arginine and Caries Prevention: A systematic Review. *Caries Res.* 50(4):383-393.
- Berto LA, Lauener A, Carvalho TS, Lussi A, Eick S. 2019 In Vitro Effects of Arginine-Containing Toothpastes on Cariogenic Biofilms. *Oral Health Prev Dent.* 17(4):375-383.

- Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. 2019 The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. *Sci Rep.* 9(1):8405.
- Bohrer TC, Fontana PE, Lenzi TL, Soares FZM, Rocha, RO. 2018. Can Endodontic Irrigating Solutions Influence the Bond Strength of Adhesives to Coronal Dental Substrates? A Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Studies. 20(6):481-494.
- Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. 2018. Oral biofilms: Pathogens, Matrix, and polymicrobial interactions microenvironments. *Trends Microbiol.* 26(3):229-242.
- Burne RA, Marquis RE. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* 193(1):1-6.
- Chakraborty B, Burne RA. 2017. Effects of Arginine on *Streptococcus mutans* Growth, Virulence Gene Expression, and Stress Tolerance. *Appl Environ Microbiol.* 83(15).
- Cury JA, Tenuta LM. 2009. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 23(1):23-30.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan, Wade WG. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 192(19):5002-5017.
- Durieux N, Vandepuut S, Pasleau F. 2013. OCEBM levels of evidence system. *Rev Med Liege.* 68:644–649.
- Fejerskov O. 1997. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Comm Dental Oral Epidemiol.* 25(1):5-12.
- Fejerskov O, Cury JA, Tenuta LMA, Marinho V. 2015. Dental caries: the disease and its clinical management. Oxford:Wiley Blackwell. Fluorides in caries control.245-276.
- Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA. 2016. Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. *PLoS ONE.* 11(1):1-13.
- Fu D, Pei D, Huang C, Liu Y, Du X, Sun H. 2013. Effect of desensitising paste containing 8% arginine and calcium carbonate on biofilm formation of *Streptococcus mutans in vitro.* *J Dent.* 41(7):619-627.
- Geraldeli S, Soares EF, Alvarez AJ, Farivar T, Shields RC, Sinhoreti MAC, Nascimento MM. 2017. A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. *J Dent,* 63:72-80.
- He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman, Santarpia, P, Zhou X, Koo H. 2016. L-Arginine Modifies the Exopolysaccharide Matrix and Thwarts *Streptococcus*

mutans Outgrowth within Mixed-Species Oral Biofilms. J Bacteriol. 198(19):2651-2661.

Higgins J, Green S. 2011. Cochrane handbook for systematic review of interventions version 20 5.1.0 11. <http://handbook.cochrane.org>

Hoogenkamp MA, ten Cate JM. 2014. Determination of arginine catabolism by salivary pellet. Methods X. 1:1:1-5.

Huang X, Exterkate RA, ten Cate JM. 2012. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. J Dent Res. 91(12):1130-1134.

Huang X, Schulte RM, Burne RA, Nascimento MM. 2015. Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. Caries Res. 49(2):165-176.

Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, Cheng L, ten Cate JM. 2017. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. Arch Oral Biol. 82:256-262.

Jakubovics NS, Robinson JC, Samarian DS, Kolderman E, Yassin SA, Bettampadi D, Bashton M, Rickard AH. 2015. Critical roles of arginine in growth and biofilm development by *Streptococcus gordonii*. Mol Microbiol. 97(2):281-300.

Kolderman E, Bettampadi D, Samarian D, Dowd SE, Foxman B, Jakubovics NS, Rickard AH. 2015. L-arginine destabilizes oral multi-species biofilm communities developed in human saliva. PLoS One. 10(5):1-18.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. 2013. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res. 92(12):1065-1073.

Koo H, Yamada KM. 2016. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. Curr Opin Cell Biol. 42:102-112.

Koopman JE, Roling WF, Buijs MJ, Sissons CH, ten Cate JM, Keijser BJ, Crielaard W, Zaura E. 2015. Stability and Resilience of Oral Microcosms Toward Acidification and Candida Outgrowth by Arginine Supplementation. Microb Ecol. 69(2):422-433.

Ledder RG, Mistry H, Sreenivasan PK, Humphreys G, McBain AJ. 2017. Arginine Exposure Decreases Acidogenesis in Long-Term Oral Biofilm Microcosms. mSphere. 2(4):1-11.

Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Lenton P, Rudney JD, Jones RS, Aparicio C, Fok A. 2014. Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. Acta Biomater. 10(1):375-383.

- Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H. 2015. Anti-Caries Effect of Arginine-Containing Formulations in vivo: A Systematic Review and Meta-Analysis. 49(6):606-617.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JPA, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. 2009. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analysis of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. PLoS Med. 6(7).
- Liu Y, Nascimento M, Burne RA. 2012. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. Int J Oral Sci, 4(3):135-140.
- Maske TT, Brauner KV, Nakanishi L, Arthur RA, van de Sande SH, Cenci MS. 2016. An in *vitro* dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies. Biofouling. 32(3):339-348.
- Maske TT, van de Sande SH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. 2017. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. Biofouling. 33(8): 661-675.
- Marsh PD. 2015. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. BMC Oral Health. 6(1).
- McBain AJ. 2009. Chapter 4: *In vitro* Biofilm models: an overview. Adv Appl Microbiol. 69:99-132.
- Mei ML, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. 2013. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. Med Oral Patol Cir Bucal. 18(4): 557-563.
- Nascimento MM, Browngardt X, Xiaohui X, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Burne RA. 2014. The effect of arginine on oral biofilm communities. Mol Oral Microbiol. 29(1):45-54.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. 2005. The Global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull World Health Organ. 83(9):661-669.
- Pinto-Sarmiento TC, Abreu MH, Gomes MC, Costa EM, Martins CC, Granville-Garcia AF, Paiva SM. 2016. Determinant Factors of Untreated Dental Caries and Lesion Activity in Preschool Children Using ICDAS. PloS One. 11(2).
- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekastrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. 2017. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 25(3).

- Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C. 2012. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol.* 113(6):1540-1553.
- Sharma S, Lavender S, Woo J, Guo L, Shi W, Kilpatrick-Liverman L, Gimzewski JK. 2014. Nanoscale characterization of effect of L-arginine on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion by atomic force microscopy. *Microbiology.* 160(Pt 7):1466-1473.
- Signore C, van de Sande FH, Maske TT, de Oliveira EF, Cenci MS. 2016. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of *in vitro* microcosm biofilms. *Caries Res.* 50(2):97-103.
- Sirin Karaarslan E, Aytaç F, Çadirci BH, Ağaccioğlu M, Taştan E, Yılmaz G, Özkoçak BBC. 2018. Evaluation of the effects of different remineralizing agents on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology.* 32(23):2617-2630.
- Tada, A, Nakayama-Imahiji, Yamasaki H, Hasibul K, Yoneda S, Uchida K, Nariya H, Suzuki M, Miyake M, Kuwahara T. 2016. Cleansing effect of acidic L-arginine on human oral biofilm. *BMC Oral Health.* 16(40):1-9.
- Takahashi N, Nyvad B. 2008. Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 42(6):409-418.
- Takahashi N, Nyvad B. 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dental Res.* 90(3):294-303.
- Wade WG. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 69(1):137-143.
- Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu Q, Wang S, Zhou Y, Li M, Li Y, Cheng L, Li J, et al. 2015. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 94(2):344-353.
- Zheng X, He J, Wang L, Zhou S, Peng X, Huang S, Zheng L, Cheng L, Hao Y, Li J, et al. 2017. Ecological effect of arginine on oral microbiota. *Sci Rep.* 7(1):7206.

3.2 Publicação 2*

Avaliação da capacidade antibiofilme e anticárie da associação da arginina com glicerofosfato de cálcio e flúor

Marina Lins Miranda^a, Marcelle Danelon^b, Fernanda Lourenção Brighenti^a.

^aDepartamento de Morfologia e Clínica Infantil, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

^bDepartamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil / Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Fernanda Lourenção Brighenti, Departamento de Morfologia e Clínica Infantil, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara, São Paulo, Brasil. CEP: 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil. Telefone: +55 (16) 33016551. E-mail: f.brighenti@unesp.br

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade antibiofilme e anticárie da arginina (Arg; 0,8%) com glicerofosfato de cálcio (CaGP; 0,05%) e flúor (F; 110 ppm). Utilizou-se um inóculo polimicrobiano e blocos de esmalte bovino. Os grupos utilizados foram: controle negativo; F; CaGP; Arg; F+CaGP; Arg+F; Arg+CaGP; Arg+F+CaGP. Foram analisadas a acidogenicidade e composição microbiana do biofilme e a perda de dureza de superfície dos blocos de esmalte. A arginina promoveu uma elevação do pH, independente da associação. O F promoveu a maior redução de bactérias totais; Arg; Arg+CaGP e Arg+F+CaGP de bactérias acidúricas e Arg+F e Arg+F+CaGP, de estreptococos do grupo mutans. A menor perda de dureza de superfície foi observada na associação Arg+F+CaGP. Os achados do estudo indicam um sinergismo das substâncias associadas, com evidenciação no controle de mecanismos anticárie como o controle de espécies patogênicas e a diminuição da desmineralização do esmalte dentário.

Palavras-chave: Arginina. Cárie dentária. Biofilme.

* O artigo segue as normas da revista *BIOFOULING: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*.

1. Introdução

O uso da arginina para o manejo ecológico da cárie dentária tem sido bastante estudado pela sua capacidade de modular a composição microbiana e metabolismo do biofilme, além de auxiliar na inibição da desmineralização do esmalte e da dentina (Zheng et al. 2017). O seu uso é capaz de inibir a expressão de fatores de virulência do biofilme, como a modulação do crescimento, a expressão gênica e metabolismo de *Streptococcus mutans* (Chakraborty, B.; Burne 2017) e a redução da espessura e concentração de polissacarídeos extracelulares em biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos (Huang et al. 2017a; Zheng et al. 2017). A ação da arginina em biofilmes dentários ocorre em consequência do seu metabolismo pelos microrganismos orais com consequente produção de álcalis (Liu et al. 2012), o que auxilia a manutenção de uma flora menos cariogênica (Cummins 2013).

Além disso, tem sido demonstrado que, quando associada ao flúor, há uma potencialização do efeito da arginina em biofilmes dentários, com aumento mais acentuado de espécies arginolíticas e diminuição de espécies cariogênicas (Zheng et al. 2015a; Zheng et al. 2017; Bijle et al. 2018). O mecanismo de ação dessa associação não está totalmente estabelecido na literatura. Porém, acredita-se que o flúor reduz a produção de ácido pelos microrganismos, reforçando a ação da arginina (Miranda et al. 2020). Ainda, essa associação foi capaz de aumentar a absorção de flúor pelo esmalte dentário em comparação ao flúor isolado, contribuindo para uma maior proteção contra a desmineralização (Cheng et al. 2015).

Além de sinergir com o flúor, a molécula de arginina é capaz de formar complexos com íons metálicos como, por exemplo, o cálcio (Vranić et al. 1991; Cheng et al. 2015). A afinidade por íons metálicos poderia promover a reação da arginina com íons cálcio provenientes da saliva, do fluido do biofilme ou mesmo a partir do cálcio proveniente de formulações odontológicas. A capacidade de formação de complexos também pode promover a afinidade da arginina com a estrutura dentária desmineralizada, o que aumentaria sua concentração nos sítios em que sua presença é mais necessária. Entretanto, os dados a respeito dessas hipóteses são escassos ou inexistentes.

Dentifrícios disponíveis comercialmente que associam arginina ao flúor também possuem cálcio em sua formulação. Porém, esse cálcio é proveniente de uma fonte insolúvel com função de abrasivo, como o carbonato de cálcio, e não é adicionado como ingrediente ativo (Fu et al. 2013; Ledder et al. 2017; Sirin Karaarslan et al. 2018; Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM 2019). Essa fonte insolúvel pode limitar tanto a quantidade de íons cálcio disponíveis para a formação de complexos com a arginina quanto sua ação no processo de des- e remineralização do tecido dentário. Com base no exposto, é interessante estudar se uma fonte de cálcio solúvel associada ao flúor pode aumentar o efeito anticárie da arginina. A hipótese levantada aqui se baseia no fato de que a arginina age como um ligante na forma monoprotonada, mas não forma quelatos com o cálcio, conforme observado pelos baixos valores de constante de estabilidade descritos por Antonilli et al (Antonilli et al. 2009). Esses dados indicam que a ligação do cálcio à molécula de arginina é reversível e que não há sequestro do cálcio presente no meio. Portanto, a formação desses complexos não iria diminuir a biodisponibilidade do cálcio, mas poderia aumentar ainda mais o efeito anticárie de formulações odontológicas.

Dentre as fontes de cálcio solúvel utilizadas como ingredientes ativos em formulações odontológicas, destaca-se o glicerofosfato de cálcio (CaGP), um polifosfato orgânico com propriedades anticariogênicas (Bowen 1972; Lynch 2004; A. C.S.F. Zaze et al. 2014). Estudos na literatura demonstram vários mecanismos pelos quais o CaGP apresenta propriedades cariostáticas, que incluem a capacidade de: 1) aumentar a resistência do esmalte dentário pela sua ligação com radicais fosfatos da molécula de CaGP; 2) reduzir a perda mineral (Lynch & Ten Cate 2006; A. C.S.F. Zaze et al. 2014); 3) aumentar os níveis de cálcio no biofilme (Duke et al. 1979); 4) tamponar o pH (Bowen 1972; Fernandes et al. 2018) e 5) reduzir a biomassa do biofilme (Nordbö & Rölla 1972).

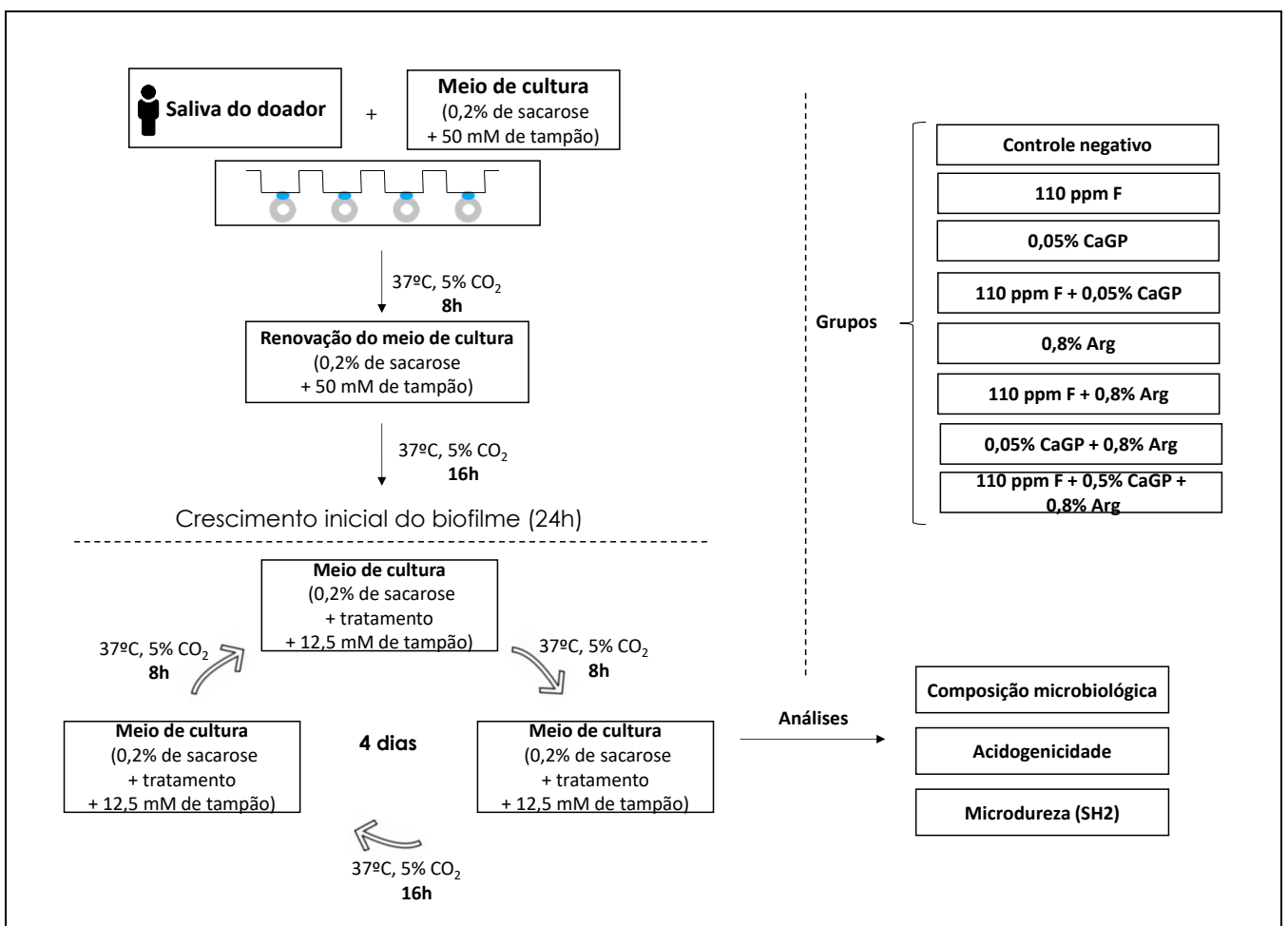
Apesar do potencial do uso da arginina na prevenção da cárie dentária, revisões sistemáticas e meta-análises recentes apontam evidências insuficientes para indicar seu uso clínico (Li et al. 2015; Ástvaldsdóttir et al. 2016; Wang et al. 2017), além de demonstrarem a necessidade de um melhor entendimento sobre seu mecanismo de ação e comportamento quando associado a outras substâncias (Miranda et al. 2020). Diante do mecanismo de ação conhecido da arginina e considerando que sua ação é reforçada pela presença de íons cálcio e flúor, a

associação desses compostos poderia provocar um efeito sinérgico benéfico na manutenção da homeostase do biofilme e na manutenção do equilíbrio mineral do esmalte dentário, representando uma abordagem promissora para o controle da cárie dentária. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade antibiofilme e anticárie da associação da arginina com glicerofostato de cálcio e flúor pela análise do pH do meio de cultura, viabilidade bacteriana e inibição na desmineralização do esmalte pela microdureza de superfície. As hipóteses nulas testadas foram que a associação da arginina com o glicerofostato de cálcio e flúor em solução aquosa não afeta a acidogenicidade do biofilme (H_0), não reduz a viabilidade bacteriana (H_0') e não tem efeito na diminuição da perda de dureza de superfície (H_0'').

2. Materiais e métodos

O delineamento experimental do estudo está ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Resumo do delineamento experimental do estudo.



Fonte: elaboração própria

2.1 Inóculo e condições de crescimento

Foi utilizado um inóculo polimicrobiano obtido a partir da saliva de um doador para mimetizar o biofilme formado *in vivo* (Sissons 1997). O uso da saliva foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos local (CAEE: 04863218.0.0000.5416; ANEXO B). A metodologia de coleta da saliva será descrita a seguir.

Para o cultivo dos biofilmes polimicrobianos, foi utilizado o meio de cultura proposto por McBain (McBain et al. 2005), que é composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L) NaCl, (0,35 g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl₂ (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina, (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0. O caldo McBain foi suplementado com 0,2% de sacarose (Huang et al. 2012), 50 mM de tampão PIPES nas primeiras 24 horas para o crescimento inicial do biofilme e 12,5 mM nos demais dias para o tratamento dos biofilmes. Os biofilmes polimicrobianos foram cultivados a 5% CO₂ e 37 °C.

2.2 Seleção do doador

2.2.1 Critérios de inclusão e não inclusão e coleta da saliva

O doador de saliva tem boa saúde geral e bucal, com idade de 26 anos e sexo feminino. Não estava gestante, não era portadora de prótese bucal ou aparelho ortodôntico, não apresentava doença periodontal (profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, presença de sangramento gengival (Wiebe, C.B.; Puttins 2000)), não era fumante, portadora de doenças sistêmicas ou fazia terapia medicamentosa com drogas que pudessem interferir com as condições de saúde bucal, como opióides, anti-histamínicos, antidepressivos, anti-epiléticos, ansiolíticos e anti-colinérgicos (Feio, M.; Sapeta 2005). O doador não utilizou antibióticos, antifúngicos ou enxaguatórios bucais nos últimos seis meses (VAN DE SANDE 2011).

A coleta foi realizada entre 9:00 e 10:00 h da manhã (Walter Luiz Siqueira et al. 2007), com o doador em jejum de no mínimo 2 h, sem escovar os dentes há 24 h e sem ter ingerido bebida alcoólica nas 24 horas anteriores. Foi coletada a saliva estimulada por meio de mastigação de uma película resistente (Parafilm®) à água por 5 min (Exterkate, R.A.; Crielaard, W.; Ten CateATE 2010).

2.3 Preparo e seleção dos blocos de dentes bovinos

O uso de dentes bovinos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (n° 36-2018; ANEXO C).

Foram utilizados incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos previamente em formol a 2% pH 7,0 durante 30 dias. Os espécimes foram submetidos à profilaxia prévia com pasta profilática e analisados através de um estereomicroscópio. Os dentes que apresentaram rachaduras, hipoplasias e manchamentos foram excluídos da amostra. Após a limpeza, os dentes tiveram as raízes separadas da coroa na junção amelocementária. Em seguida, as coroas foram fixadas em um dispositivo acoplado à plataforma de uma furadeira de bancada (modelo FGC-16, Ferrari, São Paulo, SP, Brasil), e com auxílio de uma ponta diamantada para corte de vidro (8 mm em diâmetro, Dinser Diamond Tools Ltda, Sacomã, SP, Brasil), sob constante irrigação, foram obtidos blocos de esmalte com 5,7 mm de diâmetro a partir do terço médio da face vestibular de cada dente. Em seguida, a dentina foi ajustada para obtenção de um paralelismo com o esmalte utilizando uma politriz (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e lixas de granulação 320 por 20 s (CARBIMET Paper Discs, 30-5108- 320, BUEHLER). O esmalte foi polido com auxílio de uma politriz (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e lixas de granulação 600, 800 e 1200 (20 s cada) e feltro com solução diamantada 1 µm por 2 min. A cada troca de lixa, os blocos de esmalte foram lavados em cuba ultrassônica e água deionizada por 2 minutos. Após o uso da solução diamantada, os blocos de esmalte foram lavados em cuba ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution, Buehler) diluída 1:20 em água deionizada (3 minutos), finalizando com lavagem durante 30 s com jato de água deionizada.

Os blocos foram submetidos ao teste de microdureza inicial (SH1), utilizando microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 s, acoplado ao software para análise de imagem Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA) (VIEIRA 2005). Foram realizadas cinco impressões na região central do bloco de esmalte, com espaço de 100 µm entre elas. Os blocos que apresentaram SH1 entre 320-380 KHN foram distribuídos em grupos estatisticamente homogêneos, de

acordo com a média de dureza da população total de blocos e seu intervalo de confiança ($\alpha < 0,05$).

2.4 Avaliação da capacidade antibiofilme e anticárie da associação da arginina com glicerofostato de cálcio e flúor

2.4.1 Grupos experimentais

Os seguintes grupos experimentais foram utilizados:

- a) Meio de cultura sem tratamento (controle negativo);
- b) Solução contendo 110 ppm F na forma de NaF (F) (controle positivo);
- c) Solução contendo 0,05% de Glicerofostato de cálcio (CaGP)
- d) Solução contendo 0,8% de Arginina (Arg);
- e) Solução contendo 110 ppm F na forma de NaF e 0,05% de Glicerofostato de cálcio (F + CaGP);
- f) Solução contendo 0,8% de Arginina e 110 ppm F na forma de NaF (Arg + F);
- g) Solução contendo 0,8% de Arginina e 0,05% de Glicerofostato de cálcio (Arg + CaGP);
- h) Solução contendo 0,8% de Arginina, 110 ppm F na forma de NaF e 0,05% de Glicerofostato de cálcio (Arg + F + CaGP).

A arginina (L – Arginine, Merk, CAS: 74-79-3, Alemanha), o Glicerofostato de cálcio (G6626, Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, USA) e o flúor (NaF - Merck, CAS 7681-49-4, Alemanha) tiveram suas concentrações escolhidas com base na literatura (A. C.S.F. Zaze et al. 2014; Chakraborty, B.; Burne 2017; Ledder et al. 2017; Wolff & Schenkel 2018), com concentração final equivalente à 10%, para simular a utilização prolongada de substâncias (Cabral & Fernandes 2007). O pH das soluções foi ajustado para 7,0 para otimização da atividade arginolítica (Hoogenkamp & ten Cate 2014). As soluções de tratamento foram preparadas associadas aos meios de cultura e autoclavadas.

2.4.2 Crescimento e tratamento dos biofilmes polimicrobianos

Para avaliação da capacidade antibiofilme e anticárie da associação da arginina com glicerofostato de cálcio e flúor, foi utilizado um modelo de aderência ativa (Exterkate, R.A.; Crielaard, W.; Ten Cate ATE 2010) modificado (Albuquerque et

al. 2018). A adoção desses modelos tem como objetivo mimetizar os desafios de aderência dos microrganismos à superfície dentária.

Os blocos de esmalte foram isolados com verniz ácido resistente (Colorama®), deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Em seguida, foram posicionados verticalmente (Albuquerque et al. 2018) e esterilizados em micro-ondas por 3 min a 650 W em 200 ml de água destilada (Viana et al. 2010).

Para o crescimento dos biofilmes, a saliva do doador foi coletada na manhã do experimento, conforme descrito anteriormente (item 2.2). Em seguida, os blocos de esmalte bovino foram transferidos para placas de 24 poços contendo saliva e caldo McBain suplementado com 0,2% de sacarose e 50 mM de tampão PIPES na proporção de 1:50. Após 8 h, o meio de cultura foi renovado com caldo McBain suplementado com 0,2% de sacarose e 50 mM de tampão PIPES (Huang et al. 2012).

Após o crescimento inicial do biofilme (total de 24 h), os meios foram renovados com caldo McBain suplementado com 0,2% de sacarose, 12,5 mM de tampão PIPES e suas respectivas soluções de tratamento em períodos alternados de 8 h / 16 h durante 4 dias. A cada troca do meio de cultura, a acidogenicidade do biofilme foi aferida por meio da leitura do pH no meio de cultura anterior, utilizando um eletrodo específico acoplado a um analisador de íons (pHmetro Quimis, Diadema – SP, Brasil).

Após um total de 5 dias, os blocos de esmalte bovino contendo biofilme foram lavados em NaCl 0,9% e o biofilme foi disperso em banho de ultrassom (cuba de ultrassom Cristófoli, Campo Mourão – PR, Brasil), por 10 s, em uma potência de 42 KHz. Os biofilmes foram analisados quanto a composição microbiológica.

Para avaliação da concentração microbiana, uma alíquota de biofilmes dispersos foi processada para determinação da concentração de bactérias totais em ágar Wilkins-Chalgren (McBain et al. 2005), de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSBS) (Gold, O.G.; Jordan, H.V.; Van Houte 1973) e de bactérias acidúricas em ágar BHI pH 4,7 (Azevedo et al. 2014). As placas de ágar Wilkins-Chalgren e de MSBS foram incubadas em 5% CO₂ a 37 °C por 24 h, e as placas de BHI pH 4,7 em 5% CO₂ a 37 °C por 48 h. Para identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans, foram consideradas colônias escuras, de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso. Colônias atípicas foram excluídas da contagem. O

número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de contador de colônias (Phoenix Lufesco CP 600 Plus, Araraquara – SP, Brasil). Os resultados foram expressos em $\log(1 + \text{UFC/mL})$.

2.5 Análise da perda de dureza de superfície

Após o crescimento e tratamento dos biofilmes, foi realizado um novo teste de microdureza de superfície (SH2) de acordo com a metodologia descrita no item 2.3. A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH = 100 \times (SH2 - SH1) / SH1$.

2.6 Planejamento estatístico e análise dos dados

Os dados foram analisados por meio do programa SigmaPlot versão 12.0 (SigmaPlot, Systat Software Incorporation, San Jose, CA) versão 20.0, com nível de significância de 5% para todas as análises. Para avaliação da acidogenicidade do meio, foi realizado a análise de variância a dois fatores (ANOVA two-way), tendo como variáveis independentes o tempo e o grupos. Para avaliação da viabilidade bacteriana, os dados apresentaram distribuição não-normal (Shapiro-Wilk: $p < 0,05$), sendo, portanto, realizado o teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram realizadas com a correção de Bonferroni. Para análise da perda de dureza de superfície entre os diferentes grupos experimentais, foi utilizado análise de variância a um fator (ANOVA One-way). Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram testados e confirmados (Shapiro-Wilk: $p > 0,05$, Teste de Levene: $p > 0,05$). As comparações múltiplas foram realizadas utilizando pós-teste de Tukey. O poder estatístico do teste realizado para acidogenicidade dos biofilmes, viabilidade bacteriana e perda de dureza de superfície foi de 1,0.

3. Resultados

3.1 Acidogenicidade dos biofilmes

A acidogenicidade do biofilme demonstrou uma interação estatisticamente significativa entre os fatores tratamento e tempo ($p < 0,001$). No crescimento inicial do biofilme (T: 8 h e 24 h), referente ao período sem tratamento, não foi observada diferença estatística entre os diferentes grupos ($p > 0,600$ e $p > 0,800$). Após 8 h de tratamento (T: 32 h), todos os grupos apresentaram valores de pH elevados em

relação ao controle, com exceção do CaGP. Todos os grupos tratados com flúor, independente da associação, apresentaram valores de pH semelhantes e mais elevados em relação ao controle, mas permaneceram abaixo do pH crítico (5,5) para o esmalte. O tratamento com Arg + CaGP apresentou os valores de pH mais altos nesse período (6,43) e estatisticamente diferente dos demais tratamentos.

Após 24 h de exposição ao tratamento (T: 48 h), foi observada uma elevação do pH para acima de 7,0 em todos os meios contendo arginina. O tratamento com arginina isolada e Arg + CaGP, promoveram os valores mais elevados de pH em relação aos demais grupos, com pH maior que 8,0. Os biofilmes tratados com F não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle.

No período de 56 h, todos os grupos apresentaram valores de pH elevados em relação ao controle. Porém, todos os grupos sem arginina (F, CaGP ou F+CaGP) apresentaram valores de pH abaixo de 5,5. Os grupos com arginina permaneceram com valores alcalinos.

No período de 72 h, não foi observada diferença estatística entre o F e o controle. Todos os grupos tratados com arginina (Arg; Arg + F; Arg + CaGP; Arg + F + CaGP) apresentaram valores de pH maior que 8,0, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Já no período de 80 h, os menores valores de pH foram encontrados para os grupos controle (pH 5,06) e F (pH 5,65). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos CaGP e F + CaGP. Todos os biofilmes tratados com arginina apresentaram valores de pH acima de 7,0.

No período de 104 h, não foi observada diferença estatística entre os grupos F e controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos tratados com arginina. Ao final do experimento (T: 120 h), todos os grupos experimentais contendo arginina apresentaram pH maior que 8,0 sem diferença estatística entre eles para o fator tratamento ($p > 0,500$) (Apêndice A). Não foi observada diferença estatística na acidogenicidade entre os grupos F e controle ($p = 0,571$) (tabela 1).

Tabela 1 – Resultado de anova a dois fatores para valores de pH (média \pm desvio padrão) (n=12).

Tratamentos								
Tempo	Controle	F	CaGP	F + CaGP	Arg	Arg + F	Arg + CaGP	Arg + F + CaGP
8 h	5,95 \pm 0,07 ^{A,a}	5,96 \pm 0,10 ^{A,a}	6,05 \pm 0,11 ^{A,a}	6,04 \pm 0,11 ^{A,a}	6,01 \pm 0,08 ^{A,a}	6,00 \pm 0,10 ^{A,a}	6,05 \pm 0,07 ^{A,a}	6,06 \pm 0,08 ^{A,a}
24 h	6,01 \pm 0,16 ^{A,a}	6,03 \pm 0,08 ^{A,a}	6,07 \pm 0,06 ^{A,a}	6,05 \pm 0,08 ^{A,a}	6,02 \pm 0,12 ^{A,a}	5,99 \pm 0,14 ^{A,a}	6,02 \pm 0,15 ^{A,a}	6,00 \pm 0,13 ^{A,a}
32 h	4,79 \pm 0,17 ^{A,b}	5,47 \pm 0,15 ^{B,b,d}	4,87 \pm 0,22 ^{A,b}	5,36 \pm 0,13 ^{B,b,c}	5,71 \pm 0,33 ^{C,b}	5,43 \pm 0,22 ^{B,b}	6,43 \pm 0,37 ^{D,b}	5,49 \pm 0,18 ^{B,b}
48 h	4,98 \pm 0,18 ^{A,b,c}	5,11 \pm 0,16 ^{A,C,c}	5,46 \pm 0,26 ^{B,c}	5,23 \pm 0,22 ^{C,b}	8,21 \pm 0,22 ^{D,c}	7,91 \pm 0,35 ^{E,c,f}	8,23 \pm 0,22 ^{D,c}	7,13 \pm 0,43 ^{F,c}
56 h	4,87 \pm 0,18 ^{A,b,e}	5,48 \pm 0,30 ^{B,b,d}	5,18 \pm 0,15 ^{C,d}	5,41 \pm 0,11 ^{B,b,c}	7,93 \pm 0,35 ^{D,d}	7,77 \pm 0,36 ^{D,c}	7,96 \pm 0,31 ^{D,d}	7,33 \pm 0,48 ^{E,d}
72 h	5,13 \pm 0,26 ^{A,c,d}	5,20 \pm 0,31 ^{A,c}	5,75 \pm 0,28 ^{B,e}	5,48 \pm 0,38 ^{C,c}	8,10 \pm 0,32 ^{D,c,d}	8,25 \pm 0,22 ^{D,d}	8,30 \pm 0,21 ^{D,c}	8,23 \pm 0,28 ^{D,e,g}
80 h	5,06 \pm 0,09 ^{A,c,e}	5,65 \pm 0,38 ^{B,b}	5,28 \pm 0,15 ^{C,d}	5,38 \pm 0,09 ^{C,b,c}	7,80 \pm 0,18 ^{D,d}	7,40 \pm 0,22 ^{E,e}	7,82 \pm 0,21 ^{D,E,d}	7,48 \pm 0,23 ^{F,f}
96 h	5,25 \pm 0,18 ^{A,c,d}	5,57 \pm 0,37 ^{B,b}	5,83 \pm 0,16 ^{C,e}	5,78 \pm 0,22 ^{C,d}	8,13 \pm 0,18 ^{D,c,d}	8,03 \pm 0,19 ^{D,f}	8,17 \pm 0,19 ^{D,c}	8,07 \pm 0,23 ^{D,g}
104 h	5,19 \pm 0,05 ^{A,c,d}	5,23 \pm 0,06 ^{A,c}	6,39 \pm 0,28 ^{B,f}	6,49 \pm 0,10 ^{B,e}	8,29 \pm 0,03 ^{C,c}	8,24 \pm 0,07 ^{C,d}	8,26 \pm 0,08 ^{C,c}	8,35 \pm 0,04 ^{C,e}
120 h	5,34 \pm 0,13 ^{A,d}	5,30 \pm 0,11 ^{A,c,d}	6,50 \pm 0,21 ^{B,f}	6,54 \pm 0,15 ^{B,e}	8,29 \pm 0,08 ^{C,c}	8,28 \pm 0,15 ^{C,d}	8,35 \pm 0,08 ^{C,c}	8,36 \pm 0,07 ^{C,e}

Análise de Variância a dois fatores (ANOVA two way) ($p < 0,05$). As variáveis analisadas foram pH e tratamentos em diferentes períodos de tempo. Letras maiúsculas: diferenças estatísticas entre tratamentos dentro de um mesmo período. Letras minúsculas subscritas distintas mostram diferença estatística entre os tempos em cada tratamento. F: NaF (110 ppm F), CaGP: glicerofosfato de cálcio 0,05%, Arg: arginina 0,8%. Fonte: elaboração própria.

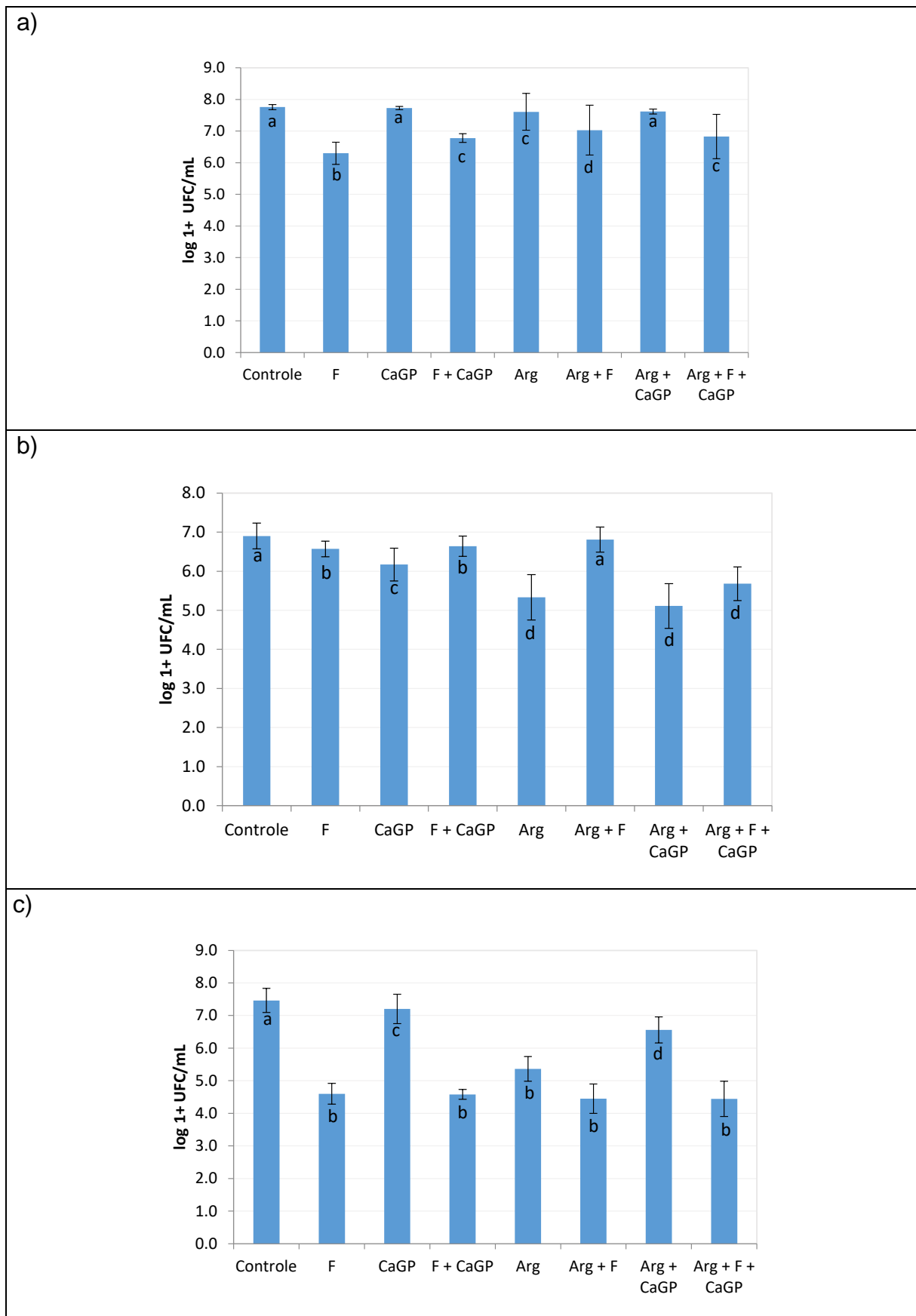
3.2 Viabilidade bacteriana

A viabilidade de bactérias totais, bactérias acidúricas e de estreptococos do grupo mutans está representada na Figura 2. Para a viabilidade de bactérias totais, não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos controle, CaGP e Arg + CaGP ($p>0,001$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos F + CaGP; Arg e Arg + F + CaGP ($p>0,001$). O grupo tratado com flúor apresentou a menor viabilidade de bactérias totais.

Para a viabilidade de bactérias acidúricas, os grupos que apresentaram maior viabilidade bacteriana foram o controle e Arg + F, sem diferença estatística entre eles ($p>0,001$). A menor viabilidade de bactérias acidúricas encontrada nos grupos Arg Arg + CaGP e Arg + F + CaGP, sem diferenças estatísticas entre eles ($p>0,001$).

Para estreptococos do grupo mutans ($p<0,001$), todos os tratamentos apresentaram menor viabilidade bacteriana em comparação ao controle. Os grupos que promoveram uma menor viabilidade de estreptococos do grupo mutans foram o F; F + CaGP; Arg; Arg + F e Arg + F + CaGP, sem diferenças estatísticas entre eles.

Figura 2: Viabilidade microbiana (Log 1+ UFC/mL; n=12) para: a) bactérias totais; b) bactérias acidúricas; c) estreptococos do grupo mutans.



As diferentes letras representam diferenças estatísticas entre tratamento dentro de um mesmo grupo microbiano. Controle: sem tratamento; F: Flúor (NaF; 110 ppm F); CaGP: Glicerofosfato de cálcio (0,05%); Arg: Arginina (0,8%). Fonte: elaboração própria.

Para bactérias totais, o grupo F apresentou a menor viabilidade bacteriana em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não foi observado diferença estatística significativa entre os tratamentos F + CaGP, Arg e Arg + F + CaGP ($p > 0,05$). Os grupos tratados com CaGP e Arg + CaGP não apresentaram diferença em relação ao meio de cultura sem tratamento ($p > 0,05$) (Figura 2).

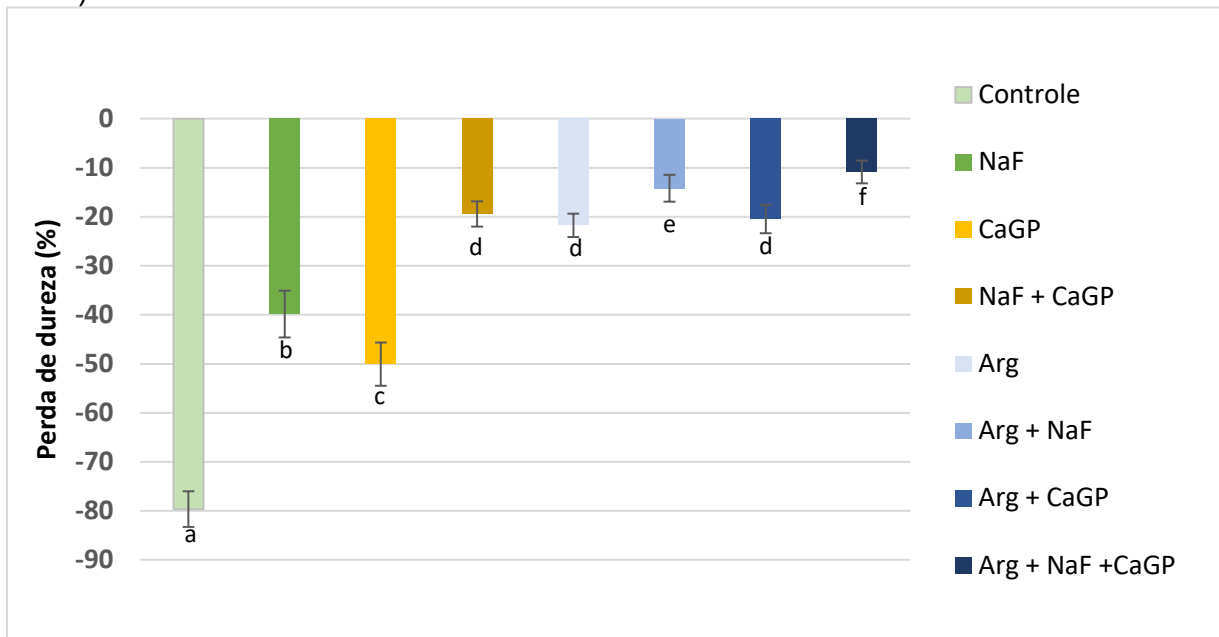
Para bactérias acidúricas, os grupos tratados com arginina e arginina + glicerofosfato de cálcio associados ou não ao flúor, apresentaram maior redução na viabilidade de bactérias acidúricas, sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Os grupos tratados com F e F + CaGP não apresentaram diferença em relação a viabilidade de bactérias acidúricas ($p > 0,05$). O grupo tratado com Arg + F não apresentou diferença em relação ao meio de cultura sem tratamento ($p > 0,05$) (Figura 2).

Para estreptococos do grupo mutans, os grupos F, F + CaGP, Arg, Arg + F e Arg + F + CaGP, promoveram a maior redução na viabilidade de estreptococos do grupo mutans, com Log redução superior a 3 Log 1 + UFC / mL, seguidos do grupo Arg + CaGP com redução de 1,51 Log 1 + UFC / mL e do grupo CaGP, com redução de 0,25 Log 1 + UFC / mL. (Apêndice B).

3.3 Porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) dos blocos de esmalte bovino

Em relação à %SH, o grupo controle apresentou %SH estatisticamente maior em relação aos outros tratamentos (79,6%) ($p < 0,001$). Seguido do controle, a maior perda de dureza de superfície foi encontrada para os grupos CaGP (50,1%); seguido do flúor (39,8%). Não houve diferenças estatisticamente significantes para os grupos NaF + CaGP, Arg, e Arg + CaGP, que apresentaram %SH variando de 19,4% a 21,7% ($p > 0,2$). A associação Arg + F apresentou uma %SH de 14,2%. A menor %SH foi observada para a associação Arg + F + CaGP, com perda de 10,9% e diferença estatística significativa entre os demais tratamentos ($p < 0,01$) (Figura 3).

Figura 3: Porcentagem de perda de dureza de superfície nos blocos de esmalte após crescimento de biofilmes polimicrobianos e exposição aos tratamentos (%SH; n=12).



Análise de Variância a um fator (ANOVA one way) ($p < 0,05$). As diferentes letras representam as diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento. Controle: sem tratamento; F: flúor (NaF; 110 ppm F); CaGP: glicerofosfato de cálcio (0,05%); Arg: arginina (0,8%). Fonte: elaboração própria.

4. Discussão

A cárie dentária é uma doença complexa, mediada por biofilme cujo desenvolvimento ocorre pela interação entre a estrutura dentária e o biofilme microbiano (Pitts et al. 2017). Apesar do flúor ser considerado o principal agente cariostático (Cury & Tenuta 2008), a cárie continua um problema de saúde pública mundial (Petersen et al. 2005). O principal mecanismo do flúor no processo cariioso é essencialmente físico-químico (Fernández et al. 2016), promovendo o aumento da remineralização e diminuição da desmineralização dentária (Cury & Tenuta 2009). Logo, é desejável o uso de substâncias que auxiliem no controle de fatores de virulência do biofilme, como um adjuvante para auxiliar no controle da cárie dentária. Esse estudo avaliou a associação da arginina ao glicerofosfato de cálcio e flúor no controle de fatores de virulência do biofilme e na capacidade em impedir a desmineralização do esmalte.

No presente estudo, o grupo tratado com flúor não apresentou diferença do grupo controle em relação a acidogenicidade do biofilme ao final do experimento,

enquanto os grupos contendo CaGP (CaGP e F + CaGP) apresentaram uma menor acidogenicidade. Esses dados apontam que a menor acidogenicidade observada no grupo F + CaGP foi promovido pelo CaGP, o que pode ser atribuído ao seu efeito tamponante (Bowen 1972). É provável que esse efeito esteja associado à sua capacidade em elevar os níveis de fosfato no biofilme (Lynch 2004), refletindo em um efeito tampão e estabilização do pH. Entretanto, valores de pH acima de 5,5 para esses grupos tratados com CaGP foram observados apenas após 96 h de experimento, correspondente a 72 h de exposição ao CaGP. Estudos anteriores relatam que o flúor possui a capacidade de inibir a queda do pH pela inibição da enzima glicolítica enolase (Kaufmann & Bartholmes 1992; Curran et al. 1994). Porém, essas elevações de pH pelo flúor aconteceram de maneira discreta, permanecendo com valores de pH abaixo de 5,5 (Mayanagi et al. 2014; Ishiguro et al. 2019), semelhante aos valores observados no presente estudo. Ainda, os baixos valores de pH encontrados no presente estudo podem ser explicados pela alta cariogenicidade do modelo utilizado (Albuquerque et al., 2018).

Por outro lado, o uso da arginina diminuiu significativamente a acidogenicidade do meio de cultura. De modo geral, todos os biofilmes tratados com arginina atingiram valores de pH acima de 7,0, independente da associação utilizada (Tabela 1). A alcalinidade foi observada a partir de 48 h de crescimento dos biofilmes (correspondente a 24 h de tratamento) e se manteve constante durante todo experimento. Essa alcalinidade observada é decorrente do metabolismo da arginina pelo sistema arginina deiminase (ADS) com consequente produção de amônia (NH₃). Estudos na literatura têm demonstrado que o metabolismo da arginina promove um aumento na atividade do sistema arginina deiminase (Nascimento et al. 2019), (Berto et al. 2019), com aumento na produção de metabólitos como ornitina, putrescina e citrulina (Agnello et al. 2017), produção de ATP (Burne & Marquis 2000) e elevação do pH de maneira dependente da produção de NH₃ (Huang et al. 2012) e desses metabólitos (Berto et al. 2019).

Esse controle da acidogenicidade promovido pela arginina refletiu na composição microbiana do biofilme. A maior redução na viabilidade de bactérias acidúricas foi observada para os grupos Arg, Arg + CaGP e Arg + F + CaGP. Possivelmente, a presença de arginina promoveu o aumento do pH e produção de ATP pelo sistema arginina deiminase e favoreceu a sobrevivência de espécies arginolíticas (que vivem bem em ambiente alcalino), com desvantagem para a

sobrevivência das espécies acidúricas (Burne & Marquis 2000; Huang et al. 2017b). A redução menos acentuada de bactérias acidúricas na presença do flúor pode ser associada ao fato de que *Lactobacillus* spp., principais constituintes desse grupo bacteriano, têm sido descritas como resistentes ao flúor, com capacidade de crescer na sua presença (Bibby & Van Kesteren; Maltz & Emilson 1982; Hamilton et al. 1985; Milnes et al. 1985). Entretanto, outros mecanismos podem estar associados a esses achados, o que devem ser avaliados no futuro.

Já em relação à viabilidade de bactérias totais dos biofilmes, a maior redução foi promovida nos grupos tratados com flúor (1,46 log UFC / mL). Esses achados podem ser explicados pela conhecida ação antimicrobiana do flúor, que inibe o transporte e metabolização de açúcares e aumenta a permeabilidade de prótons das membranas celulares (Marquis 1995; Koo 2008). Para que esses efeitos sejam observados, é necessário que o flúor penetre na célula bacteriana, o que é favorecido em pH ácido. Em pH ácido, condição semelhante ao encontrado no presente estudo, o flúor é amplamente protonado como ácido fluorídrico HF, que cruza facilmente as membranas celulares.

Por outro lado, os grupos contendo arginina apresentaram menor redução na viabilidade de bactérias totais (máximo de 0,85 log UFC/mL), o que sugere um mecanismo de ação diferente daquele encontrado no grupo F. O mecanismo de ação da arginina está voltado para a manutenção do equilíbrio ecológico do biofilme e não para promover a morte bacteriana total. A sua principal ação no biofilme oral é concentrada em promover uma remodelação na comunidade microbiana, prejudicando espécies patogênicas e favorecendo a dominância de espécies benéficas. Na presença de arginina, há o crescimento de espécies arginolíticas, como *S. sanguinis* (Zheng et al. 2015b; Zheng et al. 2017; Berto et al. 2019; Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM 2019) e *S. gordonii* (He et al. 2016; Berto et al. 2019; Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM 2019). Ainda em relação à viabilidade de bactérias totais, não foram observadas diferenças entre os grupos controle, CaGP e Arg + CaGP. Esses achados vão de encontro com a literatura, que demonstra uma ausência de atividade antimicrobiana do CaGP em biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* e *S. mutans* (Fernandes et al., 2018).

Embora a partir de mecanismos distintos, tanto os grupos contendo flúor quanto os grupos contendo arginina reduziram a viabilidade de estreptococos do grupo mutans, representado, predominantemente, por *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Especula-se que algum efeito antibacteriano do flúor é obtido pela sua capacidade de penetrar na célula bacteriana e inibir enzimas intracelulares de *S. mutans* (Cai et al. 2015; Thurnheer & Belibasakis 2018). Conforme já mencionado, para que o flúor seja capaz de penetrar na parede celular bacteriana, é necessário que esteja na sua forma protonada (HF), que está amplamente presente em pH abaixo de 5,5(Thurnheer & Belibasakis 2018). No presente estudo, o grupo F não foi capaz de elevar o pH para acima de 5,5 durante a maior parte do período experimental, o que pode justificar a ação do flúor contra estreptococos do grupo mutans. Já a arginina, aumenta o pH do ambiente prejudicando a hegemonia de *S. mutans* e outras espécies acidúricas e promove a manutenção de espécies benéficas (Zheng et al. 2015a), permitindo o equilíbrio ecológico no biofilme. Vale ressaltar que uma redução microbiana a partir de 3 log UFC / mL, alcançada pelos grupos Arg + F e Arg + F + CaGP, é um parâmetro considerado para avaliar a relevância clínica do tratamento (Pankey & Sabath 2004).

Essa redução em estreptococos do grupo mutans pode ser atribuída como um meio para o controle da cárie dentária, uma vez que *S. mutans*, membro desse grupo microbiano, está fortemente associado à cárie dentária (Bowen et al. 2018). Porém, essa espécie não é a única responsável pelo desenvolvimento da cárie dentária (Bowen et al. 2018). Outras espécies microbianas, além de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. podem colaborar para a progressão da doença, como, por exemplo, *Candida* spp.(Raja et al. 2010; Brighenti et al. 2014), *Actinomyces naeslundii* (de Oliveira et al. 2020) e espécies da família Bifidobacteriaceae (de Matos, Bruno Mello Brighenti et al. 2017). Segundo a teoria ecológica estendida da cárie, o ácido produzido no biofilme induz a adaptação e subsequente seleção de bactérias não-mutans de “baixo pH”, o que desempenha um papel crítico na desestabilização da homeostase do biofilme, facilitando uma mudança no equilíbrio da remineralização para desmineralização (estágio acidogênico). Com o ambiente ácido estabelecido, *S. mutans* e outras bactérias acidúricas podem aumentar e promover o desenvolvimento de lesões ao manter um ambiente caracterizado por desmineralização (estágio acidúrico) (Takahashi & Nyvad 2011). O único tratamento que reduziu, simultaneamente, a viabilidade de bactérias acidúricas e de estreptococos do grupo mutans foi o grupo Arg + NaF + CaGP, demonstrando que a combinação dessas substâncias pode ser utilizada com sucesso para controle do estágio acidúrico do biofilme.

Além dos aspectos microbiológicos, é importante um olhar mais amplo, como as alterações refletidas no esmalte dental, imprescindíveis para melhor compreender a ação das substâncias no processo cariioso. Diante disso, o modelo experimental realizado nesse estudo utilizou blocos de esmalte bovino para simular as alterações que acontecem durante o desafio cariogênico e avaliar como o controle dos fatores de virulência do biofilme descritos nesse estudo interfere no processo de desmineralização do esmalte. No modelo proposto, todos os grupos experimentais obtiveram uma perda de dureza de superfície significativamente menor quando comparado ao controle. O uso do flúor, substância padrão para a prevenção da cárie dentária, promoveu uma perda de dureza de superfície de 40%. Os agentes fluoretados promovem uma precipitação de uma camada semelhante ao fluoreto de cálcio (CaF_2), que atua como reservatório de F e Ca. Assim, esses íons são liberados durante desafios cariogênicos para reduzir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte (Buzalaf et al. 2011). flúor É importante ressaltar que, apesar dos blocos de esmalte bovino terem sido expostos aos tratamentos de forma contínua, a perda de dureza dos grupos controle e F foram ajustadas para se obter valores semelhantes aos descritos na literatura (Brighenti et al. 2006; Brighenti et al. 2012; Brighenti et al. 2013; Gonçalves et al. 2020).

A associação do CaGP ao flúor (F + CaGP) potencializou o efeito do F isolado, promovendo uma menor perda de dureza de superfície. Isso pode ser explicado pelo potencial do CaGP em elevar os níveis de cálcio no biofilme (Duke et al. 1979) e pela sua interação positiva com o esmalte dental para reduzir a sua solubilidade. A capacidade em elevar os níveis de cálcio é atribuída como um meio eficaz para reduzir a subsaturação e importante para atuar no equilíbrio de des e remineralização (A. C.S.F. Zaze et al. 2014; Santos et al. 2019). Além disso, foi estabelecido que o CaGP potencializa a ação anti-cárie formulações contendo flúor (A. C.S.F. Zaze et al. 2014; Ana Carolina Soares Fraga Zaze et al. 2014) e ambas as substâncias possuem efeito sinérgico, com elevação prolongada nos níveis de cálcio e atuação em conjunto na dissolução do esmalte (A. C.S.F. Zaze et al. 2014; Ana Carolina Soares Fraga Zaze et al. 2014).

Quando o flúor foi associado com a arginina (Arg + F), o efeito na desmineralização do esmalte foi ainda mais evidente, com uma perda de dureza de 14,2%. Possivelmente, essa menor perda de dureza pode ser atribuída à capacidade da arginina em diminuir a acidogenicidade dos biofilmes. Dessa maneira,

a manutenção de um pH alcalino não permitiu que períodos prolongados de desmineralização acontecesse, mesmo na presença de sacarose. Estudos anteriores demonstram a capacidade da arginina em potencializar a capacidade remineralizadora do fluoreto no esmalte dentário (Srisilapanan et al. 2013; Cheng et al. 2015; Bijle et al. 2018). Além disso, formulações contendo arginina e flúor foram capazes de potencializar a inibição da desmineralização do esmalte em relação ao flúor sozinho (Berto et al. 2019). Esse efeito pode ser explicado pela capacidade da arginina em aumentar a absorção de flúor pelo esmalte (Cheng et al. 2015).

A associação da arginina ao glicerofosfato de cálcio e flúor (Arg + F + CaGP) foi o tratamento mais eficaz em inibir a desmineralização dentária, promovendo a menor %SH entre todos os tratamentos (10,9%) (Figura 3). Apesar de relatos na literatura da potencialização do flúor pelo CaGP, não há dados anteriores sobre a potencialização dessas substâncias com o uso da arginina. Esse é o primeiro estudo que avaliou a associação da arginina com uma fonte solúvel de cálcio. Estudos anteriores têm sugerido que a associação da arginina com o carbonato de cálcio pode exercer um efeito protetor contra a cárie dentária (Kraivaphan et al. 2013; Souza JA et al. 2013; Yin et al. 2013; Ledder et al. 2017). Porém, o carbonato de cálcio não fornece cálcio solúvel e os estudos realizados não utilizaram todos os grupos necessários para demonstrar que o efeito observado é devido à associação das duas substâncias.

Os achados encontrados no presente estudo indicam um sinergismo das substâncias utilizadas e, apesar de diferentes mecanismos anticárie, seus efeitos se somaram e serviram para evidenciar suas capacidades em controlar a acidogenicidade dos biofilmes, em controlar a hegemonia de espécies patogênicas e em inibir a desmineralização do esmalte dentário. Um possível mecanismo de ação da associação Arg + F + CaGP pode ser devido à capacidade da arginina em melhorar a absorção do cálcio pela formação de complexos (Vranić et al. 1991) e também aumentar a absorção de flúor no esmalte (Cheng et al. 2015). Além disso, o CaGP é reconhecido com uma fonte de cálcio insolúvel, o que pode ter permitido uma maior disponibilidade do cálcio para atuar no processo.

Em resumo, as hipóteses nula levantadas no presente estudo que a associação da arginina com o glicerofostato de cálcio e flúor em solução aquosa não afeta a acidogenicidade do biofilme (H_0) e não reduz a viabilidade bacteriana (H_0') foram parcialmente rejeitadas enquanto que a hipótese H_0'' foi rejeitada totalmente, pois

observou-se que a associação dos três agentes ativos diminuiu a perda mineral do esmalte. Apesar de se tratar de um modelo *in vitro*, que não mimetiza totalmente o ambiente bucal e que apresenta um modelo de exposição contínua às soluções de tratamento, o modelo possui vantagens, como a utilização de um inóculo polimicrobiano proveniente da saliva, o que permite simular o comportamento de uma microbiota diversificada (Maske et al. 2017), além de empregar um modelo de aderência ativa para a formação do biofilme. Além disso, o estudo *in vitro* é essencial para a triagem de substâncias com potencial anticariogênico e para a compreensão dos mecanismos de ação associados com o potencial anticariogênico. Estudos futuros que auxiliem no melhor entendimento do mecanismo de ação da associação proposta devem ser realizados. A avaliação da desmineralização do esmalte em secção longitudinal, a avaliação de outros fatores de virulência do biofilme, além da concentração de cálcio e fosfato no fluido do biofilme podem servir como base para fortalecer as hipóteses do estudo e servir de guia para futuros estudos clínicos.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [auxílio nº 19/08375-0] e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (bolsa recebida pelo MLM). FAPESP, CAPES e CNPq não tiveram envolvimento no delineamento do estudo na coleta, análise e interpretação dos dados e na redação do relatório.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses

Referências

- Agnello M, Cen L, Tran NC, Shi W, McLean JS, He X. 2017. Arginine Improves pH Homeostasis via Metabolism and Microbiome Modulation. *J Dent Res.* 96(8):924–930.
- Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Delbem ACB, Ramirez-Rueda RY, Gontijo AVL, Brighenti FL. 2018. Mouthwash containing Croton doctoris essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. *Fut Microbiol.* 13(1):631–643.
- Antonilli M, Bottari E, Festa MR, Gentile L. 2009. Complex formation between

- arginine and calcium (II) and magnesium (II). *Chem Speciat Bioavail.* 21(1):2047–6523.
- Ástvaldsdóttir Á, Naimi-Akbar A, Davidson T, Brolund A, Lintamo L, Attergren Granath A, Tranæus S, Östlund P. 2016. Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. *Caries Res.* 50(4):383–393.
- Azevedo MS, Sande FH van de, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. 2014. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling.* 30(8):903–909.
- Berto LA, Lauener A, Carvalho TS, Lussi A, Eick S. 2019. In Vitro Effects of Arginine-Containing Toothpastes on Cariogenic Biofilms. *Oral Heal Prev Detn.* 17(373–383).
- Bibby BG, Van Kesteren M. The Effect of Fluorine on Mouth Bacteria.
- Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM YC. 2019. The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. *Sci Rep.* 9(1):8405.
- Bijle MNA, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. 2018. The combined enamel remineralization potential of arginine and fluoride toothpaste. *J Dent.* 76:75–82.
- Bowen WH. 1972. The cariostatic effect of calcium glycerophosphate in monkeys. *Caries Res.* 6(1):43–51.
- Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. 2018. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 26(3):229–242.
- Brighenti F, Delbem A, Buzalaf M, Oliveira F, Ribeiro D, KT S. 2006. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res.* 40(3):239–244.
- Brighenti F, Takeshita E, Sant’ana C, Buzalaf M, Delbem A. 2013. Effect of low fluoride acidic dentifrices on dental remineralization. *Braz Dent J.* 24(1):35–39.
- Brighenti FL, Gaetti-Jardim EJ, Danelon M, Evangelista GV, Delbem ACB. 2012. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. *Arch Oral Biol.* 54(8):1034–1040.
- Brighenti FL, Medeiros AC, Matos BM, Ribeiro ZEA, Koga-Ito CY. 2014. Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. *J Appl Oral Sci.* 22(6):484–489.
- Burne RA, Marquis RE. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* 193(1):1–6.
- Buzalaf M, Pessan J, Honorio H, ten Cate J. 2011. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 22:97–114.
- Cabral CT, Fernandes MH. 2007. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig.* 11(2):155–164.
- Cai JN, Kim MA, Jung JE, Pandit S, Song KY, Jeon JG. 2015. Effects of combined oleic acid and fluoride at sub-MIC levels on EPS formation and viability of *Streptococcus mutans* UA159 biofilms. *Biofouling.* 31(7):555–563.
- Chakraborty, B.; Burne RA. 2017. Effects of Arginine on *Streptococcus mutans* Growth, Virulence Gene Expression, and Stress Tolerance. *Appl Env Microbiol.* 83(15):1–13.
- Cheng X, Xu P, Zhou X, Deng M, Cheng L, Li M, Li Y, Xu X. 2015. Arginine promotes fluoride uptake into artificial carious lesions in vitro. *Aust Dent J.* 60(1):104–111.
- Cummins D. 2013. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent.* 41(2):1–11.
- Curran TM, Buckley DH, Marquis RE. 1994. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. *Fed Eur Microbiol Soc.* 119(3):283–288.

- Cury J, Tenuta L. 2009. Enamel remineralization : controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 23(1):23–30.
- Cury JA, Tenuta LM. 2008. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 20(1):13–16.
- Duke SA, Rees DA, Forward GC. 1979. Increased plaque calcium and phosphorus concentrations after using a calcium carbonate toothpaste containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate: Pilot study. *Caries Res.* 13(1):57–59.
- Exterkate, R.A.; Crielaard, W.; Ten Cate JM. 2010. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 44(4):372–379.
- Feio, M.; Sapeta P. 2005. Xerostomia em cuidados paliativos. *Acta Méd Port.* 18:459–466.
- Fernandes G, Delbem A, do Amaral J, Gorup L, Fernandes R, de Souza Neto F, Souza J, Monteiro D, Hunt A, Camargo E, Barbosa D. 2018. Nanosynthesis of Silver-Calcium Glycerophosphate: Promising Association against Oral Pathogens. *Antibiotics.* 7(3):52.
- Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA. 2016. Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. *PLoS One.* 11(1).
- Fu D, Pei D, Huang C, Liu Y, Du X, Sun H. 2013. Effect of desensitising paste containing 8% arginine and calcium carbonate on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in vitro. *J Dent.* 41(7):619–627.
- Gold, O.G.; Jordan, H.V.; Van Houte J. 1973. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 18(11):1357–1364.
- Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, dos Passos Silva M, Cannon ML, Danelon M. 2020. Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin Oral Investig.*:1–10.
- Hamilton IR, Boyar RM, Bowden' GH. 1985. Influence of pH and Fluoride on Properties of an Oral Strain of *Lactobacillus casei* Grown in Continuous Culture. *Infection and Immunity.* 48(3):664-670.
- He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman L, Santarpia P, Zhou X, Koo H. 2016. L-Arginine Modifies the Exopolysaccharide Matrix and Thwarts *Streptococcus mutans* Outgrowth within Mixed-Species Oral Biofilms. *J Bacteriol.* 198(19):2651–2661.
- Hoogenkamp MA, ten Cate JM. 2014. Determination of arginine catabolism by salivary pellet. *MethodsX.* 1:1–5.
- Huang X, Exterkate RAM, Ten Cate JM. 2012. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. *J Dent Res.* 91(12):1130–1134.
- Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, Cheng L, ten Cate JM. 2017a. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 82:256–262.
- Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, Cheng L, ten Cate JM. 2017b. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 82:256–262.
- Ishiguro T, Mayanagi G, Azumi M, Otani H, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N. 2019. Sodium fluoride and silver diamine fluoride-coated tooth surfaces inhibit bacterial acid production at the bacteria/tooth interface. *J Dent.* 84:30–35.
- Kaufmann M, Bartholmes P. 1992. Purification, characterization and inhibition by

- fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. *Caries Res.* 26(2):110–116.
- Koo H. 2008. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res.* 20(1):17–21.
- Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T, Mateo LR, Ellwood R, Cummins D, DeVizio W, Zhang Y-P. 2013. Two-Year Caries Clinical Study of the Efficacy of Novel Dentifrices Containing 1.5% Arginine, an Insoluble Calcium Compound and 1,450 ppm Fluoride. *Caries Res.* 47(6):582–90.
- Ledder R, Mistry H, Sreenivasan PK, Humphrey G, McBain A. 2017. Arginine Exposure Decreases Acidogenesis in Long-Term Oral Biofilm Microcosm. 2(4):1–11.
- Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H. 2015. Anti-Caries Effect of Arginine-Containing Formulations in vivo: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res.* 49(6):606–617.
- Liu YL, Nascimento M, Burne RA. 2012. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci.* 4(3):135–140.
- Lynch RJM. 2004. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. *Int Dent J.* 54(S5):310–314.
- Lynch RJM, Ten Cate JM. 2006. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res.* 40(2):142–147.
- Maltz M, Emilson CG. 1982. Susceptibility of Oral Bacteria to Various Fluoride Salts. *J Dent Res.* 61(6):786–790.
- Marquis RE. 1995. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol.* 41(11):955–964.
- Maske T. ., van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDN., Cenci MS. 2017. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling.* 33(8):661–675.
- de Matos, Bruno Mello Brighenti FL, Do T, Beighton D, Koga-Ito CY. 2017. Acidogenicity of dual-species biofilms of bifidobacteria and *Streptococcus mutans*. *Clin Oral Investig.* 21:1769–1776.
- Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. 2014. Effect of fluoride-releasing restorative materials on bacteria-induced pH fall at the bacteria-material interface: An in vitro model study. *J Dent.* 42(1):15–20.
- McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, Vizio W De, Gilbert P. 2005. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 98(3):624–634.
- Milnes AR, Bowden GH, Hamilton IR. 1985. Effect of NaF and pH on the Growth and Glycolytic Rate of Recently Isolated Strains of Oral Lactobacillus Species. *J Dent Res.* 64(3):401–404.
- Miranda ML, Silva BNS, Salomão KB, de Oliveira AB, Gabbai-Armelin P, Brighenti F. 2020. Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic review of in vitro studies. *Biofouling.* 36(6).
- Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Browngardt C, Jenkins R, Sinhoreti MC, Ribeiro APD, Dilbone DA, Richards VP, Garrett TJ, Burne RA. 2019. Metabolic Profile of Supragingival Plaque Exposed to Arginine and Fluoride. *J Dent Res.* 98(11):1245–1252.
- Nordbö H, Rölla G. 1972. Desorption of Salivary Proteins from Hydroxyapatite by Phytic Acid and Glycerophosphate and the Plaque-Inhibiting Effect of the Two Compounds In Vivo. *J Dent Res.* 51(3):800–802.
- de Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, Koga-ito CY, de Farias AL, Kirker

- KR, James GA, Brighenti FL. 2020. Streptococcus mutans and actinomyces naeslundii interaction in dual-species biofilm. *Microorganisms*. 8(2).
- Pankey G, Sabath L. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 28(6):864–870.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. 2005. The Global Burden of Oral Diseases and Risks to Oral Health Policy and Practice The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 83(9):661–669.
- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. 2017. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim*. 3(1):1–16.
- Raja M, Hannan A, Ali K. 2010. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res*. 44(3):272–276.
- VAN DE SANDE FH et al. 2011. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 27(9):1057–1063.
- Santos SS, Delbem ACB, Moraes JCS, Souza JAS, Oliveira LQC, Pedrini D. 2019. Resin-modified glass ionomer containing calcium glycerophosphate: Physico-mechanical properties and enamel demineralization. *J Appl Oral Sci*. 27.
- Sirin Karaarslan E, Aytaç F, Çadirici B, Ağaccioğlu M, Taştan E, Yılmaz G, BBC. Ö. 2018. Evaluation of the effects of different remineralizing agents on Streptococcus mutans biofilm adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology. J Adhes Sci Technol*. 32(23):2617–2630.
- Sissons CH. 1997. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*. 11(1):110–126.
- Souza MLR, Cury JA, Tenuta LMA, Zhang YP, Mateo LR, Cummins D, Ellwood RP. 2013. Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. *J Dent*. 41(2):35–41.
- Srisilapanan P, Korwanich N, Yin W, Chuensuwonkul C, Mateo LR, Zhang YP, Cummins D, Ellwood RP. 2013. Comparison of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence. *J Dent*. 41(2):29–34.
- Takahashi N, Nyvad B. 2011. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res*. 90(3):294–303.
- Thurnheer T, Belibasakis GN. 2018. Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. *Arch Oral Biol*. 89:77–83.
- Viana PS, MacHado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. 2010. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: Effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res*. 44(4):349–357.
- VIEIRA AE et al. 2005. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res*. 39(6):514–520.
- Vranić L, Granić P, Rajić Z. 1991. Basic amino acid in the pathogenesis of caries. *Acta Stomatol Croat*. 25(2):71–76.
- Walter Luiz Siqueira, Siqueira MF, Mustacchi Z, Oliveira E de, Nicolau J. 2007. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with down syndrome. *Spec Care Dent*. 27(5):202–205.
- Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L. 2017. Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. *PLoS One*. 12(8).

- Wiebe, C.B.; Puttins EE. 2000. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc.* 66(11):594–597.
- Wolff MS, Schenkel AB. 2018. The Anticaries Efficacy of a 1.5% Arginine and Fluoride Toothpaste. *Adv Dent Res.* 29(1):93–97.
- Yin W, Hu DY, Fan X, Feng Y, Zhang YP, Cummins D, Mateo LR, Pretty IA, Ellwood RP. 2013. A clinical investigation using quantitative light-induced fluorescence (QLF) of the anticaries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate. *J Clin Dent.* 24:15–22.
- Zaze A. C.S.F., Dias AP, Amaral JG, Miyasaki ML, Sasaki KT, Delbem ACB. 2014. In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. *J Dent.* 42(12):1621–1625.
- Zaze Ana Carolina Soares Fraga, Dias AP, Sasaki KT, Delbem ACB. 2014. The effects of low-fluoride toothpaste supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 18(6):1619–1624.
- Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, Li M, Li Y, Cheng L, Li J, et al. 2015a. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 94(2):344–353.
- Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, Li M, Li Y, Cheng L, Li J, et al. 2015b. Combinatorial Effects of Arginine and Fluoride on Oral Bacteria. *J Dent Res.* 94(2):344–353.
- Zheng X, He J, Wang L, Zhou S, Peng X, Huang S, Zheng L, Cheng L, Hao Y, Li J, et al. 2017. Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. *Sci Rep.* 7(1):7206.

4 CONCLUSÃO

A arginina demonstrou potencial atividade anticárie e antibiofilme quando utilizada sozinha ou em associação ao glicerofosfato de cálcio e fluoreto. O seu uso isolado é capaz de promover alterações no biofilme, refletindo em biofilmes mais irregulares, com menor biomassa, com controle do pH e redução de espécies patogênicas e consequente aumento de espécies microbianas benéficas. Ao associar a arginina ao glicerofosfato de cálcio e fluoreto, seus efeitos no biofilme se tornam ainda mais evidentes e, há uma redução na desmineralização do esmalte dentário com redução da perda de dureza de superfície.

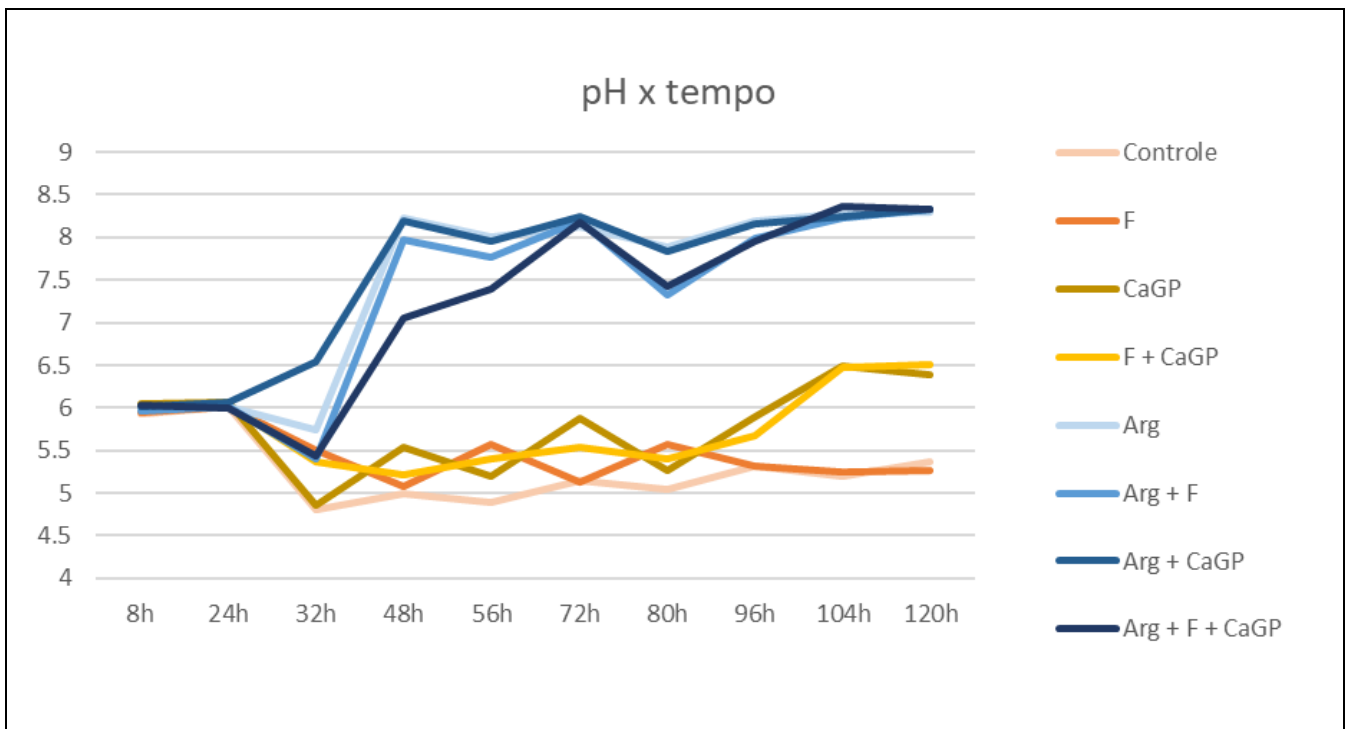
REFERÊNCIAS*

1. Brito A, Clementino M, Gomes MC, Neves E, Barbosa A, Medeiros C et al. Sociodemographic and behavioral factors associated with dental caries in preschool children: Analysis using a decision tree. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2018; 36(3): 244–49.
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94(5): 650–58.
3. AAPD. Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. *Am Acad Pediatr Dent.* 2008.
4. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(18): 12–22.
5. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294–303.
6. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(3): 441–54.
7. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Res.* 2018; 52(1–2): 153–65.
8. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004; 38: 182–91.
9. de Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, Koga-ito CY, de Farias AL, Kirker KR et al. *Streptococcus mutans* and *actinomyces naeslundii* interaction in dual-species biofilm. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 1-15.
10. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: An alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* Intern. and American Associations for Dental Research. 2002; 15: 108–25.
11. Boger RH, Bode-Boger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41: 79–99.
12. Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 193(1): 1–6

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Xu B, Yang X, Zhang P, Ma Z, Lin H, Fan H. The arginine deiminase system facilitates environmental adaptability of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* through pH adjustment. *Res Microbiol.* 2016; 167(5): 403–12.
14. Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(3): 135–40.
15. Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X et al. Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res.* 2013; 92(7): 604–08.
16. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(2): 89–95.
17. Nascimento MM, Browngardt C, Xiaohui X, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Burne RA. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29(1): 45–54.
18. Cheng X, Xu P, Zhou X, Deng M, Cheng L, Li M et al. Arginine promotes fluoride uptake into artificial carious lesions in vitro. *Aust Dent J.* 2015 ;60(1): 104–11.
19. Vranić L, Granić P, Rajić Z. Basic amino acid in the pathogenesis of caries. *Acta Stomatol Croat.* 1991; 25(2): 71–6.

APÊNDICE A – Gráfico de variação de pH



APÊNDICE B – Redução bacteriana (Log 1+ UFC / mL)

	Bactérias totais	Bactérias acidúricas	Estreptococos do grupo mutans
	Log Redução UFC/mL	Log Redução UFC/mL	Log Redução UFC/mL
Controle	–	–	–
F	1.46±0,35 ^a	0.33±0,20 ^a	2.86±0.32 ^a
CaGP	0.03±0,05 ^b	0.73±0,42 ^b	0.25±0,45 ^b
F + CaGP	0.99±0,14 ^c	0.31±0,26 ^a	2.89±0,15 ^a
Arg	0.74±0,58 ^c	1.35±0,58 ^c	2.67±0.38 ^a
Arg + NaF	0.65±0,79 ^d	0.01±0,32 ^a	3.03±0,45 ^a
Arg + CaGP	0.04±0,08 ^b	1.60±0,57 ^c	1.51±0,40 ^c
Arg + F + CaGP	0.85±0,70 ^c	1.19±0,43 ^c	3.03±0,54 ^a

Análise de variância a um fator (ANOVA one-way) ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças estatísticas entre os tratamentos para viabilidade (Log UFC / mL) e para redução (Log UFC / mL). F: NaF (110 ppm F), CaGP: glicerofosfato de cálcio 0,05%, Arg: arginina 0,8%. Fonte: elaboração própria.

ANEXO A- Políticas editoriais da revista


















Biofouling

Publication Information

Title	Biofouling [English] Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research [English]
ISSNs	Print: 0892-7014 Electronic: 1029-2454
URL	http://www.tandfonline.com/toc/gbif20/current
Publishers	Taylor and Francis [Commercial Publisher]

Publisher Policy

Open Access pathways permitted by this journal's policy are listed below by article version. Click on a pathway for a more detailed view.

Published Version	   None  CC BY  PMC 	 Any Website, Journal Website, +2	+
Accepted Version [pathway a]	 12m  PMC 	 Institutional Repository, Subject Repository, PMC, +4	+
Accepted Version [pathway b]	 None 	 Author's Homepage, Facebook, Google, LinkedIn, Twitter	+
Submitted Version	 None 	 arXiv, bioRxiv, SocArXiv, +2	+

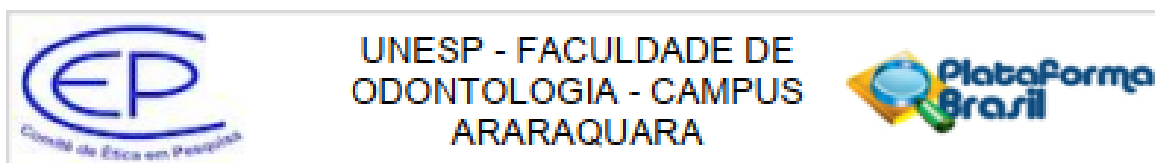
For more information, please see the following links:

- [Sharing your work](#)
- [Publishing your research open access](#)
- [Institutional repositories](#)
- [Open access options](#)

Record Information

Sherpa Romeo information is accurate to the best of our knowledge but should not be relied upon for legal advice.

[Suggest an update for this record](#)

ANEXO B – Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estratégias para o controle de biofilmes dentários

Pesquisador: Fernanda Lourenção Brighenti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04863218.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.183.780

Apresentação do Projeto:

Este estudo visa avaliar estratégias para o controle de biofilmes dentários. Para isso, serão utilizados 6 voluntários para doação de saliva, para avaliação da capacidade de formação de biofilme (concentração de micro-organismos e biomassa do biofilme).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho será avaliar a capacidade anti-biofilme e anti-cárie da associação da arginina com glicerofostato de cálcio e fluoreto.

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Descrição dos riscos inerentes ao pesquisador: O químico que apresenta maior risco à saúde é o cloreto de cálcio portanto, o uso de EPI – obrigatório para manipulação de químicos, será suficiente para controlar os riscos. Os meios de cultura (ágar BHI, Ágar Mitis Salivarius, Peptona bacteriológica, Tripton, Extrato de levedura, Hemina) não são perigosos se as seguintes de controle de exposição e proteção individual forem seguidas: manusear de acordo com as boas práticas de higiene e segurança; lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho; utilizar óculos de proteção testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas; manusear com luvas; utilizar jaleco de manga longa. Não é necessária proteção respiratória. Todos os participantes já receberam treinamento sobre boas práticas de laboratório. Para mais informações, consultar arquivo: Descrição dos riscos. Descrição dos riscos inerentes à

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 3.153.750

população: O voluntário permanecerá 24 h sem higienização bucal. Esse período não irá trazer prejuízo para a saúde bucal, pois as doenças bucais relacionadas à falta de higiene – cárie e doença periodontal – possuem um aspecto crônico, ou seja, é necessária a abstenção durante um longo período de tempo (21 dias para a cárie dentária) para que os primeiros sinais da doença sejam observados clinicamente. O voluntário poderá sentir desconforto por ficar esse período sem realizar a higienização bucal. Por isso, imediatamente após a coleta da saliva, o voluntário receberá uma profilaxia dental profissional. O voluntário irá mascar um pedaço de uma película resistente à água para estimular a salivação. Esse material é flexível, indolor, incolor, e inerte e não causa alergias. Há o risco de desconforto por excesso de mastigação. Para diminuir o risco desse desconforto, limitaremos o tempo da coleta em 2 minutos.

Benefícios:

Esta pesquisa não trará nenhum benefício imediato em relação a sua pessoa, porém contribuirá do ponto de vista clínico para avaliar a eficácia da associação da arginina com glicerofostato de cálcio e flúor, três produtos que possuem relatos de serem eficazes para a prevenção da cárie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa foi apresentada de maneira detalhada, bem descrita, incluindo critérios de inclusão, exclusão, riscos e benefícios. Os objetivos estão claros e os resultados representam uma abordagem promissora para o controle da cárie dentária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1247608.pdf	25/02/2019 17:25:59		Aceito

Endereço: HUMAITA,1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

ANEXO C – Certificado de Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-BIOFILME E ANTI-CÁRIE DA ASSOCIAÇÃO DA ARGININA COM GLICEROFOSTATO DE CÁLCIO E FLUORETO"**, registrada com o nº 36/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Fernanda Lourenção Brighenti** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 21/02/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Dezembro/2020
Espécie/linhagem	Gado Nelore
Nº de animais	105 dentes
Peso/Idade	250 kg/ 3anos
Sexo	-
Origem	Mondelli Indústria de Alimentos S/A.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
 Coordenadora da CEUA

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 22 de janeiro de 2021.

Marina Lins Miranda